



Evaluación técnica de la exposición del Tereftalato de Polietileno (PET) a la acción de cepas microbianas y/o extractos enzimáticos a nivel de laboratorio con fines de degradación

Yesenia Andrea Castaño Castro

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Minas, Departamento de Procesos y Energía
Medellín, Colombia
2024

Evaluación técnica de la exposición del Tereftalato de Polietileno (PET) a la acción de cepas microbianas y/o extractos enzimáticos a nivel de laboratorio con fines de degradación

Yesenia Andrea Castaño Castro

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ingeniería Química

Director (a):

Ph.D. Camilo Alberto Suárez Méndez

Línea de Investigación:

Bioprocesos

Grupo de Investigación:

Bioprocesos y Flujos Reactivos BIOFRUN

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Minas, Departamento de Procesos y Energía

Medellín, Colombia

2024

A mi amada familia,

En este viaje académico, cada uno de ustedes ha sido un reservorio constante de apoyo y energía positiva. Al igual que en un ciclo termodinámico, hemos experimentado fases de trabajo, absorbiendo conocimientos, superando obstáculos y disfrutando de los momentos de victoria y celebración.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Yesenia Andrea Castaño Castro

Fecha 30/01/2024

Agradecimientos

Quiero agradecer a Dios por poner en mi camino personas, experiencias y retos que me han fortalecido como persona y profesional. Gracias a mi familia, y a los amigos que se convirtieron en familia, por su apoyo incondicional, palabras de aliento y por creer en mí incluso en situaciones que ni yo misma lo hice. A mi asesor, el profesor Camilo Suárez, por su paciencia, acompañamiento, consejos, sugerencias; por incentivar mi curiosidad e invitarme rumiar mis ideas.

Agradezco a mi alma máter, la Universidad Nacional de Colombia por ser partícipe activa en mi formación. Por su apoyo a través del Beneficio de Exención de Derechos Académicos (BEDA), y contraprestación de la convocatoria de proyectos conectando conocimientos 852-2019 del Ministerio de Ciencia Colombiano. Así mismo al laboratorio de Bioprocesos y Flujos Reactivos, y al Laboratorio Interfacultades SISLAB UNAL, gracias por permitirme desarrollar mi experimentación y análisis de los resultados obtenidos a través de diferentes tecnologías.

Infinitas gracias a la Universidad de Naciones Unidas por brindarme el recurso económico para realizar mi pasantía de investigación en México. A la profesora Amelia Farres y todos los integrantes del laboratorio 312 de esta universidad por tener la paciencia y gentileza para enseñarme. A la universidad de La Sabana, en especial a los profesores Carlos Jiménez y Luis Eduardo Díaz, y a la estudiante de doctorado Sonia Ruiz, por el apoyo técnico y suministro de la cepa de *Penicillium spp* y *Streptomyces spp*.

Gracias a la profesora Nubia Moreno del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN), por proveerme amablemente la cepa de *Aspergillus nidulans*.

Resumen

El Tereftalato de polietileno (PET) es un plástico utilizado comúnmente en la industria textil y de empaques. Actualmente es uno de los residuos posconsumo más contaminantes del mundo debido a que tarda siglos en degradarse en el ambiente. Como consecuencia de lo anterior, en la presente investigación se realizó la evaluación de la degradación del PET tras la exposición de éste a la acción de cepas microbianas y/o extractos enzimáticos. Se determinaron las condiciones fisicoquímicas que favorecieron el crecimiento de *Penicillium spp*, *Aspergillus nidulans* y *Streptomyces spp*, además de la producción de proteína con actividad esterasa a partir de estas cepas, encontrándose que *Aspergillus nidulans* presentó la mayor productividad de biomasa y la mayor actividad enzimática esterasa a nivel de matraz (0.047 g/L-h y 2.14 U/mL), y biorreactor (0.18 g/L-h, 36.7 U/mL).

Tras la presencia del PET en crecimiento de *Aspergillus nidulans*, se encontró que éste posee la capacidad de metabolizar el ácido tereftálico (TPA), por lo que la estrategia de degradación del material abordada fue a través de la exposición a sus extractos enzimáticos durante 144 horas, hallándose que para el PET en láminas de 0.5 cm, la concentración de TPA en el medio fue 0.056 ppm, con una pérdida de peso del material inferior al 1%. Finalmente, se determinó que el pretratamiento de reducción del tamaño del PET a 177 μm , aumentó la concentración de TPA a 0.062 ppm, además de reflejar una pérdida de peso del material aproximadamente del 6.0%.

Con esta investigación se logró obtener enzimas hidrolíticas con capacidad de degradar el PET en monómeros básicos como el TPA, además de identificar la reducción del tamaño de este material como un pretratamiento físico que potencia su degradación.

Palabras clave: Degradación biológica, tereftalato de polietileno, cutinasa, actividad enzimática, *Penicillium spp*, *Aspergillus nidulans*, *Streptomyces spp*.

Abstract

Technical evaluation of polyethylene terephthalate (PET) exposure to microbial strains and/or enzymatic extracts at laboratory level for degradation purposes

Polyethylene terephthalate (PET) is a plastic commonly used in the textile and packaging industries. It is currently one of the most polluting post-consumer waste in the world because it takes centuries to degrade in the environment. Because of this, the present study evaluated PET degradation under exposure of the material to the action of microbial strains and/or enzymatic extracts. Physicochemical conditions enhancing the growth of *Penicillium spp*, *Aspergillus nidulans* and *Streptomyces spp* were determined, as well as the protein production showing esterase activity from these strains. It was found that *Aspergillus nidulans* showed the highest biomass productivity and the highest esterase enzymatic activity at the flask level (0.047 g/L-h and 2.14 U/mL), and bioreactor (0.22 g/L-h, 36.7 U/mL).

When PET was present in cultivations of *Aspergillus nidulans*, it was found that this microorganism has the capacity to metabolize terephthalic acid (TPA), thus, the preferred PET degradation strategy was through exposing the material to enzymatic extracts for 144 hours. It was found that for PET cut in 0.5 cm sheets, the TPA concentration in the medium was 0.056 ppm, with a material weight loss less than 1%. Finally, it was observed that reducing PET size to 177 μ m, increased the TPA concentration to 0.062 ppm, as well as yielding a material weight loss of 6.0%.

In this research, it was possible to obtain hydrolytic enzymes capable of degrading PET into its basic monomers such as TPA, in addition to observing that reducing material size, as a physical pretreatment, enhances its degradation.

Keywords: Biological degradation, polyethylene terephthalate, cutinase, enzyme activity, *Penicillium spp.*, *Aspergillus nidulans*, *Streptomyces spp.*

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras.....	XIV
Tabla de imágenes	XIX
Lista de tablas	XX
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XXI
Introducción	1
1. Marco teórico.....	5
1.1 Tereftalato de polietileno	5
1.1.1 Cristalinidad.....	7
1.1.2 Reciclaje del PET	8
1.2 Cutinasas	17
1.2.1 Descomposición del PET debido a la acción de la enzima cutinasa	20
1.2.2 Microorganismos productores de cutinasas	22
1.2.3 Género <i>Penicillium</i>	23
1.2.4 Género <i>Aspergillus</i>	24
1.2.5 Género <i>Streptomyces</i>	25
1.3 Fermentación	26
1.3.1 Fermentaciones sólidas	27
1.3.2 Fermentaciones sumergidas.....	28
1.4 Métodos de cuantificación y caracterización.....	31
1.4.1 Cuantificación de azúcares reductores	31
1.4.2 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier	32
1.4.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	33
1.4.4 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	34
1.5 Antecedentes	34
1.5.1 Degradación del PET.....	34
1.5.2 Pretratamiento del PET.....	39
1.5.3 Recuperación del PET y productos de descomposición.....	41
1.5.4 Métodos de identificación de la degradación del PET	42
1.6 Planteamiento del problema.....	42
1.6.1 Pregunta de investigación.....	42
1.6.2 Hipótesis.....	43
1.6.3 Objetivo general.....	43
1.6.4 Objetivos específicos.....	43

2. Metodología.....	45
2.1 Objetivo específico 1.....	45
2.1.1 Activación de cepas microbianas.	45
2.1.2 Diseño experimental a nivel de matraz enfocado en la producción de biomasa. 47	
2.1.3 Fermentaciones realizadas en biorreactor de 7L.....	50
2.2 Objetivo específico 2.....	51
2.2.1 Evaluación de la producción de proteína y actividad esterasa empleando diferentes fuentes de carbono.....	51
2.2.2 Cuantificación de proteína.....	52
2.2.3 Cuantificación de la actividad enzimática esterasa.....	52
2.2.4 Electroforesis de medios de extractos enzimáticos.....	53
2.2.5 Evaluación de la actividad enzimática esterasa mediante zimografía.....	53
2.2.6 Diseño experimental factorial.....	53
2.2.7 Producción de la enzima en biorreactor de 7 L.....	54
2.2.8 Concentración del extracto enzimático obtenido en biorreactor.....	54
2.3 Objetivo específico 3.....	55
2.3.1 Selección del material PET a descomponer.....	55
2.3.2 Evaluación de la degradación del PET en matraz.....	56
2.3.3 Identificación de los productos de degradación.....	56
2.3.4 Evaluación de la degradación del PET en el tiempo en tubos de ensayo empleando extracto enzimático.....	56
2.3.5 Evaluación de la degradación del PET en biorreactor.....	57
2.3.6 Pretratamientos del PET para promover la degradación.....	57
2.3.7 Evaluación de cambios morfológicos del PET tras su exposición a extractos enzimáticos.....	58
3. Resultados y discusión.....	59
3.1 Tiempos de fermentación de las cepas microbianas.....	59
3.1.1 <i>Penicillium spp.</i>	59
3.1.2 <i>Streptomyces spp.</i>	61
3.1.3 <i>Aspergillus nidulans</i>	62
3.2 Reducción del tamaño de formación de aglomerados del hongo <i>Penicillium spp.</i> 65	
3.2.1 Biomasa producida.....	66
3.2.2 Diámetro de aglomerados de biomasa.....	68
3.2.3 Rendimiento biomasa – glucosa.....	71
3.3 Condiciones de fermentación para producción de biomasa a nivel de matraz ..	73
3.3.1 <i>Penicillium spp.</i>	74
3.3.2 <i>Streptomyces spp.</i>	78
3.4 Producción de biomasa en biorreactor de 7 litros.....	82
3.4.1 <i>Penicillium spp.</i>	83
3.4.2 <i>Streptomyces spp.</i>	88
3.4.3 <i>Aspergillus nidulans</i>	90
3.5 Efecto de la fuente de carbono en la producción de proteína y actividad esterasa 93	
3.5.1 Selección del microorganismo.....	93
3.5.2 Selección del inductor y/o fuente de carbono para <i>A. nidulans</i>	98
3.5.3 Actividad esterasa en gel de proteína obtenida a partir de <i>A. nidulans</i>	100

3.6	Efecto de la concentración del inductor y/o fuente de carbono sobre la producción de proteína y actividad enzimática.	102
3.7	Producción de proteína en biorreactor de 7 L.....	104
3.8	Selección del material PET a emplear en la evaluación de la degradación.	107
3.9	Identificación de productos de degradación.....	109
3.10	Desarrollo del método de cuantificación de Ácido Tereftálico	112
3.11	Elección del método de evaluación de la degradación del PET (exposición al microorganismo y/o extracto enzimático)	115
3.12	Evaluación de la degradación del PET en el tiempo	120
3.12.1	Degradación en tubos de ensayo	120
3.12.2	Degradación en biorreactor	123
3.13	Efecto del pretratamiento del PET en su degradación	125
3.13.1	Empleo de extracto enzimático y buffer tris HCl como medio de reacción. ..	125
3.13.2	Empleo de extracto enzimático como único medio de reacción.	127
3.14	Evaluación de cambios morfológicos del PET posterior al empleo de extracto enzimático.	129
3.14.1	Análisis de cambios en la morfología empleando la técnica ATR-FTIR	129
3.14.2	Análisis de cambios en la morfología empleando la técnica DSC.	133
4.	Conclusiones y recomendaciones.....	135
4.1	Conclusiones.....	135
4.1.1	Objetivo específico 1 y 2.....	135
4.1.2	Objetivo específico 3	136
4.2	Recomendaciones.....	138
A.	Anexo: Curvas de fermentación de los microorganismos en biorreactor	140
B.	Anexo: Regresión lineal de la actividad enzimática del extracto crudo.....	145
C.	Anexo: Tiempo de retención del TPA, MHET y BHET.....	147
D.	Anexo: Cuantificación de TPA en el tiempo.....	149
E.	Anexo: Producción de TPA al exponer PET pretratado al extracto + buffer	153
F.	Anexo: Producción de TPA al exponer PET pretratado al extracto.....	155
G.	Anexo: Análisis DSC de PET expuesto a extracto enzimático.....	157
	Bibliografía	159

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1 Reacción para producir PET. Tomado de [13].....	6
Figura 1-2 Estructura amorfa y cristalina de un polímero [17]	7
Figura 1-3 Diagrama de regiones del PET. [17]	8
Figura 1-4 Degradación del Tereftalato de Polietileno mediante glicólisis química [21]. 10	
Figura 1-5 Degradación del PET mediante metanólisis [21].....	11
Figura 1-6 Degradación del PET mediante hidrólisis ácida [23].	11
Figura 1-7 Degradación biológica del PET mediante hidrólisis alcalina [23]	12
Figura 1-8 Hidrólisis neutra del PET. [19]	12
Figura 1-9 Biopolímero cutina [30]	17
Figura 1-10 Estructura de la enzima cutinasa [32].....	19
Figura 1-11 Mecanismo catalítico de las serin-hidrolasas [35].....	21
Figura 1-12 . Características morfológicas del género <i>Penicillium</i> . (A) monoverticilada, (B) biverticilada, (C) terverticilada, (D) cuatirverticilada. Tomada de [42]	24
Figura 1-13 . Estructura del hongo <i>Aspergillus nidulans</i> . Tomada de [44]	25
Figura 1-14 Estructura de <i>Streptomyces sp.</i> Tomada de [50].....	26
Figura 1-15 Formación de pellets de biomasa en microorganismos filamentosos. Tomada de [56].....	29
Figura 3-1 Diagrama de Pareto para la producción de biomasa – Experimento de reducción de pellets de <i>Penicillium spp.</i>	67
Figura 3-2 Gráfica de efectos principales para biomasa – Experimento de reducción de pellets de <i>Penicillium spp.</i>	68
Figura 3-3 Diagrama de Pareto para el diámetro de pellets de biomasa – Experimento de reducción de pellets de <i>Penicillium spp.</i>	69
Figura 3-4 Gráfica de efectos principales del diámetro de pellets de biomasa – Experimento de reducción de pellets de <i>Penicillium spp.</i>	70
Figura 3-5 Diagrama de Pareto para el rendimiento – Experimento de reducción de pellets de <i>Penicillium spp.</i>	72
Figura 3-6 . Gráfica de efectos principales para el rendimiento – Experimento de reducción de pellets de <i>Penicillium spp.</i>	72
Figura 3-7 Diagrama de Pareto del crecimiento del hongo <i>Penicillium spp.</i>	74
Figura 3-8 Gráfica de efectos principales del crecimiento del hongo <i>Penicillium spp.</i> ..	75
Figura 3-9 Diagrama de Pareto para la biomasa (<i>Penicillium spp.</i>) – Diseño Box- Behnken	76

Figura 3-10	Gráfico de efectos principales para la biomasa (<i>Penicillium spp</i>) – Diseño Box-Behnken	77
Figura 3-11	Superficie de respuesta para la biomasa (<i>Penicillium spp</i>) – Diseño Box-Behnken	78
Figura 3-12.	Diagrama de Pareto del crecimiento de la bacteria <i>Streptomyces spp.</i>	79
Figura 3-13.	Gráfico de efectos principales del crecimiento de la bacteria <i>Streptomyces spp.</i>	79
Figura 3-14	Diagrama de Pareto para la biomasa (<i>Streptomyces spp</i>) – Diseño Box-Behnken	80
Figura 3-15	Gráfico de efectos principales para la biomasa (<i>Streptomyces spp</i>) – Diseño Box-Behnken	81
Figura 3-16	Superficie de respuesta para la producción de biomasa (<i>Streptomyces spp</i>) – Diseño Box-Behnken	82
Figura 3-17	Curvas de %pO ₂ (azul), mL NaOH (rojo) en fermentación por lotes de <i>Penicillium spp.</i>	83
Figura 3-18	(A) Curvas de %pO ₂ - mL NaOH. (B) Curvas de %pO ₂ -pH en fermentación por lotes de <i>Penicillium spp</i> – reducción aglomerados biomasa	85
Figura 3-19	Curvas de %pO ₂ y NaOH adicionado en fermentación por lotes de <i>Streptomyces spp.</i>	90
Figura 3-20	Curvas de %pO ₂ y base adicionada en fermentación 1 (líneas discontinuas) y fermentación 2 (líneas sólidas) de <i>Aspergillus nidulans</i>	91
Figura 3-21	Evaluación del empleo de diferentes fuentes de carbono en el crecimiento de <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Penicillium spp.</i> y <i>Streptomyces spp.</i> (A) control A. linaza, (B) control salino, (C) fermentación A.linaza + PET, (D) fermentación glucosa, (E) fermentación glucosa + A. linaza, (F) fermentación glucosa + A. linaza + PET, (G) fermentación glucosa + PET, (H) fermentación PET, fermentación A. linaza	94
Figura 3-22	Evaluación del empleo de diferentes fuentes de carbono en la producción de proteína a partir de <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Penicillium spp</i> y <i>Streptomyces spp.</i> (A) control A. linaza, (B) control salino, (C) fermentación A.linaza + PET, (D) fermentación glucosa, (E) fermentación glucosa + A. linaza, (F) fermentación glucosa + A. linaza + PET, (G) fermentación glucosa + PET, (H) fermentación PET, fermentación A. linaza	96
Figura 3-23	Evaluación del empleo de diferentes fuentes de carbono en la actividad esterasa en <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Penicillium spp.</i> y <i>Streptomyces spp.</i> (A) control A. linaza, (B) control salino, (C) fermentación A.linaza + PET, (D) fermentación glucosa, (E) fermentación glucosa + A. linaza, (F) fermentación glucosa + A. linaza + PET, (G) fermentación glucosa + PET, (H) fermentación PET, fermentación A. linaza	97
Figura 3-24.	Evaluación del empleo de diferentes fuentes de carbono en la producción de proteína y actividad esterasa en <i>Aspergillus nidulans</i> . (A) control A. linaza, (B) control salino, (C) fermentación A.linaza + PET, (D) fermentación glucosa, (E) fermentación glucosa + A. linaza, (F) fermentación glucosa + A. linaza + PET, (G) fermentación glucosa + PET, (H) fermentación PET, fermentación A. linaza	99
Figura 3-25	Evaluación del empleo de diferentes fuentes de carbono en la producción de biomasa y proteína a partir de <i>Aspergillus nidulans</i> . (A) control A. linaza, (B) control salino, (C) fermentación A.linaza + PET, (D) fermentación glucosa, (E) fermentación	

glucosa + A. linaza, (F) fermentación glucosa + A. linaza + PET, (G) fermentación glucosa + PET, (H) fermentación PET, fermentación A. linaza.....	99
Figura 3-26 Diagrama de Pareto del efecto de la concentración de fuente de carbono e inductor en la producción de proteína a partir de <i>A. nidulans</i>	102
Figura 3-27 Gráfico de efectos principales en la producción de proteína a partir de <i>A. nidulans</i>	103
Figura 3-28 A) Producción de proteína. B) Actividad enzimática esterasa en extracto crudo a partir de <i>A. nidulans</i> ante variación de la concentración de glucosa y aceite de linaza en el medio de cultivo.	103
Figura 3-29 A) Crecimiento de <i>A. nidulans</i> . B) Producción de proteína, ante variación de la concentración de glucosa y aceite de linaza en el medio de cultivo.....	104
Figura 3-30 Desempeño de la fermentación de <i>Aspergillus nidulans</i> con propósito de producción de proteína con actividad esterasa	105
Figura 3-31 Calorimetría Diferencial de Barrido de las botellas de agua Brisa	108
Figura 3-32 Calorimetría Diferencial de Barrido de las botellas de agua Cristal	108
Figura 3-33 Calorimetría Diferencial de Barrido de las botellas de agua Manantial .	109
Figura 3-34 Control de inocuidad del medio de cultivo (ausencia de <i>Penicillium spp</i>), empleando PET como única fuente de carbono disponible	111
Figura 3-35 Fermentación de <i>Penicillium spp</i> empleando PET como única fuente de carbono disponible.....	111
Figura 3-36 Comparación de las moléculas de TPA, MHET y BHET. Basado en [128]	112
Figura 3-37 Construcción de la curva de calibración con patrón de 0.1 ppm y 1 ppm.	114
Figura 3-38 Cromatograma del medio de cultivo de <i>Penicillium spp</i> posterior a la fermentación empleando glucosa y PET como fuente de carbono.....	114
Figura 3-39 Medio de cultivo compuesto por sales minerales y PET, sin inoculación de <i>Penicillium spp</i>	115
Figura 3-40 Fermentación de <i>Penicillium spp</i> en presencia de PET para su degradación	116
Figura 3-41 Comparación entre la molécula de TPA y ácido fenilacético. Basado en [128],[134]	117
Figura 3-42 Medio de cultivo compuesto por sales minerales y TPA, sin inoculación de <i>Penicillium spp</i>	118
Figura 3-43 Crecimiento de <i>Penicillium spp</i> empleando TPA como única fuente de carbono	118
Figura 3-44 (Superior) Medio de cultivo compuesto por sales minerales y TPA, sin inoculación de <i>A. nidulans</i> . (Inferior). Crecimiento de <i>A. nidulans</i> empleando TPA como única fuente de carbono.....	119
Figura 3-45 Blanco del buffer Tris HCl 0.1 M pH 9	120
Figura 3-46 Blanco del buffer Tris HCl 0.1 M pH 9 y extracto enzimático	121
Figura 3-47 Medio de degradación del PET a las 144 horas de exposición del PET	124

Figura 3-48	Espectro del PET calentado a la temperatura de transición vítrea sin exposición a extracto enzimático (rojo) y con exposición a extracto enzimático (negro).	130
Figura 3-49	Espectro del PET reducido al tamaño de 177 μm sin exposición a extracto enzimático (negro) y con exposición a extracto enzimático (rojo).....	132
Figura A-1	Curvas de %pO ₂ (azul oscuro), mL NaOH (verde), pH (verde aguamarina) en fermentación por lotes de <i>Penicillium spp</i>	140
Figura A-2	Curvas de %pO ₂ (azul oscuro), mL NaOH (verde), pH (verde aguamarina) en fermentación por lotes de <i>Penicillium spp</i> – reducción aglomerados biomasa.....	141
Figura A-3	Curvas de %pO ₂ (azul oscuro), mL NaOH (verde), pH (verde aguamarina) en fermentación por lotes de <i>Penicillium spp</i> – Validación reducción aglomerados biomasa	142
Figura A-4	Curvas de %pO ₂ (azul oscuro), mL NaOH (verde), pH (verde aguamarina) en fermentación por lotes de <i>Streptomyces spp</i>	143
Figura A-5	Desempeño de la fermentación de <i>Aspergillus nidulans</i> con propósito de producción de proteína con actividad esterasa.....	144
Figura B-1	Regresión lineal del extracto concentrado (1:5) en membrana con tamaño de corte de 30 kDa	145
Figura C-1	Curva patrón de BHET (10mg/L)	147
Figura C-2	Curva patrón de MHET (10mg/L).....	147
Figura C-3	Curva patrón de TPA (10mg/L)	148
Figura D-1	Curva patrón de TPA (2.5 mg/L) a partir del método de cuantificación desarrollado en la Universidad Nacional de Colombia - Medellín	149
Figura D-2	Cuantificación de TPA a la hora 24 de exposición PET	150
Figura D-3	Cuantificación de TPA a la hora 48 de exposición del PET.....	150
Figura D-4	Cuantificación de TPA a la hora 96 de exposición del PET.....	151
Figura D-5	Cuantificación de TPA a la hora 144 de exposición del PET.....	151
Figura E-1	Cuantificación de TPA en pretratamiento de reducción de tamaño (177 μm). Medio de reacción compuesto por buffer y extracto.	153
Figura E-2	Cuantificación de TPA en pretratamiento de temperatura de transición vítrea (76°C). Medio de reacción compuesto por buffer y extracto.	154
Figura E-3	Cuantificación de TPA en pretratamiento de temperatura funcionalización de la superficie de PET. Medio de reacción compuesto por buffer y extracto	154
Figura F-1	Cuantificación de TPA en pretratamiento de temperatura de transición vítrea (76°C). Medio de reacción compuesto por extracto.	155
Figura F-2	Cuantificación de TPA en pretratamiento de reducción de tamaño (177 μm). Medio de reacción compuesto por extracto.	156
Figura F-3	Cuantificación de TPA en pretratamiento de temperatura funcionalización de la superficie de PET. Medio de reacción compuesto por extracto.....	156
Figura G-1	Análisis DSC en película de PET calentada a 76°C sin exposición a extracto enzimático.	157
Figura G-2	Análisis DSC en película de PET calentada a 76°C con exposición a extracto enzimático.	157

Figura G-3	Análisis DSC en PET de tamaño 177 μm sin exposición a extracto enzimático.	158
Figura G-4	Análisis DSC en PET de tamaño 177 μm con exposición a extracto enzimático.	158

Tabla de imágenes

Imagen 3-1. Fermentaciones líquidas <i>Penicillium spp</i> y cuantificación de glucosa	61
Imagen 3-2. Fermentaciones líquidas <i>Streptomyces spp</i> y cuantificación de glucosa	62
Imagen 3-3. Fermentaciones líquidas <i>Aspergillus nidulans</i> y cuantificación de glucosa .	64
Imagen 3-4. Fermentación líquida en matraz del hongo <i>Penicillium spp</i>	65
Imagen 3-5. Resultado de los tratamientos para la reducción de tamaño de Pellet de <i>Penicillium spp</i>	68
Imagen 3-6. Tinción del medio de fermentación de <i>Penicillium spp</i>	84
Imagen 3-7.(A y B) Formación de aglomerados de <i>Penicillium spp</i> en biorreactor a pH 7.5.(C). Reducción del tamaño de pellets de <i>Penicillium spp</i> tras el aumento de pH.....	87
Imagen 3-8. Crecimiento de <i>Penicillium spp</i> en biorreactor al final de la fermentación. Agitación detenida con el propósito de observar sedimentación de los pellets.	88
Imagen 3-9. Validación de inocuidad del medio de fermentación <i>Streptomyces spp</i>	88
Imagen 3-10. Validación de inocuidad del medio de fermentación <i>Aspergillus nidulans</i> . 91	
Imagen 3-11. Gel SDS-PAGE. Canal 1: marcador peso molecular. Canal 2 y 6: control sales minerales. Canal 3 y 7: control aceite. Canal 4 y 9: glucosa + PET + aceite. Canal 5 y 10: aceite + PET	100
Imagen 3-12. Gel SDS-PAGE. Canal 1: marcador peso molecular. Canal 2 y 7: glucosa + PET. Canal 3 y 9: glucosa + aceite. Canal 4 y 8: glucosa. Canal 5 y 10: PET	101

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1 Propiedades del PET. [13]	5
Tabla 1-2 Microorganismos con capacidad para degradar PET. Tomada de [24]	15
Tabla 1-3 Enzimas hidrolíticas de PET. Tomado de [26].....	16
Tabla 1-4 Microorganismos productores de cutinasas. Tomado de [29].....	22
Tabla 1-5 Estrategias para cambiar morfología de estructuras coagulativas y no coagulativas de microorganismos filamentosos. Tomada de [56].....	30
Tabla 1-6 Degradación de diferentes poliésteres sintéticos empleando cutinasas obtenidas a partir de <i>A. nidulans</i> . Tomado de [75] [77].	38
Tabla 1-7 Pretratamiento del PET para potenciar su degradación	40
Tabla 2-1 Medio de cultivo mínimo para <i>A. nidulans</i>	46
Tabla 2-2 Composición medio de cultivo para <i>Penicillium spp.</i>	47
Tabla 2-3 Factores y niveles del diseño experimental para <i>Penicillium spp.</i>	48
Tabla 2-4 Composición del medio de cultivo para crecimiento de <i>Streptomyces spp.</i>	49
Tabla 2-5 Factores y niveles del diseño experimental para <i>Streptomyces spp.</i>	49
Tabla 2-6 Combinación de fuentes de carbono empleadas	52
Tabla 2-7 Factores y niveles diseño experimental para evaluación de producción de proteína cutinasa	54
Tabla 3-1 Resultados de fermentaciones líquidas de <i>Penicillium spp</i> a diferentes tiempos de fermentación.....	59
Tabla 3-2 Resultados de fermentaciones líquidas de <i>Streptomyces spp.</i> a diferentes tiempos de reacción.....	62
Tabla 3-3 Resultados de fermentaciones líquidas de <i>Aspergillus nidulans</i> empleando diferentes tiempos de reacción	63
Tabla 3-4 Factores y variables del diseño experimental para reducción de tamaños de pellets de biomasa	66
Tabla 3-5 Cuantificación del ácido tereftálico presente en medios de degradación de PET en el tiempo	122
Tabla 3-6 Cuantificación del ácido tereftálico presente en medios de degradación de PET (extracto enzimático + buffer) ante diferentes pretratamientos del polímero, en un tiempo de 144 h.	125
Tabla 3-7 Cuantificación del ácido tereftálico presente en medios de degradación de PET (extracto enzimático) ante diferentes pretratamientos del polímero, en un tiempo de 144 h.	127
Tabla 3-8 Cristalinidad del PET en cada tratamiento.	133

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolo	Término	Unidad SI
Y_{sx}	Rendimiento biomasa - sustrato	$\frac{g \text{ biomasa}}{g \text{ glucosa}}$
H_m	Calor de fusión	$\frac{J}{g}$
H_{m0}	Calor de fusión para PET cristalino	$\frac{J}{g}$
H_c	Calor de cristalización en frío	$\frac{J}{g}$

Abreviaturas

Abreviatura	Término
ANCUT1	Cutinasa 1 de <i>Aspergillus nidulans</i>
ANCUT2	Cutinasa 2 de <i>Aspergillus nidulans</i>
Asp	Aspartato
BCA	Ácido bicinconínico
BHET	bis- (2-hidroxietilo)
BSA	Albúmina Sérica de Bovino
DGT	Diglicolteraftalato
DMT	Diglicolteraftalato
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
EDX	Espectroscopía de rayos X de dispersión de energía
EG	Etilenglicol
FTIR	Espectroscopía infraroja por transformada de Fourier
His	Histadina
HPLC - DAD	Cromatografía líquida de alta precisión acoplada a un detector de diodos
IcPET	Tereftalato de polietileno de baja cristalinidad
IR	Espectroscopía infraroja
ISP-2	Streptomyces Project – 2 Medium
kDa	Kilo Dalton
MHET	Tereftalato de mono (2-hidroxietilo)
PBS	Poli(succinato de butileno)
PCL	Poli(caprolactona)
PDA	Agar Papa Dextrosa

<i>PES</i>	Poli(succinato de etileno)
<i>PET</i>	Tereftalato de polietileno
<i>PLLA</i>	Ácido poli (L-láctico)
<i>p-NF</i>	para-nitrofenol
<i>p-NFB</i>	para-nitrofenol butirato
<i>ppm</i>	Partes por millón
<i>rpm</i>	Revoluciones por minute
<i>SEM</i>	Microscopía electronica de barrido
<i>Ser</i>	Serina
<i>Tg</i>	Temperatura de transición vítrea
<i>TGA</i>	Termogravimetría
<i>TPA</i>	Ácido tereftálico
<i>U</i>	Unidades internacionales de actividad enzimática
<i>UV</i>	Ultravioleta

Introducción

El plástico en los últimos 100 años se ha convertido en un sustituto ideal de materiales como el vidrio, metales, marfil, seda, algodón, caucho, etc., esto debido a su resistencia al desgaste, ligereza, facilidad para moldear y esterilizar, y sobre todo por su rentabilidad para producirse. Este material es empleado en sectores como la construcción, agricultura, producción textil, sanidad, empaques, transporte, entre otros [1]. Dentro de la amplia gama de plásticos se encuentra el tereftalato de polietileno (PET), el cual es un poliéster aromático cuya resina se destina en un 60% para la industria textil y en un 40% para la industria de empaques, mayoritariamente botellas. Como consecuencia de la creciente demanda de plástico, el mundo pasó de producir cerca de dos millones de toneladas en el año 1950 a producir casi trescientos sesenta y siete millones de toneladas en el año 2020, de las cuales la producción del PET correspondió al 22% del plástico total producido en ese año [2], [3]. Se espera que para el 2026 la producción del PET incremente en un 5% [2].

Hasta el año 2015, seis mil trescientos millones de toneladas de plástico se convirtieron en residuos, en donde solo el 9% fue reciclado, el 12% incinerado (aumentando los gases de efecto invernadero) y el 79% tuvo como destino final los rellenos sanitarios, ríos, océanos, etc. [2], contaminando el medio ambiente y representando un peligro para la vida, dado que es un material que tarda más de 400 años en degradarse y puede liberar compuestos tóxicos en los cuerpos de agua [4].

En el año 2022, a nivel mundial se produjeron cerca de mil millones de botellas de PET por minuto, de las cuales solo 27.2% fueron recicladas [4], [5], [6]. Esta tasa de reciclaje promedio global está por encima del reciclaje de PET en Colombia, dado que en el país se producen cerca de 1500 millones de botellas al año y solo son reincorporadas a nuevos procesos el 26%, conllevando a que el país se enfrente a una crisis ambiental por exceso de este residuo sin recuperación [7]. Es evidente entonces, que si bien la producción de

plástico y específicamente la producción del PET ha sido creciente en las últimas décadas (alrededor de 5% anual), los sistemas para contener, controlar y reciclar este material no siguen la misma tendencia [8], [9].

En Colombia, el principal método de reciclaje corresponde al mecánico y a nivel industrial se proyecta en los próximos años aplicar ampliamente el reciclaje químico, dentro del cual se encuentra la degradación foto-oxidativa, metanólisis, pirólisis, gasificación, entre otras; sin embargo, estos métodos pueden requerir un alto consumo energético, la incorporación de sustancias químicas con potencial nocivo, y condiciones de temperatura y presión superiores a las ambientales. Adicionalmente, por estándares de calidad del material y costos logísticos, una vez el material es incorporado al relleno sanitario o cuerpos de agua, su reciclaje químico o mecánico pierde viabilidad, lo que imposibilita recuperar el polímero [10]. En concordancia con lo anterior, se hace necesario buscar nuevas alternativas de degradación del PET que sean sostenibles desde el punto de vista social, ambiental y económico.

A nivel mundial se desarrollan investigaciones entorno a la necesidad de la degradación sostenible del PET, en donde se ha concluido que una alternativa viable es la degradación biótica, es decir, mediante el uso de microorganismos, ya que no implica la incorporación de sustancias nocivas, condiciones de operación extremas, ni producción de sustancias químicas peligrosas. En este sentido, se han descubierto microorganismos como bacterias y hongos productores de enzimas que descomponen el polímero en sus monómeros constituyentes (etilenglicol y ácido tereftálico) u oligómeros de cadena corta (bis-2-hidroxietil-tereftalato (BHET), mono-(2-hidroxietil-tereftalato), entre otros), los cuales se pueden reincorporar en su proceso de producción, fortaleciendo la economía circular del proceso, o para la producción de otra resina de uso industrial [11]. Al emplear esta alternativa es posible realizar la degradación del material independientemente de si se encuentra en cuerpos de agua, rellenos sanitarios o ha sufrido algún un proceso de recolección inadecuado.

En Colombia recientemente se ha explorado la degradación biótica del PET, enfocándose los estudios en la degradación a nivel de caja de Petri o de matraz (250 mL como volumen máximo de trabajo) [12], [13], es por lo anterior que el presente trabajo busca evaluar la biodegradación del material en moléculas simples empleando extractos enzimáticos y/o cepas microbianas a través de fermentaciones sumergidas a nivel de laboratorio (matraz y biorreactor de 7 L de capacidad), lo anterior a través de la determinación de condiciones de crecimiento de biomasa de 3 cepas microbianas, cuantificación de proteínas y actividad enzimática en los medios de cultivo al finalizar las fermentaciones de dichas cepas, y finalmente la evaluación de la degradación del PET empleando extractos enzimáticos con variaciones en el pretratamiento del material polimérico tanto a nivel de matraz como a nivel de reactor de 7 litros. Con lo cual se busca generar avances en la comprensión del proceso a una mayor escala, lo que supone un paso adelante para la industrialización de éste y consecuentemente la reducción sostenible del PET como residuo contaminante posconsumo.

1. Marco teórico

1.1 Tereftalato de polietileno

El Tereftalato de Polietileno, conocido por sus siglas en inglés como PET (*polyethylene terephthalate*) es un poliéster aromático lineal (material sintético), químicamente estable con fórmula molecular $(C_{10}H_8O_4)_n$. Se clasifica como un material termoplástico y semicristalino debido al grado de orden de las moléculas y átomos en su estructura. Presenta algunas propiedades físicas como la transparencia, resistencia al desgaste y corrosión, además de resistencia química y térmica. Presenta un coeficiente de fricción de 0.25 y un porcentaje de absorción de agua por día del 0.02%; este conjunto de propiedades hace que este material sea atractivo para la producción de empaques desplazando otros materiales como vidrio y metales [14]. El resumen de algunas propiedades del PET se muestra en la tabla 1-1.

Tabla 1-1 Propiedades del PET. [15]

Propiedad	Unidades	Valor
Densidad	g/cm ³	1.34 – 1.39
Resistencia a la tensión	MPa	59-72
Resistencia a la compresión	MPa	76-128
Resistencia al impacto	J/mm	0.01-0.04
Resistencia al calor	°C	80-120
Absorción de agua/24 h	%	0.02
Efecto solar	-	Decoloración ligera

6 Evaluación técnica de la exposición del Tereftalato de Polietileno (PET) a la acción de cepas microbianas y/o extractos enzimáticos a nivel de laboratorio con fines de degradación

Temperatura de fusión	°C	265
Temperatura de transición Vítrea	°C	80

El PET se obtiene a partir de una reacción de policondensación entre monómeros del ácido tereftálico y etilenglicol. La reacción se muestra en la figura 1-1.

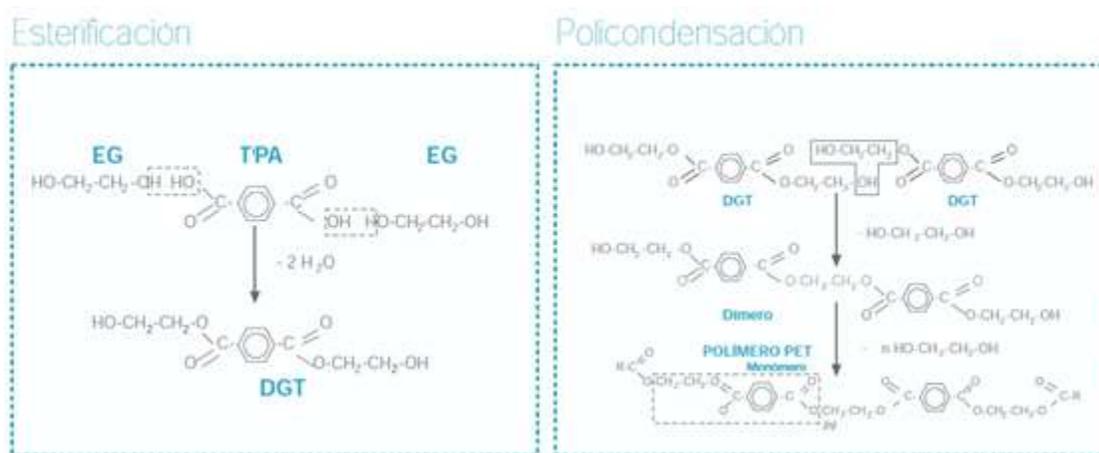


Figura 1-1 Reacción para producir PET. Tomado de [15]

La reacción para obtener el PET consta de dos etapas, la primera etapa corresponde a la esterificación, en esta etapa el monómero etilenglicol reacciona con el ácido tereftálico (TPA) agregándose uno a otro tras la eliminación de agua y la formación del enlace éster, para así formar una cadena lineal de Diglicoltereftalato (DGT). La segunda etapa consiste en la asociación de moléculas de DGT a una temperatura de 250°C, en la cual se elimina la cadena lineal hidrocarbonada del enlace éster de un monómero de DGT, y el grupo hidroxilo del enlace éster de otro monómero de DGT, uniendo varios monómeros a través de este enlace y formar el Tereftalato de polietileno [16].

1.1.1 Cristalinidad

La cristalinidad hace referencia a la integración tridimensional de las moléculas y átomos constituyentes del polímero, esta depende de la temperatura y tiempo de síntesis del material, lo que una variación de alguna de estas variables resultará en la variación de la cristalinidad y la densidad cristalina. La orientación se define como la dirección preferente de las macromoléculas lineales en la estructura cristalina [17]. En los polímeros que tienen tendencia a la cristalinidad, sus moléculas y átomos se agrupan de forma ordenada para así crear regiones cristalinas; de manera contraria, los polímeros cuyas moléculas no tienen ningún orden establecido son considerados polímeros amorfos (ver figura 1-2). Las propiedades mecánicas de los polímeros se dan principalmente por la estructura cristalina de estos y su orientación, lo anterior como consecuencia de los enlaces químicos entre las cadenas poliméricas y moléculas de la misma cadena. Aquellos materiales que contienen regiones cristalinas y amorfas son llamados materiales semicristalinos, dentro de los cuales se encuentra el PET [18].

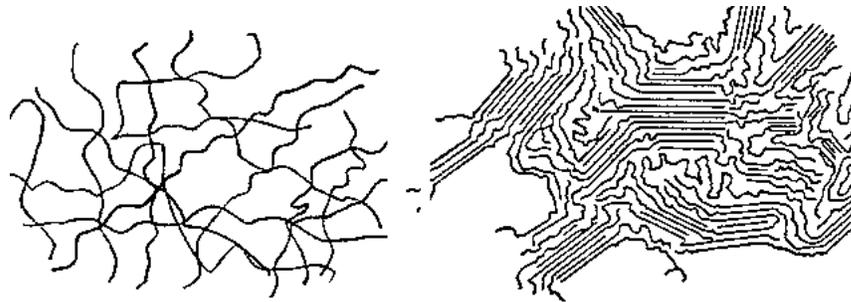


Figura 1-2 Estructura amorfa y cristalina de un polímero [19]

La estructura semicristalina del PET está compuesta por tres regiones: región cristalina, región amorfa y región interfibrilar, que corresponde a la unión entre ambas regiones, dicho modelo se muestra en la figura 1-3.

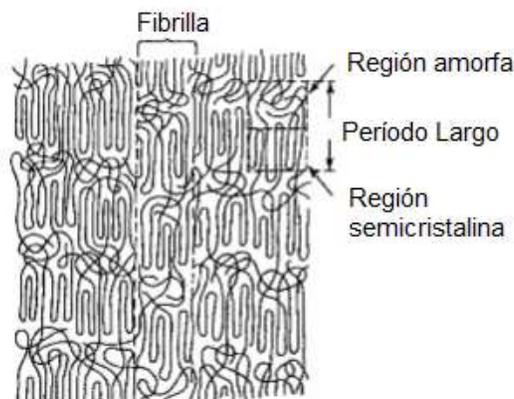


Figura 1-3 Diagrama de regiones del PET. [19]

Considerando que el PET presenta una región amorfa, la interacción intermolecular e intramolecular son menos fuertes en esta región que en regiones cristalinas, por lo tanto, le permite mayor movilidad a la cadena polimérica y esta región se vuelve clave a la hora de degradar este polímero.

1.1.2 Reciclaje del PET

El cambio de la estructura fisicoquímica de una cadena polimérica y/o disminución de su peso molecular, en este caso del Tereftalato de Polietileno, se puede realizar a partir de la influencia de diferentes factores como el calor, exposición a luz UV, empleo de compuestos químicos o fuerzas aplicadas sobre este material. La influencia de estos factores tiene como consecuencia cambios en las propiedades del polímero, entre ellas la resistencia a la tracción, el color, la forma, etc. En general, la vulnerabilidad de un polímero a la degradación depende de su estructura; por ejemplo, las cadenas que contienen funcionalidad aromática son susceptibles a la degradación ultravioleta, los polímeros a base de hidrocarburos son susceptibles a la degradación térmica, y aquellos polímeros con menor grado de cristalinidad tienen mayor movimiento de cadenas que facilita los ataques microbianos sobre el material [20].

A continuación, se describe brevemente algunas técnicas de reciclaje y/o degradación del PET, desde las convencionales, hasta alternativas más recientes.

- **Técnica de reciclaje primario:** Corresponde al reciclaje mecánico del residuo del material polimérico que se genera durante un proceso de producción, el cual debido a que no está contaminado con otro material por no ser un residuo posconsumo, es posible realizar un proceso de re-extrusión, es decir, fundir y moldear nuevamente el plástico a presión constante para incorporación al proceso productivo de interés. De acuerdo con la literatura, este tipo de reciclaje se realiza sobre una pequeña porción del PET que es producido anualmente, dado que la mayoría de los residuos de PET son posconsumo contaminados con otros materiales y/o residuos [21].
- **Técnica de reciclaje secundario:** Esta técnica hace alusión a la intervención mecánica de mezclas de residuos plásticos, por lo cual requiere de la clasificación por tipo y color de material, lavado, secado, corte y termoformado del mismo [21]. Con base en diferentes estudios que emplean técnicas cromatográficas, se ha evidenciado que el PET obtenido del reciclaje secundario contiene acetaldehído y limoneno, haciendo que su uso no sea considerado para la industria alimentaria y de empaque, así mismo propiedades como el color, resistencia a la tensión, impacto y compresión sea reducida [21], [22].
- **Reciclaje terciario (degradación):** El reciclaje terciario hace referencia a aquel que se realiza por vía térmica y química, implicando la exposición de material a altas condiciones de temperatura, presión y/o exposición ante compuestos químicos nocivos para la salud humana y del medio ambiente.
 - *Pirólisis:* Se emplea principalmente cuando el PET como residuo posconsumo posee contaminantes u otros componentes poliméricos que no pueden ser reciclados por vía mecánica o química [23]. La pirólisis se lleva a cabo en ausencia de aire, a temperaturas entre 300°C y 700°C en una atmósfera libre de oxígeno con el propósito de producir una variedad de hidrocarburos [23].

- *Degradación Química:* El reciclaje químico tiene como principal beneficio la capacidad de degradar el residuo de PET en oligómeros de cadena corta, o en sus monómeros básicos (mono etilenglicol y ácido tereftálico), debido a diferentes escisiones en la cadena polimérica, que permite que se produzca nuevamente PET a partir de los monómeros básicos de síntesis, o la producción de resinas poliméricas alternas [21]. Dentro de los principales métodos de degradación química se encuentran:
 - Glicólisis química del PET: Proceso de despolimerización que se da por el empleo del etilenglicol para reducir las cadenas poliméricas a oligómeros de diferentes pesos moleculares, atacando principalmente los enlaces éster y dando paso a la formación de grupos funcionales hidroxilo. Con este método se produce principalmente el oligómero BHET empleando temperaturas entre 110 °C y 270°C, además de presiones entre 1 – 25 atmósferas [21], [23].

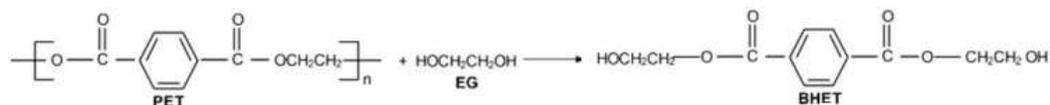


Figura 1-4 Degradación del Tereftalato de Polietileno mediante glicólisis química [23].

- Metanolisis: Se utiliza metanol como medio de reacción para la despolimerización, en donde los principales productos de degradación corresponden al dimetil tereftalato (DMT) y el mono etilenglicol (ver figura 1-5). La temperatura y presión de reacción se encuentran entre 160-350°C y entre 20-40 atm respectivamente, adicionalmente requiere del empleo de catalizadores del grupo de acetatos y sales de ácido sulfónico. Si bien se obtiene una

reacción ocurre a una temperatura promedio de 230°C y una presión de 20 atmósferas [23], [24].

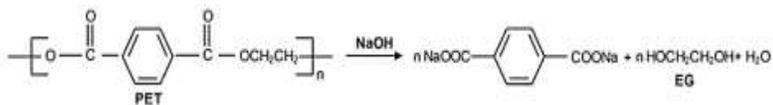


Figura 1-7 Degradación biológica del PET mediante hidrólisis alcalina [25]

Finalmente, la hidrólisis neutra del PET se realiza empleando una corriente de agua en estado líquido o gaseosa, empleando temperaturas entre 115°C y 420°C, y presiones entre 10 y 420 atm. Los productos de degradación son principalmente el ácido tereftálico (TPA) y mono etilenglicol (EG); los monómeros empleados como materia prima en la síntesis del PET [21].

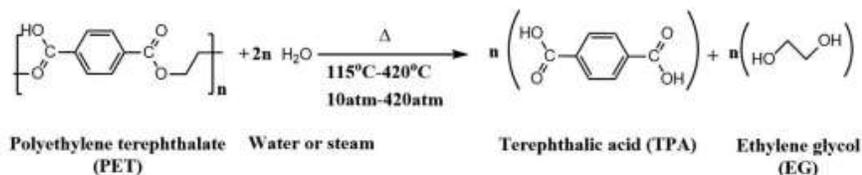


Figura 1-8 Hidrólisis neutra del PET. [21]

Dentro de los tipos de reciclaje presentados hasta ahora correspondientes al reciclaje mecánico, térmico y químico, se logra evidenciar que el reciclaje químico permite tratar una mayor cantidad de residuo de PET, en el que los productos de degradación son empleados nuevamente para su repolimerización o en otras aplicaciones industriales, permitiendo así ciclos “infinitos” de reciclaje del material en comparación con el reciclaje mecánico, en donde el material pierde sus propiedades en cada ciclo de reciclaje. De la hidrólisis neutra se obtiene principalmente los monómeros que son materia prima en la producción del PET y son de origen petroquímico (TPA y EG), representando una posible oportunidad de transición de una economía lineal de

este plástico a una economía circular; no obstante, este tipo de degradación, y la degradación química en general involucra temperaturas y presiones de operación que demandan un alto consumo energético, además de incluir catalizadores y/o sustancias que además de aumentar los costos del proceso, pueden resultar nocivos para el medio ambiente y requieren de medidas de seguridad más rigurosas.

En la actualidad se requiere continuar fortaleciendo investigaciones relacionadas con la degradación del PET con proyección a su reducción en oligómeros de cadena corta o en el mejor de los casos a sus monómeros básicos, asegurando procesos que se armonicen en aspectos económicos, sociales y ambientales, y si es posible, propender por un cambio a una economía circular y no lineal como la actual.

- **Degradación Biológica del PET:** Debido a las diferentes limitaciones de los métodos de reciclaje y degradación mencionados anteriormente, en la última década se ha incrementado el uso de métodos biológicos basado en microorganismos capaces de transformar el polímero en sus monómeros básicos, sea porque el microorganismo tiene la capacidad de metabolizar el material polimérico y emplearlo como fuente de carbono o fuente de electrones, o porque a través de medios de cultivos inductores produce enzimas capaces de degradar plásticos como el PET en moléculas más sencillas [26], [27].

Los productos obtenidos a partir de materias primas derivadas del petróleo presentan baja biodegradabilidad al estar expuestos a condiciones ambientales, esto como consecuencia de la mínima presencia de grupos funcionales reactivos en su estructura molecular, así mismo debido a su alta hidrofobicidad. En el caso del PET los grupos aromáticos del tereftalato reducen la movilidad de la cadena dificultando el ataque enzimático; sin embargo, contraria a la alta estabilidad que proporcionan los enlaces C-C, la presencia de los enlaces éster en el polímero genera zonas susceptibles a ataques enzimáticos y/o microbianos, que en complemento con las

zonas de estructuras amorfas del PET facilitan la descomposición del polímero en moléculas de menor peso molecular [28].

De acuerdo con la literatura consultada, en los estudios realizados sobre degradación biológica del PET, se han empleado bacterias en el 56% de estos estudios, en el 32%, hongos, en el 7%, combinación de hongos y bacterias, en el 1.4%, algas y en el 2.8% se han empleado insectos[26]. Sin embargo, la atención no se ha centrado solo en el tipo de microorganismo sino también en las enzimas que éstos secretan, ya que al igual que en el reciclaje químico, se ha evidenciado que la hidrólisis del material por vía microbiológica, atacándose principalmente las regiones amorfas del material, permite obtener compuestos de bajo peso molecular de interés industrial y que a su vez son materia prima para la producción de PET, tales como el ácido tereftálico y mono etilenglicol [28].

Se ha identificado que al emplear enzimas hidrolíticas pueden ocurrir dos mecanismos de acción diferentes en la ruptura del material, por un lado, las enzimas hidrolíticas endo-activas hidrolizan los enlaces centrales de la cadena polimérica, trayendo como consecuencia la funcionalización del polímero y reducción de su carácter hidrofóbico, lo cual no se ve reflejado en el cambio de peso del material; por otro lado, las exo-enzimas actúan sobre los extremos del polímero, generando la liberación de oligómeros de cadena corta y monómeros, lo que consecuentemente se refleja en la pérdida de peso del material [29], [30].

En la tabla 1-2 se presentan algunos de los diferentes géneros de microorganismos empleados en la degradación del PET, así mismo, en la tabla 1-3 se agrupan algunas de las enzimas hidrolíticas degradadoras de PET que han sido caracterizadas bioquímicamente.

Tabla 1-2 Microorganismos con capacidad para degradar PET. Tomada de [26]

Microorganismo	Porcentaje de Degradación	Técnica
Bacterias		
<i>Ideonella sakaiensis</i>	75% a 28 °C en 70 días	SEM
<i>Bacillus subtilis</i>	74.59-1.75% en un mes	Pérdida de peso
	NA	IR
		SEM
<i>Bacillus licheniformis</i>	NA	FTIR
		SEM
<i>Streptococcus pyogenes</i>	3.922-3.846% en un mes	Pérdida de peso
<i>Thermobifida fusca</i>	NA	HPLC
Hongos		
<i>Microsphaeropsis arundinis</i>	3.0-2.0% en 14 días	SEM
<i>Pleurotus ostreatus</i>	13% en 45 días	Pérdida de peso, DSC
<i>Penicillium sp.</i>	NA	SEM
<i>Mucor sp.</i>	1.3% en 2 meses	Cambios físicos
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.83% en 2 meses	-
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	0.22% en 2 meses	-
<i>Fusarium falciforme</i>	NA	Cambios físicos
<i>Aspergillus niger</i>	52.94% en 1 mes	Pérdida de peso
Microalgas		
<i>Spirulina sp.</i>	48.61% en 112 días	FTIR, SEM, EDX

Tabla 1-3 Enzimas hidrolíticas de PET. Tomado de [28]

Enzima	Número de Acceso	Organismo	Rango de Temperatura (Temperatura Óptima) (°C) / Sustrato
PETase	GAP38373.1	<i>Ideonella sakaiensis 201-F6</i>	20-45 (40) / PET / pNPB
TfH	WP_011291330.1	<i>Thermobifida fusca DSM43793</i>	30-60 (60) / PET/ pNPB
LCC	AEV21261.1	<i>Bacteria no cultivada</i>	30-80 (70) / PET/ pNPB
FsC	1CEX	<i>Fusarium solani pisi</i>	30-60 (50) / PET/ pNPB; / pNPP
Thc_Cut1	ADV92526.1	<i>Thermobifida cellulosilytica DSM44535</i>	50 / PET/ pNPB
Thc_Cut2	ADV92527.1	<i>Thermobifida cellulosilytica DSM44535</i>	50 / PET/ pNPB
Thf42_Cut1	ADV92528.1	<i>Thermobifida fusca DSM44342</i>	50 / PET/ pNPB
Tha_Cut1	ADV92525.1	<i>Thermobifida alba DSM43185</i>	50 / PET/ pNPB
Thh_Est	AFA45122.1	<i>Thermobifida halotolerans DSM44931</i>	50 / PET/ pNPB
Cut190	S226P/R228S	<i>Saccharomonospora viridis AHK190</i>	60-65 / PET/ pNPB
HiC	4OYY	<i>Humicola insolens</i>	30-85 (80) / PET/pNPB
BsEstB	ADH43200.1	<i>Bacillus subtilis 4P3-11</i>	40-45 (40) / PET / pNPB
PET2	C3RYL0	Bacteria no cultivada	50 / placa de agar con nanopartículas de PET/ pNPO
PET5	R4YKL9	<i>Oleispira antarctica RB-8</i>	50 / placa de agar con nanopartículas de PET
PET6	UPI0003945E1F	<i>Vibrio gazogenes</i>	50 / placa de agar con nanopartículas de PET/ pNPO

PET12	A0A0G3BI90	<i>Polyangium brachysporum</i>	50 / placa de agar con nanopartículas de PET
Tcur0390	CDN67546.1	<i>Thermomonospora curvata</i> DSM43183	50 / nanopartículas de PET) / pNPB
Tcur1278	CDN67545.1	<i>Thermomonospora curvata</i> DSM43183	50-60 (60) / nanopartículas de PET/ pNPB

De las enzimas presentadas en la tabla 1-3, varias de estas pertenecen al grupo de las cutinasas, enzimas hacia las cuales se han dirigido múltiples investigaciones ya que presentan actividades significativas en la degradación de diferentes polímeros, entre ellos el PET[28].

1.2 Cutinasas

Según la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, el código de clasificación de la cutinasa corresponde a EC 3.1.1.74, lo que permite identificar la enzima como una hidrolasa que actúa sobre enlaces ésteres de ácidos carboxílicos del polímero cutina [31]. La cutina es un biopolímero compuesto por ácidos grasos epoxis hidroxilados, generalmente con cadenas de carbono n-C₁₆ y n-C₁₈ (figura 1-9), adicionalmente contiene en promedio dos grupos hidroxilos que forman el componente estructural de las plantas. Es en este biopolímero que descubrieron el crecimiento de hongos fitopatógenos que producen dicha enzima.

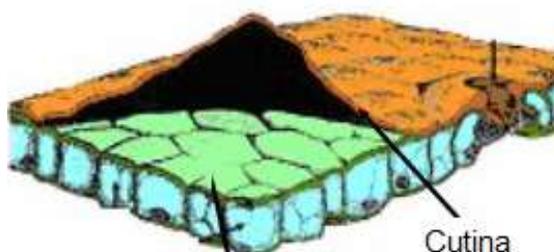


Figura 1-9 Biopolímero cutina [32]

Las cutinasas son serinas estererasas que poseen una triada catalítica de Ser-His-Asp. Se diferencian principalmente de las estererasas por su capacidad de hidrolizar poliésteres de alto peso molecular, esto como consecuencia de la ausencia de la tapa hidrófoba que cubre la serina del sitio activo, por lo que permite la adecuada acomodación del sustrato a catalizar. Adicionalmente, se diferencian de las lipasas por su capacidad para hidrolizar sustratos solubles más pequeños sin necesidad de activación interfacial, ya que las lipasas para desplegar la máxima actividad catalítica se deben encontrar en presencia de interfaces lípido-agua [33].

Las cutinasas son extracelulares e inducibles, es decir, que son secretadas por el microorganismo en el medio (en su mayoría hongos fitopatógenos, filamentosos y mesófilos) y adicionalmente son sintetizadas en cantidades pequeñas, lo que conlleva a que la velocidad de síntesis pueda ser aumentada por otra molécula que se denomina inductor, siendo este normalmente un sustrato de una ruta catabólica o una molécula similar al sustrato natural (cutina). La producción de esta enzima hidrolítica es inducida en diferentes estudios por cutina de manzana, aceite de oliva y aceite de linaza (ácidos grasos hidroxilados n-C₁₈) que contienen un número promedio de 18 carbonos [31].

En la figura 1-10 se presenta la estructura de la cutinasa en donde se puede observar que el sitio activo se encuentra presente en un extremo elipsoide de la proteína, permitiendo que la cutina de alto peso molecular u otro tipo de sustrato pueda acomodarse en la cavidad catalítica para realizar la ruptura del enlace éster empleando agua. De esta figura se identifica que la movilidad de la enzima aumenta a medida que se acerca a la región de la triada catalítica (Asp-His-Ser), representando el color azul la región de menor movilidad de la proteína y el rojo la región de mayor movilidad.

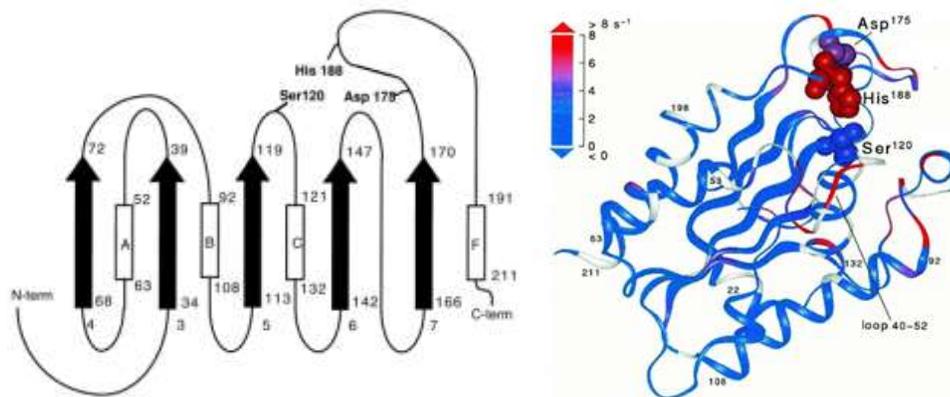


Figura 1-10 Estructura de la enzima cutinasa [34]

Estas serin-hidrolasas presentan actividad hidrolítica en diversos tipos de compuestos ésteres, desde sintéticos hasta triglicéridos de cadena larga insoluble, además, en medios con baja actividad de agua tienen la capacidad de catalizar reacciones de esterificación y transesterificación en diferentes sustratos [35].

Con base en las reacciones de hidrólisis y síntesis que cataliza, las cutinasas tienen potencial para los siguientes usos:

- Industria alimentaria: hidrólisis de la grasa de la leche.
- Industria de detergentes: síntesis de surfactantes (función similar a la de las proteasas).
- Oleoquímica: síntesis de triglicéridos estructurales.
- Agroquímica: degradación de insecticidas y sustancias tóxicas.
- Degradación de polímeros.

1.2.1 Descomposición del PET debido a la acción de la enzima cutinasa

La descomposición biológica del PET se da como consecuencia de la hidrólisis enzimática del enlace éster sobre la superficie del polímero. Las cutinasas que provienen de diferentes microorganismos como hongos, bacterias y levaduras, actúan preferentemente sobre las regiones de baja cristalinidad o amorfas del material, debido a que las interacciones intermoleculares y entre cadenas poliméricas (fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno, interacción dipolo-dipolo, entre otros) son débiles en comparación con las regiones cristalinas. En esta región, la enzima hidrolítica a través de su triada catalítica dispuestas en su centro activo (Ser-His-Asp) rompe el enlace éster y con este se da la formación de grupos hidroxilos y carboxilos, los cuales aumentan el carácter hidrofílico del PET y la degradación de este. En el proceso de descomposición son liberadas moléculas de bajo peso molecular que son empleadas por el microorganismo como fuente de carbono [36].

En la figura 1-11 se muestra el mecanismo de hidrólisis realizado por la enzima. Se puede observar que en el paso A y B el residuo de histidina (His) actúa como una base y el oxígeno del residuo de serina (Ser) es el encargado de llevar a cabo el ataque nucleofílico al carbonilo del grupo éster del sustrato, entrando en un estado de transición en el que la histidina transfiere un protón de serina al etilenglicol producido (EG). Posteriormente, en el paso C y D ocurre una desacidación en la que la histidina actuando como base nuevamente restaura la serina catalítica a través de la transferencia de un protón de la molécula de agua a la de serina, para finalmente liberar una molécula de ácido tereftálico (TPA) como se presenta en el paso F [37].

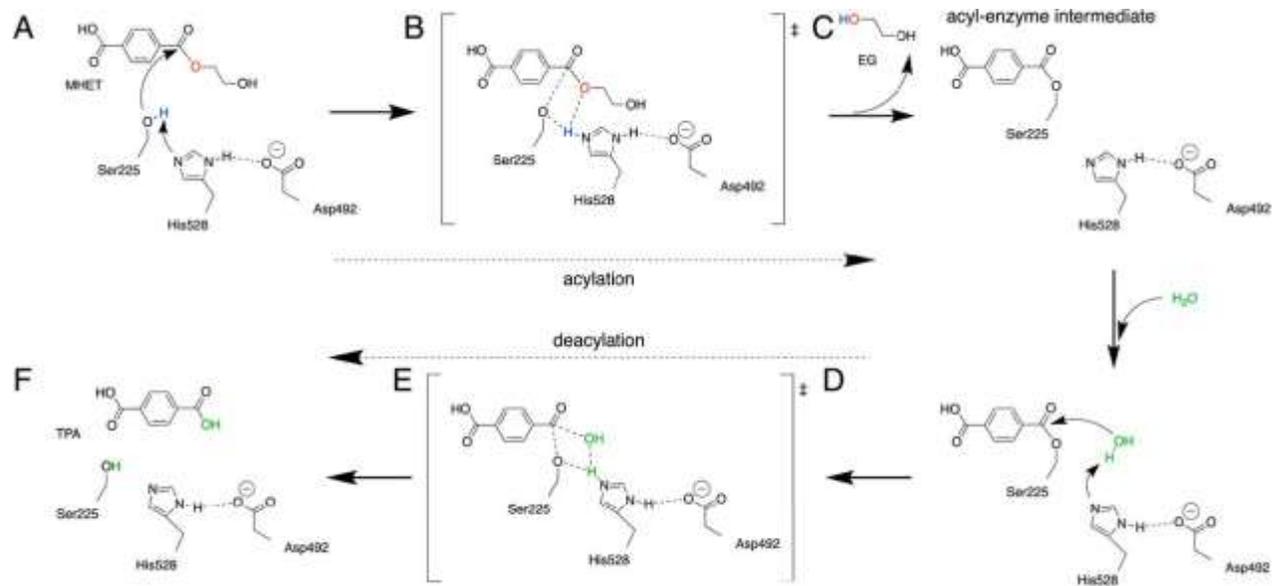


Figura 1-11 Mecanismo catalítico de las serin-hidrolasas [37]

Con base en el mecanismo de acción de las cutinasas para la hidrólisis del PET presente en la figura 1-11, puede identificarse que a condiciones de reacción viables (que son menores a las empleadas en la degradación química con el fin de mantener la viabilidad del microorganismo y/o enzima), los productos finales de degradación corresponden al etilenglicol y el ácido tereftálico, sin embargo; ante la hidrólisis parcial de este material puede obtenerse polímeros como tereftalato de mono (2-hidroxietilo) (MHET), bis- (2-hidroxietilo) (BHET) [37].

Kämper y Kolattukudy en 1997 realizaron la producción *in vivo* de la enzima cutinasa y encontraron que dicha producción está fuertemente regulada por las condiciones de crecimiento del microorganismo (Fuente de carbono, pH, concentración de sales, temperatura). Se demostró además que la expresión es controlada a nivel de transcripción génica y es inducida significativamente por el ácido 9,10,18- trihidroxipalmítico liberado por la cutinasa [38].

1.2.2 Microorganismos productores de cutinasas

Las cutinasas pueden obtenerse a partir de una amplia variedad de microorganismos que se encuentran en la naturaleza. En la tabla 1-4 se enuncian varios de ellos de acuerdo con su clasificación.

Tabla 1-4 Microorganismos productores de cutinasas. Tomado de [31]

Fuente	Género	Especie
Hongos	<i>Alternaria</i>	<i>brassicicola</i>
	<i>Aspergillus</i>	<i>oryzae</i>
	<i>Botrytis</i>	<i>cinerea</i>
	<i>Colleotrichum</i>	<i>gloesporioides</i> <i>lagenarium</i> <i>lindemuthianum</i>
	<i>Fusarium</i>	<i>solani oxysporium</i>
	<i>Penicillium</i>	<i>chrysogenum</i>
	<i>Glomerella</i>	<i>cingualata</i>
	<i>Trichoderma</i>	<i>harzianum</i>
	<i>Venturia</i>	<i>inaequalis</i>
Bacterias	<i>Streptomyces</i>	<i>scabies</i>
	<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i> <i>aeruginosa</i>
	<i>Thermonospora</i>	<i>fusca</i>
	<i>Thermoactinomyces</i>	<i>vulgaris</i>
	<i>Thermobifida</i>	<i>fusca</i>
Levaduras	<i>Cryptococcus</i>	<i>sp.</i>
	<i>Pseudozyma</i>	<i>jejuensis</i>

De acuerdo con la información presentada en la tabla 1-4, es posible identificar que las cutinasas han sido descubiertas mayoritariamente en la familia de los hongos filamentosos [39].

Las primeras cutinasas aisladas fueron del hongo fitopatógeno *Fusarium solani* en el año 1978 [40], para ello cultivaron el hongo en glucosa e indujeron la producción de cutinasa con hidrolizado de cutina y ácidos grasos con cadenas n-C18, de lo cual se observó que la glucosa actuaba como represor en la producción de cutina; se obtuvo además que la velocidad de producción de la enzima dependió principalmente de la concentración de inductor en el medio y la actividad enzimática fue mayor en el caso de los ácidos grasos en comparación con el hidrolizado de cutina. Posteriormente se reportó la producción de cutinasa en polen de plantas, bacterias, levaduras y en hongos no patógenos [41].

En el año 2002 Taipa, Calado, Cabra y Fonseca optimizaron las condiciones de cultivo y caracterización de la cutinasa producida a partir de la cepa SU50 de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante. Se realizaron fermentaciones en las cuales se evaluaron las concentraciones de oxígeno disuelto en el cultivo de fermentación con 5, 30 y 60% de la saturación del aire, de esta manera se obtuvo que la mayor tasa de producción específica y mayor rendimiento de la cutinasa con respecto a la biomasa se presentó en el caso de 5% de saturación del aire, lo que podría tener un impacto en la economía del proceso. Adicionalmente se reportó que la obtención de cutinasa aumenta al incrementar el pH del medio de 5,25 a 6,25 [42].

1.2.3 Género *Penicillium*

Penicillium es uno de los hongos filamentosos más comunes y disponibles en la mayoría de los hábitats, debido a esto tiene un alto impacto económico en la vida humana. Se estima que existen más 354 especies del género *Penicillium* aceptadas. Con respecto a su taxonomía, pertenece al reino de los hongos, orden eurotiales, familia tricomáceas y clase ascomicetos [43], [44].

Las colonias de *Penicillium* son de fácil crecimiento, algunas son de color verde y otras blancas, la superficie presenta en la mayoría de los casos exudados y en el reverso de la placa se puede observar un color amarillo pálido. Estas colonias están compuestas por conidióforos (estructura para la reproducción asexual de esporas llamadas conidias), los cuales se encuentran en los extremos de las hifas con el fin de ser esparcidos con mayor

eficiencia. En la figura 1-12 se presenta la estructura morfológica de *Penicillium*, las cuales permiten la identificación de sus diferentes especies.

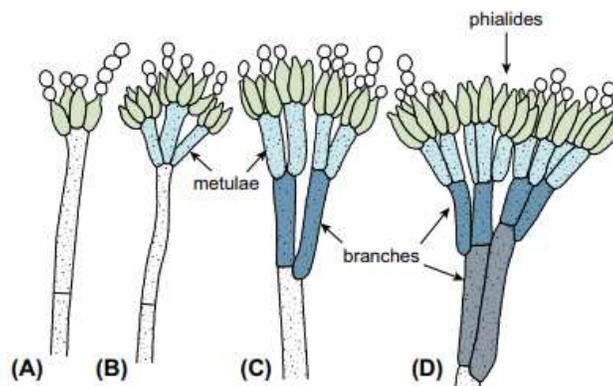


Figura 1-12 . Características morfológicas del género *Penicillium*. (A) monovercificada, (B) bivercificada, (C) tervercificada, (D) cuatirvercificada. Tomada de [44]

Como método de identificación de *Penicillium* es usualmente empleado el medio de cultivo Czapek Dox agar a 25°C. La formación de colonias se puede observar entre los 3 y 7 días posterior a la incubación. *Penicillium* es un hongo mesófilo, lo que quiere decir que crece entre los 5 y 37°C con temperatura óptima entre 20 y 30 °C, un rango amplio de pH entre 3 y 9 [43]. A partir de este microorganismo se pueden obtener en la naturaleza compuestos orgánicos como alcoholes, cetonas, ésteres y terpenos, adicionalmente se ha evidenciado la producción de enzimas cutinasas [35], [43].

1.2.4 Género *Aspergillus*

Aspergillus es un hongo filamentoso saprofito que tiene la capacidad de degradar materia orgánica. Su hábitat natural es el suelo, en donde sobrevive y se desarrolla [45]. Este microorganismo pertenece al filo Ascomycota, se encuentra formado por hifas hialinas septadas y puede tener tanto reproducción sexual como asexual (con formación de conidios). Se han reportado aproximadamente 185 especies, de las cuales alrededor de 20 de ellas se reportan como patógenas para los seres humanos (*Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, y *A. niger*) [46], [47].

Las especies de *Aspergillus* pueden identificarse debido a su tamaño, tasa de crecimiento, textura, color de la colonia (verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro), entre otros [46]. La especie *Aspergillus nidulans* crece mediante colonias de aspecto polvoriento de color verde oscuro, adicionalmente, los conidióforos son cortos, la pared es lisa y de color café (ver figura 1-13).



Figura 1-13 . Estructura del hongo *Aspergillus nidulans*. Tomada de [46]

El género de *Aspergillus* puede aislarse a una temperatura de 37°C, sin embargo, posee un rango amplio de temperatura y pH de crecimiento 12-65°C, 2.1 y 8.8, respectivamente. Tiene la capacidad de producir micotoxinas, compuestos orgánicos volátiles, además, debido a la presencia de glucosilhidrolasas en algunas especies de este microorganismo, éste posee la capacidad de crecer degradando polisacáridos presentes en las paredes celulares de las plantas [48].

En el caso de la especie *Aspergillus nidulans*, su genoma se ha estudiado a profundidad, del cual se ha identificado que 60 genes codifican para esterasas, correspondiendo cuatro de éstas a cutinasas [49].

1.2.5 Género *Streptomyces*

El género *Streptomyces* engloba bacterias filamentosas que forman parte de la familia streptomycetaceae y se ubican en el orden actinomycetales. Este género cuenta con más de 500 especies que se hallan tanto en ambientes terrestres como acuáticos. Muchas de

estas especies desempeñan un papel crucial en la descomposición de la materia orgánica en el suelo y son conocidas por su habilidad para producir antibióticos de amplio espectro, sustancias químicas que se generan de manera natural y que tienen la capacidad de eliminar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos [50].

Las *Streptomyces* se caracterizan por ser bacterias grampositivas aeróbicas con una morfología compleja. Estas bacterias forman una estructura filamentosa en forma de red, conocida como micelio, similar al de los hongos, que contiene cadenas de esporas cuando alcanzan la madurez. Las hebras ramificadas de estas bacterias presentan un diámetro que varía entre 0.5 y 1.0 micrómetros (ver figura 1-14). Se ha encontrado que su temperatura y pH ideal de crecimiento se encuentra entre 20-25°C y 6.5-8.0, respectivamente [50], [51].



Figura 1-14 Estructura de *Streptomyces sp.* Tomada de [52]

Del género de *streptomyces* se ha identificado la capacidad de producir enzimas cutinasas debido a la hidrólisis de los biopoliésteres insolubles de las plantas (cutina) [53].

1.3 Fermentación

Para la producción de enzimas hidrolíticas es necesario que se lleve a cabo un proceso fermentativo. La fermentación es un proceso de transformación de la materia empleando

un microorganismo o una mezcla de estos, los cuales son capaces de metabolizar la fuente de carbono disponible a unas condiciones de operación controladas con el fin de potenciar su crecimiento y la obtención de metabolitos secundarios de interés comercial (no esenciales para el crecimiento del microorganismo). La fermentación es ampliamente empleada en la industria farmacéutica para la producción de antibióticos como es el caso de la penicilina a partir del hongo de género *Penicillium*, adicionalmente es empleada en la industria alimentaria en casos como la elaboración de vinos y cervezas a partir de levadura, y elaboración de yogurt y derivados de la leche a partir de la bacteria facultativa *Lactobacillus*, entre otros [54].

La fermentación puede realizarse en estado sólido que se denomina fermentación sólida, o puede realizarse en estado líquido, la cual se denomina fermentación sumergida. Las ventajas y desventajas de ambas fermentaciones se presentan a continuación.

1.3.1 Fermentaciones sólidas

Se define como aquella fermentación que ocurre en ausencia de agua libre o ésta es limitada. Si bien es un proceso antiguo, en la actualidad es ampliamente aplicada para procesos en los cuales se emplean residuos agroindustriales, conocidos como procesos verdes. En esta fermentación no hay un control efectivo de la temperatura y oxígeno disuelto en el medio, convirtiéndose en una fermentación heterogénea. Se emplea para producir productos en pequeñas cantidades, tal es el caso de enzimas como xilanasas, celulasas y amilasas. Se considera atractivo además por la reducción del costo de operación debido a los siguientes factores [55]:

- Uso de fermentadores de bandeja y tambores rotatorios en lugar de reactores sofisticados empleados en la fermentación sumergida.
- Las enzimas producidas en la fermentación se encuentran concentradas y se facilita su recuperación.
- Mayor productividad en la fermentación debido a mayor concentración final de productos.

- Mayor estabilidad del producto con menor represión catabólica.
- Menor demanda de esterilidad como consecuencia de menor actividad de agua en comparación con la fermentación sumergida.

Aunque la fermentación en estado sólido presenta ventajas en la obtención de productos, en la actualidad el proceso se lleva a cabo a escala de laboratorio principalmente, exceptuando casos como la producción de goma xantana que se da industrialmente en estado sólido [55].

1.3.2 Fermentaciones sumergidas

Hace referencia a la fermentación que se realiza en presencia de agua libre. Es el tipo de fermentación preferida para la producción industrial de enzimas debido a la facilidad de manejo a gran escala en comparación con la fermentación en estado sólido. En esta fermentación se puede realizar control sobre parámetros como pH, temperatura, formación de espuma, agitación y oxígeno disuelto en el medio; la formulación de este medio puede ser indefinido, como en el caso de medios enriquecidos con caldos y vitaminas, o un medio de composición definida de las sales y fuente de carbono [56]. En la fermentación sumergida se minimizan los problemas de transferencia de masa y calor originadas al emplearse densidades celulares altas, debido a que estos fenómenos de transferencia pueden limitar las tasas metabólicas y como consecuencia se dan cambios en el patrón fisiológico. La minimización de los problemas de transferencia gas-líquido se da gracias a que el impulsor realiza la mezcla del aire, la biomasa y las partículas suspendidas en el reactor, favoreciendo la homogeneidad del medio de reacción. Estos beneficios sobreponen la fermentación en estado líquido sobre la fermentación en estado sólido [57].

En las fermentaciones sumergidas de microorganismos con crecimiento filamentoso, su crecimiento se puede dar en forma de pellets esféricos, que pueden ser en forma de agregación compacta de hifas, o en forma filamentosa con hifas homogéneamente

dispersas, lo que hace que el medio sea heterogéneo y aerobio [58]. En estudios experimentales se ha hallado que la morfología de los microorganismos filamentosos tiene un impacto significativo en el rendimiento y productividad en fermentaciones llevadas a cabo en biorreactor [59]. La formación de los pellets de biomasa puede darse mediante la formación coagulativa o no coagulativa. La formación coagulativa hace referencia a la agregación de esporas para su posterior germinación y formación de aglomerado; por otro lado, la formación no coagulativa se da inicialmente por la germinación de cada espора de manera individual, por lo cual una sola espора podría generar un pellet [58], [59], tal como se muestra en la figura 1-15.

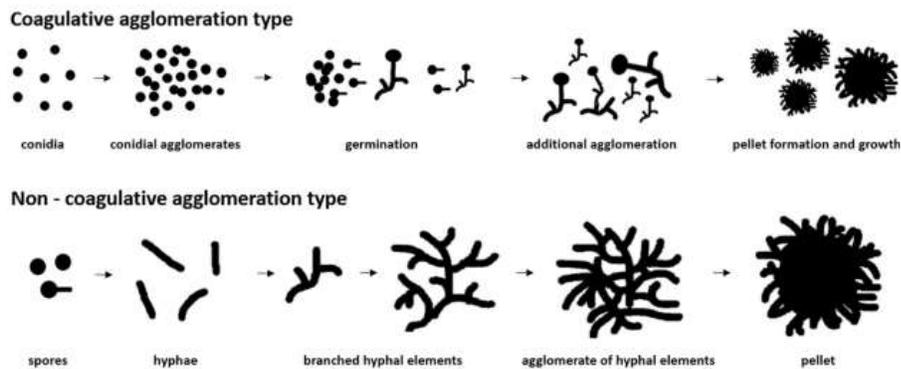


Figura 1-15 Formación de pellets de biomasa en microorganismos filamentosos.
Tomada de [58]

En el procesamiento de materiales usando fermentaciones sumergidas es conveniente evitar la formación de pellets, los cuales dificultan la obtención de medios de reacción homogéneos. Por tanto, implementar estrategias para alterar la morfología de diferentes microorganismos filamentosos en las fermentaciones sumergidas es una acción casi que obligatoria. Algunas de ellas se resumen en la tabla 1-5.

Tabla 1-5 Estrategias para cambiar morfología de estructuras coagulativas y no coagulativas de microorganismos filamentosos. Tomada de [58]

Tipo	Especies	Morfología Preferida	Alteración de la Morfología
Tipo Coagulativo	<i>Aspergillus</i>	Para producción de ácido cítrico: Ramas de hifas hinchadas, aglomerados compactos = conglomerados, aglomerados con capas finas de biomasa y núcleo suelto	Fuerte agitación (se desea fragmentación de las hifas), aireación con mezcla de oxígeno/aire 1:1, alta tasa de crecimiento, bajo pH (2.0 ± 0.2), presencia de manganeso Nivel de inóculo de esporas, dispersión de aglomerados en lugar de inóculo de esporas, surfactante: Tween 20
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Tamaño pequeño de aglomerados (~ 5.5 mm^3) para producción de peroxidasa de lignina	Alta tasa de cizallamiento
	<i>Blakeslea y Choanephora</i>	Forma compacta de aglomerado	Polímeros aniónicos obstaculizan la agregación de esporas antes de la germinación
	<i>C. unicolor</i>	Forma de aglomerado en estrella compacto, Cultivo mejorado con micropartículas (partículas de Al_2O_3)	Cultivo mejorado con micropartículas (Partículas de Al_2O_3)
	<i>C. fumago</i>	Forma compacta de aglomerado	Volumen de inóculo pequeño, fuente de carbono (fructosa)
	<i>C. sinensis</i>	Aglomerados pequeños y sueltos	Surfactante: Tween 80 pH: óptimo 6.0
Tipo No Coagulativo	<i>A. ochraceus</i>	Forma compacta de aglomerado	Inóculo de esporas y agitación
	<i>R. oryzae</i>	Aglomerados sueltos en producción de ácido láctico	Medio: peptona, dextrosa, carbonato de calcio
	<i>P. chrysogenum</i>	Aglomerado "esponjoso" para asegurar una capa activa lo más grande posible con altas cantidades de citosol	Aireación con oxígeno/aire, tasa de crecimiento controlada CSL en medio, concentración de CO_2 , nivel de inóculo de esporas, control del proceso fisiológico basado en el enfoque de modelado morfológico
	<i>P. sp. L1</i>	Tamaño grande de aglomerado	Dispersión de aglomerados en lugar de inóculo de esporas

1.4 Métodos de cuantificación y caracterización

1.4.1 Cuantificación de azúcares reductores

Los azúcares reductores son aquellos que pueden donar un electrón a una molécula de un ácido o una base. Se encuentran presentes en una amplia variedad de alimentos y bebidas, así como en materiales biológicos. La cuantificación de azúcares reductores es importante en diversas aplicaciones, como el control de calidad de alimentos, la investigación científica y el diagnóstico médico [60].

Existen diversos métodos para la cuantificación de azúcares reductores. Uno de los más comunes es el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Este método se basa en la reacción de los azúcares reductores con el ácido DNS para formar un producto coloreado que se mide espectrofotométricamente [60], [61].

En el método DNS, la muestra de azúcares reductores se trata con ácido DNS y ácido sulfúrico concentrado. La reacción produce un producto coloreado de color rojo anaranjado, cuya absorbancia se mide a una longitud de onda de 540 nm. La concentración de azúcares reductores se determina a partir de una curva de calibración preparada con soluciones de azúcares reductores de concentración conocida [61].

El método DNS es un método rápido y sencillo que ofrece una buena precisión y reproducibilidad. Sin embargo, es importante tener en cuenta que este método puede verse afectado por la presencia de otros compuestos que también sean reductores, como los aminoácidos o los ácidos orgánicos [61].

1.4.2 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una técnica analítica que se utiliza para determinar la composición molecular de una muestra. Se basa en la absorción de radiación infrarroja por parte de los grupos funcionales de las moléculas [62].

Los cambios morfológicos en los materiales pueden afectar la distribución de los grupos funcionales en la muestra. Por ejemplo, un cambio en la cristalinidad de un material puede alterar la intensidad de las bandas de absorción características de los grupos funcionales cristalinos [62].

La espectroscopía FTIR se puede utilizar para identificar cambios morfológicos en materiales mediante el análisis de las bandas de absorción características de los grupos funcionales. Por ejemplo, la disminución de la intensidad de la banda de absorción a 1100 cm^{-1} , que se debe a la vibración de estiramiento del grupo carbonilo, puede indicar una disminución de la cristalinidad del material [63].

La espectroscopía FTIR es una técnica no destructiva y versátil que se puede utilizar para identificar cambios morfológicos en una amplia variedad de materiales, incluyendo plásticos, polímeros, cerámicas y metales [63].

En el caso específico del PET, los cambios morfológicos que pueden ser identificados mediante espectroscopía FTIR incluyen:

- Disminución de la cristalinidad: La disminución de la intensidad de la banda de absorción a 1100 cm^{-1} , que se debe a la vibración de estiramiento del grupo carbonilo, puede indicar una disminución de la cristalinidad del PET [63].

- Aumento de la cristalinidad: El aumento de la intensidad de la banda de absorción a 1100 cm^{-1} , que se debe a la vibración de tensión del grupo carbonilo, puede indicar un aumento de la cristalinidad del PET [63], [64].
- Degradación: La aparición de nuevas bandas de absorción en el espectro infrarrojo puede indicar la degradación del PET. Por ejemplo, la aparición de una banda de absorción a 1700 cm^{-1} , que se debe a la vibración de estiramiento del grupo carbonilo en las cetonas, puede indicar la degradación del PET por la acción de agentes oxidantes [63], [64].

1.4.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica analítica utilizada para medir los cambios de entalpía en función de la temperatura o el tiempo. Se basa en la medición de la diferencia de temperatura entre una muestra y un material de referencia, ambos expuestos a las mismas condiciones experimentales [65].

En el caso de los polímeros, la DSC se utiliza para determinar una amplia gama de propiedades, incluyendo la temperatura de fusión, la temperatura de transición vítrea, el grado de cristalinidad, y la cinética de las reacciones químicas[65].

La determinación del grado de cristalinidad del PET mediante DSC se basa en la medición del calor liberado durante la fusión de la fase cristalina. En el caso del PET, la fusión de la fase cristalina se produce en un intervalo de temperatura relativamente estrecho, entre 225 y 260 °C . La cantidad de calor liberado durante esta transición se denomina calor de fusión, y es proporcional al grado de cristalinidad de la muestra [65], [66].

1.4.4 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

La cromatografía de alta resolución (HPLC) es una técnica analítica que se utiliza para separar y cuantificar compuestos químicos debido a su reproducibilidad y versatilidad. La técnica se basa en la distribución de los compuestos entre dos fases: una fase estacionaria y una fase móvil. La fase estacionaria es un material sólido que se encuentra dentro de una columna, mientras que la fase móvil es un líquido que fluye a través de la columna. Los compuestos se separan en la columna debido a sus diferentes afinidades por las dos fases [67], [68].

La técnica de HPLC se puede utilizar para analizar los productos de degradación del PET, incluyendo el ácido tereftálico (TPA), el etilenglicol (EG) y los monómeros de etilenglicol. La técnica se puede utilizar para determinar la cantidad de cada producto de degradación, así como para identificar los productos de degradación secundarios [67], [68].

1.5 Antecedentes

1.5.1 Degradación del PET

La idea de degradación del PET por vía microbiana surge al observar el crecimiento de hongos en la superficie del material después de un período de tiempo de exposición en los rellenos sanitarios, en el cual la descomposición del polímero se refleja en la pérdida de peso del material. Diferentes microorganismos emplean materiales poliméricos como su única fuente de carbono excretando enzimas hidrolíticas que interactúan con la superficie del polímero y aumenta el carácter hidrofílico de este mediante la degradación del enlace éster. Entre este tipo de enzimas se encuentran las cutinasas que han sido identificadas por su asociación a la potencial degradación del PET

Joachim et al., (2005) realizaron un estudio sobre la despolimerización del PET empleando la enzima cutinasa del hongo *Thermobifida fusca*, de este estudio se obtuvo que las tasas de erosión eran alrededor de 8 a 17 μm por semana tras ser incubado el material con la enzima a una temperatura de 55°C y una agitación de 50 rpm en matraces. Adicionalmente, se observó que la cristalinidad, punto de fusión y la temperatura de transición vítrea tienen un efecto directo sobre el ataque enzimático en PET, siendo más favorable para la degradación el poliéster con bajo grado de cristalinidad [69]. Al igual que esta investigación, en el mismo año se comprobó la hipótesis de la dependencia de degradación del PET con el grado de cristalinidad del material, para esto se planteó como objetivo degradar fibras de PET empleadas en la industria textil; en el ensayo se incorporó una cutinasa obtenida del hongo *Fusarium solani* en un sistema en el que la fuente de carbono fue el PET en fibras con diferentes grados de cristalinidad, la fermentación tuvo una duración de 5 días. Encontraron que hubo mayor actividad enzimática en el polímero con estructura cristalina amorfa, y mínima actividad enzimática con PET altamente cristalino [70].

En 2005, Kim, Min y Lee emplearon dos hidrolasas, una a partir del hongo *Fusarium oxysporium* y otra a partir de la levadura *Candida cylindracea* para la degradación de dipropil ftalato (DPrP). De esta investigación se halló que la degradación del DPrP a partir de la cutinasa obtenida del hongo *F. oxysporum* fue alrededor de 70% del DPrP inicial en un tiempo inferior a 2,5 horas; por el contrario, la esterasa obtenida de la levadura incorporada a la misma concentración solo degradó el 10% del polímero inicial, y permaneció hasta después de 3 días de tratamiento [71].

En el año 2007 se realizaron los primeros estudios de producción de cutinasa a partir de hongos del género *Penicillium*, en particular se realizó la hidrólisis del PET y bis-(benzoiloxiethyl) tereftalato con la enzima hidrolítica cutinasa empleando como fuente de carbono ambos polímeros a una concentración de 1g/L, a diferentes condiciones de temperatura y pH durante un tiempo de fermentación de 24 h. Se obtuvo que las condiciones de temperatura y pH a las cuales hubo mayor actividad cutinasa fue a 36°C y 8.3, respectivamente. Adicionalmente, la hidrólisis superficial del PET con la enzima condujo a un aumento del carácter hidrofílico de los materiales, basado esto en el

aumento de la altura (5,1 cm) y la disipación de las gotas de agua (55 s). Finalmente, encontraron que tanto el PET como el bis-(benzoiloxietil) tereftalato liberaron bis- (2-hidroxietil) tereftalato y mono- (2-hidroxietil) tereftalato en su hidrólisis, mientras que sólo se obtuvieron mínimas cantidades de ácido tereftálico [72].

Nowak et al., 2011 llevaron a cabo la biodegradación de un material PET modificado con el poliéster "Bionolle®". Dicha degradación fue llevada a cabo empleando el microorganismo *Penicillium funiculosum* en una fermentación sumergida durante 84 días, a una temperatura de 30°C y un pH de 5,2. Se expuso inicialmente el polímero al hongo durante su crecimiento y posteriormente a un extracto enzimático. De la investigación se encontró que hubo una reducción significativa de los anillos aromáticos derivados del ácido tereftálico, obtenido como producto de degradación de las películas de PET; lo anterior indicó que la degradación de este material no solo fue debido a enzimas hidrolíticas sino también a enzimas oxidativas. Adicionalmente, se determinó que las enzimas hidrolíticas tuvieron dos efectos en la biodegradación, dependiendo de si su modo de acción era como endo o exo-enzima; en el caso de la acción endo-enzimática hubo una hidrólisis preferencial de los enlaces localizados en el centro del polímero, produciendo la funcionalización de la superficie sin conducir propiamente a una pérdida de peso significativa en el material, por otro lado, en el caso de la acción exo-enzimática de la hidrolasa, hubo degradación al final de la cadena del PET, produciendo oligómeros de cadena corta que a su vez estuvieron acompañados por pérdida de peso del material [73].

Adicional al estudio anterior, en el año 2013, Sepperumal et al. realizó la evaluación de cambios morfológicos del tereftalato de polietileno empleando el microorganismo *Penicillium sp.*, para ello realizaron una fermentación sumergida a una temperatura de 30°C y agitación de 120 rpm durante 30 días. Se identificó la secreción de la enzima poliesterasa que fue la encargada de producir cambios en las películas de PET tanto en segmentos alifáticos como aromáticos, esto detectado a través de espectros FTIR. Los investigadores observaron que el hongo filamentoso creció sobre la superficie del PET

formando esporas y el crecimiento de las colonias se duplicó en el caso en el que el material se encontraba en polvo en comparación con el material en láminas [74].

En el año 2016, la universidad de la Sabana ubicada en Bogotá, Colombia, desarrolló un proyecto para la degradación del PET, para esto aislaron diferentes cepas de hongos de residuos agroindustriales de la sabana y evaluaron 7 cepas diferentes, obteniendo que la mayor actividad de cutinasa se logró a partir de la cepa H7 que corresponde al hongo filamentoso y mesófilo *Penicillium spp*, el cual tuvo una temperatura de crecimiento sobresaliente entre 20-30°C y un pH entre 7 y 9, estas condiciones determinadas a nivel de matraz [75]. En el mismo año, científicos japoneses descubrieron en botellas plásticas de rellenos sanitarios la bacteria *Ideonella sakaensis*, dicho microorganismo secreta dos enzimas, la PETasa y MHETasa, las cuales trabajan conjuntamente para llevar a cabo la degradación del PET, esto debido a que la enzima PETasa actúa sobre la superficie del polímero hidrolizando el enlace éster para que posteriormente la enzima MHETasa continúe con la descomposición y obtengan productos de degradación como el ácido tereftálico y etilenglicol, ambos monómeros básicos para producción de PET; se halló que el producto obtenido mayoritariamente es el ácido tereftálico [76].

Entre el año 2010 y 2020 el grupo de investigación de alimentos y biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México logró identificar cuatro cutinasas obtenidas a partir del hongo filamentoso *Aspergillus nidulans*, las cuales identificaron como ANCUT1, ANCUT2, ANCUT3 y ANCUT4, obtenida esta última en condiciones de estrés del microorganismo. Para el crecimiento del microorganismo se emplearon 3 medios diferentes, identificados como medio mínimo basado en Käffer, 1985 (compuesto por aminoácidos, sales minerales, elementos trazas y glucosa como fuente de carbono principal), medio optimizado para la expresión de cutinasas (medio mínimo complementado con extracto de levadura, glicerol y cutina) y medio MEHM modificado (medio mínimo complementado con extracto de levadura, sacarosa, y aceite de oliva), a una temperatura de 37°C, 300 rpm y un pH de 6.5, obteniéndose mayor expresión de cutinasas con el medio MEHM modificado [35], [49], [77], [78]. Las cutinasas obtenidas se han empleado en estudios para evaluar la degradación de diferentes poliésteres

sintéticos durante 4 semanas de incubación del extracto enzimático con estos polímeros. El porcentaje de degradación alusivo a cada tratamiento se presenta en la tabla 1-6.

Tabla 1-6 Degradación de diferentes poliésteres sintéticos empleando cutinasas obtenidas a partir de *A. nidulans*. Tomado de [77] [79].

Enzima	Peso molecular kDa		Poli (butilen tereftalato adipato) PBS	Poli (succinato de etileno) PES	Poli (caprolactona) PCL	Ácido Poli (L-láctico) PLLA	Poli (etilen tereftalato) PET
ANCUT1	24		50%	87.39%	47.25%	15.18%	0.29%
ANCUT2	33		2.02%	3.55%	8.75%	13.40%	1.10%
ANCUT3	29		27.31%	25.43%	60.75%	30.12%	49.69%
ANCUT4	27.8		3.38%	16.57%	29.89%	7.54%	30.32%

Con la motivación de encontrar microorganismos que pudieran degradar el PET de manera más eficiente, Farzi et al., 2019, realizaron fermentaciones en medio líquido empleando la especie de la bacteria *Streptomyces*, de las cuales obtuvieron una degradación máxima del 68% en 18 días, a una temperatura de 28°C y 120 rpm. Por otro lado, en la recuperación de los productos de degradación encontraron que los principales productos eran etilbenceno y hexametilclotrisiloxano. El primero debido al rompimiento de la cadena molecular de PET que contiene grupos aromáticos; el segundo como consecuencia de que el polímero de PET se llena con fibras de vidrio de borosilicato de clase E antes del moldeo por inyección para aumentar su temperatura de transición vítrea [80]. De este estudio se logró determinar además que el pretratamiento del PET antes de exponerlo ante el microorganismo juega un papel importante en la degradación, dado que la degradación del polímero cuando se trituró hasta un tamaño de partícula de 500 µm, fue del 49.2% en comparación con la de degradación del PET cuando su tamaño fue de 212 µm, la que correspondió al 68.8% [80].

En 2020, investigadores de la universidad de Toulouse y la empresa francesa Carbios reportaron el descubrimiento de una enzima PET-hidrolasa que logró el 90% de la despolimerización del PET en sus monómeros básicos en un tiempo de reacción de 10 horas luego de ser modificada y mejorada mediante ingeniería de enzimas, con una producción de 200 gramos por cada kilogramo de PET en suspensión y una concentración de enzima de 3 miligramos por cada gramo de PET [81]. La empresa Carbios pudo purificar los monómeros de ácido tereftálico para producir nuevamente botellas, lo cual cierra el ciclo de este producto, siendo un logro insignia en la transición a la economía circular.

En septiembre de 2021 se inauguró la planta de demostración industrial de la empresa Carbios, la cual opera en Clermont-Ferrand con el propósito de la validación del desempeño técnico, ambiental y económico del reciclaje enzimático de PET [82]. Como consecuencia del éxito de este piloto, en 2023 Carbios obtuvo la licencia de construcción y funcionamiento para la primera planta de reciclaje biológico de PET en Longlaville, Gran Este. Se proyecta su operación para el año 2025 con una capacidad de procesamiento de 50.000 toneladas de PET posconsumo al año, equivalente a 2000 millones de botellas de PET de colores [83].

1.5.2 Pretratamiento del PET

Se ha descubierto que el pretratamiento de tereftalato de polietileno tiene una fuerte incidencia en la degradación del polímero. En la tabla 1-7 se realiza un resumen de las estrategias de pretratamiento realizadas por diferentes autores con resultados positivos en la degradación del PET.

Tabla 1-7 Pretratamiento del PET para potenciar su degradación

Proceso	Descripción
Pulverización de las láminas de PET	Las láminas de PET se cortan mediante cuchillas para producir escamas que son incorporadas a un horno durante 30 min a una temperatura de 100°C, posteriormente se tritura y se tamiza en una malla de 1 mm. El PET pulverizado es lavado con Etanol al 70% y agua destilada. Encontraron que, a menor tamaño de partícula del PET, la interacción Sustrato-Enzima aumenta significativamente [74].
	Las láminas de PET son cortadas en pequeños trozos a los cuales son sumergidos en nitrógeno líquido. Posteriormente se muelen los trozos con una máquina de molienda con tamaño máximo de malla de 50 µm (Modelo ZM 200 Retsch, Alemania). Para lograr otros tamaños pequeños, el material se pasa por mallas 40 (420 µm), 50 (300 µm) y 70 (212 µm). Obtuvieron un porcentaje de degradación máxima de PET de 68,8% empleando un tamaño de partícula de 212 µm [80].
Corte en láminas de PET	El PET es secado al vacío durante 4 horas a 60°C, se cortan películas en tiras del tamaño de 40 mm x 10 mm, pesado, desinfectado al 70% alcohol isopropílico y lavado en agua destilada estéril [75].
Funcionalización de la superficie del PET con surfactante	Se incubó la película de PET de baja cristalinidad (IcPET) (3 a 5% de cristalinidad, 0,6 cm de diámetro, 200 µm de espesor) con 250 ppm de dodeciltrimetilamonio ($C_{12}-N(CH_3)_3^+$) durante 1 h antes de la adición de TfCut2 (concentración final 1 µM). La adsorción de la enzima en la película del PET aumenta debido a las interacciones electrostáticas de la película funcionalizada con la carga positiva del surfactante y la carga global negativa de la enzima [84].

<p>Empleo de hidrofobinas para aumentar el carácter hidrofílico del PET</p>	<p>Tanto la película de PET como el polvo de PET se lavan con SDS al 1% (dodecil sulfato de sodio), luego con etanol al 70% y finalmente con agua destilada durante 30 minutos en cada paso. Posteriormente se emplean hidrofobinas obtenidas del hongo filamentoso <i>Thermobifida fusca</i>, las cuales actúan sobre la superficie del PET favoreciendo la presencia de enlaces OH y debilita el enlace carbonilo y éster [85].</p> <p>El PET tratado con hidrofobina aumenta el número de moléculas de enzima PETasa por unidad de superficie de PET y, por lo tanto, exhibe un mayor porcentaje de hidrólisis.</p>
<p>Tratamiento térmico y radiación UV</p>	<p>Se cortan discos de polietileno, unos son esterilizados en autoclave, otros tratados con radiación UV y el restante son esterilizados por medio químico con etanol, hipoclorito de sodio y agua. Se inocula el medio con el hongo <i>Penicillium simplicissimum</i>. Los discos que se exponen a radiación UV son aquellos que tienen mayor porcentaje de degradación (38%), debido a la oxidación del polímero que trae consigo la generación de radicales libres y facilita el ataque enzimático [86].</p>

1.5.3 Recuperación del PET y productos de descomposición

El método de separación propuesto por diferentes autores para el PET residual que se encuentra en el medio de fermentación, y los metabolitos orgánicos (ácido tereftálico (TA), tereftalato de mono (2-hidroxietilo) (MHET), bis- (2-hidroxietilo) (BHET)), es la extracción con solvente orgánico; siendo el tolueno un solvente de desempeño sobresaliente dado su bajo consumo y alta solubilidad. El PET retenido en el filtro es secado en estufa durante 72 h a 70 °C con el fin de hallar el porcentaje de degradación por diferencia de peso entre la cantidad inicial del material suministrado al medio y la cantidad final que permanece como residuo [75], [80].

1.5.4 Métodos de identificación de la degradación del PET

En la investigación realizada por Brueckner et al, 2008, después de la descomposición del polímero, la subsecuente recuperación del PET no descompuesto y una filtración del medio de reacción, el líquido filtrado se procesó para analizarse mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa RP-C18 (Discovery1 HS-C18, 5mm, 150 mm, 4,6 mm). Esta técnica emplea acetonitrilo al 20%, ácido sulfúrico 10 mM al 20% y agua al 60% (v / v) como eluyente. Mediante esta técnica es posible identificar algunos monómeros y oligómeros producto de la biodegradación [87].

Un método alternativo y/o complementario de identificación de la degradación del PET corresponde a la técnica gravimétrica de peso seco, en la cual diversos autores describen que el PET inicial es pesado y el PET remanente en la degradación se seca para hallar su peso final [30], [77], [88]

Umamaheswari. et al, 2013, proponen emplear la microscopía electrónica de barrido (SEM) y el análisis de espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) con el propósito de determinar los cambios superficiales y estructurales del PET posterior al crecimiento de microorganismos sobre la superficie del PET en medio sólido [89].

1.6 Planteamiento del problema

1.6.1 Pregunta de investigación

¿Cómo se puede llevar a cabo la degradación del Tereftalato de Polietileno (PET) cuando se da la interacción entre el polímero y las cepas microbianas y/o extractos enzimáticos a unas condiciones de reacción a nivel de laboratorio?

1.6.2 Hipótesis

Bajo unas condiciones microbiológicas y fisicoquímicas apropiadas en la fermentación con cepas microbianas, se podrá evidenciar una notable concentración de biomasa y proporcionalmente la respectiva secreción de enzimas inducibles que hidrolicen el enlace éster del PET en sus monómeros constituyentes, etilenglicol y ácido tereftálico.

1.6.3 Objetivo general

Evaluar el efecto de emplear extractos enzimáticos y/o cepas microbianas sobre el Tereftalato de Polietileno (PET) con miras a su degradación en fermentaciones sumergidas.

1.6.4 Objetivos específicos

- Definir unas condiciones de operación para la producción de biomasa a escala de laboratorio tendiente a la producción de enzimas con actividad para degradar PET.
- Establecer unas condiciones fisicoquímicas y microbiológicas que favorezcan la producción de enzimas hidrolíticas degradadoras de PET.
- Evaluar la degradación del PET empleando extractos enzimáticos y/o cepas microbianas, a través de la cuantificación de pérdida de peso del material, productos de degradación y potenciales cambios en su morfología.

2. Metodología

La metodología empleada para alcanzar los objetivos específicos propuestos y el objetivo general del presente proyecto se detalla a continuación.

2.1 Objetivo específico 1.

Definir unas condiciones de operación para la producción de biomasa a escala de laboratorio tendiente a la producción de enzimas con actividad para degradar PET.

2.1.1 Activación de cepas microbianas.

La activación de las cepas microbianas se realizó en medio sólido empleando un medio enriquecido, temperatura y pH de acuerdo con las características de cada cepa.

- *Cepa de Penicillium spp.* El crecimiento de *Penicillium spp.* se lleva a cabo en el medio de cultivo sólido Agar Papa Dextrosa (PDA), el cual es recomendado para la detección y conteo de hongos y levadura [90], la temperatura de incubación fue aproximadamente 24°C durante 96 h.
- *Cepa de Streptomyces spp.* La activación del género *Streptomyces spp.* se realizó empleando el International *Streptomyces* Project-2 Medium (ISP-2), el cual es un medio enriquecido cuya composición en %p/v es 0.4% de extracto de levadura, 1% de extracto de malta, 0.4% de dextrosa, 2% de agar y el restante es agua [91]. La temperatura de incubación fue a 37°C durante 7 días.

- *Cepa de Aspergillus nidulans*. La cepa de *Aspergillus nidulans* creció en el medio mínimo basado en Käffer [78], cuya composición se presenta en la tabla 2-1.

Tabla 2-1 Medio de cultivo mínimo para *A. nidulans*

Componente	Concentración	Unidades
Sales 20X	50	mL/L
NaNO ₃	120	g/L
KCl	10.4	g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	10.4	g/L
KH ₂ PO ₄	30.4	g/L
Elementos traza	1	mL/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	22	g/L
H ₃ BO ₃	11	g/L
MnCl ₂ .4H ₂ O	5	g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	5	g/L
CoCl ₂ .5H ₂ O	1.6	g/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	1.6	g/L
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	1.1	g/L
NaEDTA	50	g/L
Aminoácidos		
Arginina	5	mL/L
Biotina	0.5	mL/L
Metionina	11	mg/L
Glucosa	10	g/L

Agar	20	g/L
------	----	-----

2.1.2 Diseño experimental a nivel de matraz enfocado en la producción de biomasa.

Las fermentaciones se realizaron para las cepas de *Penicillium spp.* y *Streptomyces spp.* de acuerdo con dos diseños experimentales factoriales aleatorizadas, formulados con el software estadístico Statgraphics ®. Estos experimentos constaron de dos niveles y tres factores, siendo factores el pH del medio, la concentración de la fuente de carbono y la temperatura de reacción, esto con el fin de cuantificar el efecto de estas variables sobre la producción de biomasa. El objetivo del diseño experimental fue encontrar las condiciones a las que se obtenía la mayor producción del microorganismo.

Para el caso de la cepa *A. nidulans* no se realizó este diseño experimental factorial ya que se emplearon las condiciones de crecimiento óptimo determinadas por [78] para esta especie.

- Diseño experimental para *Penicillium spp.*: El medio empleado para las fermentaciones sumergidas en matraz se presenta en la tabla 2-2 el cual está basado en [12], [59]. Los niveles de los factores evaluados se seleccionaron de acuerdo con las condiciones de crecimiento adecuadas para el género *Penicillium*, estos niveles se presentan en la tabla 2-3. La agitación del medio fue de 180 rpm, debido a la dinámica de los fluidos en matraz sin baffles descrita por [92]. Finalmente, el tiempo de fermentación se estableció evaluando el consumo de glucosa en el tiempo, hasta que su consumo fuera de al menos el 80% de la glucosa alimentada

Tabla 2-2 Composición medio de cultivo para *Penicillium spp.*

Sustancia	Concentración g/L
NaNO ₃	0.6
K ₂ HPO ₄	0.6

KH ₂ PO ₄ - pH 7.25	0.18
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.41
KCl	0.2
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.1
ZnSO ₄ . H ₂ O	0.07
CaCl ₂ .H ₂ O	0.023
(NH ₄) ₂ SO ₄	7
NaCl	0.1
Glucosa	10

Tabla 2-3 Factores y niveles del diseño experimental para *Penicillium spp.*

Factor	Nivel superior	Nivel inferior	Centro
Temperatura	30	20	25
pH	9	5.5	7.3
Concentración fuente de carbono	10	1	5.5

- Diseño experimental para *Streptomyces spp.*: El medio de cultivo usado en las fermentaciones líquidas se presenta en la tabla 2-4, el cual corresponde al medio mineral reportado por [88]. Los niveles de los factores evaluados se seleccionaron de acuerdo con las condiciones de crecimiento adecuadas para la cepa de *Streptomyces spp.*, estos niveles se presentan en la tabla 2-5. Al igual que en el caso de *Penicillium spp.*, la agitación del medio fue de 180 rpm. El tiempo de fermentación se estableció evaluando el consumo de glucosa en el tiempo, hasta que su consumo fuera de al menos el 80% de la glucosa alimentada.

Tabla 2-4 Composición del medio de cultivo para crecimiento de *Streptomyces spp.*

Sustancia	Concentración g/L
NH ₄ Cl	0.3
NaCl	0.15
KH ₂ PO ₄	0.9
Na ₂ HPO ₄	1.8
CaCl ₂ .H ₂ O	0.045
MgSO ₄	0.15
Glucosa	5

Tabla 2-5 Factores y niveles del diseño experimental para *Streptomyces spp.*

Factor	Nivel superior	Nivel inferior	Centro
Temperatura	30	25	27.5
pH	9	5.5	7.3
Concentración fuente de carbono	10	1	5.5

- Condiciones de producción de la especie *Aspergillus nidulans*: El medio de cultivo empleado para la producción de biomasa correspondió al medio mínimo presentado en la tabla 2-1, omitiendo el agar. El pH del medio se estableció en 6.5, la temperatura de incubación fue de 37°C, la agitación de 300 rpm y el tiempo de fermentación correspondió al establecido evaluando el consumo de glucosa en el tiempo, hasta que su consumo fuera de al menos el 80% de la glucosa alimentada
- Inóculo: Se inoculó cada matraz con una concentración inicial de 1×10^6 esporas/mL de cada microorganismo. Para el conteo se tomaron 990 μ L de agua desionizada y 10 μ L de una solución de esporas en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se

homogenizó la dilución y se añadió 20 μL en cada extremo de la cámara de Neubauer. Se empleó el objetivo 40X para realizar el conteo de los 5 cuadrantes.

- Cuantificación de biomasa por el método de peso seco: la separación de biomasa del medio líquido se llevó a cabo empleando un equipo de filtración al vacío y una membrana de nitrocelulosa Sartorius de tamaño de poro de 0.8 μm , la cual fue secada previamente durante 72 h a 70°C, incorporada en un desecador hasta que igualó la temperatura y pesada en una balanza analítica. La membrana con la biomasa retenida se secó y se pesó siguiendo el mismo procedimiento realizado para la membrana sin biomasa. Finalmente, se estableció la diferencia de peso y se halló la cantidad de biomasa producida por ensayo.
- Cuantificación de glucosa en los medios de fermentación: Se empleó el método DNS (Ácido 3,5-dinitrosalicílico) para la cuantificación glucosa al finalizar el tiempo establecido de fermentación, esto debido a que la glucosa fue el único azúcar añadido al medio formulado, por lo cual la determinación de azúcares reductores correspondió completamente a glucosa. Se empleó el espectrofotómetro UV-visible Genesys 20 configurado a una longitud de onda de 540 nm. La curva de calibración empleada comprendió valores de concentración entre 0.2 – 2 g/L de glucosa.

2.1.3 Fermentaciones realizadas en biorreactor de 7L

Posterior a la determinación de las condiciones adecuadas de crecimiento de la biomasa a nivel de matraz, se realizó la producción de biomasa por lote a estas condiciones en un biorreactor de 7 litros de capacidad y 3 litros de volumen de trabajo (Biostat® A Plus, Sartorius™, Goettingen, Alemania). La velocidad de agitación empleada inicialmente fue 500 rpm con el objetivo de reducir la formación de pellets de biomasa en la fermentación [93], no obstante, la velocidad de agitación establecida fueron 600 rpm, ya que ayudó a superar la baja disponibilidad de oxígeno disuelto en el medio de cultivo en el transcurso de la fermentación. El inóculo se preparó como en los ensayos llevados a cabo en matraz

y se alimentó al reactor mediante un sistema de bombeo en el tiempo cero de la fermentación. La concentración inicial de biomasa en el reactor fue 0.1 g/L. Durante el tiempo de la fermentación se tomaron muestras periódicas para evaluar la concentración de glucosa y biomasa en el medio para monitorear la evolución de la reacción en el tiempo. La cuantificación de biomasa y glucosa en el medio se realizó a través del método de peso seco y método de DNS, descritos con anterioridad.

2.2 Objetivo específico 2

Establecer condiciones fisicoquímicas y microbiológicas que favorezcan la producción de enzimas hidrolíticas degradadoras de PET

2.2.1 Evaluación de la producción de proteína y actividad esterasa empleando diferentes fuentes de carbono.

A las condiciones y medios de producción de biomasa establecidos para los 3 microorganismos (*Penicillium spp.*, *Aspergillus nidulans* y *Streptomyces spp.*) se evaluó el efecto de la variación de la fuente de carbono en la producción de proteína con actividad esterasa. Para ello se emplearon únicas fuentes de carbono, o mezclas de ellas, como se presenta en la tabla 2-6. En los casos en el que se empleó una fuente de carbono única, su concentración fue de 10 g/L, mientras que en los casos en los que se emplearon combinaciones de fuentes de carbono, la concentración inicial del primer sustrato fue de 10 g/L, y el de la segunda fuente de carbono fue 5 g/L, la cual se añadió a las 48 horas de reacción en el caso de *Penicillium spp.* y *Streptomyces spp.*, y a las 24 horas de reacción en el caso de *Aspergillus nidulans*. La selección de las fuentes de carbono se realizó considerando la capacidad de crecimiento de los microorganismos en glucosa y el posible efecto de inducción del aceite de linaza y el PET en la producción de las enzimas serin-hidrolasas. En el caso del PET se empleó una concentración de 0.9 g/L como consecuencia de la posible inhibición enzimática debido al aumento de la concentración del polímero en el medio de reacción [88].

Tabla 2-6 Combinación de fuentes de carbono empleadas

Fuente de Carbono
Glucosa
Glucosa + A. Linaza
Glucosa + A. Linaza + PET
A. Linaza + PET
PET

2.2.2 Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína en los sobrenadantes se realizó por el método de BCA (ácido bicinconínico) ajustado a microplaca con volumen final de reacción de 225 μL . Se emplearon 25 μL de muestra y 200 μL de solución de trabajo (kit BCA-RAC Assay Thermofisher). Se incubó durante 30 min a 37°C y la coloración generada se cuantificó a través del espectrofotómetro iMark™ Microplate Absorbance Reader, configurado a una longitud de onda 562 nm. La concentración de proteína se obtuvo mediante la curva patrón realizada con albúmina, sérica de bovino (BSA).

2.2.3 Cuantificación de la actividad enzimática esterasa

La actividad esterasa se determinó de manera cuantitativa empleando como sustrato el p-nitrofenil butirato (p-NPB) 1mM. Adicionalmente, se empleó el buffer Tris-HCl 50 mM a pH 7, el cual se utiliza además como blanco. A cada pozo se añadió 170 μL de buffer, 10 μL de sobrenadante y 20 μL de p-NPB, para un volumen de reacción de 200 μL . La cinética de la reacción fue evaluada durante 10 min con registro de lectura cada minuto. La coloración del medio se cuantificó empleando el espectrofotómetro iMark™ Microplate Absorbance Reader, configurado a una longitud de onda de 420 nm [77]. La actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que catalizó la conversión de 1 μmol de sustrato por minuto.

2.2.4 Electroforesis de medios de extractos enzimáticos

Los SDS-PAGE se llevó a cabo en geles de acrilamida al 14%, de acuerdo con [94]. Las muestras fueron diluidas en una solución buffer de muestras desnaturizante 4X con β -MercaptoEtanol y calentada a 95°C durante 5 minutos antes de cargarse en el gel. El peso molecular de las bandas se determinó comparando su movilidad en el gel con la del estándar de bajo peso molecular (Precision Plus Protein™ Dual Xtra) que contiene una mezcla de 12 proteínas recombinantes (2-250 kDa). Los geles fueron corridos en cámaras MiniProtean II empleando un buffer de corrida 1X a un voltaje constante de 80 V durante 30 minutos, y posteriormente se incrementó a 120 V. Las proteínas en el gel se observaron a través de la tinción con azul coomasie.

2.2.5 Evaluación de la actividad enzimática esterasa mediante zimografía

Los SDS-PAGE se llevó a cabo en geles de acrilamida al 14%, de acuerdo con [94]. Las muestras fueron diluidas en una solución buffer de muestras 4X no desnaturizando (sin β -MercaptoEtanol). El peso molecular de las bandas se determinó comparando su movilidad en el gel con la del estándar de bajo peso molecular (Precision Plus Protein™ Dual Xtra) que contiene una mezcla de 12 proteínas recombinantes (2-250 kDa). Los geles fueron corridos en cámaras MiniProtean II empleando un buffer de corrida 1X a un voltaje constante de 80 V durante 30 minutos, y posteriormente se incrementó a 120 V

La actividad tipo esterasa fue detectada empleando el acetato de α -naftilo como sustrato y el Fast Red como revelador de esta actividad. El gel se incubó a 37°C con la mezcla de reacción hasta la aparición de bandas de color que varían entre café y rojo [49].

2.2.6 Diseño experimental factorial

Se realizó un diseño experimental factorial centrado en la cara para el microorganismo que presentó mayor concentración de proteína y actividad enzimática a las condiciones de

reacción evaluadas. Este diseño constó de 2 niveles y 2 factores (ver tabla 2-7). Las variables de respuesta fueron la concentración de proteína producida y la actividad enzimática para cada ensayo, cuantificadas con la metodología descrita con anterioridad.

Tabla 2-7 Factores y niveles diseño experimental para evaluación de producción de proteína cutinasa

Factor	Nivel superior	Nivel inferior	Centro
Concentración de A. Linaza (Inductor)	5	0.5	2.8
Concentración fuente de carbono	10	1	5.5

2.2.7 Producción de la enzima en biorreactor de 7 L

A las condiciones de fermentación establecidas mediante el diseño experimental a nivel de reactor con propósitos de obtención de proteína, se evaluó la concentración de enzima y su actividad en un biorreactor de 7 litros de capacidad y 3 litros de volumen de trabajo (Biostat® A Plus, Sartorius™, Goettingen, Alemania). Se realizó la cuantificación de proteína y su actividad enzimática en las diferentes muestras tomadas en el tiempo de reacción.

2.2.8 Concentración del extracto enzimático obtenido en biorreactor

El medio de cultivo fue filtrado al vacío empleando filtros de nitrocelulosa de 0.2 µm de tamaño de poro (Sartorius™). Posteriormente se empleó la unidad de ultrafiltración Vivaflow 200 Sartorius™, con una membrana de celulosa regenerada modificada de 30.000 MWCO PES y área activa de 200 cm².

2.3 Objetivo específico 3

Evaluar la degradación del PET empleando extractos enzimáticos y/o cepas microbianas, a través de la cuantificación de pérdida de peso del material, productos de degradación y potenciales cambios en su morfología.

2.3.1 Selección del material PET a descomponer

Se seleccionó el material proveniente de botellas comerciales de PET con menor grado de cristalinidad, por lo cual se evaluó botellas de la marca Brisa, Cristal y Manantial. La cristalinidad se determinó a través de calorimetría diferencial de barrido (DSC), empleando el equipo DSC 250 Discovery DSC Series, y realizando el siguiente procedimiento [95]:

- Se generó una atmósfera libre de oxígeno empleando nitrógeno como gas inerte
- Se pesó una cantidad conocida de muestra y se colocó en un crisol de DSC.
- Se calentó la muestra a una velocidad controlada de 10 °C/min hasta una temperatura de 300°C.
- Se registró la curva DSC, que muestra la diferencia de temperatura entre la muestra y el material de referencia.

La altura del pico de fusión de la curva DSC es proporcional al grado de cristalinidad de la muestra. Por lo tanto, para determinar el grado de cristalinidad se utilizó la ecuación (2.1):

$$\%Cristalinidad = \left(\frac{\Delta H_m - \Delta H_c}{H_{m0}} \right) * 100 \quad (2.1)$$

En donde:

H_m es el calor de fusión de la muestra en J/g

H_{m0} es el calor de fusión de la muestra totalmente cristalina (140.1 J/g para el PET)

H_c es el calor de cristalización en frío del material en J/g.

2.3.2 Evaluación de la degradación del PET en matraz

A las condiciones de biorreacción en las que se favoreció la producción de enzima y su actividad hidrolítica se realizaron los ensayos a nivel de matraz con el fin de evaluar el grado de descomposición del polímero. Se propusieron dos formas de exposición del material a la enzima; la primera correspondió a la incorporación de láminas de PET al inicio de la fermentación de la cepa microbiana, es decir, que el PET estuviera en el medio de cultivo durante el crecimiento del microorganismo y en la secreción de la enzima. El segundo método correspondió a la recuperación y concentración de la enzima para posteriormente exponer el material polimérico solo a la acción del extracto enzimático, a condiciones de temperatura, pH y agitación definidas.

2.3.3 Identificación de los productos de degradación

La identificación se realizó mediante la técnica de cromatografía líquida HPLC de fase reversa empleando el equipo HPLC Agilent 1100 series con detector UV/VIS y una columna C18 Phenomenex (150 mm, 4.6 mm, 5 μ m). El volumen de inyección fue de 10 μ L, flujo de 0.5 mL/min, fase móvil 80% ácido fórmico (0.1% (v/v)) 20% acetonitrilo y λ = 240 nm. Para la construcción de la curva de calibración del ácido tereftálico (TPA) se solubilizó este compuesto en una solución al 50% (v/v) de acetonitrilo-agua. El tiempo de retención de este metabolito a las condiciones mencionadas fue de aproximadamente 9.6 min.

2.3.4 Evaluación de la degradación del PET en el tiempo en tubos de ensayo empleando extracto enzimático

Para llevar a cabo la evaluación de la degradación del PET tanto a nivel de tubos de ensayo y biorreactor en el tiempo se tuvo en cuenta la actividad específica de la proteína en el extracto enzimático obtenido en la fermentación de *Aspergillus nidulans* en biorreactor, la cual correspondió a 0.38 U/ μ g. Adicionalmente se consideró el empleo del buffer Tris-HCl 0.1 M pH 9 como medio de reacción, debido a la estabilidad que proporciona a esta [96].

El Medio de reacción estuvo compuesto por 4 mL de extracto (150 U, 385 µg proteína), 2 mL de solución buffer y aproximadamente 0.04 g de PET en películas de 0.5 cm de tamaño. La evaluación de la degradación del PET a la hora 24, 48, 96 y 144 se realizó mediante la cuantificación del ácido tereftálico empleando la técnica de HPLC de fase reversa, así mismo se determinó la pérdida de peso del material mediante el método de peso de peso seco.

2.3.5 Evaluación de la degradación del PET en biorreactor

Una vez se definió el mejor método de exposición del material a la enzima a nivel de matraz, se realizó la evaluación de la descomposición del material en el biorreactor. La evaluación se realizó a la hora 24, 28, 96 y 144 de exposición del material al medio de reacción. Este medio de reacción estuvo compuesto por 50 mL de extracto (1815 U, 4813 µg proteína), 1.95 L de solución buffer tris-HCl pH 9 y aproximadamente 2 g de PET en películas de 0.5 cm de tamaño. Como en los experimentos realizados en tubos de ensayo, se empleó la técnica de HPLC de fase reversa como método de cuantificación del TPA como indicador de la degradación, así como la pérdida de peso del material mediante el método de peso seco.

2.3.6 Pretratamientos del PET para promover la degradación

Se evaluaron los siguientes pretratamientos del PET en tubos de ensayo durante 144 horas con el fin de identificar su efecto en la degradación tras la exposición del material al medio de reacción. Se emplearon 2 medios de reacción, el primero compuesto por 4 mL de extracto enzimático + 2 mL buffer Tris-HCl pH 9, y el segundo compuesto únicamente por 4 mL de extracto enzimático.

- **Tamaño de partícula:** Se empleó PET en diferentes tamaños comprendidos entre láminas de 0.5 cm hasta partículas de 177 µm (malla # 80). El PET de menor tamaño de partícula se obtuvo a partir de la reducción del tamaño en láminas de 0.5 cm y posterior empleo del molino de cuchillas IKA® MF10 basic. El producto de la molienda se tamizó empleando mallas # 35, 40, 70 y 80.

- Térmico: El PET se calentó en estufa hasta su temperatura de transición vítrea (76°C). El tiempo de exposición a esta temperatura fue de 3 horas.
- Funcionalización del material: Se buscó cargar positivamente el polímero para favorecer las interacciones electrostáticas con el polímero, por lo cual se incubó la película de PET con 250 ppm de dodeciltrimetilamonio ($C_{12}-N(CH_3)_3^+$) durante 1 h antes de la exposición del material al medio de degradación.

2.3.7 Evaluación de cambios morfológicos del PET tras su exposición a extractos enzimáticos.

La evaluación de los cambios morfológicos en el PET expuesto al extracto enzimático se realizó mediante la técnica de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier de reflexión total atenuada (ATR-FTIR), empleando el equipo Spectrum 3 FT-IR/NIR de la marca PerkinElmer. El análisis se realizó en un rango de número de onda entre 450 y 4000 cm^{-1} en el eje X, y una transmitancia entre 0 y 100% en el eje Y. Se empleó ART-FTIR ya que permite la recopilación rápida, estable y robusta de muestras con estructuras finas superficiales [97].

Adicionalmente, los resultados obtenidos a partir de la técnica ATR-FTIR fueron complementados con la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC), empleando el equipo, procedimiento y condición de operación descrito en la sección 2.3.1.

3. Resultados y discusión

El objetivo general de esta investigación fue evaluar el efecto de los extractos enzimáticos y/o las cepas microbianas sobre la degradación del Tereftalato de Polietileno (PET) en fermentaciones sumergidas. Para ello, se utilizó la metodología expuesta con anterioridad. A continuación, se presentan los resultados más relevantes y la discusión en torno a ellos.

3.1 Tiempos de fermentación de las cepas microbianas

3.1.1 *Penicillium spp.*

Se procedió a la evaluación de la producción de biomasa del hongo *Penicillium spp.*, así como a su consumo de glucosa en un medio de cultivo, con la variación de los tiempos de reacción a un pH de 7.2, condiciones controladas de temperatura (24 °C) y velocidad de agitación (180 rpm). Los resultados obtenidos de estas fermentaciones se detallan en la tabla 3-1.

Tabla 3-1 Resultados de fermentaciones líquidas de *Penicillium spp* a diferentes tiempos de fermentación

Tiempo de fermentación (h)	Concentración Inicial de Glucosa (g/L)	Concentración Glucosa Final (g/L)	Glucosa consumida (g/L)	% Glucosa Consumida	Biomasa producida (g/L)	*Y _{sx}
48	10	3.2 ± 0.2	6.8 ± 0.2	68%	2.1 ± 0.1	0.29 ± 0.02
96	10	1.7 ± 0.4	8.2 ± 0.4	83%	3.6 ± 0.1	0.43 ± 0.02
120	10	1.1 ± 0.1	8.8 ± 0.1	89%	3.9 ± 0.1	0.44 ± 0.01

Nota: Valores promedio ± desviación estándar de tres réplicas.

* Se halla propagación del error de los tratamientos

A las 48 horas de iniciada la fermentación, se evidenció que el consumo de glucosa en el medio alcanzó el 68 % del azúcar inicialmente añadido. En este punto, la producción de biomasa fue de 2.05 g/L, y el rendimiento obtenido fue del 29 %.

Después de transcurrir 48 horas adicionales, el consumo de glucosa aumentó al 83 %. Simultáneamente, la producción de biomasa experimentó un incremento significativo, alcanzando los 3.6 g/L, con un rendimiento del 43 %. Al llegar a las 120 horas de fermentación, se determinó que el microorganismo logró consumir casi el 90 % de la glucosa inicial en el medio. A pesar de un modesto aumento en la biomasa a 3.9 g/L, el rendimiento se mantuvo en un 44 %.

Se observó que el cambio en la biomasa y el rendimiento entre los tiempos de fermentación de 96 horas y 120 horas no mostró diferencias significativas. Sin embargo, prolongar la fermentación durante 24 horas adicionales implicaría un consumo adicional de recursos. Considerando este hecho y el objetivo de alcanzar al menos un 80 % de consumo de la glucosa inicial, se concluye que el tiempo de fermentación óptimo es de 96 horas.

Al comparar los resultados de rendimiento del microorganismo a las 96 y 120 horas de fermentación, se constató que estos se aproximan a los reportados en la literatura para esta cepa. Dichos resultados están dentro del rango de 0,5 a 0,6 g de biomasa por cada gramo de glucosa consumida, utilizando la solución de sales minerales Czapek como medio de cultivo [98]. Es importante señalar que este valor puede variar según las condiciones de aireación, pH, temperatura, especie, entre otros factores.



Imagen 3-1. Fermentaciones líquidas *Penicillium spp* y cuantificación de glucosa

3.1.2 *Streptomyces spp.*

Se llevó a cabo la evaluación del crecimiento y consumo de glucosa para la bacteria *Streptomyces spp* durante un intervalo de 0 a 192 horas de fermentación. Las condiciones controladas incluyeron una temperatura de 25 °C, una velocidad de agitación de 180 rpm y un pH de 7.5. Se destacó que el máximo consumo de glucosa se registró a las 192 horas, alcanzando un 42 % de la cantidad inicialmente añadida al medio. La biomasa generada en este periodo fue de 0.98 g/L, con un rendimiento del 23.4 %.

Al comparar estos resultados con la información disponible en la literatura, específicamente para la especie *Streptomyces griseus*, se observa que, bajo condiciones de pH básico y después de las 96 horas de fermentación, el rendimiento en la producción de micelios en relación con la glucosa consumida se sitúa alrededor del 25 %. Aunque la cepa de *Streptomyces spp.* empleada no fue identificada, se puede inferir que los rendimientos obtenidos se asemejan a los reportados por distintos autores en fermentaciones similares, considerando las variaciones en los medios de cultivo formulados, condiciones de pH, agitación, tiempo de fermentación, entre otros [99].

Basándonos en estos hallazgos, se tomó la decisión de establecer un tiempo de fermentación de 192 horas para la cepa *Streptomyces spp*, con la particularidad de reducir la concentración de glucosa añadida a 5 g/L. Este enfoque busca optimizar las condiciones de cultivo y ajustar los sustratos para potenciar la producción de biomasa en concordancia con los rendimientos observados.

Tabla 3-2 Resultados de fermentaciones líquidas de *Streptomyces spp.* a diferentes tiempos de reacción

Tiempo de fermentación (h)	Concentración Inicial de Glucosa (g/L)	Concentración Glucosa Final (g/L)	Glucosa consumida (g/L)	% Glucosa Consumida	Biomasa producida (g/L)	Y_{SX}^*
96	10.00	8.9 ± 0.2	1.11 ± 0.2	11%	0.179 ± 0.005	0.16 ± 0.03
**120	10.00	8.0 ± 0.1	2.03 ± 0.1	20%	0.36 ± 0.02	0.18 ± 0.01
**144	10.00	7.0 ± 0.1	3.05 ± 0.1	30%	0.86 ± 0.01	0.28 ± 0.01
192	10.00	5.82 ± 0.07	4.18 ± 0.07	42%	0.98 ± 0.02	0.23 ± 0.01

Nota: Valores promedio ± desviación estándar de tres réplicas.

* Se estima propagación del error de los tratamientos

** Se realizan 2 réplicas

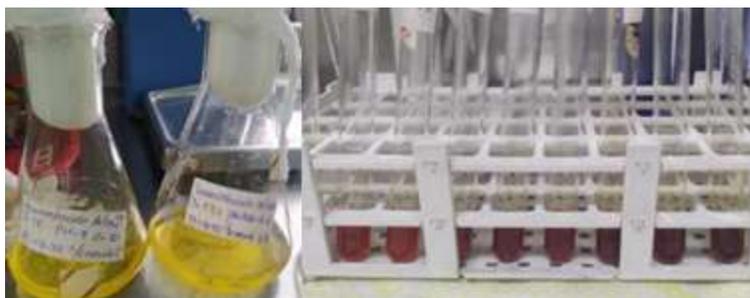


Imagen 3-2. Fermentaciones líquidas *Streptomyces spp.* y cuantificación de glucosa

3.1.3 *Aspergillus nidulans*

Se procedió a evaluar el crecimiento del hongo filamentoso *Aspergillus nidulans* en un periodo de 12 a 72 horas de fermentación, abordando un rango de tiempo menor en comparación con las cepas de *Penicillium spp.* y *Streptomyces spp.* Esta elección se justifica con base en informes que indican que *A. nidulans* presenta una capacidad metabólica destacada para la rápida metabolización de la glucosa, lo cual se traduce en un crecimiento más pronunciado en un lapso más breve [100].

La fermentación se llevó a cabo a una temperatura de incubación de 37°C, utilizando un medio de cultivo mínimo basado en Käffer [78]. Los resultados detallados de las fermentaciones se presentan en la tabla 3-3. A las 12 horas de iniciada la fermentación, se logró un consumo del 41% de la glucosa inicialmente adicionada al medio de cultivo, con una producción de biomasa de 1.3 g/L. Al llegar a las 48 horas, se evidenció un consumo del 91% de la glucosa del medio, acompañado por una producción de biomasa de 3.2 g/L. Finalmente, a las 72 horas, se identificó el agotamiento completo de la glucosa en el medio, con una producción final de biomasa de 3.4 g/L. Es relevante destacar que los rendimientos de las fermentaciones en los distintos tiempos de reacción fueron cercanos, manteniendo una relación constante entre la biomasa producida y la glucosa consumida.

Adicionalmente, se observó que la producción de biomasa entre las horas 48 y 72 solo experimentó un incremento del 7%. Considerando esta ligera variación y con el objetivo de optimizar recursos, se decidió establecer un tiempo de fermentación de 48 horas para *A. nidulans* en los diseños experimentales subsiguientes. Este enfoque busca equilibrar la eficiencia temporal con la producción sostenible de biomasa en condiciones controladas.

Tabla 3-3 Resultados de fermentaciones líquidas de *Aspergillus nidulans* empleando diferentes tiempos de reacción

Tiempo de fermentación (h)	Concentración Inicial de Glucosa (g/L)	Concentración Glucosa Final (g/L)	Glucosa consumida (g/L)	% Glucosa Consumida	Biomasa producida (g/L)	Y_{SX}^*
12	10.00	5.89 ± 0.03	4.11 ± 0.03	41%	1.26 ± 0.01	0.308 ± 0.003
24	10.00	2.00 ± 0.05	8.00 ± 0.05	80%	2.56 ± 0.01	0.321 ± 0.002
48	10.00	0.91 ± 0.01	9.09 ± 0.01	91%	3.152 ± 0.002	0.346 ± 0.001
72	10.00	0.668 ± 0.005	10.000 ± 0.005	100%	3.44 ± 0.01	0.352 ± 0.001

Nota: Valores promedio ± desviación estándar de tres réplicas.

* Se halla propagación del error de los tratamientos



Imagen 3-3. Fermentaciones líquidas *Aspergillus nidulans* y cuantificación de glucosa

En términos generales, se observa que el hongo *Penicillium spp*, con un tiempo de fermentación de 96 horas y un consumo de glucosa de 8.3 g/L, exhibe una producción de biomasa significativamente superior (3.6 g/L) y un rendimiento biomasa-sustrato del 43%, en comparación con los dos microorganismos adicionales evaluados. Este resultado sugiere una eficiencia destacada en la utilización de sustrato y una capacidad robusta de generación de biomasa por parte de *Penicillium spp* en el contexto de las condiciones experimentales establecidas.

Por otro lado, la evaluación de la eficiencia de las fermentaciones en términos de productividad (g/L-h) mostró que, para el tiempo total de fermentación de cada microorganismo, *Penicillium spp*, *Streptomyces spp* y *A. nidulans* alcanzaron valores de productividad de 0.033, 0.005 y 0.047, respectivamente. Por lo tanto, *A. nidulans* es el microorganismo que produce mayor biomasa en menor tiempo, utilizando la misma concentración de glucosa inicial en el medio de crecimiento. Además, la comparación de los valores de productividad en los tiempos en los que el rendimiento no cambia significativamente para los tres microorganismos (96 h para *Penicillium spp*, 144 h para *Streptomyces spp*, y 48 h para *A. nidulans*) muestra que la diferencia de productividad se incrementa, siendo de 0.038 g/L-h para *Penicillium spp.*, 0.006 g/L-h para *Streptomyces spp.* y 0.066 g/L-h para *A. nidulans*.

3.2 Reducción del tamaño de formación de aglomerados del hongo *Penicillium spp.*

En las fases iniciales de las fermentaciones líquidas del hongo *Penicillium spp.*, se observó la formación de pellets de biomasa con un diámetro aproximado de 1 centímetro (ver imagen 3-4). Este fenómeno evidenció la presencia de heterogeneidad en el medio, generando dificultades en la obtención de nutrientes y oxígeno por parte del microorganismo, lo que impacta directamente en la productividad de este [58]. Además de afectar la productividad, el tamaño de los pellets generados complica la toma y procesamiento de muestras, así como la inoculación en el biorreactor, ya que los inóculos se desarrollan en medios líquidos en matraces. Ante esta situación, fue necesario buscar e implementar estrategias con el objetivo de minimizar el diámetro de los pellets o prevenir su formación.

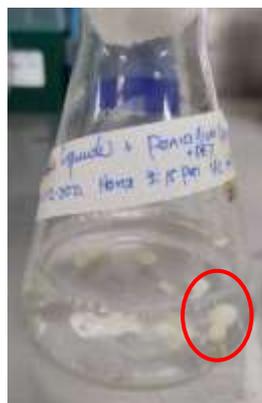


Imagen 3-4. Fermentación líquida en matraz del hongo *Penicillium spp*

Según las referencias [58], [59], la morfología de hongos filamentosos, como *Penicillium spp.*, permite la reducción en la formación y diámetro de los pellets de biomasa mediante estrategias que involucran variaciones en el pH, la concentración de NaCl y la presencia de elementos traza en el medio de cultivo.

En la tabla 3-4 se presenta el diseño experimental factorial, que consta de tres factores y dos niveles centrados en el cubo. Los factores considerados son el pH, la concentración de NaCl y la presencia de elementos traza en el medio. Este enfoque experimental tiene

como objetivo evaluar de manera sistemática el impacto de estos factores en la morfología de la biomasa producida por *Penicillium spp.*, con el propósito de optimizar las condiciones de cultivo y minimizar la formación de pellets.

Tabla 3-4 Factores y variables del diseño experimental para reducción de tamaños de pellets de biomasa

Factor	Nivel bajo	Nivel alto
pH	6.8	8.2
NaCl [g/L]	0	0.2
E. Traza [mL/L]	0	5
Variables de respuesta	Objetivo	
Biomasa [g/L]	Maximizar	
Diámetro Pellet [mm]	Minimizar	
Rendimiento [Y _{sx}]	Maximizar	

Los resultados obtenidos para cada una de las variables de respuesta se presentan a continuación.

3.2.1 Biomasa producida

La figura 3-1 presenta un diagrama de Pareto para la producción de biomasa, permitiendo identificar el impacto de la variación de cada uno de los factores evaluados en el crecimiento del hongo *Penicillium spp.* Se destaca que el incremento en la concentración de la sal NaCl y el aumento del pH del medio de cultivo en el rango considerado ejercen un efecto negativo en la biomasa obtenida en los tratamientos. En contraste, la adición y/o aumento de elementos traza en el medio parece tener un efecto positivo, resultando en una mayor producción de biomasa en comparación con los casos en los que estos componentes no están presentes.

Adicionalmente, el diagrama de Pareto revela el efecto de las interacciones entre los factores evaluados. Se observa que aumentar la concentración de NaCl y elementos traza de manera conjunta contribuye al aumento de la biomasa obtenida. De manera similar, se sugiere que aumentar la concentración de NaCl junto con el pH del medio, o incrementar

el pH simultáneamente con la concentración de elementos traza, resulta en un aumento en la producción de biomasa. Estos hallazgos proporcionan valiosa información sobre las relaciones complejas entre los factores evaluados y sus efectos combinados en la producción de biomasa de *Penicillium spp.*, facilitando así la optimización de las condiciones de cultivo.

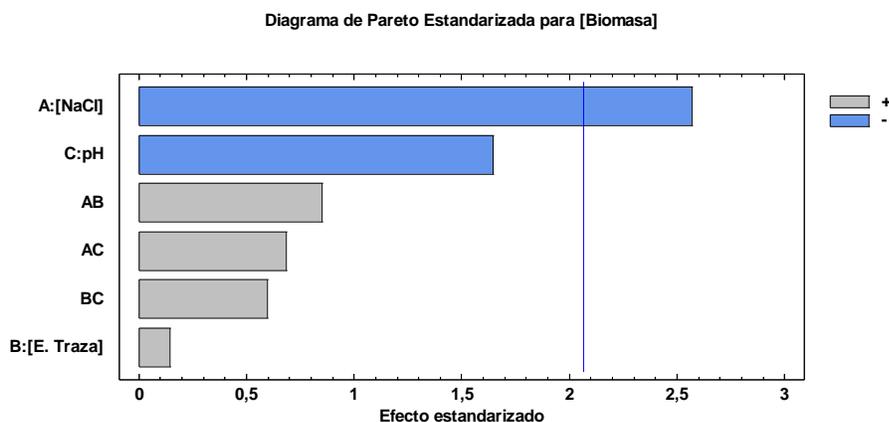


Figura 3-1 Diagrama de Pareto para la producción de biomasa – Experimento de reducción de pellets de *Penicillium spp.*

En la figura 3-2 se presentan los efectos principales en la producción de *Penicillium spp.*, proporcionando una información complementaria al diagrama de Pareto. Se confirma con una pendiente pronunciada que el aumento de la concentración de NaCl conlleva a una reducción significativa en la concentración de biomasa. Asimismo, se observa que, al incrementar el pH, la disminución en la biomasa es menos pronunciada en comparación con la variación en NaCl. Por último, aunque el aumento de la concentración de elementos traza en el medio está asociado con un incremento en la producción de biomasa, la variación en esta no es estadísticamente significativa, evidenciándose en una baja pendiente de la recta que se aproxima a cero.

Es importante destacar que la máxima producción de biomasa (3.8 g/L) se alcanzó en el punto central del diseño experimental, donde las condiciones correspondieron a un pH de 7.5, con concentraciones de NaCl y elementos traza de 0.1 g/L y 0.25 mL/L, respectivamente.

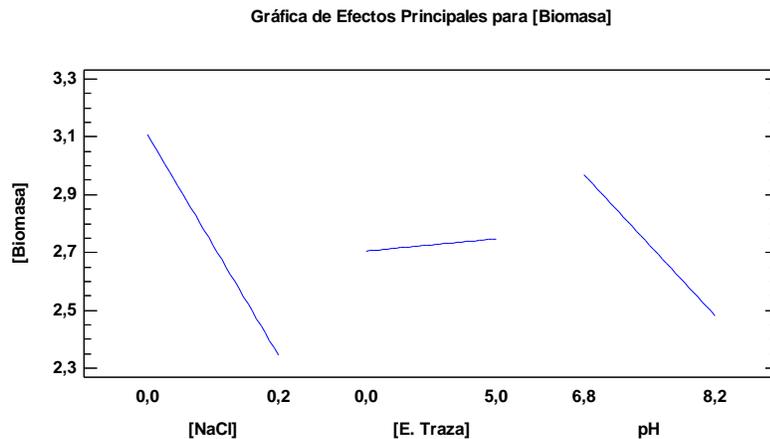


Figura 3-2 Gráfica de efectos principales para biomasa – Experimento de reducción de pellets de *Penicillium spp.*

3.2.2 Diámetro de aglomerados de biomasa

La evaluación del diámetro de los pellets de biomasa se llevó a cabo utilizando un vernier de alta precisión (1/10 mm). En la imagen 3-5 se presentan los aglomerados de biomasa formados, y en las figuras 3-3 y 3-4 se evidencia el efecto de los factores en esta variable.



Imagen 3-5. Resultado de los tratamientos para la reducción de tamaño de Pellet de *Penicillium spp.*

Con un valor p experimental menor a 0.05, se observa que el efecto del pH en el diámetro de los aglomerados de biomasa tiene un impacto negativo; es decir, el diámetro se ve significativamente reducido al aumentar el pH del medio de fermentación. De manera similar, el aumento de la concentración de NaCl, o el aumento conjunto de esta sal y el pH del medio, resulta en la reducción del tamaño de los pellets de biomasa.

Aunque el aumento de la concentración de elementos traza incrementa la producción de biomasa, lo cual es de interés para la investigación, también conlleva al aumento del diámetro de los pellets de biomasa. Este efecto contradice el objetivo del diseño experimental, ya que obstaculiza la reducción del tamaño de los aglomerados de biomasa.

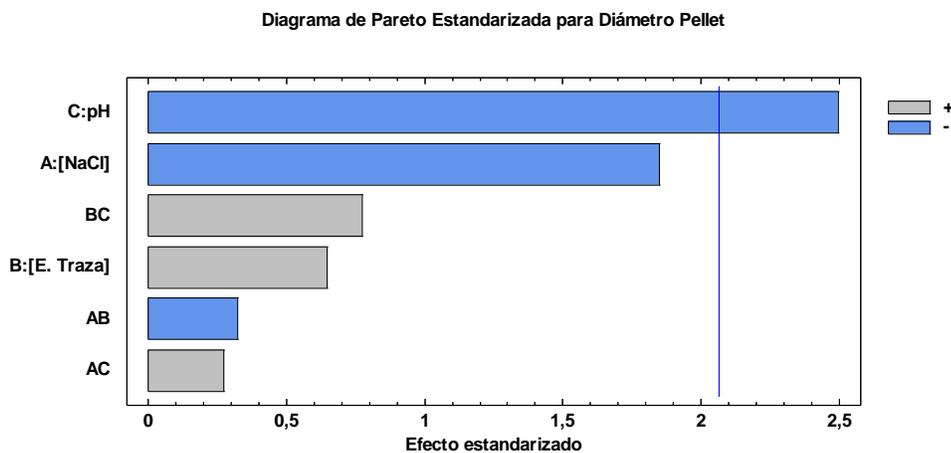


Figura 3-3 Diagrama de Pareto para el diámetro de pellets de biomasa – Experimento de reducción de pellets de *Penicillium spp*

En la gráfica de efectos principales, se confirma que la variable que tiene un mayor impacto negativo en el diámetro del pellet es el pH, ya que la pendiente es negativa y de mayor pronunciación en comparación con las demás variables. La segunda variable con mayor impacto es la concentración de NaCl y, finalmente, la presencia de elementos traza a diferentes concentraciones.

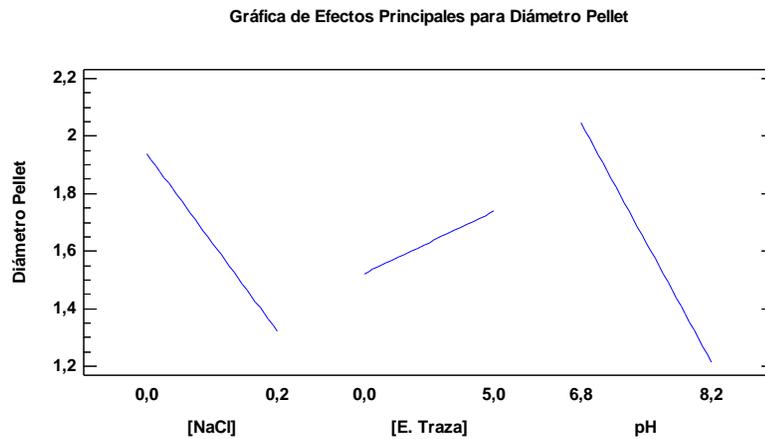


Figura 3-4 Gráfica de efectos principales del diámetro de pellets de biomasa – Experimento de reducción de pellets de *Penicillium spp.*

En todos los tratamientos evaluados se observó la presencia de esferas de biomasa, evidenciando la falta de homogeneidad en los medios. Esta heterogeneidad es inherente al crecimiento del hongo filamentoso *Penicillium spp.*, que, de acuerdo con [58], [59], ocurre de manera no coagulativa. Según estas fuentes, una sola espora tiene la capacidad de formar un pellet de biomasa, lo que implica que la reducción del tamaño de estos aglomerados es la única modificación posible.

El aumento del pH del medio de cultivo muestra un efecto significativo en el diámetro de los aglomerados. Experimentalmente se ha comprobado que la carga global de los filamentos de los hongos es parcialmente negativa. Por lo tanto, cuando el microorganismo crece en un ambiente de cargas negativas, se produce una repulsión electrostática que no inhibe el crecimiento del microorganismo, pero sí evita la interacción de los elementos hifales [58].

En el caso del aumento de la concentración de NaCl, se informa que, al incrementar la presión osmótica en el medio de fermentación, se produce un choque osmótico que resulta en la ruptura de los aglomerados de biomasa existentes [58], [101]

En términos de reducción del tamaño del pellet, las condiciones óptimas fueron a una concentración de 0.2 g/L de NaCl, pH 8.2 y en ausencia de elementos traza, logrando un diámetro de 0.4 mm. Sin embargo, estas condiciones también condujeron a la producción más baja de biomasa (1.7 g/L). Por otro lado, las condiciones que generaron un diámetro de pellet mayor (2.7 mm) fueron en el punto medio de los niveles de las variables evaluadas (0.1 g/L de NaCl, 2.5 ml/L de elementos traza, pH 7.5), donde además se obtuvo una mayor producción de biomasa, como se mencionó anteriormente.

3.2.3 Rendimiento biomasa – glucosa

Con base en las figuras 3-5 y 3-6 se puede identificar que las mayores producciones de biomasa con un menor requerimiento de glucosa se logran al aumentar el pH de la solución, con baja concentración de NaCl y con la presencia de una solución de elementos traza. De manera similar, el incremento conjunto del pH y la concentración de NaCl tiene un impacto positivo en el rendimiento biomasa-sustrato de la fermentación. En contraste, el aumento único de la concentración de NaCl provoca que el microorganismo consuma una mayor cantidad de glucosa para la producción de biomasa.

El rendimiento se ve ligeramente afectado por la variación única de los elementos traza, lo que sugiere que su adición por sí sola no es determinante en el estudio de esta variable de respuesta. Sin embargo, la interacción del pH y los elementos traza provoca que los aumentos en estas variables conlleven a un aumento en el rendimiento biomasa-glucosa.

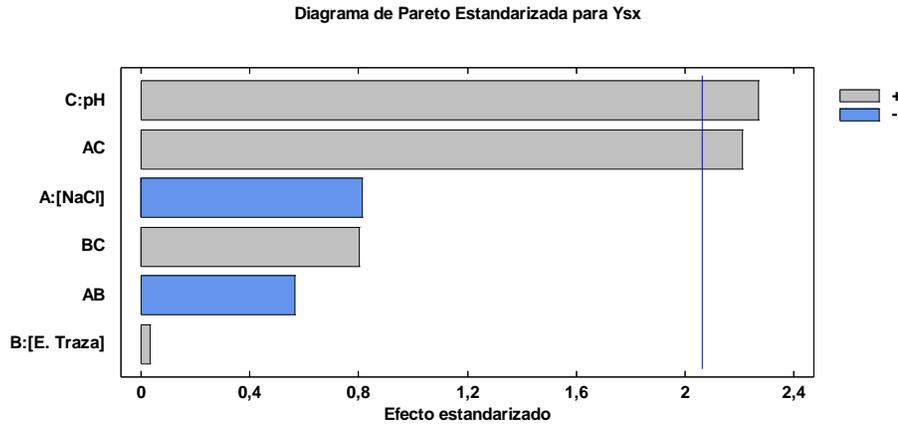


Figura 3-5 Diagrama de Pareto para el rendimiento – Experimento de reducción de pellets de *Penicillium spp.*

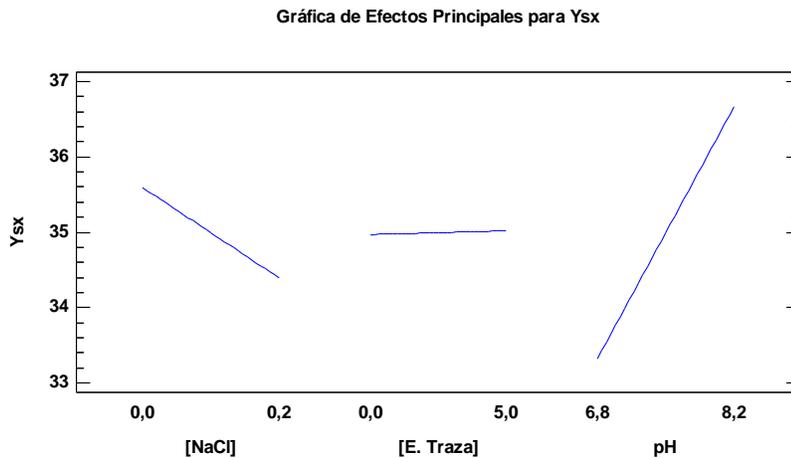


Figura 3-6 . Gráfica de efectos principales para el rendimiento – Experimento de reducción de pellets de *Penicillium spp.*

El mayor rendimiento alcanzado fue 39.4% a un pH de 7.5, con concentraciones de elementos traza y NaCl de 2.5 ml/L y 0.1 g/L, respectivamente. Al evaluar variables de respuesta como biomasa producida, diámetro de pellet y rendimiento biomasa-glucosa durante la fermentación, se observó que en general niveles elevados de pH, NaCl y elementos traza resultaron en un diámetro mínimo, aunque con una producción de biomasa reducida. En contraste, niveles intermedios de estas variables condujeron al

rendimiento máximo, la mayor producción de biomasa y un diámetro de pellet de aproximadamente 2.7 mm, el más grande entre los tratamientos evaluados.

Dado que el diámetro de 2.7 mm representa aproximadamente $\frac{1}{4}$ del diámetro inicialmente observado (10 mm) sin modificaciones en el medio, se establecieron como condiciones para futuras fermentaciones un pH de 7.5 y concentraciones de 0.1 g/L y 2.5 mL/L para NaCl y elementos traza, respectivamente.

En el caso del hongo filamentoso *A. nidulans*, la velocidad de agitación se fijó en 300 rpm. Aunque según [102] una agitación superior a 180 rpm en matraces sin baffles no afecta la mezcla, sí incrementa la aireación del sistema, desalentando la aglomeración de *A. nidulans* durante su crecimiento [103], [104]. Se informa que el crecimiento óptimo de este microorganismo se sitúa entre 200 rpm y 300 rpm. Basándonos en esta información y en el estudio de Llano, 2018, se adoptó una velocidad de agitación de 300 rpm. La evaluación de esta agitación reveló que el tamaño de los pellets es similar al observado para *Penicillium spp* bajo las condiciones de pH 7.2, y concentración de elementos traza y NaCl de 2.5 mL/L y 0.1 g/L, respectivamente, el cuál fue 2.7 mm.

En el crecimiento de *Streptomyces spp* bajo las condiciones evaluadas, no se observó la formación de pellets de un tamaño que dificultara la manipulación del microorganismo, por lo que no fue necesario implementar estrategias para reducir el tamaño de los conglomerados de biomasa.

3.3 Condiciones de fermentación para producción de biomasa a nivel de matraz

Con el propósito de cumplir con el primer objetivo de esta investigación, que se centra en identificar condiciones de fermentación que optimicen la producción de biomasa a nivel de

matraz para *Streptomyces spp* y *Penicillium spp*, se llevaron a cabo los diseños experimentales descritos en la metodología. Además, en el caso específico de *Penicillium spp*, se consideraron el pH, la concentración de elementos traza y la concentración de NaCl determinados en los experimentos destinados a la reducción de diámetros de pellets de biomasa.

3.3.1 *Penicillium spp*.

Diseño factorial 2²

En este diseño experimental factorial en el que se evaluaron la concentración de fuente de carbono y la temperatura del sistema, se encontró que ambos factores tienen un efecto significativo positivo en la biomasa producida. En particular, se observó que la biomasa aumentaba aproximadamente lineal en el rango evaluado con la concentración de fuente de carbono y con la temperatura del sistema.

Estos resultados sugieren que la biomasa producida puede aumentarse mediante el incremento de la concentración de fuente de carbono o la temperatura del sistema, dentro del rango de valores evaluados.

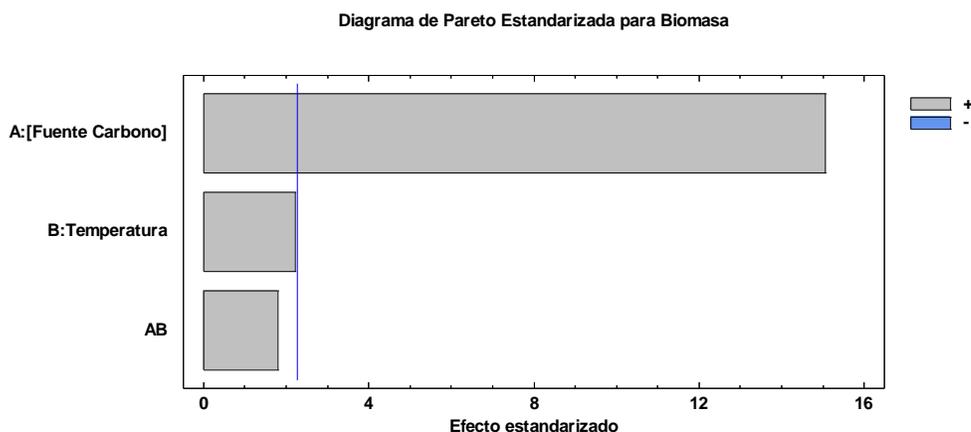


Figura 3-7 Diagrama de Pareto del crecimiento del hongo *Penicillium spp*

Al analizar la gráfica de efectos principales representada en la figura 3-8, se destaca que la fuente de carbono exhibe una pendiente positiva más pronunciada, lo que sugiere su influencia significativa y robusta en la producción de biomasa. En cuanto a la temperatura, se observa que, aunque su efecto es positivo en el rango de 20° a 30°C evaluado, su impacto en la biomasa es relativamente menor en comparación con las variaciones en la concentración de la fuente de carbono.

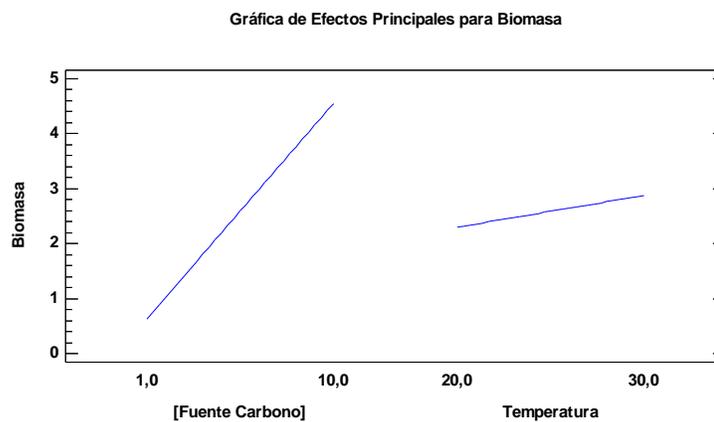


Figura 3-8 Gráfica de efectos principales del crecimiento del hongo *Penicillium spp*

A partir de este diseño experimental factorial, se estableció inicialmente como la condición más favorable para la producción de biomasa en los rangos evaluados, una temperatura de fermentación de 30 °C y una concentración de glucosa de 10 g/L. En estas condiciones, se obtuvo una concentración de biomasa promedio de 5.1 g/L, con una significancia estadística mayor al 95%.

Superficie de respuesta

Si bien se realizó un diseño experimental factorial de forma exploratoria, los diseños experimentales de superficie de respuesta tienen un mayor potencial para proporcionar estimaciones de parámetros más precisas y requerir menos esfuerzo experimental debido a las combinaciones exploradas entre los niveles de las variables [105]. Esto permitió comparar las condiciones de operación seleccionadas previamente con el diseño experimental factorial, además de identificar si existen cambios de pendiente en el comportamiento de las variables y valores más favorables de las mismas.

Como resultado del diseño experimental Box-Behnken se confirmó en este rango de valores una estrecha relación entre la producción de biomasa, el aumento de la temperatura y concentración de glucosa en el medio. Asimismo, con base en el gráfico de efectos principales de la figura 3-9, se evidenció que hay un mayor impacto en la biomasa producida al aplicar cambios de la concentración de la fuente de carbono en relación con los cambios en la temperatura del sistema.

En la figura 3-10 se observa una reducción de la pendiente de la producción de biomasa con respecto a la concentración de glucosa cuando esta es mayor a 7 g/L. Al respecto, Santos (1997) encontró que, a altas concentraciones de glucosa en el medio, el crecimiento de *Penicillium spp* puede inhibirse debido a la represión catabólica de las betaglucanasas [106].

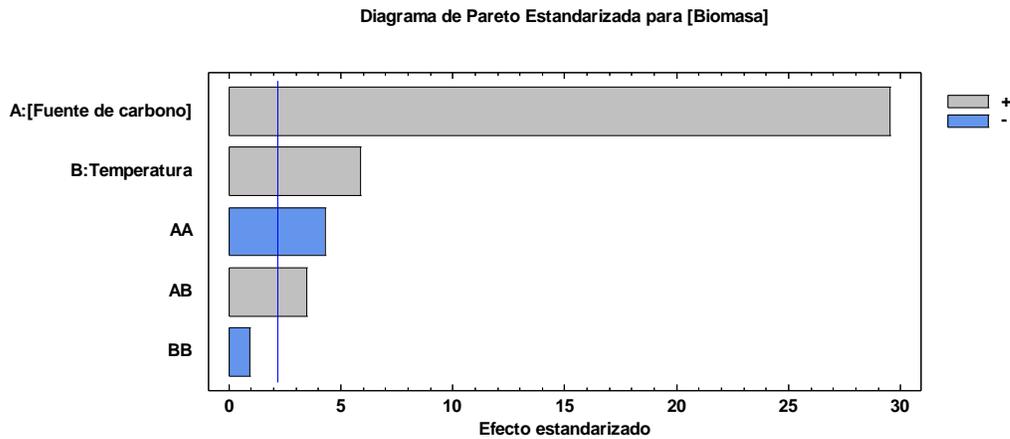


Figura 3-9 Diagrama de Pareto para la biomasa (*Penicillium spp*) – Diseño Box-Behnken

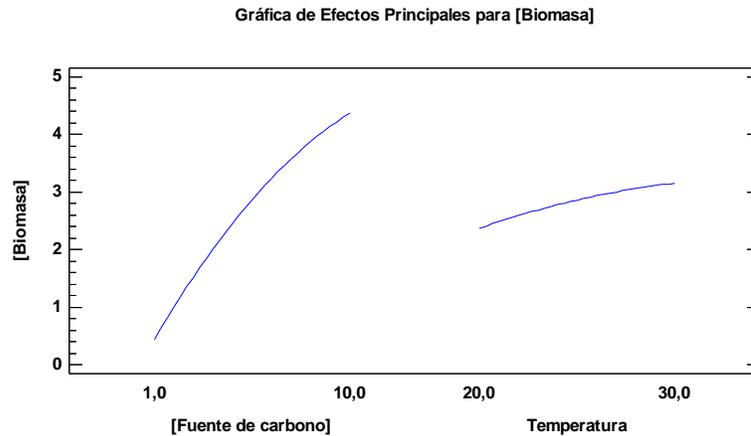


Figura 3-10 Gráfico de efectos principales para la biomasa (*Penicillium spp*) – Diseño Box-Behnken

En la figura 3-10, se observa que la producción de biomasa aumenta con tendencia aproximadamente lineal con la temperatura y la concentración de glucosa. Sin embargo, el efecto de la concentración de glucosa es más pronunciado que el de la temperatura. Esto se debe a que la glucosa es la fuente de carbono para el crecimiento de *Penicillium spp.*, por lo que una mayor concentración de glucosa proporciona más nutrientes para el crecimiento del hongo.

Las condiciones óptimas para la producción de biomasa se encuentran en el punto más alto de la superficie de respuesta, que de acuerdo con las figuras 3-11, este punto corresponde a una temperatura de 30°C y una concentración de glucosa de 10g/L. En estas condiciones, se obtiene una producción de biomasa de 5 g/L en 96 horas de fermentación.

Estos resultados sugieren que la temperatura y la concentración de glucosa son factores importantes que deben controlarse para maximizar la producción de biomasa de *Penicillium spp.*

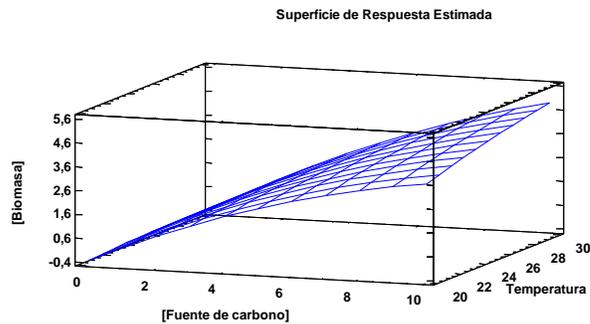


Figura 3-11 Superficie de respuesta para la biomasa (*Penicillium spp*) – Diseño Box-Behnken

3.3.2 *Streptomyces spp.*

Diseño factorial 3²

En este diseño experimental se evaluaron el pH, la concentración de glucosa y la temperatura, tal como se describió en la metodología. A diferencia del hongo *Penicillium spp*, en este caso el pH se estableció como factor ya que este no fue una restricción que favoreciera la morfología del microorganismo.

De acuerdo con la figura 3-12 se evidenció que los efectos evaluados tuvieron impacto positivo en la producción del microorganismo, significativamente estadístico para el caso del pH y la glucosa. En particular, se encontró que la concentración de glucosa tiene un efecto positivo más pronunciado que la temperatura y pH del medio, con una pendiente de 0.22 g biomasa/g glucosa frente a 0.015 g/L/°C y 0.14 g/L/pH, respectivamente (ver figura 3-13).

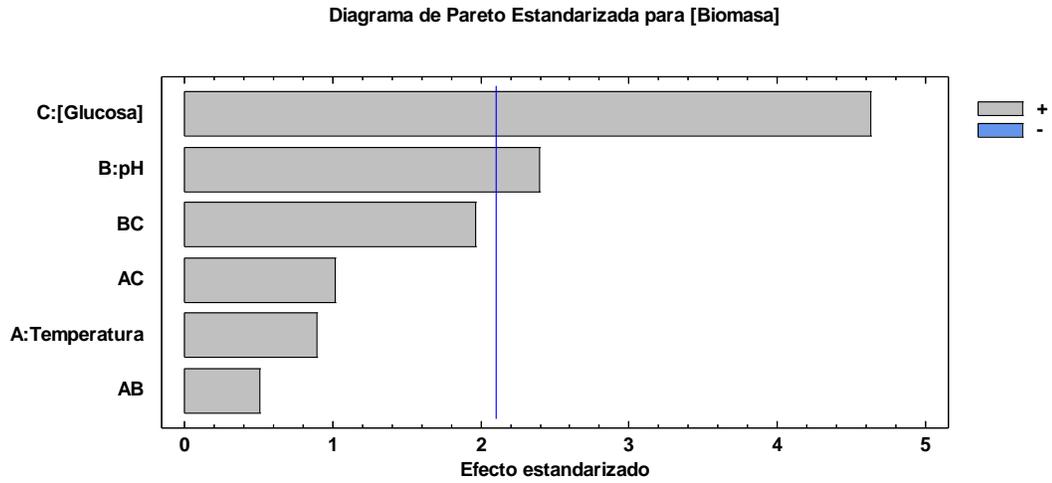


Figura 3-12. Diagrama de Pareto del crecimiento de la bacteria *Streptomyces* spp.

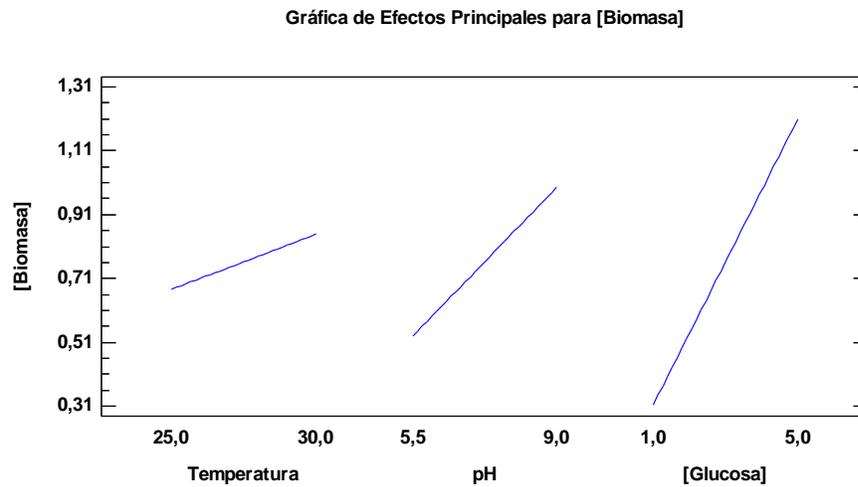


Figura 3-13. Gráfico de efectos principales del crecimiento de la bacteria *Streptomyces* spp.

Del diseño experimental factorial se determinó que la mayor producción de biomasa (2.1 g/L) en un tiempo de fermentación de 192 horas se logró a una temperatura de 30°C, pH de 9, y concentración de glucosa de 5.0 g/L.

Superficie de respuesta

En el estudio realizado para evaluar el efecto de los factores pH, temperatura y concentración de glucosa en el crecimiento de la bacteria *Streptomyces* spp, se utilizó el diseño Box-Behnken. Los resultados mostraron que, con una significancia mayor al 95%, los tres factores estudiados tuvieron un efecto positivo en la producción del microorganismo.

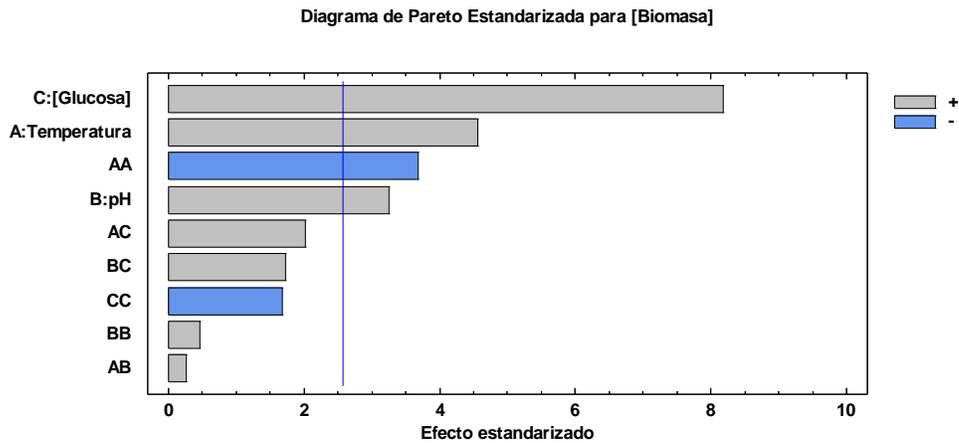


Figura 3-14 Diagrama de Pareto para la biomasa (*Streptomyces* spp) – Diseño Box-Behnken

En la figura 3-15 se observa que la biomasa producida por la bacteria *Streptomyces* spp aumenta inicialmente al aumentar la temperatura del sistema de 25 °C a 30 °C. Sin embargo, se observa un cambio de la pendiente alrededor de los 28 °C, en donde la biomasa producida disminuye hasta los 30 °C. Este comportamiento sugiere que la temperatura óptima para el crecimiento de la bacteria es de aproximadamente 29 °C.

La biomasa producida por la bacteria *Streptomyces* spp aumenta con tendencia exponencial al aumentar el pH del medio de cultivo. Con respecto a esto, diferentes investigaciones han demostrado que la actividad enzimática de *Streptomyces* spp. puede inhibirse a pH ácido. Beynon (1981) encontró que los inhibidores de proteinasa de *Streptomyces* se degradan a pH neutro o alcalino, lo que sugiere una vulnerabilidad potencial a condiciones ácidas [107].

La glucosa es el factor que tiene el mayor efecto en el crecimiento de la bacteria *Streptomyces* spp. A concentraciones más altas de glucosa, la biomasa producida por la bacteria aumenta con tendencia aproximadamente lineal con pendiente de alrededor de 0.4 g biomasa/g sustrato.

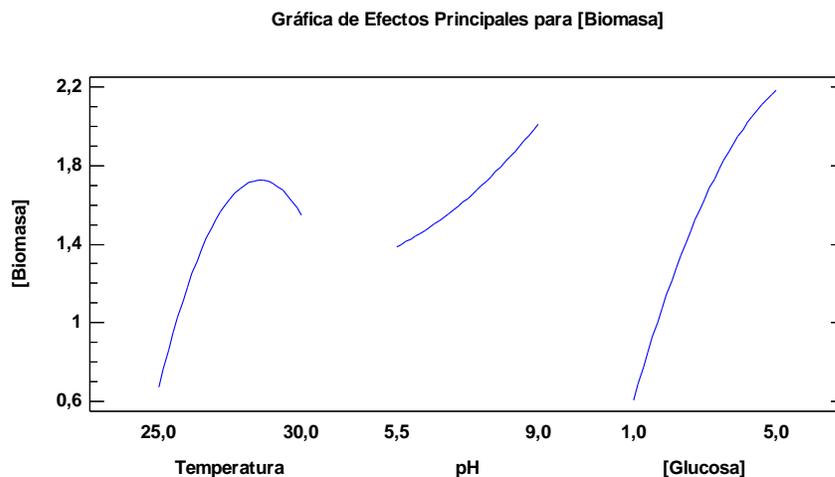


Figura 3-15 Gráfico de efectos principales para la biomasa (*Streptomyces* spp) – Diseño Box-Behnken

Finalmente, la gráfica de la superficie de respuesta presentada en la figura 3-16 muestra que la mayor producción de biomasa (2.8 g/L) se produce a 29 °C, pH 9 y 5 g/L de glucosa en el medio.

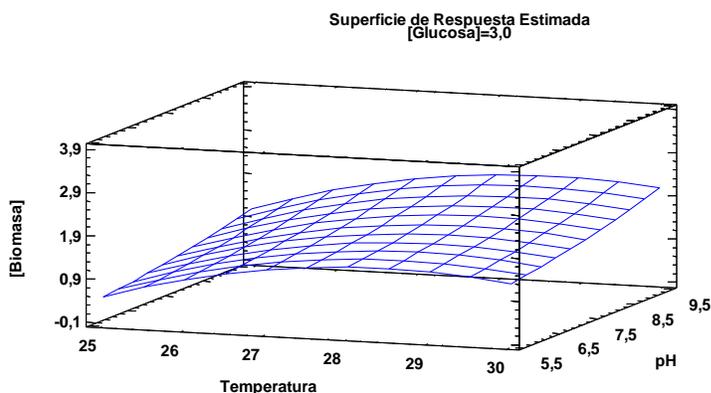


Figura 3-16 Superficie de respuesta para la producción de biomasa (*Streptomyces spp.*) – Diseño Box-Behnken

En el caso del hongo *Aspergillus nidulans*, las condiciones óptimas de crecimiento se establecieron con base en la literatura, sin necesidad de realizar un diseño experimental. Estas condiciones son una temperatura de 37°C y un pH de 6.8 [35], [49], [78].

3.4 Producción de biomasa en biorreactor de 7 litros.

Una vez evaluadas y seleccionadas las condiciones favorables para la producción de biomasa en matraces, se llevó a cabo el crecimiento a nivel de biorreactor con el fin de evaluar la producción en un entorno en el que se tiene mayor control de las variables de biorreacción, como el pH del medio, el oxígeno disuelto, la agitación, la temperatura y la producción de espuma.

A continuación, se presenta el desempeño de cada una de las cepas microbianas en las fermentaciones en operación por lotes en reactor de 7 litros con volumen de trabajo de 3 litros.

3.4.1 *Penicillium spp.*

En la figura 3-17 se presentan las curvas de desempeño de la fermentación del hongo *Penicillium spp.* El pH del medio de reacción se mantuvo controlado en aproximadamente 7.5. Se observa que, transcurridas las 56 horas de fermentación, la pendiente de descenso del oxígeno disuelto en el medio (%pO₂) incrementa, al igual que la cantidad de hidróxido de sodio (3M) añadido para mantener el pH en el valor deseado. La concentración inicial de glucosa fue de 8.2 g/L posterior al ajuste inicial de pH y adición de antiespumante, y a la hora 56 correspondió a 6.6 g/L. La adición de base al medio se realizó de manera lineal como producto de la actividad metabólica hasta la hora 126, momento en el que la curva de %pO₂ detuvo su decrecimiento en un punto de inflexión para luego incrementar. En ese momento la concentración de glucosa era de 1.23 g/L, es decir, el 85 % se había consumido. Se puede decir que durante la hora 56 y 126 de la fermentación ocurrió la fase exponencial del crecimiento de la biomasa.

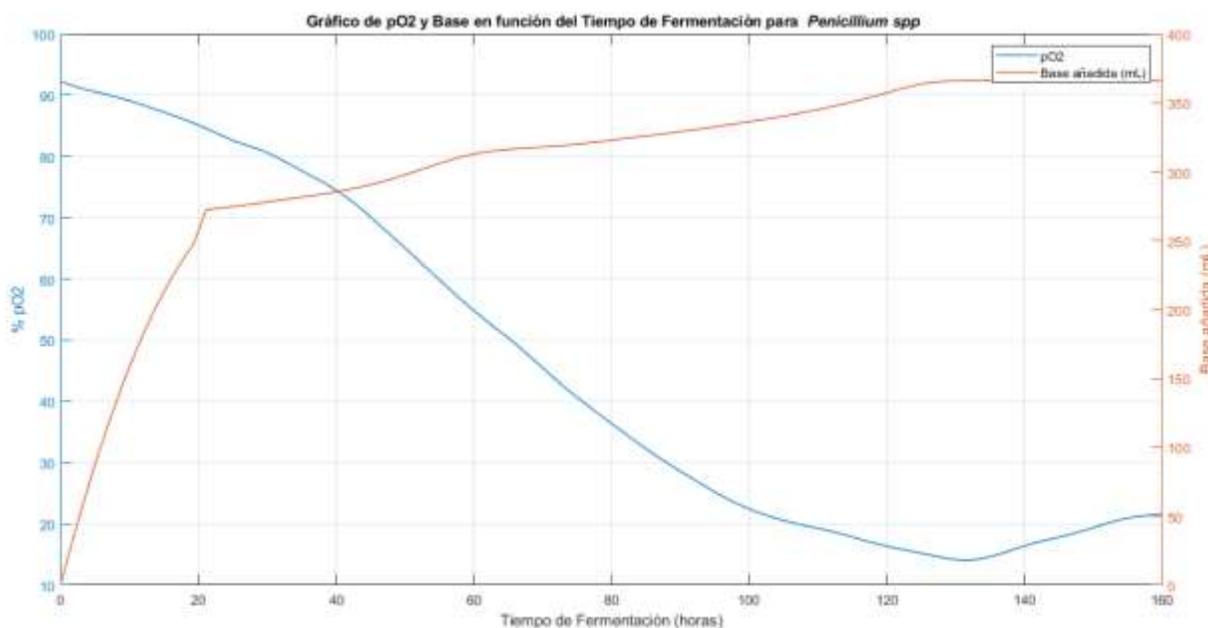


Figura 3-17 Curvas de %pO₂(azul), mL NaOH (rojo) en fermentación por lotes de *Penicillium spp.*

El incremento del oxígeno disuelto en el medio puede deberse a que la demanda de oxígeno por parte del microorganismo se redujo por pasar a la fase de estacionaria, y posteriormente a la muerte celular.

Finalmente, a la hora 158 de iniciada la fermentación, la glucosa presente fue de 0.24 g/L, es decir, el 97 % de la glucosa inicial ya había sido consumida por el microorganismo. En este momento se finalizó la fermentación, en donde se cuantificó una concentración final de biomasa en el biorreactor de 3.2 g/L \pm 0.1. Durante la fermentación se validó la inocuidad del reactor con respecto a bacterias o microorganismos diferentes a *Penicillium spp.* (ver imagen 6)

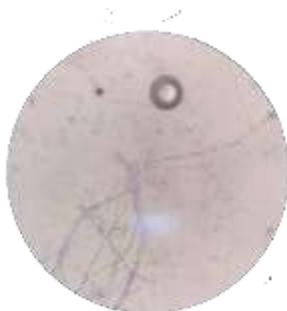


Imagen 3-6. Tinción del medio de fermentación de *Penicillium spp.*

El crecimiento de *Penicillium spp.* como hongo filamentoso presentó dificultades en el biorreactor con respecto a la formación de aglomerados de biomasa, que, si bien se había superado a nivel de matraz a las condiciones de operación y reacción replicadas en el biorreactor, se observó crecimiento del microorganismo de manera aglomerada en la superficie, sensores y paredes del biorreactor. Esta situación impidió tomar muestras de biomasa durante el tiempo de fermentación, por lo que solo fue posible hacerlo al final del proceso.

El crecimiento de los hongos filamentosos de forma aglomerada conlleva a problemas de transferencia de masa, momentum y calor, que se traducen en una menor productividad del microorganismo [58], [101]. La velocidad de agitación en el reactor fue de 500 rpm, por lo que aumentar las revoluciones por minuto del agitador podría ocasionar lisis celular; con base en las estrategias de cambio de morfología reportadas en [108] y el efecto hallado de la variable pH en el diámetro de los pellets a nivel de matraz, se modificó la condición de pH del crecimiento del hongo a un valor de 8.8. El comportamiento de la fermentación a esta nueva condición de pH se presenta en la figura 3-18.

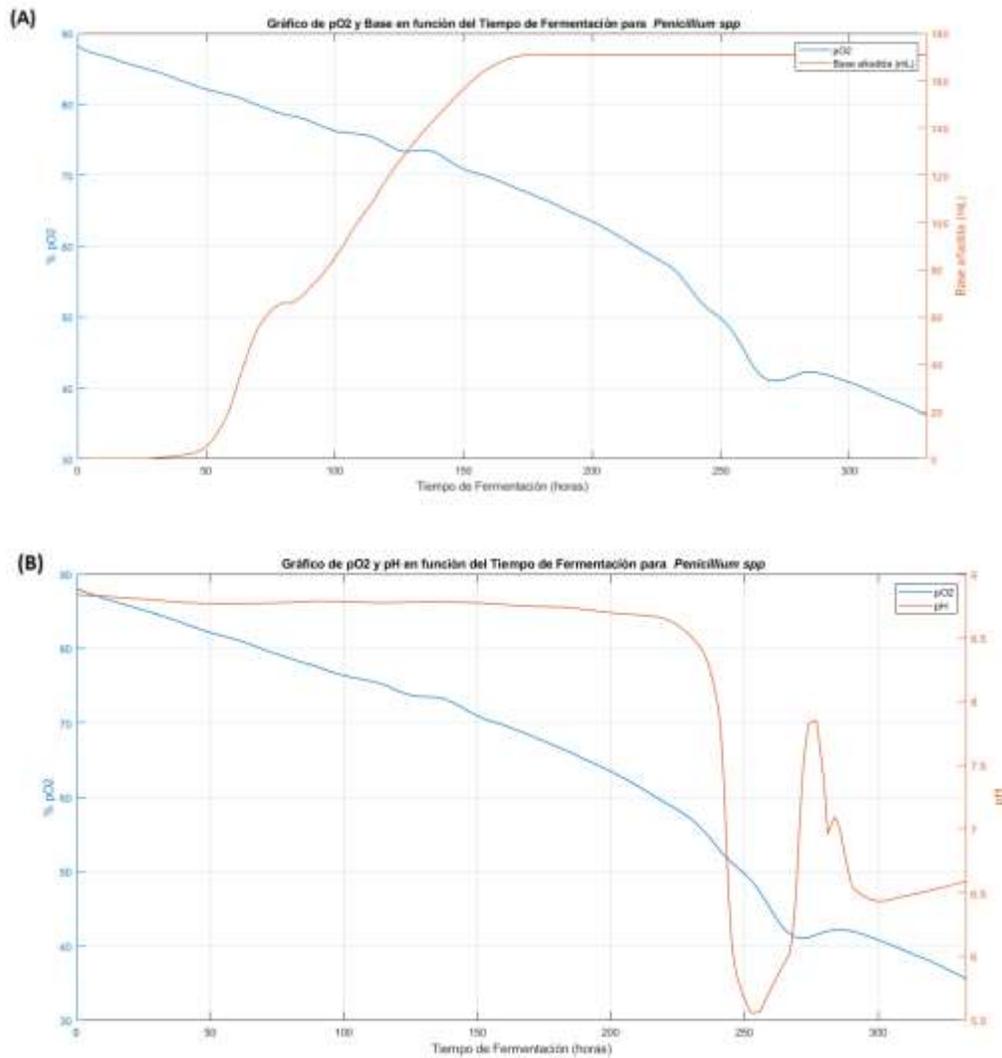


Figura 3-18 (A) Curvas de %pO₂ - mL NaOH. (B) Curvas de %pO₂ -pH en fermentación por lotes de *Penicillium* spp – reducción aglomerados biomasa

La concentración inicial de glucosa fue de 8.6 g/L. A las 56 horas de iniciada la fermentación, la concentración de glucosa se había reducido a 8.46 g/L, lo que indica una baja actividad metabólica del microorganismo [109]. Esto podría deberse a una fase de adaptación del microorganismo al medio de crecimiento. Además, el medio se estaba acidificando, lo que requirió la adición de NaOH para mantener el pH en el punto de ajuste. A las 134 horas, la concentración de glucosa se había reducido a 8.45 g/L, lo que indicaba que el microorganismo no estaba consumiendo la glucosa como fuente de carbono. Como el único factor que se había alterado con respecto a la fermentación inicial fue el pH, se decidió suspender el control de esta variable a las 150 horas.

Tras la suspensión del control de pH, el consumo de glucosa se redujo aún más. A las 225 horas, la concentración de glucosa era de 5.36 g/L. En este momento, el pH del medio comenzó a disminuir abruptamente, alcanzando un valor de 5.5 a las 250 horas. La concentración de glucosa en este momento fue 0.895 g/L, lo que indica que el 90 % de la glucosa había sido consumida. Aproximadamente a las 280 horas, el pH del medio comenzó a aumentar nuevamente, alcanzando un valor de aproximadamente 8.0 a las 300 horas. En este momento, la concentración de glucosa era de 0.065 g/L, lo que indica que aproximadamente el 100 % de la glucosa había sido consumida.

La concentración de biomasa obtenida al final de la fermentación fue de 2.9 g/L \pm 0.1. En comparación con la primera fermentación realizada en el biorreactor con *Penicillium spp*, la cantidad de biomasa se redujo con el incremento del pH. La reducción en la producción de biomasa como efecto del aumento del pH es consistente con el comportamiento observado de este hongo a nivel de matraces.

La imagen 3-7(A y B) muestra los aglomerados de biomasa formados en la fermentación realizada a pH 7.5, mientras la imagen 3-7 (C) muestra la reducción de los aglomerados de biomasa posterior a implementar la estrategia de aumentar el carácter básico del medio

de cultivo. Lo anterior da cuenta que la estrategia de aumentar el pH del medio para reducir el tamaño de los agregados de biomasa fue satisfactoria.



Imagen 3-7.(A y B) Formación de aglomerados de *Penicillium spp* en biorreactor a pH 7.5.(C). Reducción del tamaño de pellets de *Penicillium spp* tras el aumento de pH

La implementación de esta estrategia duplicó el tiempo de fermentación con respecto al experimento inicial a pH 7.5. Por ello, se propuso una nueva alternativa: ajustar el pH del medio a 8 durante las primeras 56 horas de fermentación. Esto se hizo para evitar que las esporas presentes se aglomerasen desde la etapa inicial de crecimiento. Tras las 56 horas, se finalizó el control de pH para permitir el crecimiento del microorganismo en un medio ácido, lo que favoreció la producción de biomasa con una reducción en los aglomerados. El comportamiento de la curva de pH, oxígeno disuelto y adición de base se presenta en el anexo A, figura A-3.

Se estima que la fermentación del microorganismo duró aproximadamente 132 horas, con un consumo de glucosa del 100 % y una concentración final de biomasa de $4.4 \text{ g/L} \pm 0.3$. La imagen 3-8 muestra el crecimiento del microorganismo en el biorreactor.



Imagen 3-8. Crecimiento de *Penicillium spp* en biorreactor al final de la fermentación. Agitación detenida con el propósito de observar sedimentación de los pellets.

3.4.2 *Streptomyces spp*

Luego de determinar las condiciones de crecimiento de *Streptomyces spp* en matraces, se realizó el crecimiento del microorganismo a estas condiciones en un biorreactor con un volumen de trabajo de aproximadamente 3 litros.

La imagen 3-9 muestra que el medio de cultivo en el biorreactor se tornó de color amarillo durante la fermentación, lo cual es característico del crecimiento de este microorganismo. Además, se realizó una tinción de *Streptomyces spp.* para validar que el medio que se estaba cultivando correspondía a esta cepa.



Imagen 3-9. Validación de inocuidad del medio de fermentación *Streptomyces spp.*

La figura 3-19 muestra el comportamiento de la fermentación de *Streptomyces*. Las curvas de %pO₂, pH y cantidad de base adicionada al medio sugieren que la fase de adaptación del microorganismo en este medio de cultivo bajo las condiciones de reacción (pH 8.8, 30 °C, concentración de glucosa 5 g/L y 500 rpm de agitación) se dio durante las primeras 31 horas.

A la hora 31, se inició la adición de NaOH al sistema de manera lineal para mantener el pH del medio. En este momento, el oxígeno disuelto en el medio comenzó a disminuir significativamente, lo que indica que el microorganismo se encontraba en su fase de crecimiento exponencial.

El %pO₂ aumentó nuevamente hasta un valor aproximado de 94 % a la hora 60 de la fermentación, e inició a reducirse nuevamente de manera paulatina hasta un valor de 90%. Así mismo, se continuó evidenciando la adición de base al medio con cambios en su pendiente hasta la hora 120, manteniéndose constante a partir de esta hora. Este comportamiento sugiere que aparentemente hubo un crecimiento diáuxico, en donde es posible que la fase 1 comprendida entre la hora 20 y 60 corresponda a la oxidación de la glucosa, un sustrato que demanda alto consumo de oxígeno como aceptor de electrones, ya que contiene 24 electrones por cada mol de este azúcar. La fase 2 de crecimiento puede corresponder a metabolitos obtenidos de la oxidación de la glucosa con un menor número de electrones por mol, lo cuales podrían ser consumidos entre la hora 60 y 120, con un consumo menor de oxígeno que en el caso de glucosa como fuente principal de carbono.

Se determinó una concentración final de biomasa de 3.3 ± 0.1 g/L, y una concentración final de glucosa de 0.3 g/L.

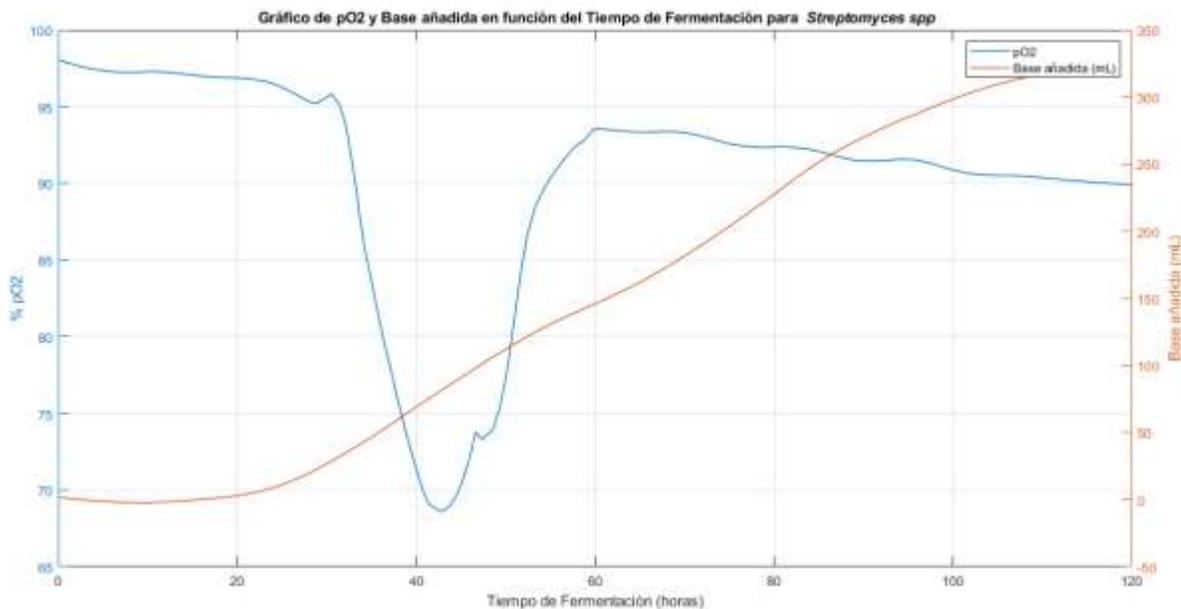


Figura 3-19 Curvas de %pO₂ y NaOH adicionado en fermentación por lotes de *Streptomyces spp*

3.4.3 *Aspergillus nidulans*

El crecimiento de *Aspergillus nidulans* a nivel de reactor se dio a las condiciones reportadas de crecimiento óptimo [35], los cuales corresponde a pH 6.8, 37°C, concentración de glucosa de 10 g/L. En la imagen 3-10 se muestra la coloración del medio y el crecimiento del microorganismo, el cual se dio en forma de pequeños pellets de biomasa. De manera similar a las anteriores fermentaciones, se validó la inocuidad del medio de reacción mediante la tinción de este cultivo, obteniéndose que la única estructura presente correspondía a *A. nidulans*.



Imagen 3-10. Validación de inocuidad del medio de fermentación *Aspergillus nidulans*.

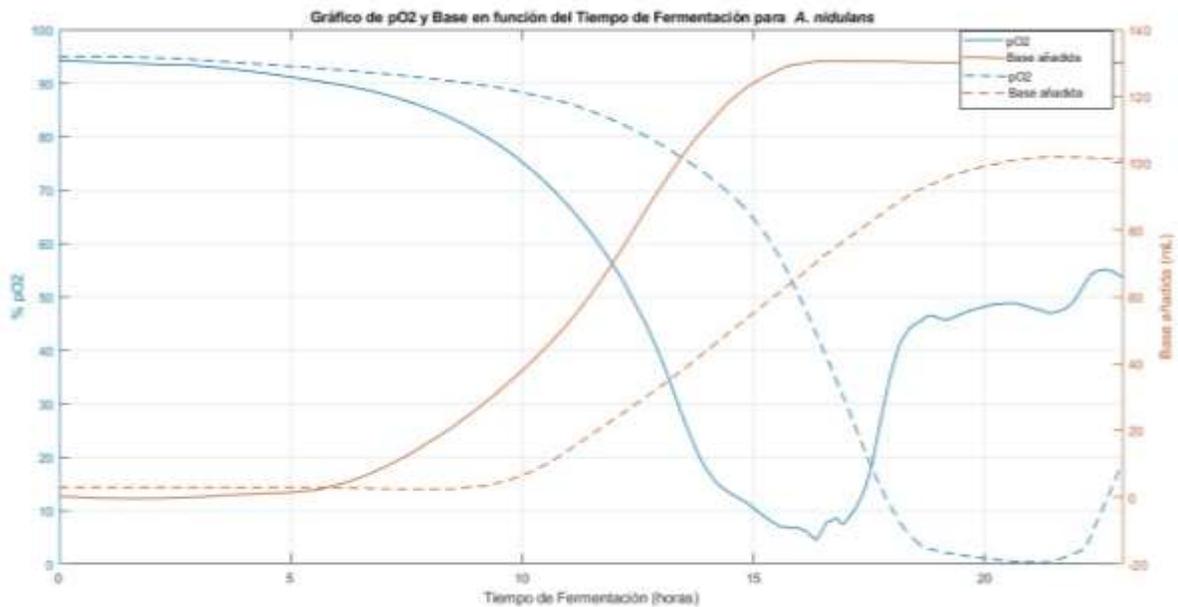


Figura 3-20 Curvas de %pO₂ y base adicionada en fermentación 1 con agitación 500 rpm (líneas discontinuas) y fermentación 2 con agitación 600 rpm (líneas sólidas) de *Aspergillus nidulans*

En la figura 3-20 se superponen dos fermentaciones del hongo *Aspergillus nidulans*. Las líneas discontinuas corresponden a la fermentación inicial en la que la agitación del medio se mantuvo en 500 rpm. Las líneas sólidas representan la segunda fermentación en la que la velocidad de agitación se aumentó a 600 rpm. Con base en lo anterior, puede evidenciarse que, si bien ambas fermentaciones tienen un comportamiento similar, existe un desfase en el tiempo de fermentación de aproximadamente 5 horas entre las curvas de la primera fermentación con respecto a la segunda. La concentración del inóculo en el

reactor en ambos casos fue aproximadamente $0.17 \text{ g/L} \pm 0.02$, al igual que la temperatura, pH, volumen de reacción y composición del medio fueron iguales; razón por la cual el desfase entre ambas curvas se puede atribuir al cambio de la agitación del medio de reacción. En la primera fermentación se observó una limitación de oxígeno en el medio entre la hora 19 y 24, razón por la cual en la segunda fermentación se decidió aumentar la agitación a 600 rpm. Al aumentar la agitación, directamente se aumentó el kLa de la fermentación, por lo cual se obtuvo una mayor concentración de oxígeno disuelto en el medio, facilitando un rápido crecimiento del microorganismo, reflejado en el rápido descenso del oxígeno disuelto. Así mismo hubo un mayor consumo de base como consecuencia de la oxidación de la glucosa, y un menor tiempo de la fermentación.

En las líneas sólidas de la figura 3-20, correspondientes a la segunda fermentación muestra de *Aspergillus nidulans*, se observó que a partir de la hora 5, la concentración de oxígeno disuelto en el medio de reacción comenzó a disminuir de forma notable. En este momento, se inició la adición de NaOH (3M) de forma exponencial para mantener el pH a 6.8, ya que el crecimiento del microorganismo estaba acidificando el medio. A la hora 10, la disminución del oxígeno disuelto y la adición de NaOH se aceleraron significativamente, lo que indica que la fermentación se encontraba en la etapa exponencial de crecimiento. En esta etapa, la concentración de glucosa en el medio fue 4.2 g/L. Aproximadamente a la hora 16, la concentración de oxígeno disuelto en el medio alcanzó su mínimo y comenzó a recuperarse. Al mismo tiempo, se detuvo la adición de NaOH, lo que sugiere que la fermentación había finalizado. La concentración final de glucosa fue de 0.3 g/L (97% de la glucosa inicial consumida) y la concentración final de biomasa fue $4.2 \pm 0.1 \text{ g/L}$.

Se determina que a escala de bioreactor en operación batch, el microorganismo con mayor productividad fue *A. nidulans*, la cual fue 0.182 g/L-h , en comparación con *Streptomyces spp* y *Penicillium spp*, cuya productividad fue 0.027 g/L-h y 0.033 g/L-h , respectivamente. Este resultado hace atractivo el empleo de *A. nidulans* en la producción de biomasa, ya que en menos tiempo se puede obtener una mayor producción de biomasa.

3.5 Efecto de la fuente de carbono en la producción de proteína y actividad esterasa

3.5.1 Selección del microorganismo

En los experimentos para producir biomasa, se utilizó glucosa como única fuente de carbono. Sin embargo, se ha demostrado que la glucosa inhibe la producción de cutinasa en varias especies de hongos y bacterias [110], [111], [112].

Se exploró el uso de fuentes de carbono alternativas y/o complementarias para inducir la actividad cutinasa de los extractos enzimáticos. El aceite de linaza y el PET se consideraron como potenciales inductores, ya que se ha reportado su efecto en diferentes microorganismos [35], [113], [114], [115].

La figura 3-21 muestra la producción de biomasa en la fermentación de *Aspergillus nidulans*, *Streptomyces spp* y *Penicillium spp* con 7 posibles fuentes de carbono y/o combinaciones de estas.

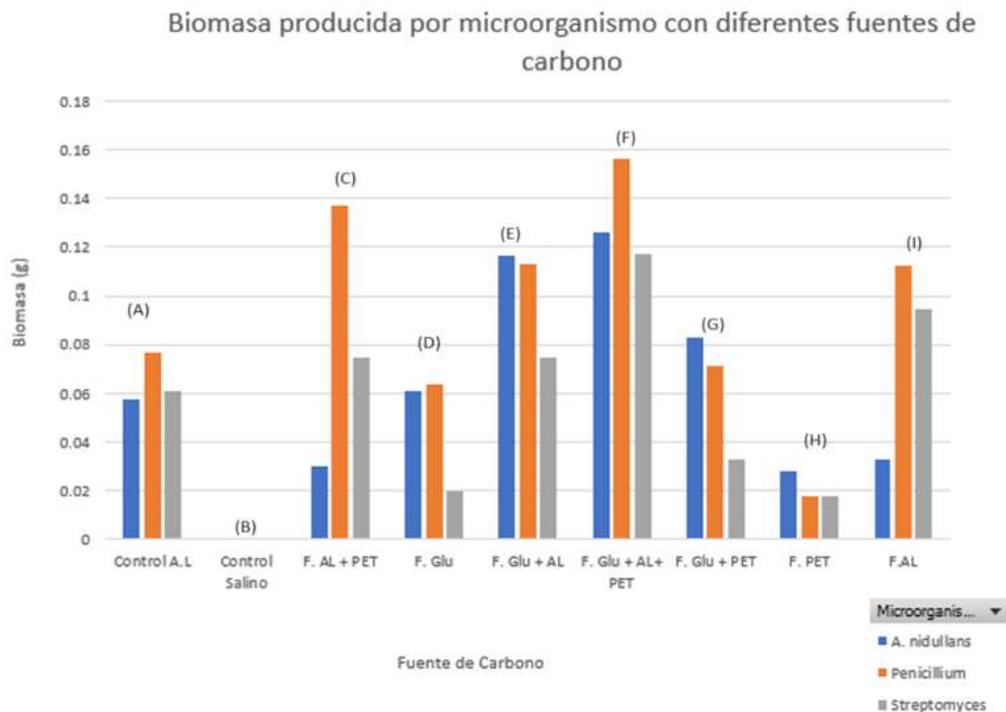


Figura 3-21 Evaluación del empleo de diferentes fuentes de carbono en el crecimiento de *Aspergillus nidulans*, *Penicillium spp.* y *Streptomyces spp.* (A) control A. linaza, (B) control salino, (C) fermentación A.linaza + PET, (D) fermentación glucosa, (E) fermentación glucosa + A. linaza, (F) fermentación glucosa + A. linaza + PET, (G) fermentación glucosa + PET, (H) fermentación PET, (I) fermentación A. linaza.

En el control del medio de cultivo en el que no se inoculó ninguno de los microorganismos y se utilizó aceite de linaza a una concentración de 5 g/L (A), se observó una masa retenida en la membrana de nitrocelulosa empleada en la filtración del medio de cultivo, la cual correspondió a 0.057 g, 0.0765 g y 0.0612 g para *A. nidulans*, *Penicillium spp.* y *Streptomyces spp.*, respectivamente. Este resultado se puede deber a una posible retención de aceite en la superficie de la membrana, la cual, en controles posteriores se evidenció que puede retener hasta el 80% de aceite de linaza. Es importante destacar que, en los ensayos en los que no se utilizó aceite de linaza como fuente de carbono principal o inductor, la cuantificación de biomasa no se vio sobreestimada por la retención de aceite en las membranas.

Se determinó que el hongo *Penicillium spp* tuvo mayor crecimiento en la mayoría de las alternativas de fuentes de carbono exploradas, excepto en los casos de emplear PET (H) como única fuente de carbono, glucosa + aceite de linaza (E), y glucosa + PET (G). En estos casos *Aspergillus nidulans* tuvo un crecimiento ligeramente mayor. Asimismo, se identificó que la combinación de fuentes de carbono que produjo mayor crecimiento de los microorganismos fue la que incluyó glucosa (10 g/L), aceite de linaza (5 g/L) y PET (0.1 g/L). En esta condición, se produjeron 6.3 g/L de *A. nidulans*, 7.85 g/L de *Penicillium spp.* y 5.88 g/L de *Streptomyces spp.* (tratamiento F de la figura 3-21).

De acuerdo con la figura 3-22, en la evaluación de la proteína producida a partir de los 3 microorganismos cultivados en las diferentes fuentes de carbono evaluadas, se encontró que *Streptomyces spp.* fue el microorganismo con mayor producción de proteína, con un valor de 2409 µg/mL al emplear glucosa y PET como fuentes de carbono. Esto puede deberse a que, además de la producción de enzimas capaces de degradar poliésteres sintéticos, el género *Streptomyces* se ha identificado como una fuente potencial de hidrofobinas. Estas proteínas mejoran la hidrólisis del PET mediante la modificación de su superficie [116], [117].

En el control que contenía aceite de linaza, si bien la mayor parte del aceite se filtró y se quedó retenida en la membrana de nitrocelulosa, se identificó la presencia de proteína propia de este aceite, la cual se presenta en forma de albúmina, globulina, prolamina y glutelina [118], [119]. La presencia de estas proteínas supone un obstáculo para la cuantificación precisa de las proteínas producto de las fermentaciones. Sin embargo, se evidencia que la cantidad de proteína en el caso de las fermentaciones que contenían combinaciones de otros sustratos con aceite de linaza fue superior a los controles realizados para los tres microorganismos (con solo aceite de linaza).

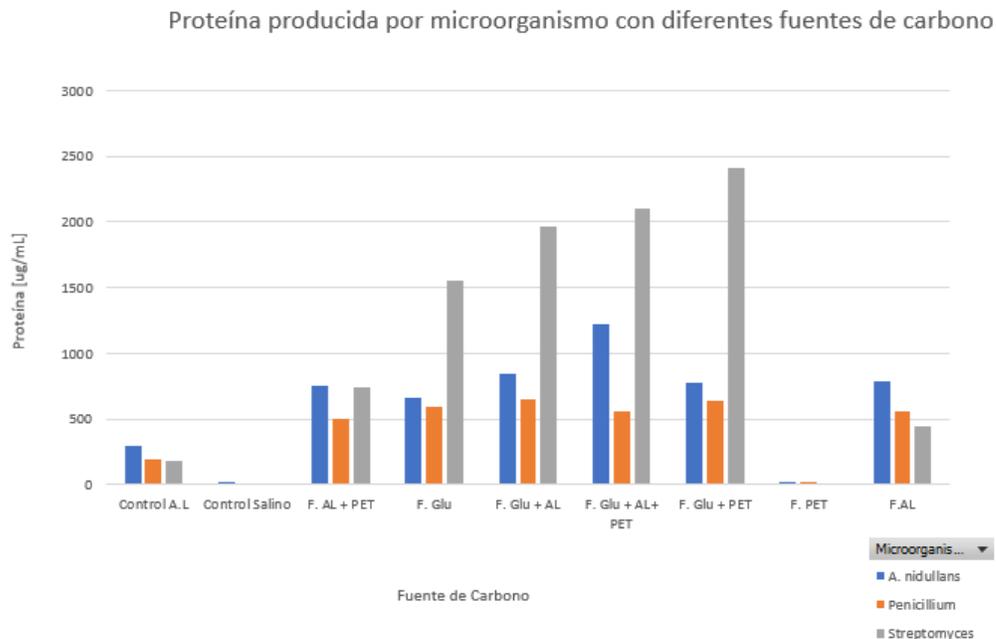


Figura 3-22 Evaluación del empleo de diferentes fuentes de carbono en la producción de proteína a partir de *Aspergillus nidulans*, *Penicillium spp* y *Streptomyces spp*. (A) control A. linaza, (B) control salino, (C) fermentación A.linaza + PET, (D) fermentación glucosa, (E) fermentación glucosa + A. linaza, (F) fermentación glucosa + A. linaza + PET, (G) fermentación glucosa + PET, (H) fermentación PET, fermentación A. linaza.

Con respecto a la actividad enzimática evaluada en los diferentes medios de cultivo empleando como sustrato el p-nitrofenilbutirato, la figura 3-23 muestra que los blancos no presentan actividad enzimática esterasa, lo que soporta la idea de que la proteína presente en estos controles corresponde a una posible proteína asociada al aceite de linaza. Adicionalmente, se observa que, en el caso de *Streptomyces spp.*, la proteína presente no tiene actividad esterasa, por lo que esta proteína podría corresponder a hidrofobinas o a algún otro tipo de enzimas.

En el gráfico se identifica que para el hongo *Penicillium spp.* la menor actividad esterasa se da empleando glucosa como única fuente de carbono, aun cuando se obtuvo una producción de proteína de 588 µg/mL. Este resultado sugiere que *Penicillium spp.* corresponde a los hongos cuya producción de cutinasa podría verse reprimida por el

empleo de glucosa como única fuente de carbono. A pesar de lo anterior, al añadir una fuente de carbono complementaria, tal como aceite de linaza y/o PET, se evidencia que la actividad esterasa aumenta.

En el caso del hongo *Aspergillus nidulans* es posible observar que es el microorganismo del cual se obtiene proteína con mayor actividad esterasa, específicamente empleando glucosa y aceite de linaza como fuentes de carbono de manera complementaria (0.66 U/mL). En la evaluación de la actividad enzimática en las fermentaciones con *A. nidulans* se identificó que, al añadir el PET a una fuente de carbono principal, su actividad enzimática se reducía en comparación con los tratamientos que no contenían este polímero. Esto va en la línea de investigaciones que han demostrado que la actividad cutinasa puede inhibirse mediante la acumulación de productos de escisión como el etilenglicol y ácido tereftálico [120].

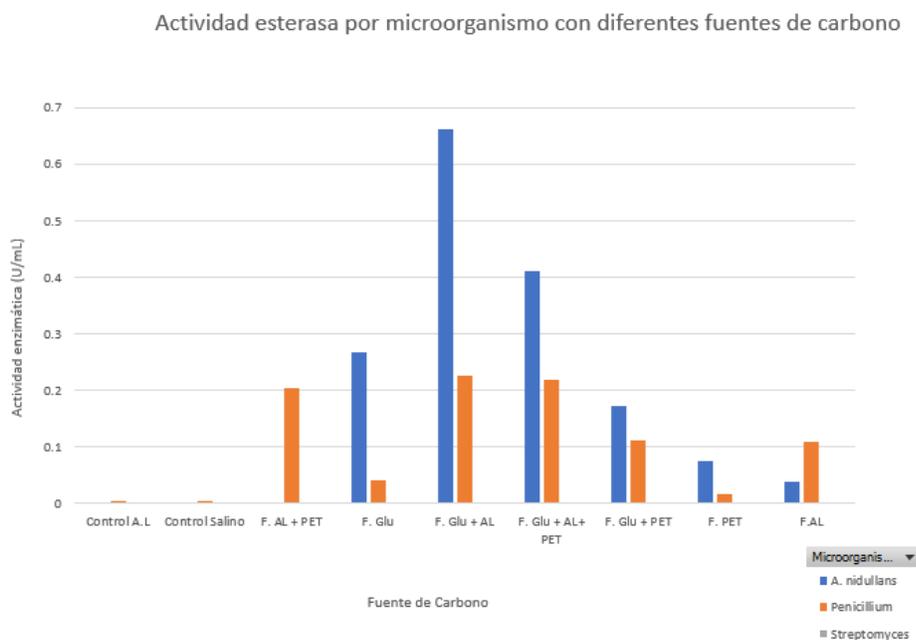


Figura 3-23 Evaluación del efecto en la actividad esterasa al emplear diferentes fuentes de carbono para *Aspergillus nidulans*, *Penicillium spp.* y *Streptomyces spp.* (A) control A. linaza, (B) control salino, (C) fermentación A.linaza + PET, (D) fermentación glucosa, (E) fermentación glucosa + A. linaza, (F) fermentación glucosa + A. linaza + PET, (G) fermentación glucosa + PET, (H) fermentación PET, fermentación A. linaza.

Los resultados de los experimentos expuestos anteriormente destacan a *Aspergillus nidulans* como un microorganismo con una producción de biomasa y proteína sobresaliente, en comparación con los otros dos microorganismos evaluados. Además, presenta la mayor actividad enzimática. Por lo tanto, para estudiar el efecto de la concentración de la fuente de carbono e inductor sobre la actividad enzimática y la proteína se decidió analizar únicamente en cultivos de *A. nidulans*, así como la evaluación de la degradación del PET.

Este enfoque permitirá profundizar en el estudio de las condiciones favorables para la producción de cutinasa por parte de *A. nidulans*, lo que podría conducir al desarrollo de una biodegradación más eficiente del PET.

3.5.2 Selección del inductor y/o fuente de carbono para *A. nidulans*

El análisis de la figura 3-24 y 3-25, que muestran la producción de proteína-actividad enzimática y biomasa-proteína, respectivamente, revela que el empleo de glucosa, aceite de linaza y PET como fuentes de carbono e inductores, favorece una mayor producción de biomasa y proteína. Sin embargo, la mayor actividad enzimática (0.66 U/mL) se obtuvo en el tratamiento con glucosa como fuente de carbono principal e inducción con aceite de linaza. En este caso, la biomasa y proteína producida fueron las segundas más altas de todos los tratamientos evaluados, con valores de 0.167 g y 845 µg/mL, respectivamente.

Con base en estos resultados, se selecciona la mezcla glucosa-aceite de linaza como fuente de carbono e inductores potenciales.

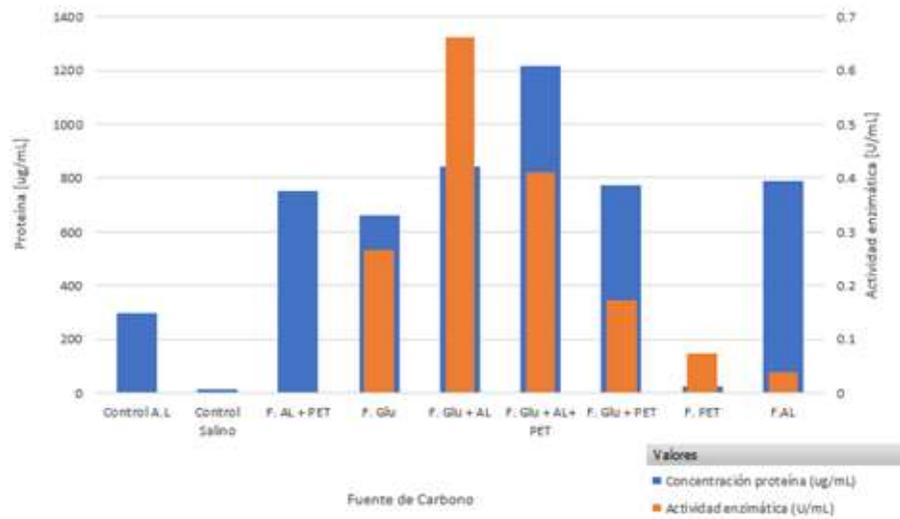


Figura 3-24. Evaluación del empleo de diferentes fuentes de carbono en la producción de proteína y actividad esterasa en *Aspergillus nidulans*. (A) control A. linaza, (B) control salino, (C) fermentación A.linaza + PET, (D) fermentación glucosa, (E) fermentación glucosa + A. linaza, (F) fermentación glucosa + A. linaza + PET, (G) fermentación glucosa + PET, (H) fermentación PET, fermentación A. linaza.

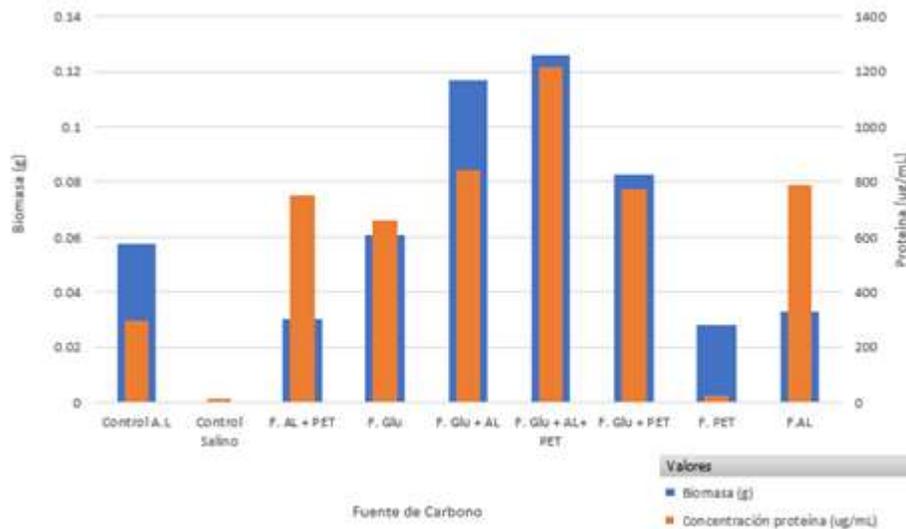


Figura 3-25 Evaluación del empleo de diferentes fuentes de carbono en la producción de biomasa y proteína a partir de *Aspergillus nidulans* . (A) control A. linaza, (B) control salino, (C) fermentación A.linaza + PET, (D) fermentación glucosa, (E) fermentación glucosa + A. linaza, (F) fermentación glucosa + A. linaza + PET, (G) fermentación glucosa + PET, (H) fermentación PET, fermentación A. linaza.

3.5.3 Actividad esterasa en gel de proteína obtenida a partir de *A. nidulans*

De acuerdo con la imagen 3-11, en el gel teñido con azul de Coomassie no se identificó la presencia de proteína en ninguno de los canales en los que se realizó la adición extractos. Sin embargo, en la zona del gel correspondiente al zimograma (canal 6-10) se observa que en el canal 9 (fuente de carbono: glucosa + aceite linaza + PET) hay la presencia de dos franjas rojas cuyo peso molecular se encuentra entre 20 y 37 kDa, lo cual indica que en este tratamiento hubo la secreción de proteínas con actividad esterasa. De acuerdo con Bermúdez (2019) y Morales (2018), *Aspergillus nidulans* tiene la capacidad de secretar 4 enzimas cutinasas, cuyo peso molecular varían entre 24 y 32 kDa [78], [79]; asimismo, Al-Tammar (2016) identificó una cutinasa llamada ANCUT 2 en el género *Aspergillus* con peso molecular de 40 kDa [121].

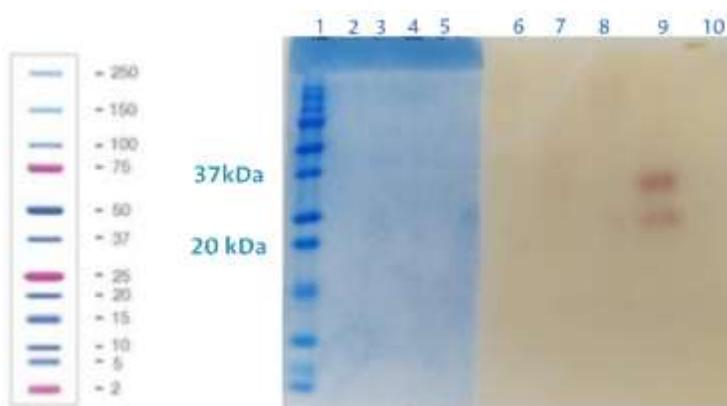


Imagen 3-11. Gel SDS-PAGE. Canal 1: marcador peso molecular. Canal 2 y 6: control sales minerales. Canal 3 y 7: control aceite. Canal 4 y 9: glucosa + PET + aceite. Canal 5 y 10: aceite + PET

De manera contraria, en el resto de los canales, correspondientes al control salino, control de aceite de linaza y empleo de aceite de linaza y PET de manera conjunta, no se evidencia actividad esterasa sobre el sustrato empleado.

El hecho de que haya actividad enzimática en el zimograma, pero no se observe proteína en el gel de electroforesis sugiere que las proteínas con actividad esterasa presentes en estos tratamientos tienen una concentración lo suficientemente baja para ser detectadas por el gel de electroforesis. Por lo tanto, sería conveniente concentrar los medios de cultivo antes de realizar la cuantificación de proteína y actividad esterasa.

En la imagen 3-12, al igual que en el caso anterior, se presenta el perfil de proteína y evaluación de la actividad enzimática mediante zimografía. En el canal 2 y 7 se añadió el extracto obtenido de emplear glucosa y PET como fuentes de carbono conjunta. En este caso se identificó una franja de proteína con un peso molecular entre 75 y 100 kDa, así mismo se identificaron dos franjas rojas en el zimograma en este rango, demostrando que proteínas con este peso molecular tienen actividad esterasa. Estas mismas franjas de actividad se encontraron para el caso de la glucosa (canal 4 y 8) y PET (canal 5 y 10) de manera independiente como única fuente de carbono en el medio.

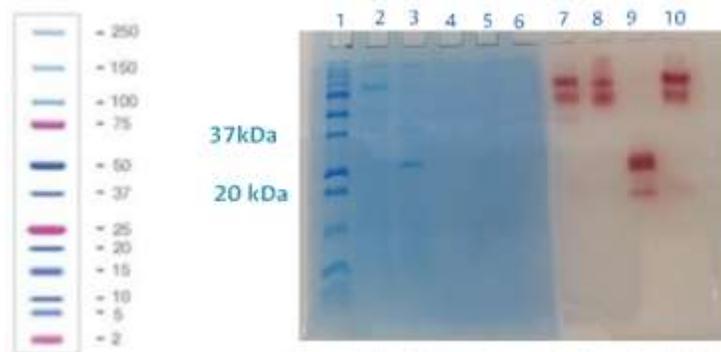


Imagen 3-12. Gel SDS-PAGE. Canal 1: marcador peso molecular. Canal 2 y 7: glucosa + PET. Canal 3 y 9: glucosa + aceite. Canal 4 y 8: glucosa. Canal 5 y 10: PET

Finalmente, en los canales 3 y 9, donde se añadió el extracto obtenido de emplear conjuntamente glucosa y aceite de linaza, se observa presencia de proteínas con un peso molecular entre 25 y 37 kDa. Las bandas del zimograma para este tratamiento se encuentran en la misma posición que las del tratamiento con glucosa, aceite de linaza y PET. Sin embargo, se observa que la intensidad de las bandas es mayor en este caso, lo que sugiere que este extracto tiene mayor actividad esterasa sobre el sustrato empleado.

3.6 Efecto de la concentración del inductor y/o fuente de carbono sobre la producción de proteína y actividad enzimática.

Se estudió el efecto sobre la producción de proteína y actividad enzimática a través del empleo de glucosa y aceite de linaza de manera conjunta a diferentes concentraciones, 1 – 10 g/L para la glucosa, y 0.5 – 5 g/L para el aceite de linaza, quien realizó el rol de inductor

El análisis del diagrama de Pareto y efectos principales presentados en las figuras 3-26 y 3-27, revela que la glucosa es la variable con mayor efecto positivo en la producción de proteína, con una pendiente de 42.2 g/L/g/L. La pendiente del aceite de linaza es de 35.5 g/L/g/L, lo que indica que tiene un efecto menor, pero también positivo. De manera similar, se encontró que a medida que aumenta la concentración de glucosa y aceite de linaza en el medio, también aumenta la actividad esterasa.

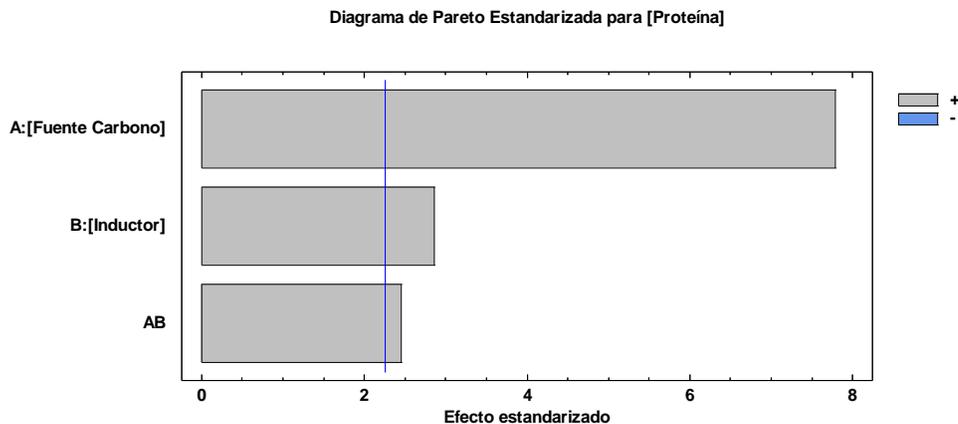


Figura 3-26 Diagrama de Pareto del efecto de la concentración de fuente de carbono e inductor en la producción de proteína a partir de *A. nidulans*

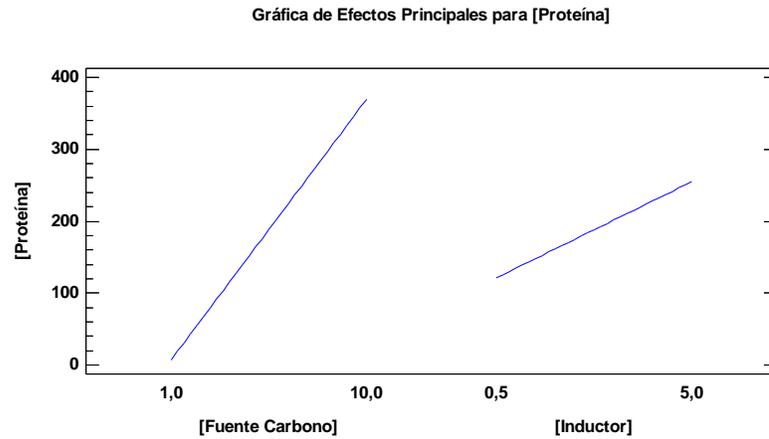


Figura 3-27 Gráfico de efectos principales en la producción de proteína a partir de *A. nidulans*

Como resultados complementarios, en la figura 3-28 y 3-29 se evidencia que las concentraciones más altas de glucosa y aceite de linaza, 10 g/L y 5 g/L, respectivamente, dieron lugar a los valores más altos de producción de biomasa (0.16 g), proteína (951.6 µg/mL) y actividad enzimática (2.14 U/mL). Estos resultados son consistentes con los observados en los zimogramas, que mostraron bandas de actividad esterasa más intensas en los tratamientos con estas concentraciones.

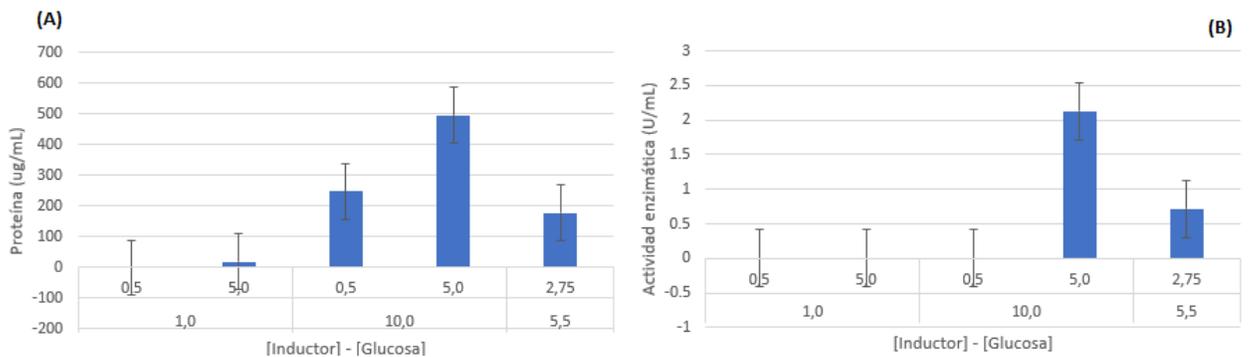


Figura 3-28 A) Producción de proteína. B) Actividad enzimática esterasa en extracto crudo a partir de *A. nidulans* ante variación de la concentración de glucosa y aceite de linaza en el medio de cultivo.

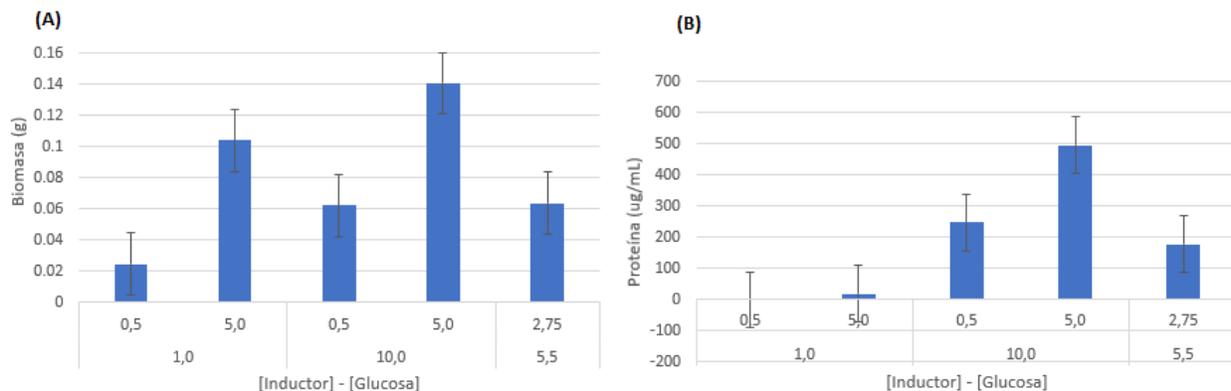


Figura 3-29 A) Producción de biomasa *A. nidulans*, y B) producción de proteína, ante variación de la concentración de glucosa y aceite de linaza en el medio de cultivo.

3.7 Producción de proteína en biorreactor de 7 L

A las condiciones de biorreacción (37°C, pH 6.8, 600 rpm, 2.5 litros de medio de cultivo), y concentración de glucosa (10 g/L) y aceite de linaza (5 g/L), se obtuvo el extracto de proteínas a las 48 horas de fermentación, cuyo desempeño se presenta en la figura 3-30.

De acuerdo con las curvas de la fermentación, el crecimiento del microorganismo empleando glucosa se dio durante las primeras 22 horas de la fermentación, y posteriormente se realizó la adición de la emulsión de aceite de linaza, favoreciendo la inducción de las proteínas. Se observaron dos fases de crecimiento de *A. nidulans*. La fase exponencial con glucosa se estima que ocurrió entre las 5 y las 16 horas. En el caso del aceite de linaza, la fase exponencial ocurrió entre las 26 y las 35 horas. De acuerdo con Souza (2011), la glucosa promueve un crecimiento más intenso que otros sustratos [122]; por lo tanto, se puede sugerir que el mayor crecimiento de biomasa se produjo en la primera fase.

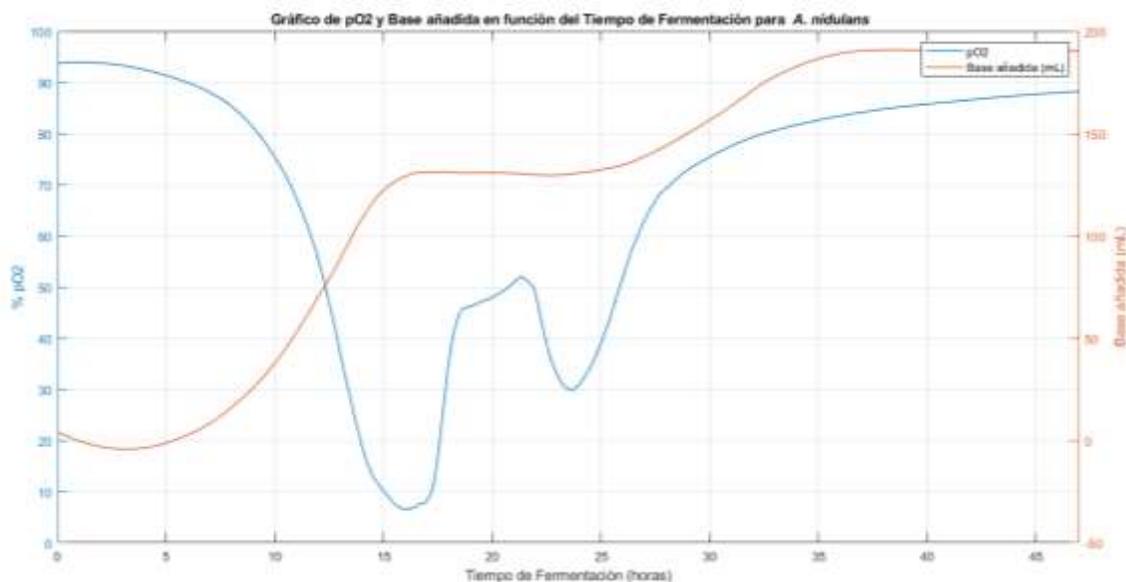


Figura 3-30 Desempeño de la fermentación de *Aspergillus nidulans* con propósito de producción de proteína con actividad esterasa

La concentración de biomasa inoculada en el reactor correspondió a 0.12 g/L y la concentración de biomasa al final de la fermentación fue 5.2 ± 0.1 g/L.

La concentración de proteína obtenida del extracto crudo concentrado con membrana capaz de retener proteína con peso molecular mayor o igual a 30 kDa (concentrado a un quinto de su volumen inicial (5x)) fue 96.27 $\mu\text{g/mL}$, y su actividad esterasa empleando como sustrato el p-nitrofenilbutirato fue 36.67 U/mL. En el caso de la fracción de extracto que pasó por la membrana (proteína con peso molecular menor a 30 kDa), la concentración de proteína fue 14.73 $\mu\text{g/mL}$ y actividad esterasa de 11.42 U/mL. Puede notarse que la cantidad de proteína cuantificada en el extracto concentrado (>30 kDa) es alrededor de 6 veces la concentración del medio diluido (< 30 kDa), y la actividad esterasa empleando la misma relación es de aproximadamente 3 veces mayor en el caso del medio concentrado, sugiriendo que la concentración del extracto enzimático crudo es una variable importante en términos de la cantidad de proteína y actividad esterasa.

De acuerdo con la actividad hallada en gel para el caso de emplear aceite de linaza y glucosa como inductor y fuente de carbono, respectivamente (Imagen 3-12- canal 9), se sugiere que la proteína concentrada podría contener a la enzima ANCUT2 reportada por [78], [79], cuyo peso molecular es mayor a 30 kDa, así mismo el extracto con peso molecular menor a 30 kDa podría estar compuesto entre otras enzimas por la ANCUT1 (24 kDa) y ANCUT3 (29 kDa).

Suponiendo que la concentración de proteína y la actividad enzimática se relacionan linealmente, para el caso de la proteína retenida en el filtro se obtiene la gráfica de regresión lineal mostrada en la figura B-1 del anexo B. Si el extracto se hubiese concentrado en 2x (volumen final 2000 mL), se esperaría que la actividad enzimática fuera alrededor de 10.8 U/mL, actividad inferior a la determinada en el extracto que pasó a través de la membrana de 30 kDa (11.42 U/mL) con volumen de 2000 mL. Este resultado complementado con la imagen 3-12 sugiere que la proteína con peso molecular mayor a 30 kDa se encuentra en mayor concentración en el extracto crudo que la proteína con peso molecular menor a 30 kDa, no obstante, la actividad enzimática cuantificada pudo deberse a la concentración de esta proteína en el extracto y no necesariamente a la superioridad de la enzima en términos de rompimiento de los enlaces éster del sustrato empleado. Para validar esta información es pertinente realizar la concentración del extracto que pasó a través de la membrana (< 30 kDa) en una relación 1:5 y comparar los resultados de ambos extractos bajo el mismo factor de concentración. Esta validación no fue posible realizarla debido a la limitación en las membranas disponibles para realizar la concentración de proteína.

Finalmente, al comparar la actividad enzimática hallada a nivel de matraz (2,14 U/mL) con la hallada en biorreactor después de la concentración en un factor 1:5 (36,67 U/mL), se evidencia que además de la influencia de la concentración del extracto crudo, la producción de enzimas con actividad carboxilesterasa se favorece en un ambiente controlado de pH, temperatura y, agitación.

3.8 Selección del material PET a emplear en la evaluación de la degradación.

El material PET utilizado para evaluar su degradación fue el proveniente de botellas de agua o bebidas gaseosas posconsumo, dado que es un residuo de alta disponibilidad en Colombia.

En las figuras 3-31, 3-32 y 3-33 se presentan los análisis de calorimetría diferencial de barrido de la marca de agua Brisa, Cristal y Manantial, respectivamente. En todas las figuras, se observa un pico alrededor de 250 °C, que corresponde a la temperatura de degradación térmica del polímero. Esta degradación es un proceso reversible que produce los monómeros básicos (EG y TPA), y provoca la pérdida de la estabilidad térmica del material. Adicionalmente, se observa que las temperaturas de fusión del PET de las botellas de agua Brisa, Cristal y Manantial son 102.3 °C, 94.4 °C y 133 °C, respectivamente.

El análisis DSC permitió identificar que las temperaturas de transición vítrea del PET de las botellas de agua Brisa, Cristal y Manantial son 75.2 °C, 70.6 °C y 68.1 °C, respectivamente. Esta temperatura es un factor que favorece la degradación biológica del PET, ya que a partir de ella las cadenas cristalinas del polímero tienen mayor movilidad, lo que facilita el ataque enzimático [123], [124], [125].

A través de la integración de los picos del análisis DSC cercano al punto de fusión, se determinó el calor absorbido en el proceso de cristalización en frío del PET (ΔH_c), el cual para las botellas de agua Brisa, Cristal y Manantial fue 0.86 J/g, 1.79 J/g y 0.36 J/g, respectivamente. Este resultado indica que la transición de las cadenas amorfas del polímero a estructura cristalina es un proceso endotérmico, requiriendo mayor consumo de energía en el caso de la marca Cristal.

De manera similar, a través de la integración del pico en la zona de descomposición térmica, se halló que el calor de fusión del PET (ΔH_m) fue 34.9 J/g para Brisa, 35.9 J/g para Cristal y 36.2 J/g para Manantial.

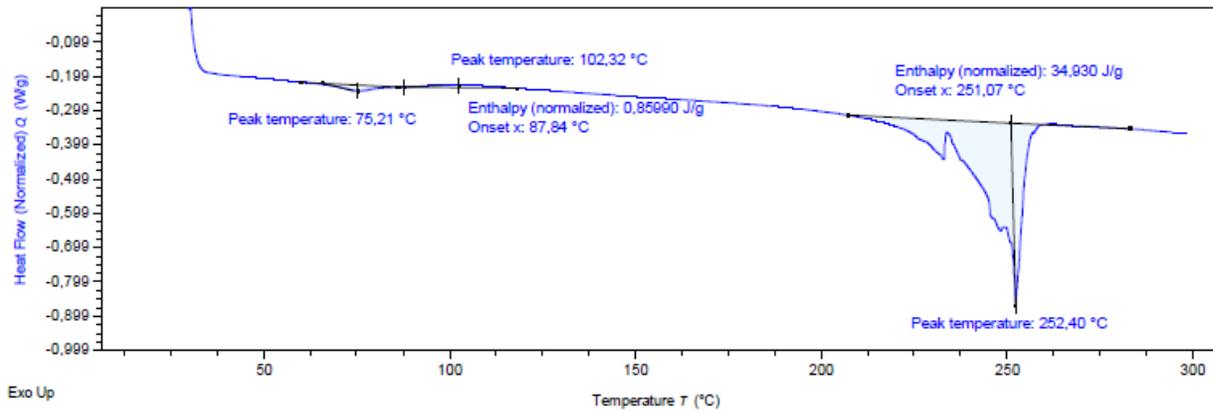


Figura 3-31 Calorimetría Diferencial de Barrido de las botellas de agua Brisa

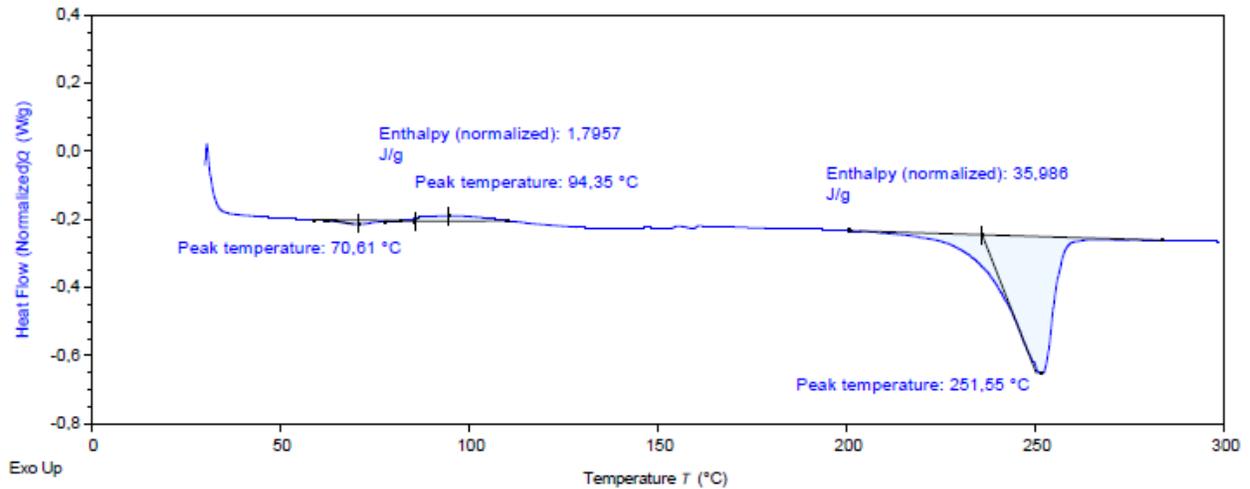


Figura 3-32 Calorimetría Diferencial de Barrido de las botellas de agua Cristal

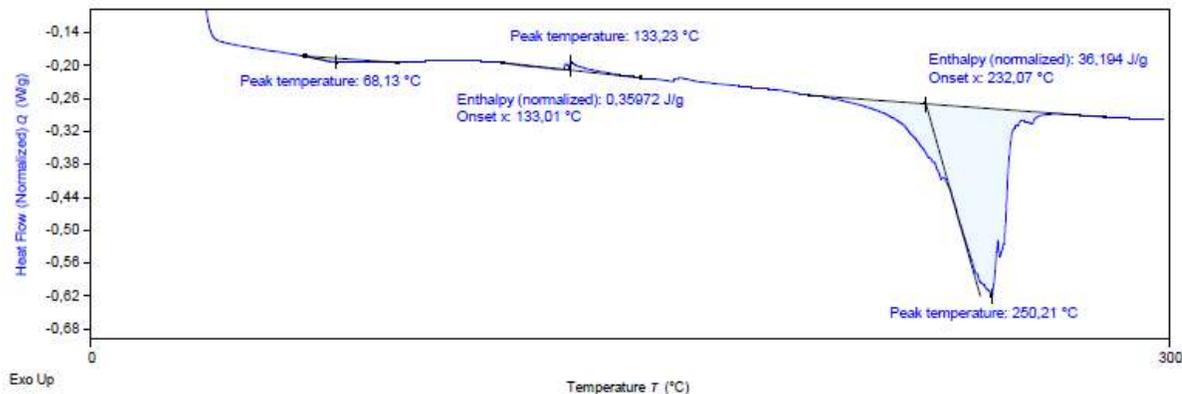


Figura 3-33 Calorimetría Diferencial de Barrido de las botellas de agua Manantial

Al determinar el porcentaje de cristalinidad empleando ΔH_c , ΔH_m y ΔH_m° , se seleccionó la marca Brisa, ya que presentó una cristalinidad promedio del 22%, siendo menor que la de las marcas Cristal (24%) y Manantial (27%). Un menor porcentaje de cristalinidad implica una mayor movilidad de las cadenas amorfas del polímero, lo que facilita su degradación en comparación con un material con mayor porcentaje de cristalinidad [126].

Adicionalmente a su cristalinidad, se reporta que el agua Brisa representa el 25% de las ventas de agua embotellada [127]. Esto la posiciona como una de las aguas más vendidas en Colombia, generando consecuentemente un mayor residuo posconsumo. Por lo tanto, ante resultados positivos de degradación, se puede lograr un mayor impacto económico, social y ambiental.

3.9 Identificación de productos de degradación

En el grupo de trabajo del laboratorio de Bioprospección de la Universidad de La Sabana se desarrolló el método de cuantificación del monómero de ácido tereftálico y los oligómeros de cadena corta MHET y BHET, a través de la técnica de HPLC de fase reversa. Se centró la atención en estos compuestos ya que son reportados como los

principales productos de degradación del PET, tanto en la hidrólisis química como enzimática [128].

En el método se empleó la columna Zorbax Eclipse Plus (4.6 x 250 mm x 5 μ m), un volumen de inyección de 20 μ L, flujo de 0.5 mL/min, una longitud de onda de 241 nm y una fase móvil compuesta por ácido fosfórico, acetonitrilo y agua. Adicionalmente los metabolitos fueron solubilizados en una solución cuya composición fue 95% metanol, 5% dimetilsulfóxido (DMSO). Con base en lo anterior, los tiempos de retención para el TPA, MHET y BHET de acuerdo con los estándares de calibración (ver anexo C) correspondieron a 10.5 min, 12.7 min y 14.7 min, respectivamente. En la figura 3-34 se presenta el cromatograma del medio de cultivo compuesto por el medio mineral Czapek Dox y PET como única fuente de carbono, sin la inoculación de *Penicillium spp.* Asimismo, en la figura 3-35 se muestra la fermentación de *Penicillium spp.* empleando PET como única fuente de carbono en el medio mineral Czapek Dox.

En la figura 3-34 se observa que, aunque no hubo presencia del microorganismo, existen picos relativos al TPA, MHET y BHET en el medio de cultivo a una concentración de 0.84 ppm, 1.44 ppm y 0.08 ppm, respectivamente; correspondiendo el MHET y BHET a productos de la hidrólisis parcial del PET, y el TPA a la hidrólisis total [128]. La presencia de estos compuestos pudo deberse a su desprendimiento en la esterilización húmeda del PET, liberación de manera espontánea en el medio de sales minerales, contaminación cruzada, entre otros. Para evitar la contaminación cruzada en la experimentación posterior se decidió almacenar las muestras en recipientes de vidrio y realizar la filtración a través de membranas de nitrocelulosa de 0.2 μ m.

Al comparar este cromatograma con el de la figura 3-35 puede notarse que el tamaño de los picos de los compuestos en presencia del microorganismo es menor al caso en el que no hay presencia de éste, de hecho, no hubo MHET en el medio de cultivo. La concentración del TPA y BHET fue 0.104 ppm y 0.067 ppm, respectivamente. Inicialmente

este resultado establece que, aunque se esté dando la degradación del material en TPA, BHET y MHET, es posible que el microorganismo esté empleando estos compuestos como una fuente viable de carbono y electrones para su crecimiento.

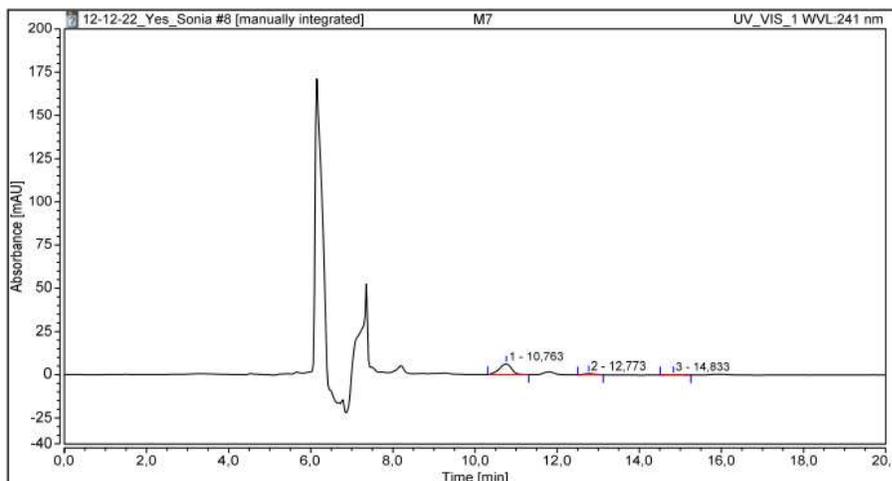


Figura 3-34 Control de inocuidad del medio de cultivo (ausencia de *Penicillium spp*), empleando PET como única fuente de carbono disponible

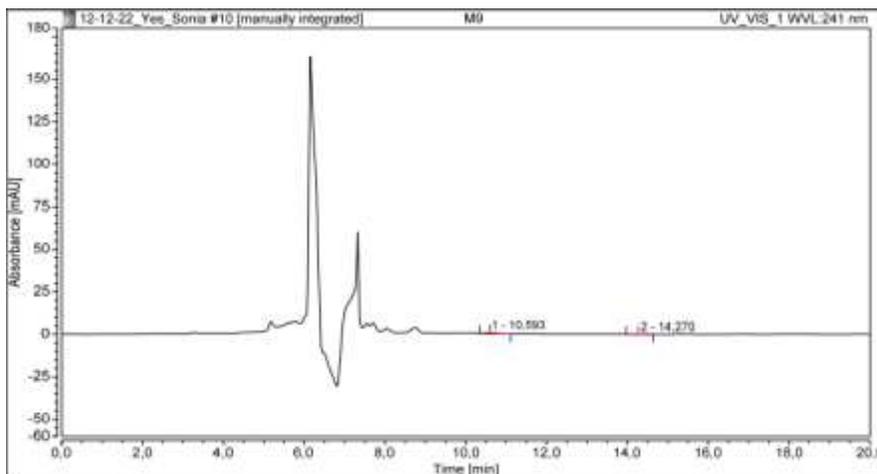


Figura 3-35 Fermentación de *Penicillium spp* empleando PET como única fuente de carbono disponible

La molécula de TPA, BHET y MHET tienen en común un anillo aromático y dos grupos carboxilos, se diferencian en que el MHET es un éster monoácido, mientras que el BHET es un éster diácido, como se muestra en la figura 3-36. Con base en las similitudes de las moléculas y su tamaño, en caso de que se esté dando el consumo de éstas por parte del microorganismo, el microorganismo aparentemente tiene mayor afinidad por las moléculas de menor tamaño molecular (TPA y MHET).

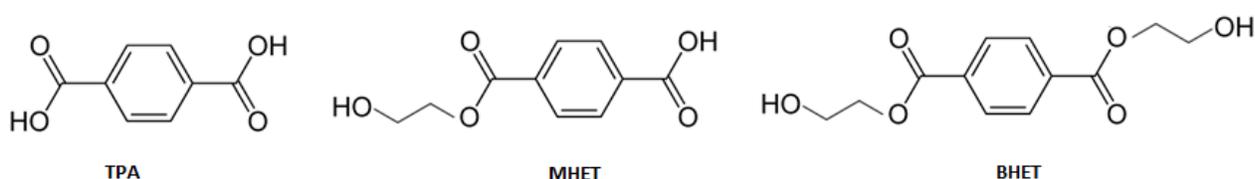


Figura 3-36 Comparación de las moléculas de TPA, MHET y BHET. Basado en [129]

Con el propósito de determinar la principal causa de presencia de metabolitos de la degradación del PET en los controles de crecimiento negativo, y la reducción de éstos en las fermentaciones, se hizo necesario el desarrollo de un método de cuantificación propio para el ácido tereftálico, el cual se describe en la siguiente sección (sección 3.10).

3.10 Desarrollo del método de cuantificación de Ácido Tereftálico

El método de cuantificación del ácido tereftálico (TPA) se realizó de manera conjunta con el laboratorio de análisis instrumental de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

El cromatógrafo empleado fue el HPLC Agilent 1100 series con detector UV/VIS y columna C18 Phenomenex (150 mm x 4.6 mm, 5 μ m). La longitud de onda correspondió a 240 nm, como sugerencia de la investigación realizada por Ravichandran (2016), en la que determinó que el pico característico del ácido tereftálico empleando espectrofotometría UV-visible se encontraba a una longitud de onda de 240 nm [130].

Se propuso el empleo de una fase móvil de carácter acida cuya composición fue 80% ácido fórmico (concentración 0.1 %v/v) y 20% de acetonitrilo, ya que el TPA en solución se encuentra presente en su forma aniónica TPA⁻², y es requerido en su estado neutral para su separación [131]. Adicionalmente, como consecuencia de la baja solubilidad del TPA en agua, se requirió la incorporación del acetonitrilo, que por su polaridad y fuerza de elución es destacado en cromatografía líquida [132]. La mezcla ternaria constó de agua - acetonitrilo -TPA compuesta por 50% agua-50% acetonitrilo a una temperatura de 220°C. Se reporta que la máxima solubilidad del TPA a estas condiciones es de 9.1 g por cada 100 g de solución [133].

La curva de calibración estuvo comprendida entre 0.5 ppm y 25 ppm, con un volumen de inyección de 10 μ L y un flujo de 0.5 mL/min. El rango evaluado fue seleccionado con base en Barth et al (2015), quienes encontraron que la máxima producción de ácido tereftálico tras la exposición a la enzima TfCut2 durante una hora fue de 100 nmol/mL (Aprox. 16.6 ppm) [134].

En la figura 3-37 se presenta el estándar de 0.1 y 1 ppm en los cuales se identificó el pico de TPA en el tiempo de retención de aproximadamente 9.6 min; asimismo, en la figura 3-38 se muestra el cromatograma correspondiente al medio de cultivo empleado para el crecimiento de *Penicillium spp*, con el cual se pudo validar que el método construido fue funcional para la identificación del ácido tereftálico. El tiempo identificado en este método es inferior al desarrollado por la universidad de La Sabana, lo cual es consecuencia de tipo de columna empleada, así como las condiciones del eluyente, flujo de inyección, solvente en el que se solubilizó la muestra, etc.

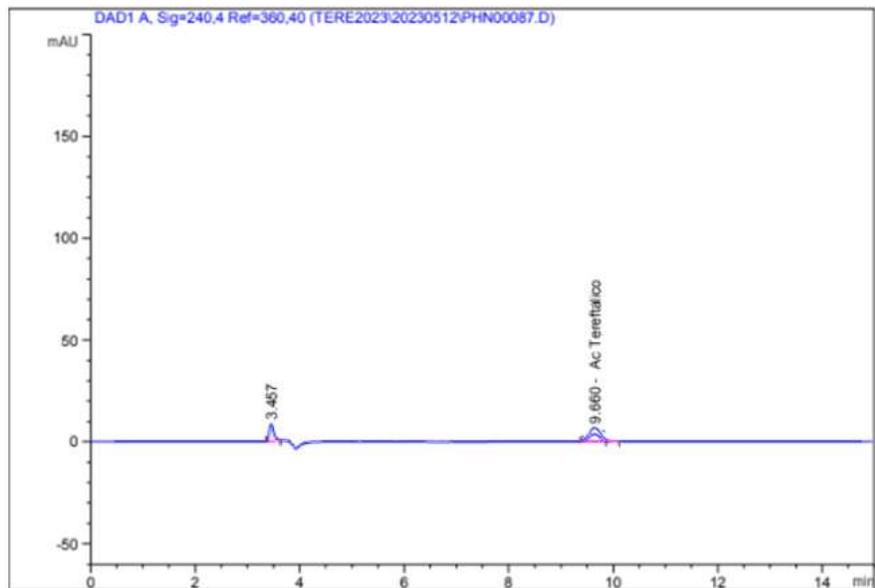


Figura 3-37 Construcción de la curva de calibración con patrón de 0.1 ppm y 1 ppm.

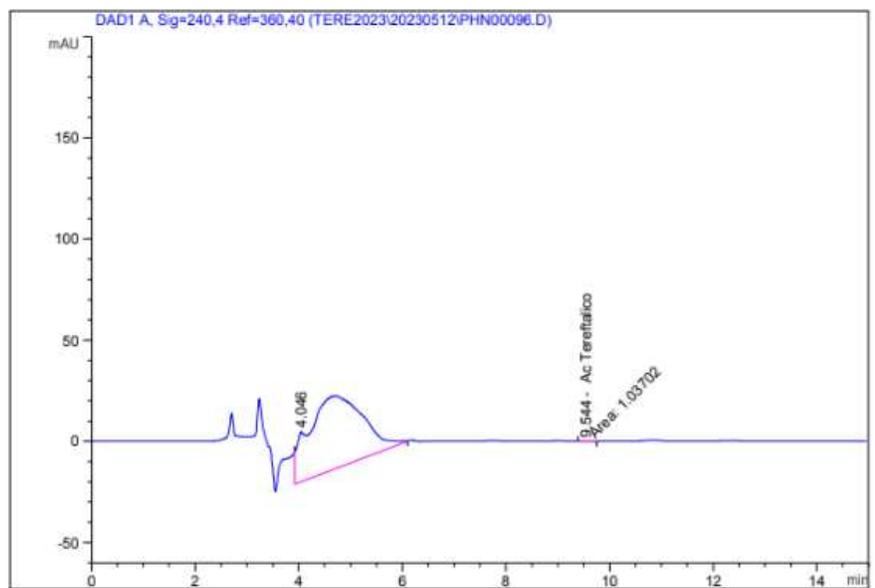


Figura 3-38 Cromatograma del medio de cultivo de *Penicillium spp* posterior a la fermentación empleando glucosa y PET como fuente de carbono.

3.11 Elección del método de evaluación de la degradación del PET (exposición al microorganismo y/o extracto enzimático)

En los medios de cultivo en los que no se inoculó el hongo *Penicillium spp*, y los cuales contenían únicamente sales minerales y el PET como única fuente de carbono (esterilizado mediante calor húmedo), se registró una concentración de ácido tereftálico de 0.9 ppm (figura 3-39). Descartando la posibilidad de contaminación cruzada, ya que el medio de cultivo fue filtrado en membranas de nitrocelulosa y almacenados en recipientes de vidrio, este resultado sugiere que la esterilización del PET con el medio de cultivo favorece el desprendimiento de monómeros del material, sin intervención del microorganismo. Nair (1990) encontró que tras la esterilización del PET con vapor se producen reacciones de escisión y ciclación de cadena, en la cual los productos pueden migrar a la superficie del polímero [108]. Por lo anterior se decidió desinfectar el PET con etanol al 70%, e introducirlo a los medios de cultivo posterior a la esterilización de éstos.

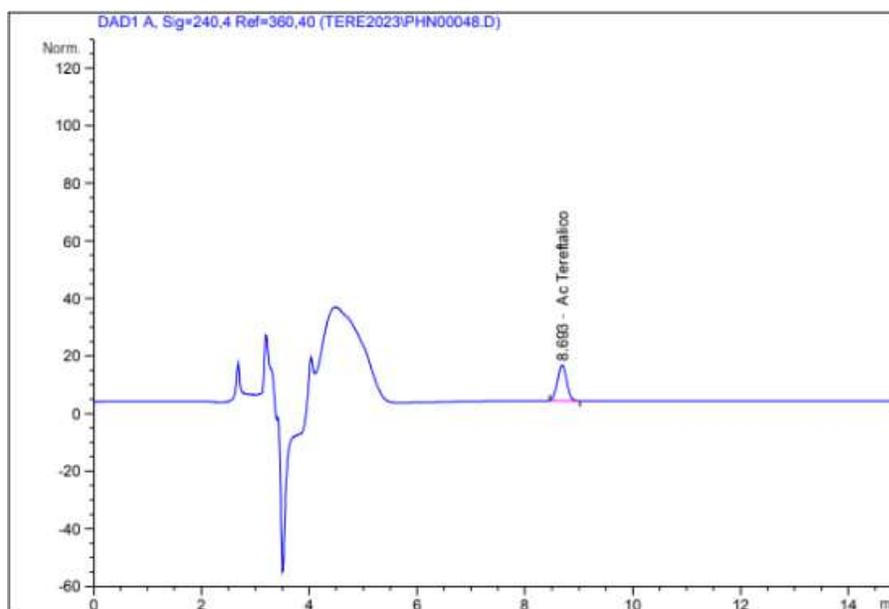


Figura 3-39 Medio de cultivo compuesto por sales minerales y PET, sin inoculación de *Penicillium spp*.

Por otro lado, al realizar la cuantificación del ácido tereftálico presente en el medio de cultivo en los tratamientos en los que hubo presencia y acción del microorganismo sobre el PET, se encontró que la concentración del ácido tereftálico fue de 0.05 ppm (figura 3-40). Este resultado es significativamente menor al caso en el que no hubo acción del microorganismo (figura 3-39)

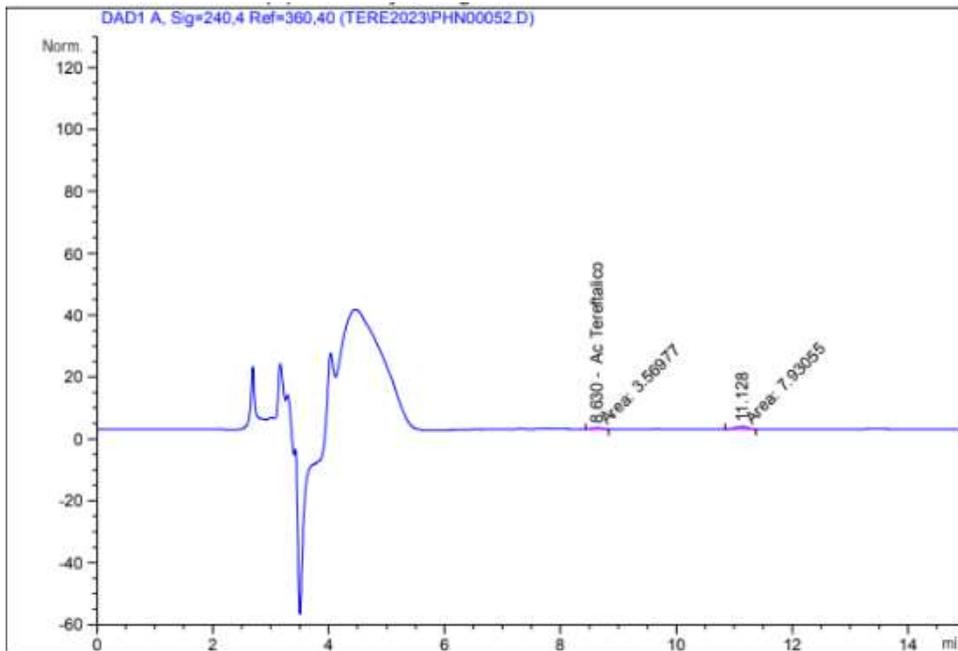


Figura 3-40 Fermentación de *Penicillium spp* en presencia de PET para su degradación

La presencia de ácido tereftálico en el medio de cultivo en una concentración mayor en ausencia del microorganismo con potencial de degradación del PET, sugirió que *Penicillium spp* podría tener la capacidad de metabolizar el ácido tereftálico presente en el medio. Con respecto a esto, se conoce que el ácido fenilacético, que es un compuesto aromático con un ácido carboxílico en su cadena lateral, es un precursor de la penicilina G en hongos filamentosos como *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus nidulans*. Estos hongos captan esta molécula mediante difusión pasiva, y es catabolizado por la vía catabólica del homogentisato [135], [136]. Siendo el ácido tereftálico un compuesto similar

al ácido fenilacético en su conformación molecular (conformada por un anillo aromático y dos cadenas laterales con ácido carboxílico) (ver figura 3-41), existe la posibilidad de que este se esté consumiendo por el microorganismo como precursor de otros metabolitos.

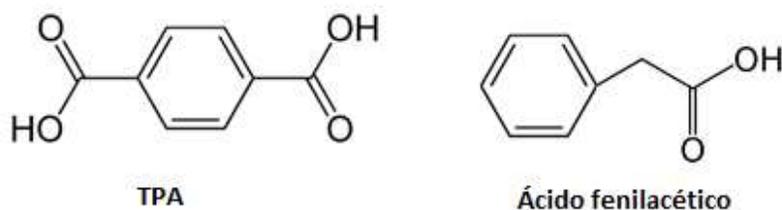


Figura 3-41 Comparación entre la molécula de TPA y ácido fenilacético. Basado en [129],[134]

Por lo anterior, se analizó un medio de cultivo para *Penicillium spp.* con una concentración inicial de TPA igual a 0.8 ppm (figura 3-42) sin la presencia del microorganismo, y otro con la presencia del microorganismo (figura 3-43). Se encontró que, posterior a las 96 horas de exposición del monómero al microorganismo, hubo una reducción significativa de la concentración de TPA en el medio, correspondiendo a 0.03 ppm. Este hallazgo confirma la hipótesis de que la cepa de *Penicillium spp.* empleada tiene la capacidad de metabolizar el TPA. La reducción de los anillos aromáticos derivados de este monómero puede ser una de las posibles explicaciones para este fenómeno, tal como fue reportado por Nowak et al. (2011) para el caso del crecimiento de *Penicillium funiculosum* en películas de PET [30].

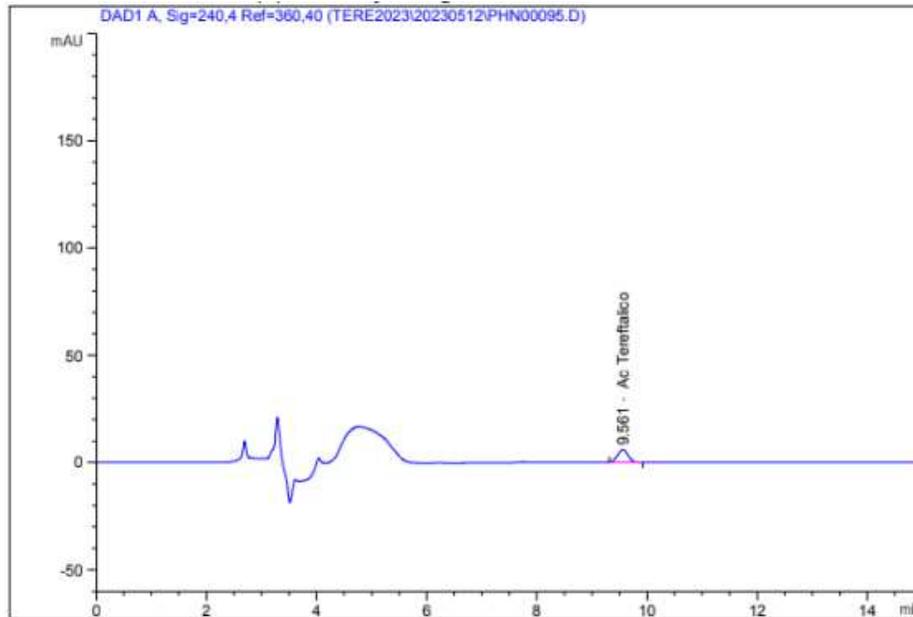


Figura 3-42 Medio de cultivo compuesto por sales minerales y TPA, sin inoculación de *Penicillium spp.*

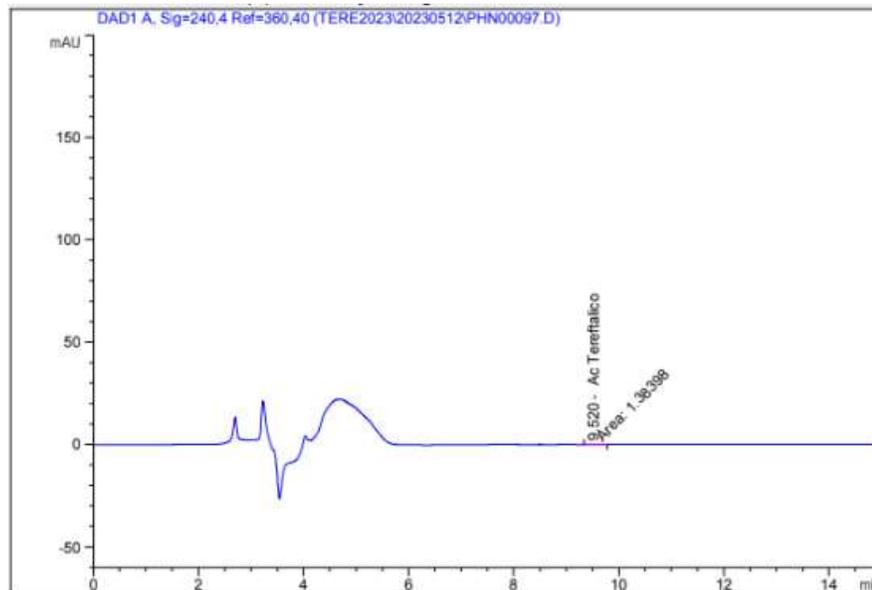


Figura 3-43 Crecimiento de *Penicillium spp* empleando TPA como única fuente de carbono

Se encontró adicionalmente que, al aplicar la misma metodología para el hongo *Aspergillus nidulans*, el microorganismo tuvo la capacidad de crecer en un medio con TPA como su única fuente de carbono, reduciendo la concentración inicial de 0.5 g/L a 0.1 g/L, tal como se observa en la figura 3-44

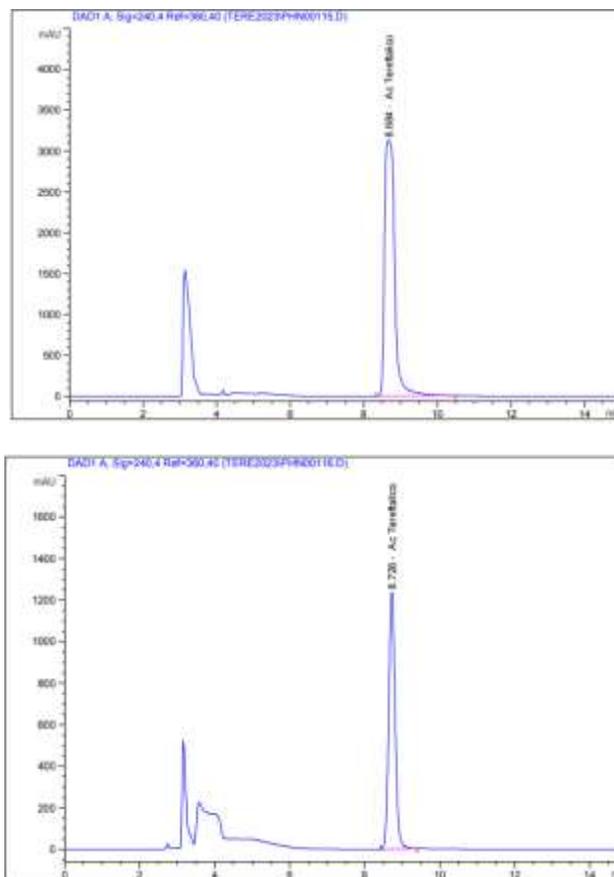


Figura 3-44 (Superior) Medio de cultivo compuesto por sales minerales y TPA, sin inoculación de *A. nidulans*. (Inferior). Crecimiento de *A. nidulans* empleando TPA como única fuente de carbono

Con base en los resultados anteriores, se determina que la exposición directa del PET al microorganismo implica que, ante la degradación de este polímero en TPA y otros productos, el TPA probablemente sería consumido por el microorganismo. Esto conllevaría a que la cuantificación de este monómero mediante HPLC se viera subestimada. Considerando lo anterior, y teniendo en cuenta que este proyecto de investigación está en dirección de la economía circular del PET, se elige evaluar la biodegradación del material

mediante su exposición al extracto enzimático concentrado obtenido en la fermentación del hongo *Aspergillus nidulans*.

3.12 Evaluación de la degradación del PET en el tiempo

3.12.1 Degradación en tubos de ensayo

En la figura 3-45 y 3-46 se presenta el control del buffer con películas de PET, y el control del buffer con extracto enzimático. De acuerdo con el estándar de TPA presentado en la figura D-1 del anexo D, el tiempo de retención de esta molécula es aproximadamente 8 minutos. Este tiempo de retención es inferior al hallado en el desarrollo del método presentado anteriormente, lo cual se puede deber a variaciones en la concentración de los componentes de la fase móvil, ya que las otras condiciones del método se mantuvieron iguales.

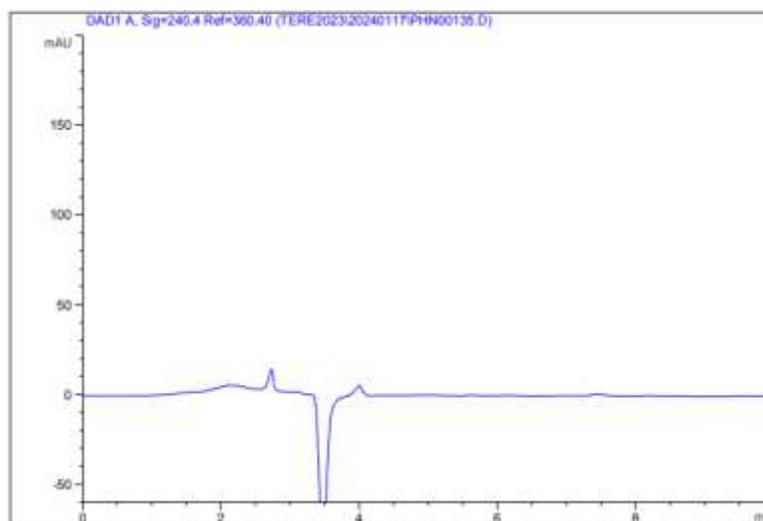


Figura 3-45 Blanco del buffer Tris HCl 0.1 M pH 9

En la figura 3-45, se observan señales en los primeros minutos del análisis, las cuales se atribuyen al buffer tris-HCl. Por otro lado, no se identifican picos de ácido tereftálico (TPA) en el tiempo de retención de 8 min. Esto indica que el buffer no participa en la degradación del PET. Adicionalmente, al no esterilizarse el PET, no se liberaron sus monómeros u oligómeros al medio de reacción, como se evidenció en casos anteriores.

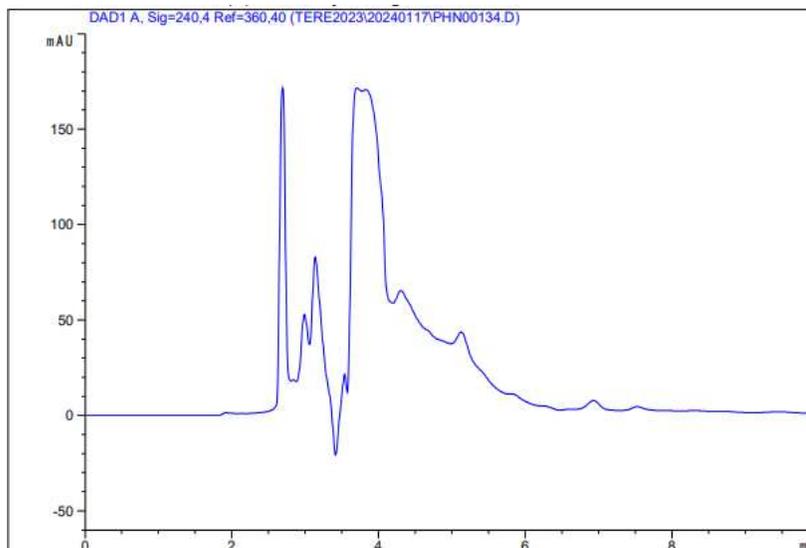


Figura 3-46 Blanco del buffer Tris HCl 0.1 M pH 9 y extracto enzimático

En la figura 3-46 se identifica la presencia de la señal del buffer tris-HCl en un tiempo de retención entre 2 y 6 min. Asimismo, en este rango se observa la señal del extracto enzimático, cuyos componentes son sales minerales y aminoácidos partícipes en el crecimiento del microorganismo *Aspergillus nidulans*. En este blanco tampoco se identifica el pico de ácido tereftálico (TPA). De acuerdo con estos blancos, se establece que el buffer y el extracto enzimático no generan interferencias en la cuantificación del TPA. Por lo tanto, la lectura del ácido que se realice en los tratamientos analizados corresponderá únicamente a este monómero, dando cuenta de la degradación del PET.

En la tabla 3-5 se muestra los resultados de la cuantificación de TPA en los medios de reacción enzimática en 6 días de evaluación. Los cromatogramas de estos tratamientos se presentan en el anexo D, de la figura D-2 a la figura D-5.

Tabla 3-5 Cuantificación del ácido tereftálico presente en medios de degradación de PET en el tiempo

Tiempo de fermentación (h)	[TPA] ppm	PET inicial (g)	Masa perdida del PET (g)
Blanco buffer	0.0± 0.0	0.0454 ± 0.0001	0.0000 ± 0.0001
Blanco buffer + extracto	0.0± 0.0	0.0± 0.0	0.0000 ± 0.0000
24	0.039 ± 0.005	0.0453 ± 0.0006	0.0001 ± 0.0000
48	0.045± 0.002	0.0395 ± 0.0008	0.0001 ± 0.0001
96	0.053± 0.001	0.0525 ± 0.0003	0.0001
*144	0.056	0.0454	0.0002

Nota: Valores promedio ± desviación estándar de dos réplicas

* Análisis de un solo tratamiento

En la evaluación de la degradación del PET añadido a cada mezcla de extracto enzimático, se halló la presencia de ácido tereftálico (TPA) en todos los tratamientos, cuya concentración osciló entre 0.039 ppm a las 24 horas de exposición y 0.056 ppm a las 144 horas. Asimismo, la reducción del peso del PET en este tiempo fue de 0.4%. Si bien la concentración del TPA y el aumento de la degradación en el tiempo son mínimos, la aparición de los picos de TPA evidencia la existencia de una enzima o grupos de enzimas (de peso molecular mayor a 30 kDa) con capacidad de realizar la degradación de este polímero.

La mínima degradación pudo deberse a que la actividad enzimática y la concentración de la enzima en el medio es reducida en comparación con la cantidad de PET añadido.

Adicionalmente, el aumento de la concentración de TPA en el medio y la disminución de peso del polímero sugiere que aumentar el tiempo de exposición podría aumentar la degradación del PET. Con base en lo anterior, se requieren abordar estrategias que tengan un efecto positivo y significativo en el mejoramiento de la biodegradación del PET. Estas estrategias podrían enmarcarse en el pretratamiento del material, el aumento de la cantidad de proteína producida, la actividad enzimática, la concentración de proteína obtenida, la cantidad de enzima añadida a los medios de reacción, la purificación de la enzima, el tiempo de exposición, entre otros.

Por otro lado, producto de la degradación del material se pueden obtener otros compuestos diferentes al ácido tereftálico. Estos compuestos podrían ser oligómeros de cadena corta, como el BHET y el MHET, u oligómeros de cadena larga. Dado que el método desarrollado solo permite realizar la identificación y cuantificación del TPA, este análisis de la evolución de la degradación del PET solo se puede realizar en términos de esta variable, desconociendo otros posibles productos de la degradación.

3.12.2 Degradación en biorreactor

Al realizar la evaluación de la degradación del PET a través de la cuantificación del TPA en el medio de reacción en biorreactor durante las 24, 48, 96 y 140 horas de exposición del material al extracto, se encontró que no hubo presencia de este monómero.

En la figura 3-47 se muestra el cromatograma de la muestra tomada del medio de reacción en el biorreactor a las 144 horas de iniciada la exposición del PET. Al comparar esta muestra con el blanco del buffer-extracto enzimático (figura 3-46), se observa que el extracto en el biorreactor se encuentra diluido de tal manera que los picos relacionados a las sales minerales y aminoácidos provenientes del medio de crecimiento de *Aspergillus nidulans* descritos en el blanco, no se pudieron identificar.

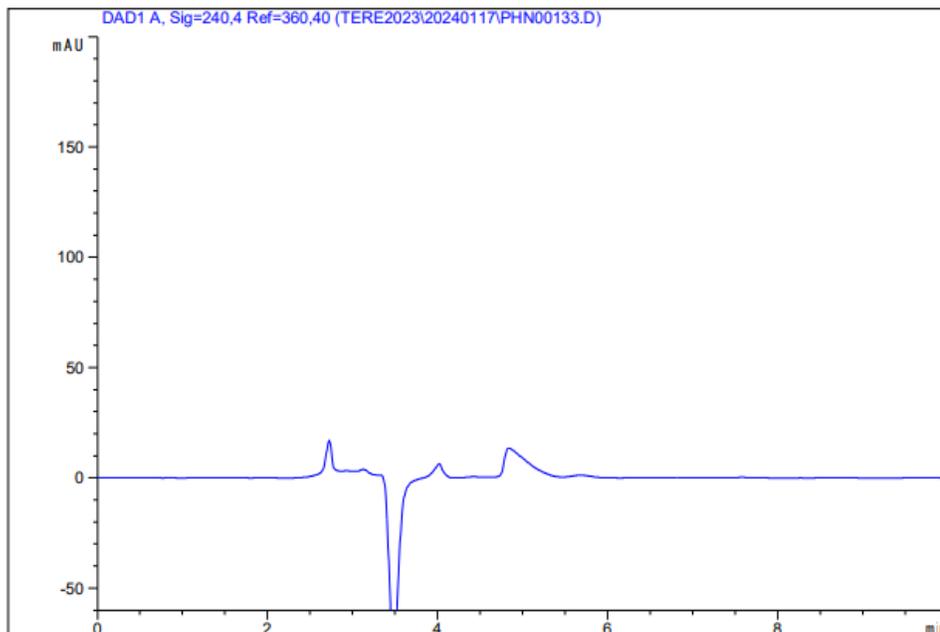


Figura 3-47 Medio de degradación del PET a las 144 horas de exposición del PET

La degradación del PET por vía enzimática obedece, entre otras cosas, a la efectiva interacción entre la enzima y la superficie del material. Por ello diferentes autores han implementado estrategias como adición de hidrofobinas o surfactantes para la funcionalización de la superficie del PET y adsorción de la enzima en ésta, las cuales han demostrado su eficacia en la optimización de esta interacción a nivel de matraces [123], [137], [138]. Sin embargo, al escalar el proceso a nivel de biorreactor, la dilución del extracto enzimático redujo las interacciones enzima-PET. Este desafío abre la puerta a la exploración de una relación óptima entre el volumen del extracto enzimático y el buffer tris HCl que no limite la interacción crucial para la degradación del PET, impulsando así el desarrollo de una tecnología sostenible para la gestión de este.

Por último, cabe mencionar que no se observó pérdida aparente de peso del material, lo que refuerza la idea de que las proteínas presentes en el medio no tuvieron acción en la superficie del material.

3.13 Efecto del pretratamiento del PET en su degradación

3.13.1 Empleo de extracto enzimático y buffer tris HCl como medio de reacción.

En la tabla 3-6 y en las figuras E-1, E-2 y E-3 del anexo E, se presentan los resultados obtenidos al realizar diferentes pretratamientos del PET, y exponerlo durante 144 horas a la mezcla de extracto enzimático – buffer Tris HCl 0.1 M pH 9 en una relación 2:1.

Tabla 3-6 Cuantificación del ácido tereftálico presente en medios de degradación de PET (extracto enzimático + buffer) ante diferentes pretratamientos del polímero, en un tiempo de 144 h.

Pretratamiento	Tipo	[TPA] (ppm)	PET inicial (g)	Masa perdida del PET (g)
Reducción de tamaño (177 μm), sin adición de surfactante ni calentamiento a Tg.	Físico	0.06 \pm 0.01	0.0448 \pm 0.0004	0.0017 \pm 0.0006
Funcionalización de la superficie del PET con surfactante catiónico, sin reducción de tamaño ni calentamiento a Tg	Químico	0.0 \pm 0.0	0.0448 \pm 0.0004	0.0002 \pm 0.0001
Calentamiento del material a su temperatura de transición vítrea (76°C), sin reducción de tamaño ni adición de surfactante	Térmico	0.049 \pm 0.002	0.0450 \pm 0.0006	0.0005 \pm 0.0002

Nota: Valores promedio \pm desviación estándar de tres réplicas

Tomando como base la concentración del TPA a las 144 horas de exposición de las láminas de PET al extracto enzimático con el buffer y sin ningún tipo de pretratamiento (0.056 ppm), se observa que la reducción del tamaño del PET a 177 μm (malla 80) aumenta ligeramente la concentración del ácido en el medio. Este aumento puede deberse a que la reducción en el tamaño del PET aumenta el área superficial del material y, por lo tanto, la probabilidad de contacto entre la enzima y la superficie del PET, como lo sugiere Farzi (2019) en su estudio de degradación del PET empleando diferentes tamaños de este [88].

La temperatura de transición vítrea (T_g) favorece la movilidad de las cadenas del polímero reduciendo la cristalinidad de este. Sin embargo, se sugiere que el material se someta a temperaturas cercanas a T_g durante el proceso de degradación [81]. Es decir, el conjunto extracto enzimático, buffer y PET deberían estar a una temperatura cercana a 76°C durante el tiempo de la evolución de la degradación. En el caso del tratamiento térmico evaluado, el material fue el único que se sometió a esta temperatura durante 3 horas para luego evaluar su degradación a 37°C . Esto se debe a que se desconoce la termoestabilidad de las enzimas presentes en el extracto.

Con base en lo anterior, si bien se observó la presencia de TPA en el medio a una concentración de 0.049 ppm, este pretratamiento no favoreció la obtención del ácido como producto de la hidrólisis completa del material, esto con respecto al emplear PET sin pretratamiento.

Adicionalmente, se obtuvo que en el pretratamiento de funcionalización de la superficie del PET con el surfactante catiónico dodeciltrimetilamonio ($\text{C}_{12}\text{-N}(\text{CH}_3)_3^+$), no se detectó la presencia del TPA en el medio, o su concentración fue inferior al límite de detección del método empleado. Este pretratamiento se diseñó con el fin de cargar positiva la superficie del PET para mejorar las interacciones electrostáticas entre el material y la enzima, que, para el caso de las cutinasas, se ha reportado que tiene carga global negativa [123]. No obstante, el resultado sugiere la posibilidad de que el surfactante presente en las películas tiene la capacidad de modificar la estructura de la enzima, además de tener un efecto inhibitorio en la reacción de despolimerización del PET, tal como lo reportaron Goto et al (1994) para la lipasa en presencia de surfactante en medio orgánico [139], y Lu et al (2021) para las lisozimas en presencia de Tween 21 y Dodecilsulfato sódico (SDS) [140].

Finalmente, en la tabla 3-6 se muestra la pérdida promedio de peso del material en cada ensayo con diferente pretratamiento. La mayor pérdida de peso correspondió al caso de emplear PET con tamaño de $177\ \mu\text{m}$, con una pérdida de 0.0017 g. Esto indica que durante

los 6 días de evaluación se tuvo una reducción del 3.0% del PET añadido inicialmente. Para el caso del tratamiento térmico la reducción del peso del PET fue el 1.1% y para el empleo de surfactante fue 0.4 %. Se evidencia una relación directa entre la pérdida de peso y la presencia de ácido tereftálico en el medio, sugiriendo que las enzimas en el extracto encargadas de la degradación del PET actúan como exoenzimas. Estas enzimas de acuerdo con Nowak et al (2011), actúan sobre los extremos del polímero, generando la liberación de oligómeros de cadena corta y monómeros, lo que consecuentemente se refleja en la pérdida de peso del material [30].

3.13.2 Empleo de extracto enzimático como único medio de reacción.

En la tabla 3-7 y en las figuras F-1, F-2 y F-3 del anexo F, se presentan los resultados obtenidos al realizar diferentes pretratamientos del PET, y exponerlo durante 144 horas a la mezcla de extracto enzimático, sin la adición del buffer Tris HCl 0.1 M pH 9.

Tabla 3-7 Cuantificación del ácido tereftálico presente en medios de degradación de PET (extracto enzimático) ante diferentes pretratamientos del polímero, en un tiempo de 144 h.

Pretratamiento	Tipo	[TPA] (ppm)*	PET inicial (g)	Masa perdida del PET (g)**
Reducción de tamaño (177 μ m), sin adición de surfactante ni calentamiento a Tg.	Físico	0.062 \pm 0.005	0.0448 \pm 0.0004	0.0026 \pm 0.0004
Funcionalización de la superficie del PET con surfactante catiónico, sin reducción de tamaño ni calentamiento a Tg	Químico	0.0451 \pm 0.0007	0.0448 \pm 0.0004	0.0002 \pm 0.0001
Calentamiento del material a su temperatura de transición vítrea (76°C), sin reducción de tamaño ni adición de surfactante	Térmico	0.049 \pm 0.008	0.0450 \pm 0.0006	0.0003 \pm 0.0001

Nota: *Valores promedio \pm desviación estándar de dos réplicas

**Valores promedio \pm desviación estándar de tres réplicas

Al analizar los resultados de la tabla 3-7, se observa un ligero aumento en la producción de TPA cuando no se utiliza el buffer Tris HCl 0.1 M pH 9. El pretratamiento que produce la mayor cantidad de ácido tereftálico (TPA) como producto de degradación es la reducción del tamaño de PET a 177 μm (malla 80), seguido por el calentamiento de las láminas de PET a su temperatura de transición vítrea. Este comportamiento es similar al que se observa cuando se utiliza el buffer en el medio de reacción.

Por otro lado, el pretratamiento de funcionalización de las películas de PET con el surfactante catiónico generó una concentración de ácido tereftálico de 0.0451 ppm, el cual no se detectó TPA cuando se utilizó el buffer en el medio de reacción. Esto podría deberse a que el Tris, aunque estabiliza e inmoviliza enzimas, también puede inhibir su actividad al unirse al sitio activo [141], [142]. Este resultado sugiere que, sin la presencia del buffer, la inhibición competitiva no ocurre y la proteína solo experimenta cambios conformacionales debido al surfactante. En conjunto, estos resultados sugieren que la estrategia de funcionalizar el PET con el surfactante y usar Tris-HCl pH 9 como buffer no es viable.

Adicionalmente, se obtuvo que la pérdida de peso en el pretratamiento de calentamiento, reducción de tamaño de partícula y funcionalización de las películas de PET fue aproximadamente 7%, 6% y 1%, respectivamente. La pérdida de peso del material apunta a que, en términos de pérdida de peso del material, el empleo del extracto sin presencia de buffer es una opción recomendable para seguir explorando.

De manera general, aunque diferentes autores han demostrado que el buffer Tris HCl estabiliza la enzima en el medio de reacción [141], [142], su ausencia mejora ligeramente la despolimerización del PET. Sin embargo, la estabilidad de la enzima a largo plazo podría verse afectada, por lo que es importante estudiar en profundidad la relación entre el buffer y el extracto, así como el tipo de buffer más favorable para la degradación del PET.

Finalmente, el porcentaje de degradación obtenido del 7% actualmente no es representativo en comparación con el reportado por la empresa francesa Carbios, la cual ha logrado una despolimerización del 90% del PET en un tiempo de 10 horas [81]. Sin embargo, estos resultados confirman la presencia de una o un conjunto de enzimas hidrolíticas con la capacidad de degradar PET. Estos resultados son un punto de partida para un estudio a mayor profundidad del extracto enzimático y el empleo de nuevas estrategias no abordadas aquí que permitan en Colombia considerar el reciclaje biológico del PET como una alternativa sostenible en términos sociales, ambientales y económicos.

3.14 Evaluación de cambios morfológicos del PET posterior al empleo de extracto enzimático.

3.14.1 Análisis de cambios en la morfología empleando la técnica ATR-FTIR

La evaluación de los cambios morfológicos se llevó a cabo para los pretratamientos de calentamiento del material a su temperatura de transición vítrea (75 °C) y de reducción del tamaño del PET a un tamaño de partícula de 177 μm . Estos pretratamientos fueron seleccionados debido a que en ellos se determinó la mayor concentración de TPA.

En la Figura 3-48 se observa el espectro de PET en láminas pretratadas a la temperatura de transición vítrea (75 °C). La curva negra corresponde a las láminas de PET expuestas al extracto enzimático concentrado, mientras que la curva roja representa las láminas de PET sin dicha exposición.

En estos espectros, los picos ubicados entre 1720 cm^{-1} y 1615 cm^{-1} se corresponden con el estiramiento del grupo carbonilo presente en enlaces éster y anillos de benceno. En la región de 3500 cm^{-1} a 3200 cm^{-1} se observan picos del grupo hidroxilo característico del

ácido carboxílico. Finalmente, los picos en las regiones de $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ y $1450 - 1350 \text{ cm}^{-1}$ pueden asignarse a los enlaces C-H de alcanos, alquenos y alquinos.

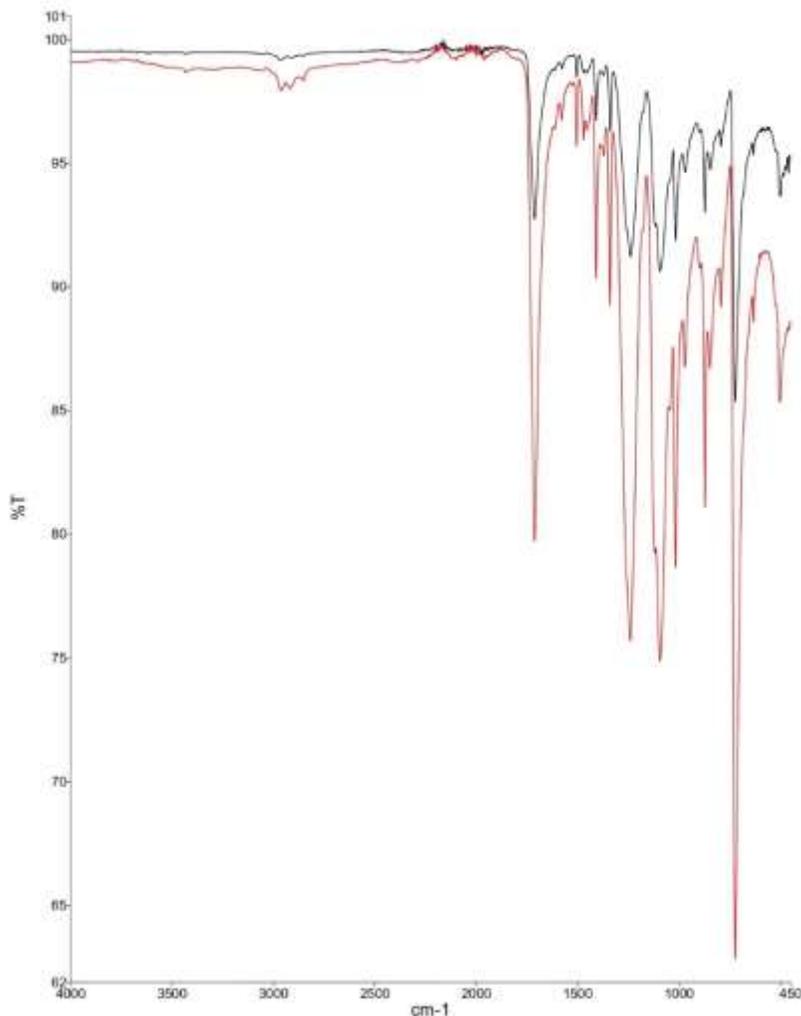


Figura 3-48 Espectro del PET calentado a la temperatura de transición vítrea sin exposición a extracto enzimático (rojo) y con exposición a extracto enzimático (negro).

Al comparar los dos espectros de la Figura 3-48, se observa un cambio de intensidad en los picos de ambos. Al exponer el material al extracto enzimático, se aprecia una disminución evidente de la intensidad de los picos, lo que, según Chen et al. (2012), es

una clara evidencia de la reducción de la cristalinidad del material polimérico [143]. Esta reducción de la cristalinidad del PET indica que en el material aumentaron las regiones amorfas y, consecuentemente, la movilidad de sus cadenas, lo que puede facilitar su degradación.

Las diferencias en los espectros del ATR-FTIR indican que el extracto enzimático ha tenido un efecto sobre la superficie del PET. La disminución de la intensidad de la banda a 1700 cm^{-1} en el PET con enzima es consistente con la hidrólisis del enlace éster, lo que se confirma con la cuantificación de monómeros de ácido tereftálico mediante HPLC.

Similar al caso del pretratamiento de exposición de las láminas de PET a su temperatura de transición vítrea, la Figura 3-49 muestra los dos espectros del PET con tamaño de partícula de $177\text{ }\mu\text{m}$. El espectro negro corresponde al PET sin exposición al extracto enzimático, mientras que el rojo corresponde al PET expuesto al extracto enzimático.

En la región de $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ del espectro negro se observan tres bandas que se reducen significativamente en el espectro rojo. Estas bandas se atribuyen a los grupos CH_2 del PET. La ausencia de estas bandas en el espectro rojo sugiere que los grupos CH_2 pueden haber sido degradados por la enzima. Asimismo, el pico de mayor intensidad en la región de 1700 cm^{-1} , correspondiente al grupo carbonilo del grupo éster, también se reduce notablemente. Esto sugiere que el grupo carbonilo también puede haber sido degradado por las enzimas presentes en el extracto.

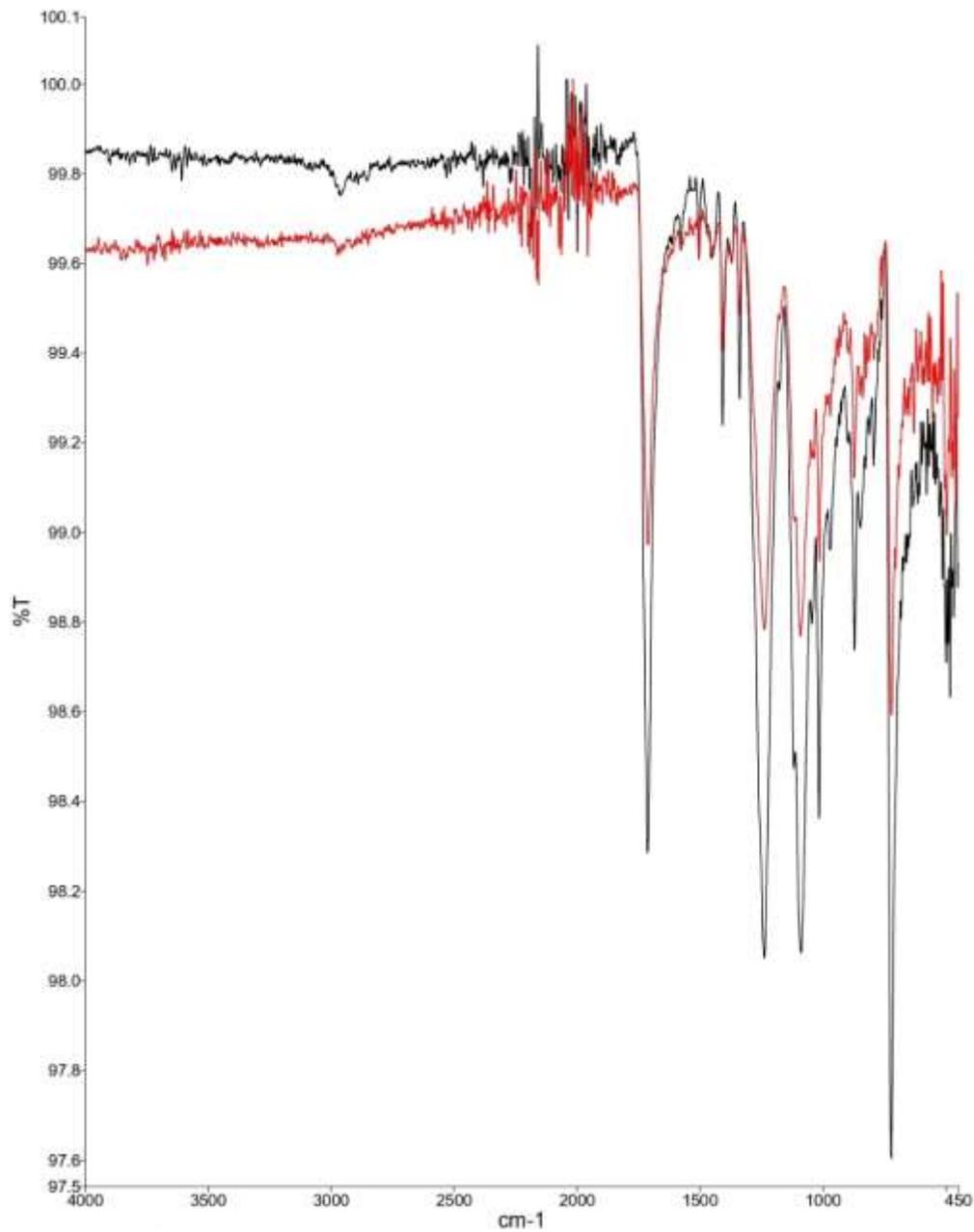


Figura 3-49 Espectro del PET reducido al tamaño de 177 μm sin exposición a extracto enzimático (negro) y con exposición a extracto enzimático (rojo).

3.14.2 Análisis de cambios en la morfología empleando la técnica DSC.

Al igual que en el empleo de la técnica ATR-FTIR, la evaluación de los cambios morfológicos en este caso se llevó a cabo para los pretratamientos de calentamiento del material a su temperatura de transición vítrea (75 °C) y de reducción del tamaño del PET a un tamaño de partícula de 177 μm . Estos pretratamientos fueron seleccionados debido a que en ellos se determinó la mayor concentración de TPA.

En la tabla 3-8 se presenta el porcentaje de cristalinidad hallado a partir de los análisis de calorimetría diferencial de barrido para cada uno de los pretratamientos mencionados (figuras G-1, G-2, G-3 y G-4 del anexo G).

Tabla 3-8 Cristalinidad del PET en cada tratamiento.

Pretratamiento	ΔH_m (J/g)	ΔH_c (J/g)	ΔH_m° (J/g)	%Cristalinidad	Reducción %Cristalinidad
Calentamiento de láminas a la temperatura de transición vítrea sin exposición al extracto enzimático	42.001	1.924	140.1	28.6	4.0%
Calentamiento de láminas a la temperatura de transición vítrea con exposición al extracto enzimático	39.881	1.411	140.1	27.5	
Reducción de tamaño (177 μm) sin exposición al extracto enzimático	41.873	2.426	140.1	28.2	2.3%
Reducción de tamaño (177 μm) con exposición al extracto enzimático	41.225	2.682	140.1	27.5	

Inicialmente, es posible observar de la tabla 3-8 que la cristalinidad del PET de las botellas de agua Brisa utilizadas en la evaluación de la degradación es alrededor del 28%, superior al 22% encontrado en las botellas de la misma marca en los experimentos de selección de material de la sección 3.8. Este cambio puede deberse a la variabilidad natural de las propiedades entre botellas de PET, e incluso entre secciones de la misma botella. Cabe mencionar que un mayor porcentaje de cristalinidad podría reducir la movilidad de las

cadena del polímero, dificultando su degradación en monómeros en comparación con botellas con menor cristalinidad (22%) [126].

La tabla 3-8 revela que la cristalinidad del PET se reduce en un 4% cuando se exponen películas de PET calentadas a su temperatura de transición vítrea al extracto enzimático. De manera similar, la cristalinidad del PET de tamaño reducido disminuye en un 2.3% al ser expuesto al mismo extracto. Estos resultados sugieren que la exposición del PET al extracto enzimático aumenta las regiones amorfas del material, haciéndolo más susceptible a la biodegradación. Estos hallazgos son consistentes y complementarios con el análisis ATR-FTIR, que evidenció una posible reducción de la cristalinidad del material después de su exposición al extracto enzimático.

La evaluación de los cambios morfológicos en el PET expuesto al extracto enzimático confirma los resultados de la cuantificación de ácido tereftálico mediante HPLC, que evidencian la degradación del polímero. Estos resultados conjuntos respaldan la continuación del estudio de la degradación del PET por vía biológica como una alternativa viable.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

Con base en el trabajo realizado para dar cumplimiento al objetivo general, el cual correspondió a la evaluación del efecto de los extractos enzimáticos y/o cepas microbianas en la degradación del PET, se presentan las siguientes conclusiones correspondientes a los objetivos específicos propuestos.

4.1.1 Objetivo específico 1 y 2

Objetivo 1: Definir unas condiciones de operación para la producción de biomasa a escala de laboratorio tendiente a la producción de enzimas con actividad para degradar PET

Objetivo 2: Establecer condiciones fisicoquímicas y microbiológicas que favorezcan la producción de enzimas hidrolíticas degradadoras de PET.

- i. La morfología del microorganismo, en particular la formación de aglomerados de biomasa es un aspecto importante para considerar en el crecimiento de hongos filamentosos, especialmente en el caso de *Penicillium spp.* Los resultados de este estudio demuestran que la adición de NaCl (0.1 g/L), solución de elementos traza (2.5 mL/L), y un pH de carácter básico del medio de cultivo (pH 7.5 en matraz y pH 8 en biorreactor) son una alternativa viable para reducir significativamente el tamaño de dichos aglomerados.
- ii. En este estudio se evaluaron las cepas de *Aspergillus nidulans*, *Penicillium spp* y *Streptomyces spp* para su potencial en la degradación del enlace éster del polímero

del PET. Los resultados mostraron que la cepa de *Aspergillus nidulans* presentó la mayor productividad de biomasa (0.047 g/L-h en matraz, 0.18 en biorreactor) y la mayor actividad enzimática esterasa (2.14 U/mL en matraz y 36.7 U/mL en biorreactor). Estos resultados sugieren que *Aspergillus nidulans* es el microorganismo con mayor potencial para la degradación del PET.

- iii. Al hallar la actividad enzimática esterasa en los extractos producidos a nivel de matraz sin concentrar (2.14 U/mL), y la producida en biorreactor y posteriormente concentrada (36.7 U/mL), permite concluir que la producción de extractos enzimáticos en biorreactor y la ultrafiltración con membrana de tamaño de corte de 30 kDa como método de concentración de enzimas, es una estrategia favorable para la obtención de extractos con mayor actividad enzimática

4.1.2 Objetivo específico 3

Objetivo 3: Evaluar la degradación del PET empleando extractos enzimáticos y/o cepas microbianas, a través de la cuantificación de pérdida de peso del material, productos de degradación y potenciales cambios en su morfología.

- iv. *Penicillium spp* y *A. nidulans* poseen la capacidad de metabolizar monómeros como el TPA en la degradación del PET. Por lo tanto, si se está interesado en obtener estos metabolitos para su incorporación a nuevos ciclos productivos, la opción acertada es emplear el extracto enzimático como medio de exposición del material.
- v. El extracto enzimático con proteína de peso molecular mayor a 30 kDa permitió la hidrólisis de cadenas de PET sin pretratamiento, alcanzando una concentración de ácido tereftálico de 0.056 ppm en el medio de reacción a las 144 horas de exposición. Estos resultados demuestran que las condiciones fisicoquímicas y microbiológicas propuestas y evaluadas son adecuadas para la producción de enzimas hidrolíticas con capacidad de degradación del PET.

- vi. La reducción del tamaño del PET a 177 μm es el pretratamiento más favorable de los evaluados individualmente para facilitar la acción de la enzima sobre el material, alcanzando una concentración de ácido tereftálico de 0.06 ppm. Estos resultados sugieren que la tasa de degradación del PET podría incrementarse al explorar nuevos tipos de pretratamiento o realizar combinaciones de estos a través de diseños experimentales factoriales o superficies de respuesta.
- vii. La evaluación de la morfología del PET mediante técnicas como DSC (calorimetría diferencial de barrido) y ATR-FTIR (espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier por atenuación total) antes y después de la exposición al extracto enzimático es un paso relevante en la validación de su despolimerización. Lo anterior debido a que el análisis DSC permite determinar cambios en la cristalinidad del material, mientras que el análisis ATR-FTIR facilita la identificación de la presencia o ausencia de grupos funcionales específicos, permitiendo determinar si la enzima o el grupo de enzimas presentes en el extracto actúan sobre el material.

De manera general, se concluye que se cumplieron de manera satisfactoria los objetivos específicos, y consecuentemente el objetivo general de este trabajo de investigación, los cuales permitieron corroborar en gran medida la hipótesis planteada, dando respuesta a la pregunta de investigación de cómo se puede llevar a cabo la degradación del PET ante la exposición del polímero a cepas microbianas y/o extractos enzimáticos a condiciones de reacción del laboratorio. La cual de acuerdo con esta investigación se da mediante el crecimiento del hongo *Aspergillus nidulans* en un biorreactor batch, a 37°C, pH 6.8 y 600 rpm, empleando glucosa (10g/L) durante las primeras 20 horas como fuente de carbono. Posteriormente se realiza la inducción de la enzima mediante la adición de aceite de linaza (5 g/L). La biomasa se separa del extracto enzimático, y éste se concentra para que el PET de tamaño reducido (177 μm) sea expuesto durante 144 horas; esto con el fin de evitar el consumo de metabolitos como el TPA por parte del microorganismo.

4.2 Recomendaciones

A continuación, se presentan recomendaciones que pueden ser consideradas para investigaciones similares o extensión de la investigación desarrollada en esta tesis.

- i. La biodegradación controlada del PET hasta el oligómero diglicoltereftalato (DGT) permitiría reincorporar los metabolitos al ciclo productivo del PET, lo que supondría una ventaja económica y medioambiental. La principal ventaja de este proceso es que reduce el consumo energético como consecuencia de la omisión de la reacción de esterificación entre monómeros de ácido tereftálico y etilenglicol, como se muestra en la figura 1-1.
- ii. De la evaluación de la actividad esterasa en gel se identificaron 2 proteínas en el rango de peso molecular de las cutinasas ANCUT1 (< 30 kDa) y ANCUT 2 (>30 kDa) reportadas para *A. nidulans* [78], [79]. Debido a las limitaciones de las membranas disponibles en el laboratorio, no fue posible evaluar la degradación del PET tras su exposición a un extracto con proteínas de peso molecular menor a 30 kDa concentrado 5x. Por lo tanto, no se pudo comparar la actividad enzimática de las proteínas identificadas en el medio concentrado. Con base en lo anterior, realizar este procedimiento proporcionaría una mayor comprensión de las proteínas presentes y su potencialidad para degradar el PET.
- iii. Variar la relación de concentración entre el extracto enzimático y el buffer tris HCl pH 9 en el medio de degradación podría favorecer el contacto entre la enzima y el PET, lo que podría dar lugar a una mayor degradación de éste.
- iv. El hallazgo en esta investigación de enzimas hidrolíticas capaces de degradar el PET proveniente de botellas de agua brisa, si bien en cantidades no tan significativas, abre la posibilidad de mejorar la degradación de este material. Para ello, es fundamental estudiar las proteínas presentes en el extracto enzimático. Al obtener más información sobre estas enzimas, se podría clonar el gen que las

codifica y sobreexpresarlo en microorganismos de fácil crecimiento a escala de reactor. Además, se podrían abordar estrategias de ingeniería de proteínas, como las desarrolladas por la empresa francesa Carbios, con el objetivo de mejorar la actividad y estabilidad térmica de las enzimas.

- v. En *Streptomyces spp* se identificó la producción de proteínas sin actividad esterasa, que se han reportado como potenciales hidrofobinas [116], [117]. La validación de esta hipótesis permitiría utilizar de forma complementaria los extractos de *Streptomyces spp* con los de *A. nidulans* para mejorar la degradación del PET.
- vi. El empleo de técnicas microscópicas, como la microscopía electrónica de barrido, posibilitaría la observación de los cambios morfológicos y el posible desgaste en la superficie del PET expuesto a degradación. Esta técnica sería complementaría a las utilizadas en la presente investigación para la evaluación de los cambios morfológicos del polímero.
- vii. Si bien se desarrolló en la UNAL Medellín el método de cuantificación del ácido tereftálico mediante la técnica de HPLC, es importante desarrollar métodos para la identificación de otros metabolitos que puedan liberarse en la degradación PET, tales como oligómeros de cadena corta y cadena larga, ya que el etilenglicol y el ácido tereftálico son productos de la hidrólisis completa de este material.

A. Anexo: Curvas de fermentación de los microorganismos en biorreactor

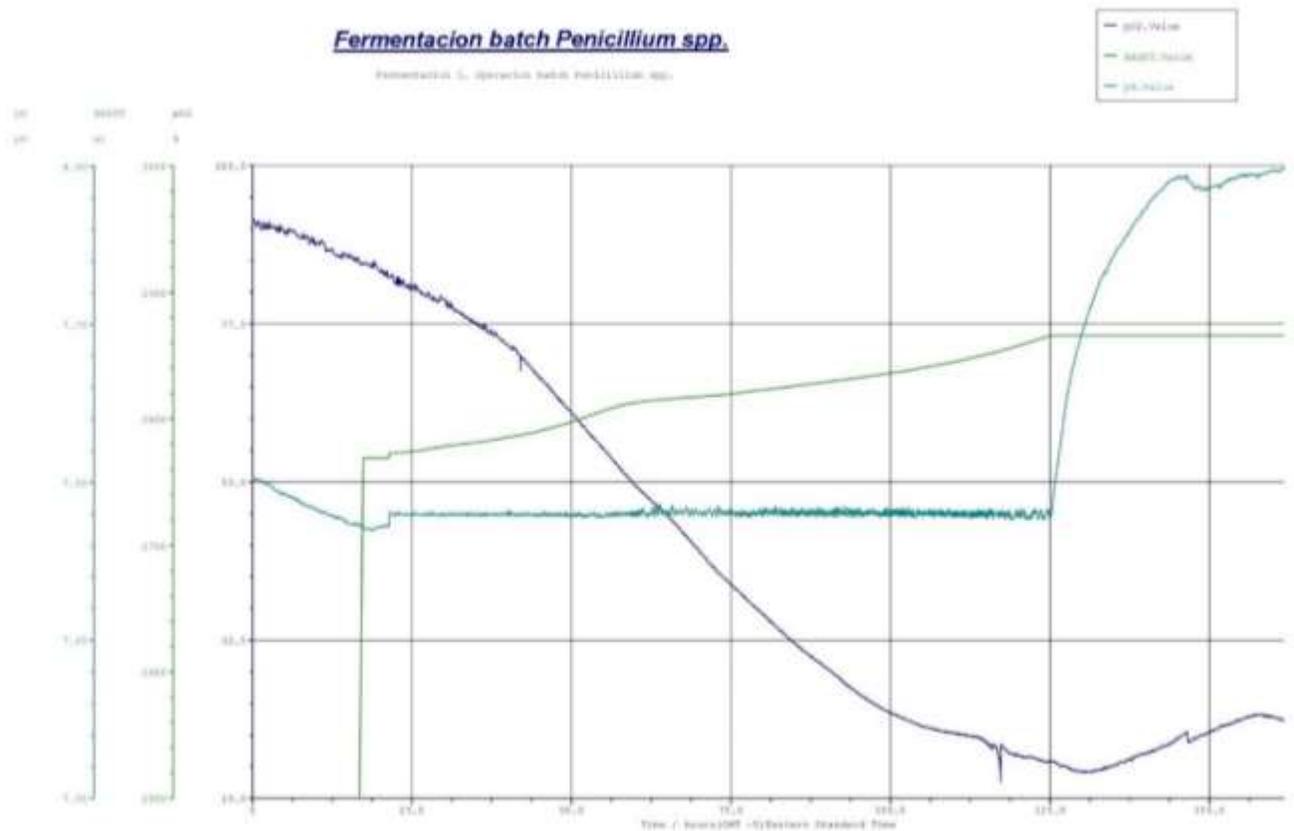


Figura A-1 Curvas de %pO₂(azul oscuro), mL NaOH (verde), pH (verde aguamarina) en fermentación por lotes de *Penicillium spp.*

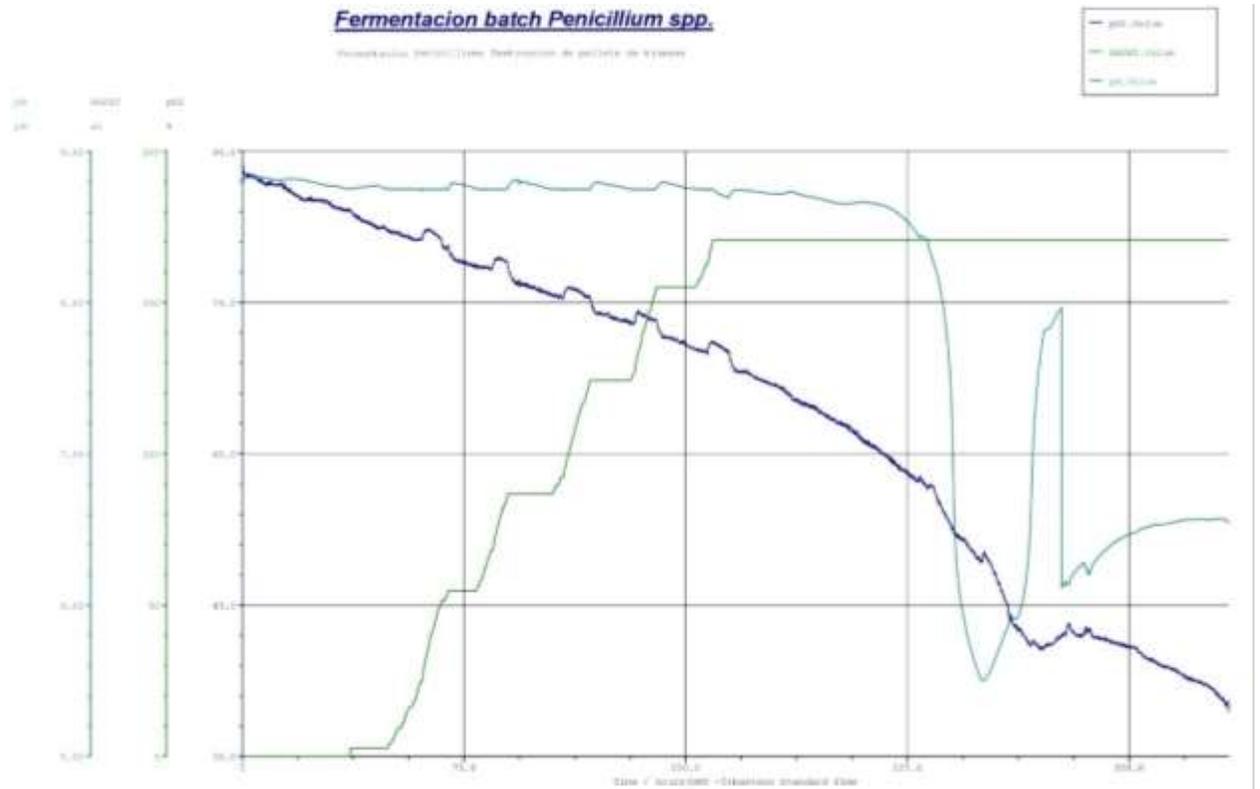


Figura A-2 Curvas de %pO₂(azul oscuro), mL NaOH (verde), pH (verde aguamarina) en fermentación por lotes de *Penicillium spp* – reducción aglomerados biomasa

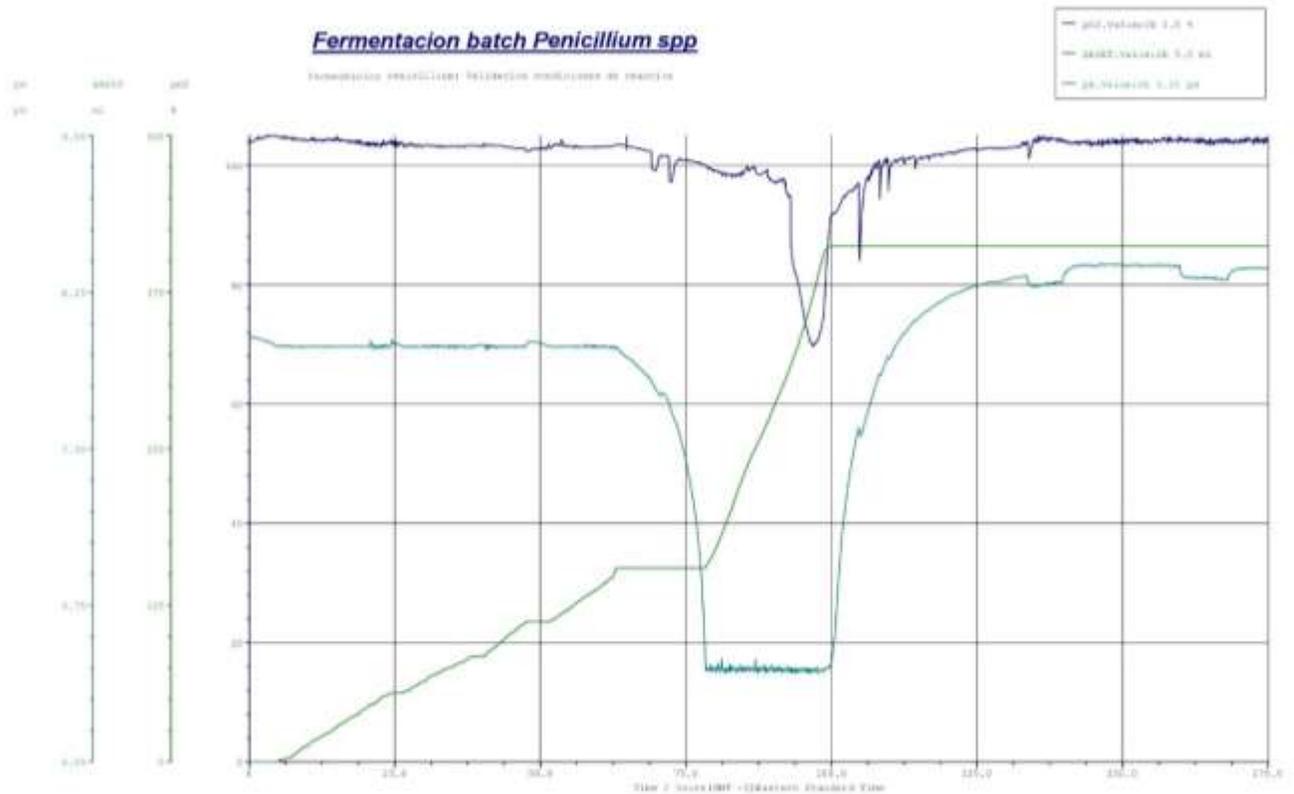


Figura A-3 Curvas de %pO₂(azul oscuro), mL NaOH (verde), pH (verde aguamarina) en fermentación por lotes de *Penicillium spp* – Validación reducción aglomerados biomasa

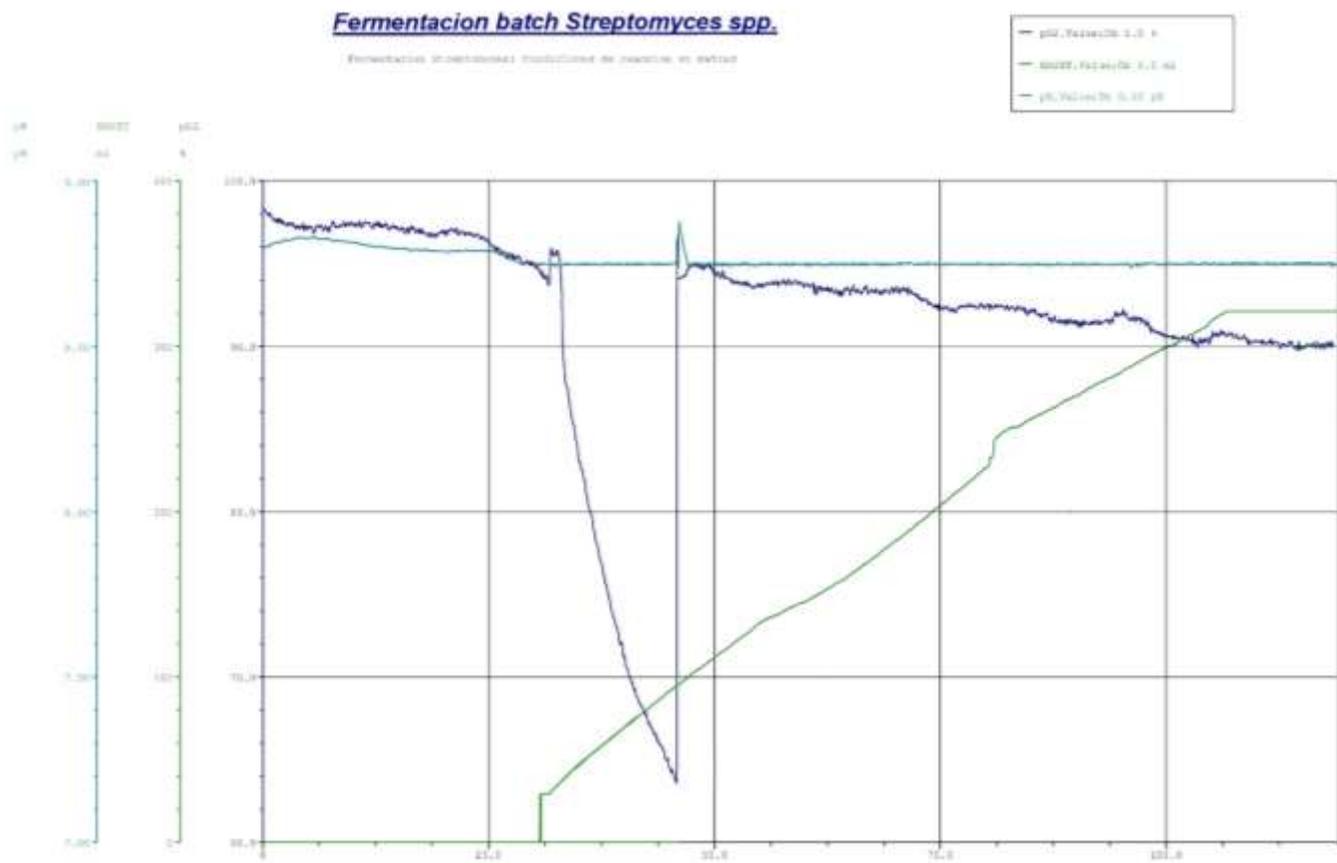


Figura A-4 Curvas de %pO₂(azul oscuro), mL NaOH (verde), pH (verde aguamarina) en fermentación por lotes de *Streptomyces spp*

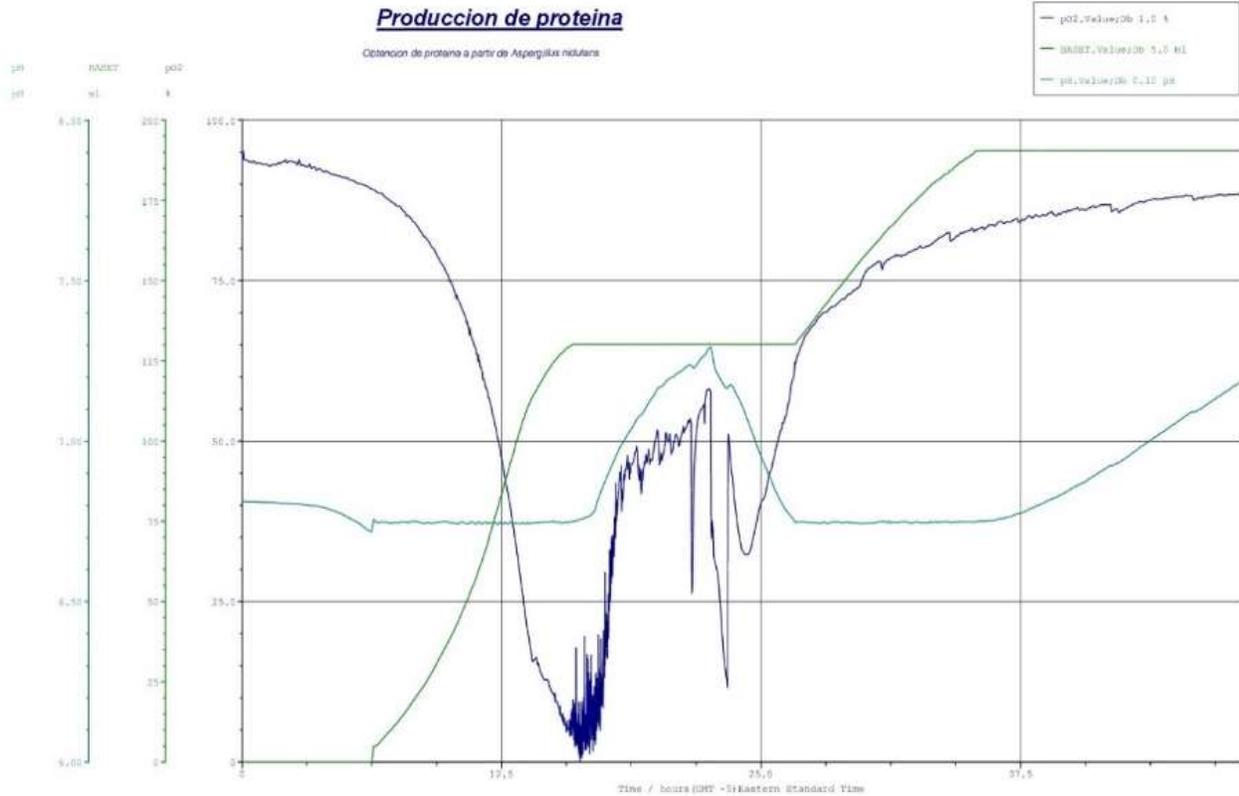


Figura A-5 Desempeño de la fermentación de *Aspergillus nidulans* con propósito de producción de proteína con actividad esterasa

B. Anexo: Regresión lineal de la actividad enzimática del extracto crudo

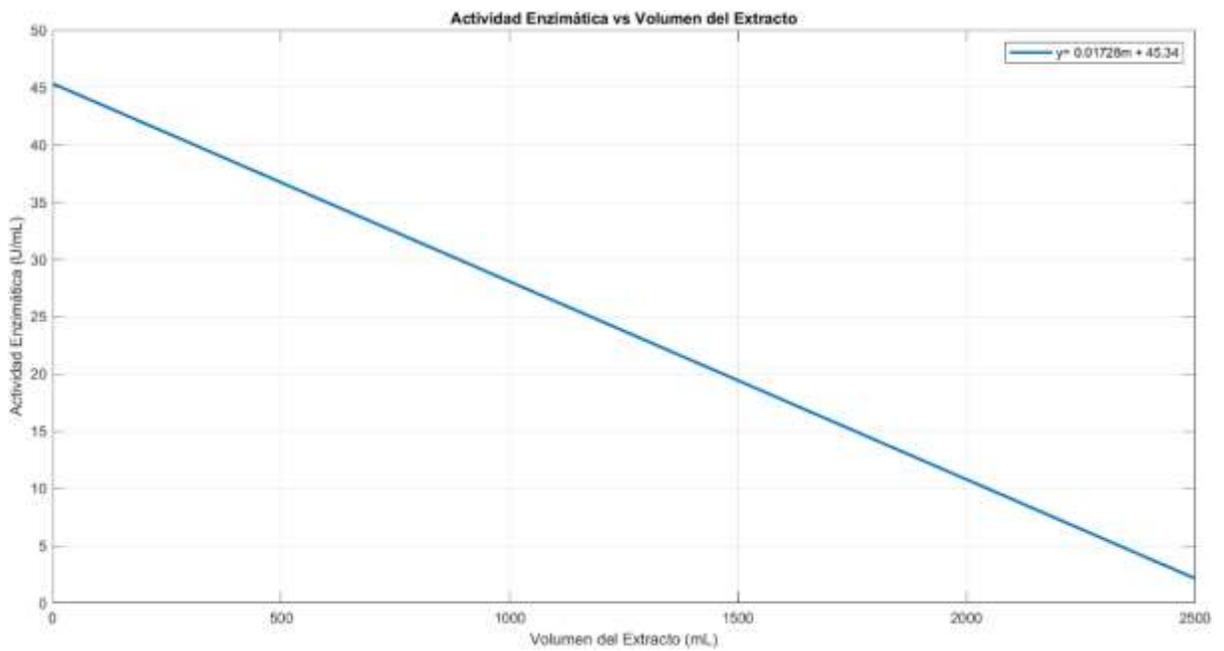


Figura B-1 Regresión lineal del extracto concentrado (1:5) en membrana con tamaño de corte de 30 kDa

C. Anexo: Tiempo de retención del TPA, MHET y BHET

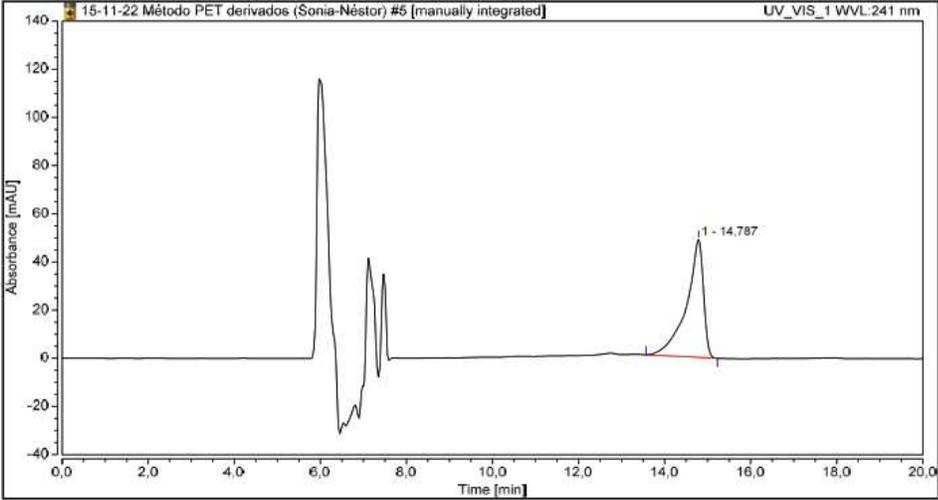


Figura C-1 Curva patrón de BHET (10mg/L)

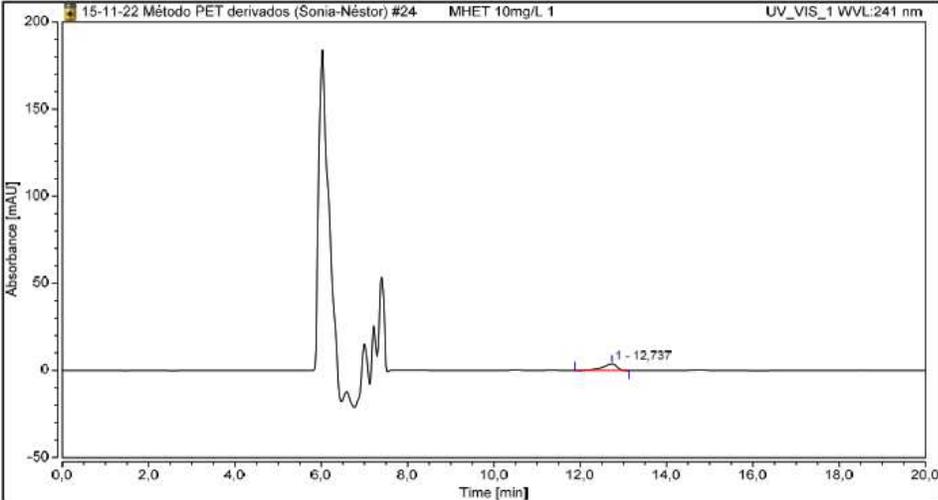


Figura C-2 Curva patrón de MHET (10mg/L)

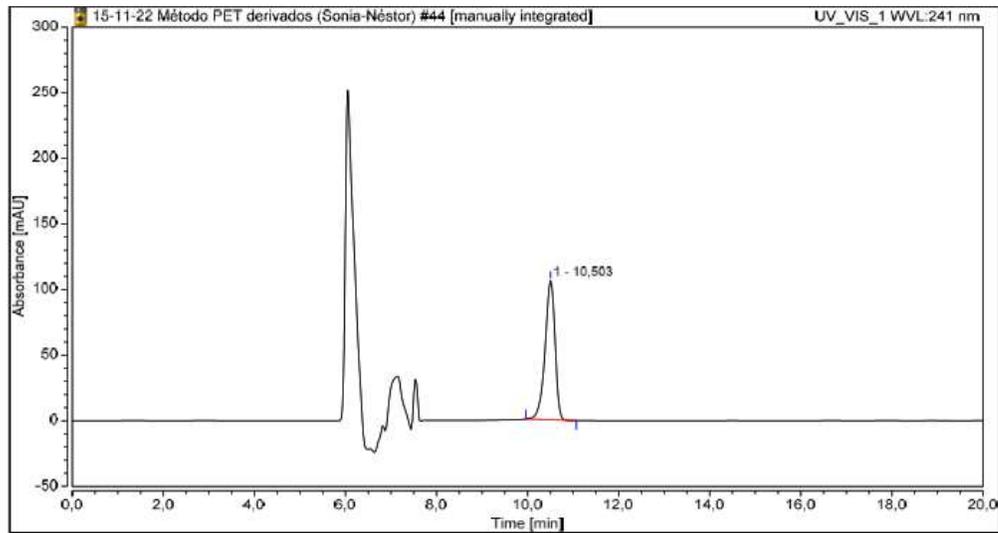


Figura C-3 Curva patrón de TPA (10mg/L)

D. Anexo: Cuantificación de TPA en el tiempo

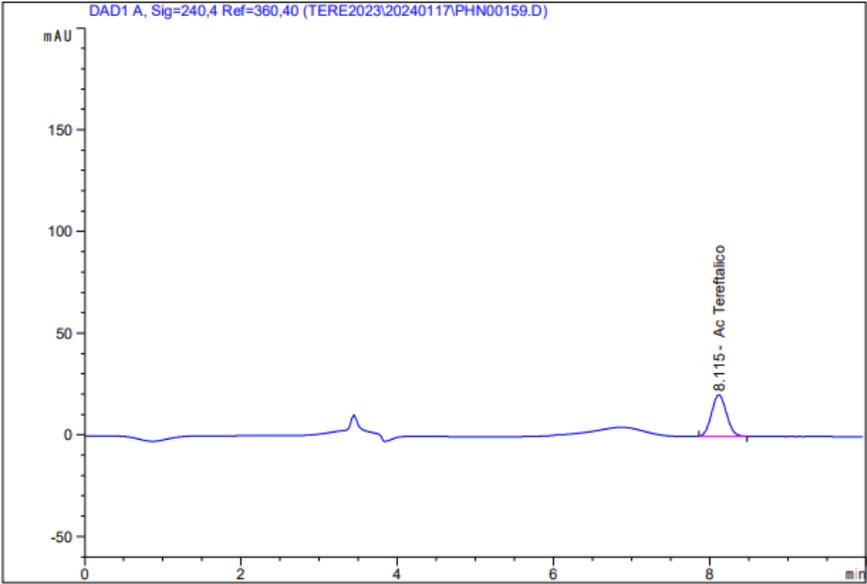


Figura D-1 Curva patrón de TPA (2.5 mg/L) a partir del método de cuantificación desarrollado en la Universidad Nacional de Colombia - Medellín

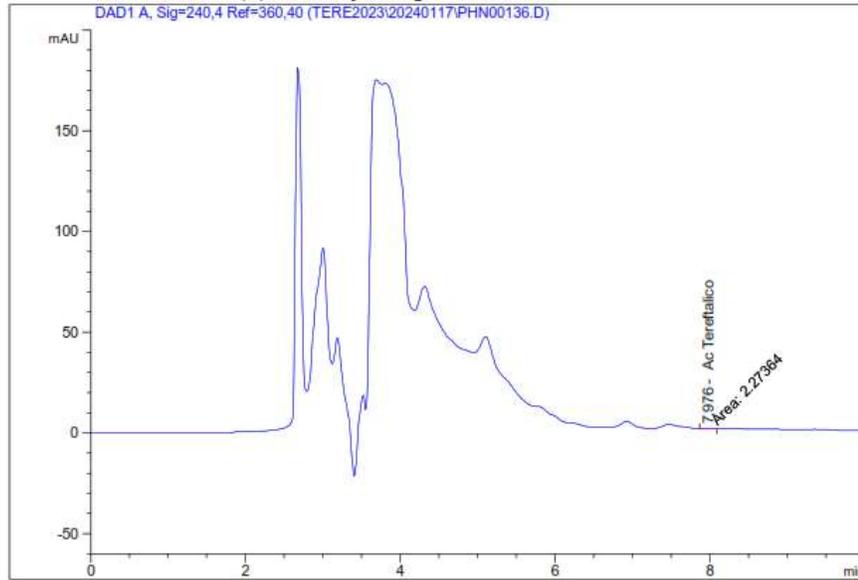


Figura D-2 Cuantificación de TPA a la hora 24 de exposición PET

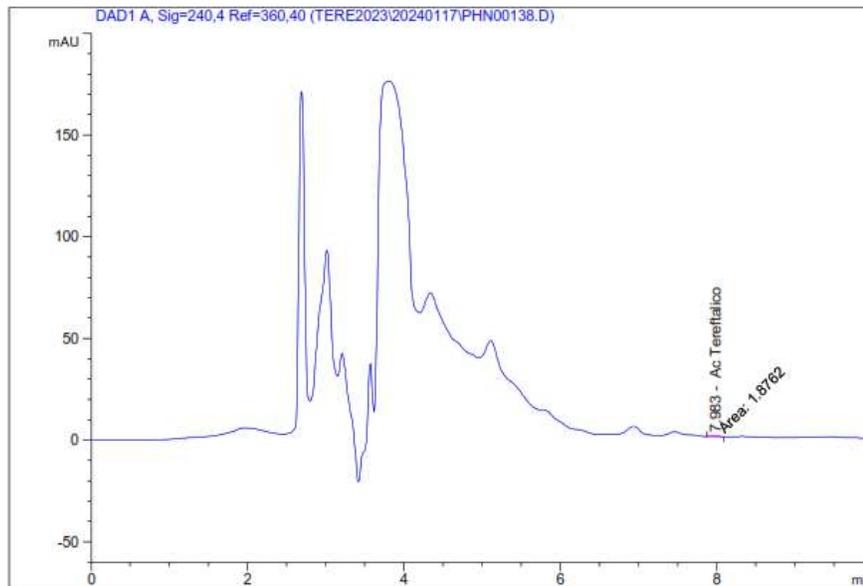


Figura D-3 Cuantificación de TPA a la hora 48 de exposición del PET

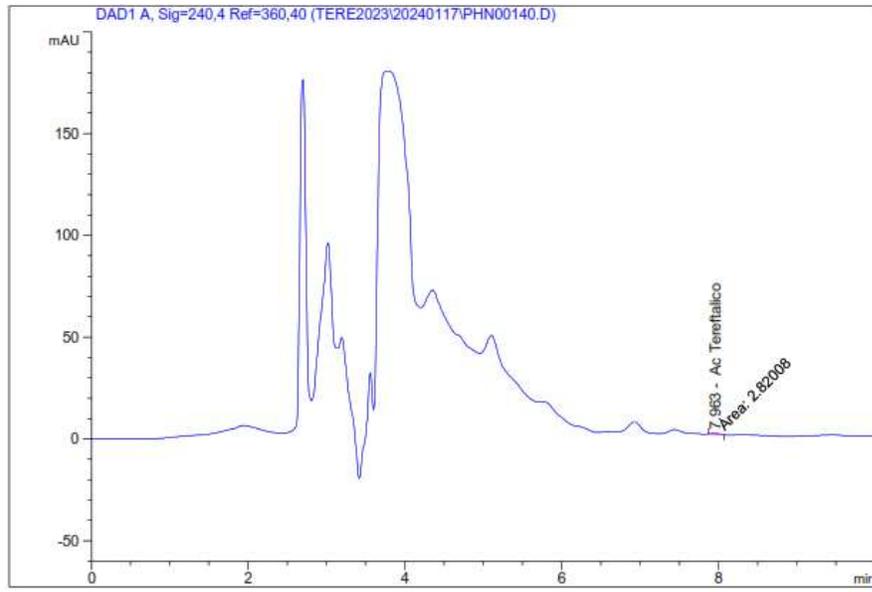


Figura D-4 Cuantificación de TPA a la hora 96 de exposición del PET

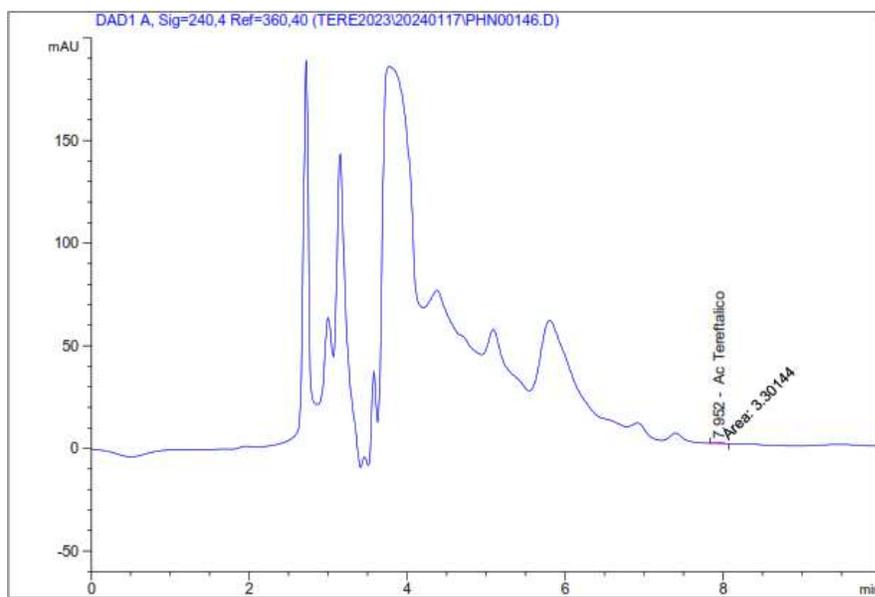


Figura D-5 Cuantificación de TPA a la hora 144 de exposición del PET

E. Anexo: Producción de TPA al exponer PET pretratado al extracto + buffer

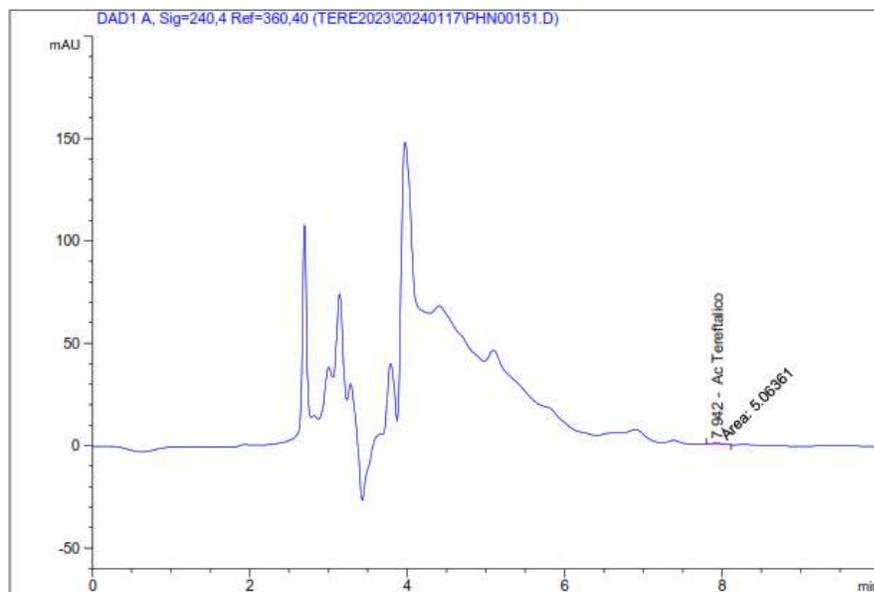


Figura E-1 Cuantificación de TPA en pretratamiento de reducción de tamaño (177 μm). Medio de reacción compuesto por buffer y extracto.

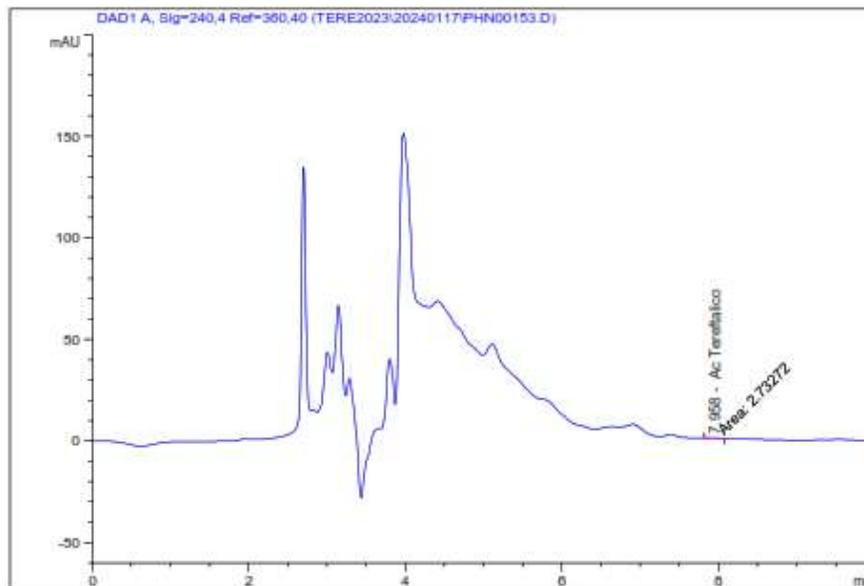


Figura E-2 Cuantificación de TPA en pretratamiento de temperatura de transición vítrea (76°C). Medio de reacción compuesto por buffer y extracto.

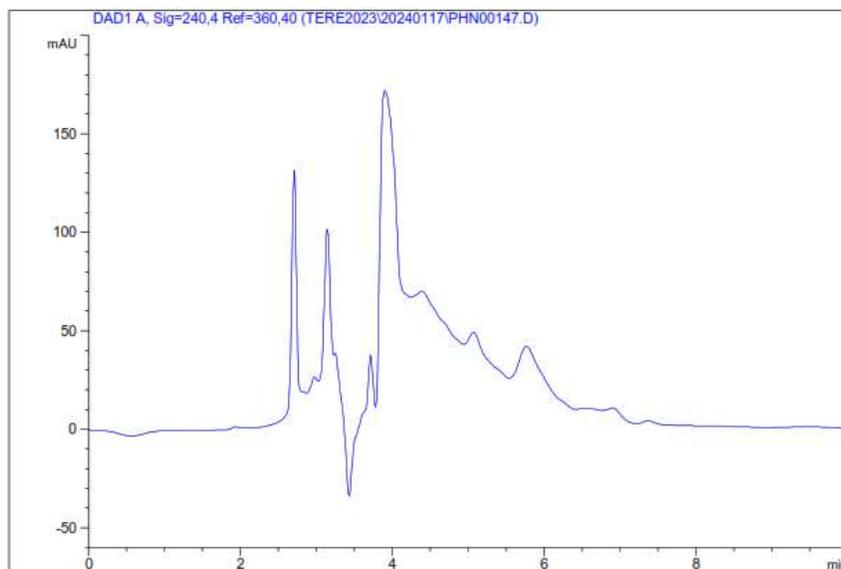


Figura E-3 Cuantificación de TPA en pretratamiento de temperatura funcionalización de la superficie de PET. Medio de reacción compuesto por buffer y extracto

F. Anexo: Producción de TPA al exponer PET pretratado al extracto.

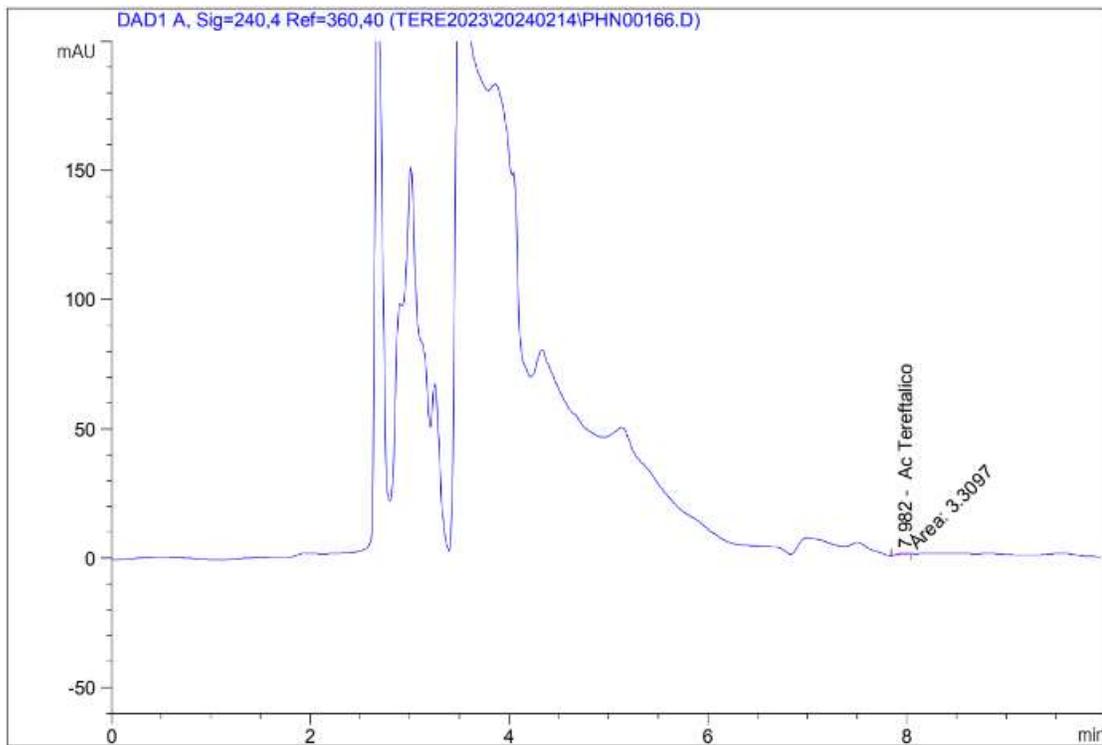


Figura F-1 Cuantificación de TPA en pretratamiento de temperatura de transición vítrea (76°C). Medio de reacción compuesto por extracto.

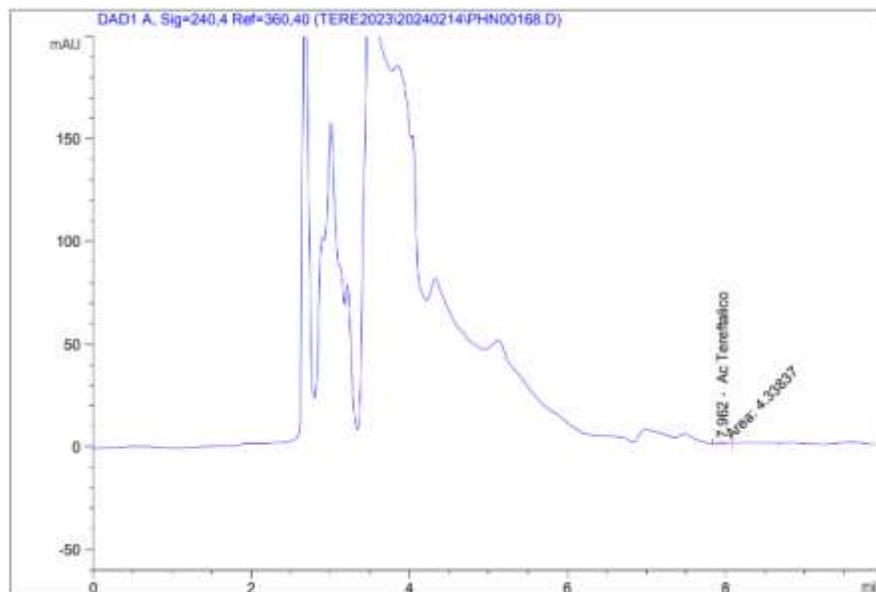


Figura F-2 Cuantificación de TPA en pretratamiento de reducción de tamaño (177 μm). Medio de reacción compuesto por extracto.

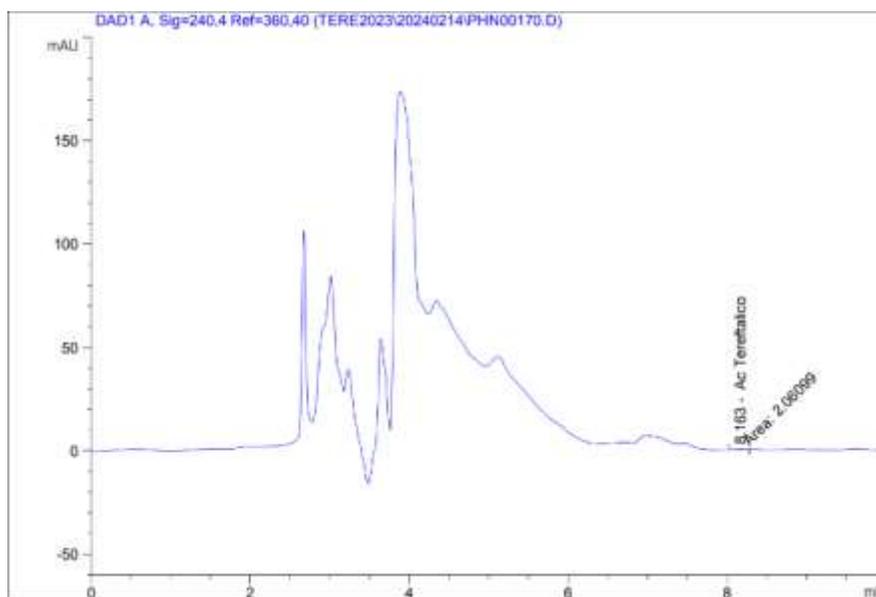


Figura F-3 Cuantificación de TPA en pretratamiento de temperatura funcionalización de la superficie de PET. Medio de reacción compuesto por extracto

G. Anexo: Análisis DSC de PET expuesto a extracto enzimático.

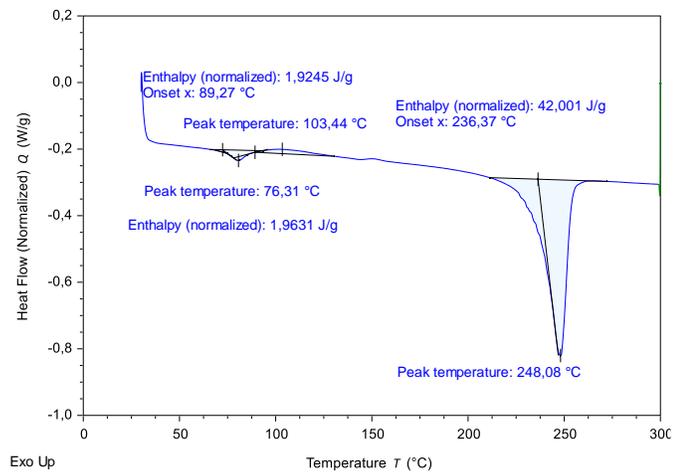


Figura G-1 Análisis DSC en película de PET calentada a 76°C sin exposición a extracto enzimático.

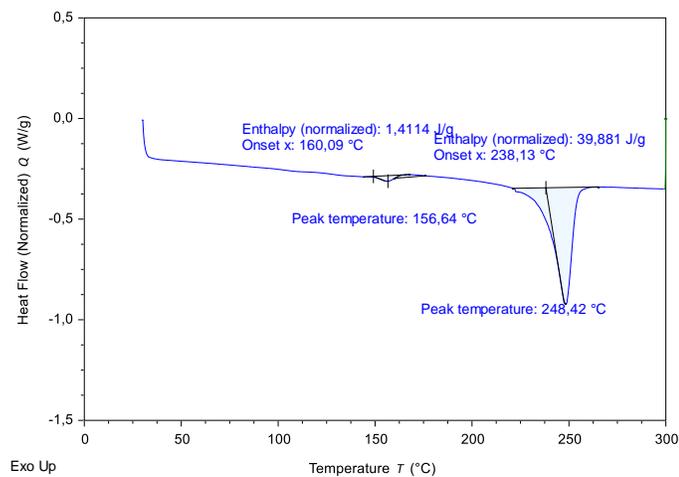


Figura G-2 Análisis DSC en película de PET calentada a 76°C con exposición a extracto enzimático.

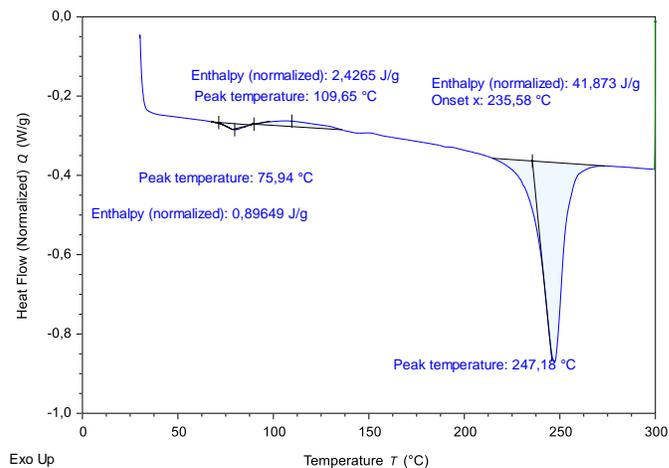


Figura G-3 Análisis DSC en PET de tamaño 177 μm sin exposición a extracto enzimático.

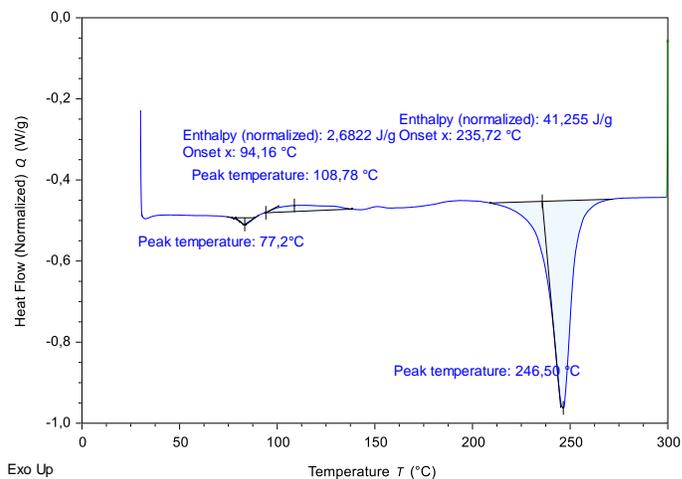


Figura G-4 Análisis DSC en PET de tamaño 177 μm con exposición a extracto enzimático.

Bibliografía

- [1] P. Clunies, S. Collie, y T. Farrelly, “Plastic in the environment”, Wellington, 2013.
- [2] Plastic soup foundation, “Plastic production decomposition”. Consultado: el 10 de noviembre de 2021. [En línea]. Disponible en: <https://www.plasticsoupfoundation.org/en/plastic-problem/plastic-environment/plastic-production-decomposition/#:~:text=World production of plastic increased,in the last thirteen years.>
- [3] I. Tiseo, “Global plastic production 1950-2020”. Consultado: el 16 de enero de 2022. [En línea]. Disponible en: <https://www.statista.com/statistics/282732/global-production-of-plastics-since-1950/>
- [4] S. Laville y M. Taylor, “A million bottles a minute: world’s plastic binge as dangerous”, *The Guardian*, London, 2017.
- [5] Statista Research Department, “Production of polyethylene terephthalate bottles worldwide from 2004 to 2021”. Consultado: el 11 de diciembre de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.statista.com/statistics/723191/production-of-polyethylene-terephthalate-bottles-worldwide/>
- [6] Transparency Market Research, “Plastic Bottle Recycling Market”. Consultado: el 11 de diciembre de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.transparencymarketresearch.com/plastic-bottle-recycling-market.html#:~:text=Increase%20in%20global%20concern%20about,was%20about%2027.2%25%20in%202021>
- [7] Enka, “Informe de sostenibilidad ENKA 2017”, Medellín, 2017.
- [8] W. Zimmermann y S. Billig, “Enzymes for the Biofunctionalization of Poly (Ethylene Terephthalate)”, *Biotechnology*, 2010, doi: 10.1007/10_2010_87.
- [9] Statista Research Department, “Market volume of polyethylene terephthalate worldwide from 2015 to 2022, with a forecast for 2023 to 2030”. Consultado: el 11 de diciembre de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.statista.com/statistics/1245264/polyethylene-terephthalate-market-volume-worldwide/>

- [10] Responsabilidad integral de Colombia, “Reciclaje químico y economía circular: retos y oportunidades”, en *Economía circular*, Bogotá, 2020.
- [11] C. Blair y B. Quinn, *Microplastic Pollutants*, 1a ed. Elsevier inc, 2017.
- [12] H. Rueda, “Evaluación del potencial de cutinasas para hidrolizar poli(etileno tereftalato) (PET), aisladas a partir de hongos filamentosos presentes en residuos agroindustriales.”, Maestría de diseño y gestión de procesos, Universidad de la Sabana, 2016.
- [13] D. Bermúdez, “Evaluación de microorganismos (*Trichoderma* spp. y *Pseudomona Aeruginosa*) para la degradación del PET”, Fundación Universidad de América, Bogotá D.C, 2021.
- [14] D. López, “Caracterización de láminas de materiales compuestos de polietilentereftalato con partículas cerámicas”, Escola Tècnica Superior d’Enginyeria Industrial de Barcelona, 2014.
- [15] D. López, “Caracterización de láminas de materiales compuestos de polietilentereftalato con partículas cerámicas”, Escola Tècnica Superior d’Enginyeria Industrial de Barcelona, 2014.
- [16] Omnexus, “Polyethylene Terephthalate (PET): A Comprehensive Review”.
- [17] I. Gacén, Esbec, “Modificación de la estructura fina de las fibras PET en el termofijado y en la tintura posterior. Tintura competitiva de sustratos termofijados a temperaturas vecinas”, 2004.
- [18] Textos científicos, “POLÍMEROS CRISTALINOS Y AMORFOS”.
- [19] Textos científicos, “POLÍMEROS CRISTALINOS Y AMORFOS”.
- [20] J. Speight, “Polymer degradation”, en *Handbook of industrial Hydrocarbon Processes*, 2a ed., Gulf Professional Publishing, 202d. C., pp. 95–142.
- [21] H. Abedsoltan, “A focused review on recycling and hydrolysis techniques of polyethylene terephthalate”, *Polym Eng Sci*, vol. 63, núm. 9, pp. 2651–2674, sep. 2023, doi: 10.1002/pen.26406.
- [22] K. G. Gopalakrishna y N. Reddy, “Regulations on Recycling PET Bottles”, en *Recycling of Polyethylene Terephthalate Bottles*, vol. 1, S. Thomas, Rane Ajay, y K. Kanny, Eds., Elsevier, 2018, pp. 23–35. doi: 10.1016/B978-0-12-811361-5.00002-X.

- [23] H. Palma y F. Tenesaca, “Estudio de la degradabilidad del PET (Polietilentereftalato) dosificado con celulosa de la cáscara de cacao. ”, Licenciatura, Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca, 202d. C.
- [24] B. Bertolotti, J. Chávez, R. Laos, C. Rospigliosi, y J. Nakamatsu, “Poliésteres y Reciclaje Químico del Poli(tereftalato de etileno) ”, *Revista de Química*, vol. 19, núm. 1, pp. 13–20, jun. 2005.
- [25] A. M. Al-Sabagh, F. Z. Yehia, Gh. Eshaq, A. M. Rabie, y A. E. ElMetwally, “Greener routes for recycling of polyethylene terephthalate”, *Egyptian Journal of Petroleum*, vol. 25, núm. 1, pp. 53–64, mar. 2016, doi: 10.1016/j.ejpe.2015.03.001.
- [26] C. Benavidez, M. Guzmán, S. Quijano, y L. Carvajal, “Microbial degradation of polyethylene terephthalate: a systematic review”, *SN Appl Sci*, vol. 4, núm. 263, sep. 2022.
- [27] R. Geyer, J. R. Jambeck, y K. L. Law, “Production, use, and fate of all plastics ever made”, *Sci Adv*, vol. 3, núm. 7, jul. 2017, doi: 10.1126/sciadv.1700782.
- [28] I. Taniguchi, S. Yoshida, K. Hiraga, K. Miyamoto, Y. Kimura, y K. Oda, “Biodegradation of PET: Current Status and Application Aspects”, *ACS Catal*, vol. 9, núm. 5, pp. 4089–4105, may 2019, doi: 10.1021/acscatal.8b05171.
- [29] G. M. Guebitz y A. Cavaco-Paulo, “Enzymes go big: surface hydrolysis and functionalisation of synthetic polymers”, *Trends Biotechnol*, vol. 26, núm. 1, pp. 32–38, ene. 2008, doi: 10.1016/j.tibtech.2007.10.003.
- [30] B. Nowak, J. Pająk, y S. Labuzek, “Biodegradation of poly(ethylene terephthalate) modified with polyester ‘Bionolle’ by *Penicillium funiculosum*”, *Polimery*, vol. 56, pp. 35–56, 2011, doi: 10.14314/polimery.2011.035.
- [31] D. Castro-Ochoa, C. Peña-Montes, y A. Farres, “Producción y características de cutinasas: Una alternativa interesante para biocatálisis a nivel industrial”, *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, vol. 1, pp. 16–25, 2010.
- [32] Diccionario biología, “Qué es cutina”.
- [33] S. Chen, L. Su, y J. Wu, “Cutinase: Characteristics, preparation, and application”, *ELSEVIER*, vol. 31, núm. 8, pp. 1754–1767, 2013, doi: doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.09.005.
- [34] M. Egmond y J. Vlieg, “*Fusarium solani* pisi cutinase”, *ELSEVIER*, vol. 82, pp. 1015–1021, 2000.

- [35] D. Castro-Ochoa, C. Peña-Montes, y A. Farres, "Producción y características de cutinasas: Una alternativa interesante para biocatálisis a nivel industrial", *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, vol. 1, pp. 16–25, 2010.
- [36] I. Donelli, V. Nierstrasz, y P. Taddei, "Surface structure and properties of poly-(ethylene terephthalate) hydrolyzed by alkali and cutinase", *Polym Degrad Stab*, 2010.
- [37] B. Knott, E. Erickson, E. Allen, J. Gado, y H. Austin, "Characterization and engineering of a two-enzyme system for plastics depolymerization", *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 41, pp. 25476–25485, 2020, doi: 10.1073/pnas.2006753117.
- [38] D. Li y P. Kolattukudy, "Cloning of cutinase transcription factor 1, a transactivating protein containing Cys6Zn2 binuclear cluster DNA-binding motif.", *The Journal of Biological Chemistry*, 1997.
- [39] M. V. Powers-Fletcher, B. A. Kendall, A. T. Griffin, y K. E. Hanson, "Filamentous Fungi", *Microbiol Spectr*, vol. 4, núm. 3, may 2016, doi: 10.1128/microbiolspec.DMIH2-0002-2015.
- [40] T. Lin y P. Kolattukudy, "Induction of a Biopolyester Hydrolase (Cutinase) by Low Levels of Cutin Monomers in *Fusarium solani* f. sp. *pisii*", *J Bacteriol*, vol. 133, núm. 942–951, 1978.
- [41] D. Castro-Ochoa, C. Peña-Montes, y A. Farres, "Producción y características de cutinasas: Una alternativa interesante para biocatálisis a nivel industrial", *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, vol. 1, pp. 16–25, 2010.
- [42] C. Calado, Á. Taipa, y J. Cabral, "Optimisation of culture conditions and characterisation of cutinase produced by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*", *ELSEVIER*, 2002.
- [43] M.-A. d'Halewyn y P. Chevalier, "Penicillium spp."
- [44] R. Srinivasan, G. Prabhu, M. Prasad, M. Mishra, M. Chaudhary, y R. Srivastava, "Penicillium", en *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*, Elsevier, 2020, pp. 651–667. doi: 10.1016/B978-0-12-823414-3.00032-0.
- [45] B. Buendía y M. López-Brea, "¿Qué debemos saber sobre *Aspergillus*?", *Enferm Infecc Microbiol Clin*, vol. 19, pp. 142–144, ene. 2001.
- [46] "Aspergillus spp. - Agentes Biológicos - Hongo". Consultado: el 5 de noviembre de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/hongos/aspergillus-spp>

- [47] J. E. Galagan *et al.*, “Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*”, *Nature*, vol. 438, núm. 7071, pp. 1105–1115, dic. 2005, doi: 10.1038/nature04341.
- [48] M. T. Hedayati, “*Aspergillus* species in indoor environments and their possible occupational and public health hazards”, *Curr Med Mycol*, vol. 2, núm. 1, pp. 36–42, 2016, doi: 10.18869/acadpub.cmm.2.1.36.
- [49] D. Castro-Ochoa *et al.*, “ANCUT2, an Extracellular Cutinase from *Aspergillus nidulans* Induced by Olive Oil”, *Appl Biochem Biotechnol*, vol. 166, núm. 5, pp. 1275–1290, mar. 2012, doi: 10.1007/s12010-011-9513-7.
- [50] M. Komatsu, T. Uchiyama, S. Ōmura, D. E. Cane, y H. Ikeda, “Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, núm. 6, pp. 2646–2651, feb. 2010, doi: 10.1073/pnas.0914833107.
- [51] A. Gunjal y D. S. Bhagat, “Diversity of actinomycetes in Western Ghats”, en *Microbial Diversity in Hotspots*, G. Aparna y S. Sonali, Eds., Elsevier, 2022, pp. 117–133. doi: 10.1016/B978-0-323-90148-2.00007-9.
- [52] D. Berd, “*Streptomyces* sp- Public Health Image Library(PHIL)”. Consultado: el 5 de noviembre de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=2983>
- [53] W. F. Fett, H. C. Gérard, R. A. Moreau, S. F. Osman, y L. E. Jones, “Cutinase production by *Streptomyces* spp.”, *Curr Microbiol*, vol. 25, núm. 3, pp. 165–171, sep. 1992, doi: 10.1007/BF01571025.
- [54] M. Álvarez, “Procesos fermentativos”, 2018.
- [55] R. Singhanía, A. Patel, y L. Thomas, “Industrial Enzymes”, en *Industrial Biorefineries and ehithe Biotechnology*, Trivandrum: Elsevier inc, 2015, pp. 473–478.
- [56] M. Mata y M. Barquero, “Evaluación de la fermentación sumergida del hongo entomopatógeno ‘*Beauveria bassiana*’ como parte de un proceso de escalamiento y producción de bioplaguicidas”, 2008.
- [57] R. Singhanía, A. Patel, y L. Thomas, “Industrial Enzymes”, en *Industrial Biorefineries and ehithe Biotechnology*, Trivandrum: Elsevier inc, 2015, pp. 473–478.
- [58] L. Veiter, V. Rajamanickam, y C. Herwing, “The filamentous fungal pellet—relationship between morphology and productivity”, *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 102, pp. 2997–3006, 2018, doi: 10.1007/s00253-018-8818-7.

- [59] J. Nielsen, C. Johansen, M. Jacobsen, P. Krabben, y J. Villadsen, "Pellet Formation and Fragmentation in Submerged Cultures of *Penicillium chrysogenum* and Its Relation to Penicillin Production", *Biotechnol Prog.*, vol. 11, pp. 93–98, 1995.
- [60] Michel. DuBois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, y Fred. Smith, "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances", *Anal Chem*, vol. 28, núm. 3, pp. 350–356, mar. 1956, doi: 10.1021/ac60111a017.
- [61] G. L. Miller, "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar", *Anal Chem*, vol. 31, núm. 3, pp. 426–428, mar. 1959, doi: 10.1021/ac60147a030.
- [62] P. R. Griffiths y J. Haseth, *Fourier transform infrared spectrometry*, 2a ed., vol. 1. Moscow: Wiley, 2004.
- [63] Z. Chen, J. N. Hay, y M. J. Jenkins, "FTIR spectroscopic analysis of poly(ethylene terephthalate) on crystallization", *Eur Polym J*, vol. 48, núm. 9, pp. 1586–1610, sep. 2012, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2012.06.006.
- [64] T. Sang, C. J. Wallis, G. Hill, y G. J. P. Britovsek, "Polyethylene terephthalate degradation under natural and accelerated weathering conditions", *Eur Polym J*, vol. 136, p. 109873, ago. 2020, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2020.109873.
- [65] P. G. De Gennes, *Scaling Concepts in Polymer Physics*, 1a ed., vol. 1. London: Cornell University Press, 1979.
- [66] J. Cowie y V. Arrighi, *Polymers: Chemistry and physics of modern materials*, 3a ed. Florida: CRC Press, 2007.
- [67] I. Arciniega, "Aislamiento de microorganismos degradadores de tereftalato de polietileno (PET) en medio ambiente combinado", Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, 2008.
- [68] X. Hu, U. Thumarat, X. Zhang, M. Tang, y F. Kawai, "Diversity of polyester-degrading bacteria in compost and molecular analysis of a thermoactive esterase from *Thermobifida alba* AHK119", *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 87, núm. 2, pp. 771–779, jun. 2010, doi: 10.1007/s00253-010-2555-x.
- [69] J. Müller, S. Hedwig, y K. Dresler, "Enzymatic Degradation of Poly(ethylene terephthalate): Rapid Hydrolyse using a Hydrolase from *T. fusca*", *Bioprocess Biosyst Eng*, 2005, doi: 10.1002/marc.200500410.
- [70] M. Vertommen y V. Veer, "Enzymatic surface modification of poly(ethylene terephthalate)", *ELSEVIER*, pp. 376–386, 2005.

- [71] Y. Kim, J. Min, y J. Lee, "Biodegradation of dipropyl phthalate and toxicity of its degradation products: a comparison of *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi cutinase and *Candida cylindracea* esterase. Kim YH1, Min J, Bae KD, Gu MB, Lee J.", *Arch Microbiol*, pp. 25–31, 2005, doi: 10.1007/s00203-005-0026-z.
- [72] S. Liebmingler y A. Eberl, "Hydrolysis of PET and bis-(benzoyloxyethyl) terephthalate with a new polyestherase from *Penicillium Citrinum*", *Biocatal Biotransformation*, núm. 1024-2422 print/ISSN 1029-2446, p. 7, 2007, doi: 10.1080/10242420701379734.
- [73] B. Nowak, J. Pająk, y S. Labuzek, "Biodegradation of poly(ethylene terephthalate) modified with polyester 'Bionolle' by *Penicillium funiculosum*", *Polimery*, vol. 56, pp. 35–56, 2011, doi: 10.14314/polimery.2011.035.
- [74] U. Sepperumal, M. Markandan, y I. Palraja, "Micromorphological and chemical changes during biodegradation of Polyethylene terephthalate (PET) by *Penicillium* sp.", *J Microbiol Biotechnol Res*, vol. 3, núm. 4, pp. 47–53, 2013.
- [75] H. Rueda, "Evaluación del potencial de cutinasas para hidrolizar poli(etilen tereftalato) (PET), aisladas a partir de hongos filamentosos presentes en residuos agroindustriales.", Universidad de la Sabana, 2016.
- [76] Y. Shosuke, H. Kazumi, T. Toshihiko, T. Ikuo, Y. Hironao, y M. Yasuhito, "A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate)", *Science* (1979), vol. 351, núm. 6278, pp. 1196–1199, 2016, doi: 10.1126/science.aad6359.
- [77] A. Llano, "Aplicación de las cutinasas recombinantes ANCUT 3 y ANCUT 4 provenientes de *Aspergillus nidulans* en la degradación de poliésteres", Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 2018.
- [78] E. Bermúdez-García *et al.*, "Regulation of the cutinasas expressed by *Aspergillus nidulans* and evaluation of their role in cutin degradation", *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 103, núm. 9, pp. 3863–3874, may 2019, doi: 10.1007/s00253-019-09712-3.
- [79] S. Morales, "Degradación de polietilen tereftalato (PET) con las cutinasas recombinantes ANCUT1 y ANCUT2 de *Aspergillus nidulans*", Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 2018.
- [80] A. Farzi, A. Dehnad, y A. Fotouhi, "Biodegradation of polyethylene terephthalate waste using *Streptomyces* species and kinetic modeling of the process", *Biocatal Agric Biotechnol*, vol. 17, pp. 25–31, 2019, doi: 10.1016/j.bcab.2018.11.002.

-
- [81] V. Tournier *et al.*, “An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles”, *Nature*, vol. 580, pp. 219–219, 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2149-4.
- [82] Carbios, “Reciclaje enzimático: Eliminar las limitaciones de los procesos actuales”. Consultado: el 11 de diciembre de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.carbios.com/en/enzymatic-recycling/>
- [83] Carbios, “Carbios obtiene los permisos de construcción y funcionamiento, según el calendario anunciado, para la primera planta de bioreciclaje de PET del mundo en Longlaville”.
- [84] M. Furukawa, N. Kawakami, A. Tomizawa, y K. Miyamoto, “Efficient Degradation of Poly(ethylene terephthalate) with Thermobifida fusca Cutinase Exhibiting Improved Catalytic Activity Generated using Mutagenesis and Additive-based Approaches”, *Nature*, 2019.
- [85] N. Puspitasari, S.-L. Tsai, y C.-K. Lee, “Fungal Hydrophobin RolA Enhanced PETase Hydrolysis of Polyethylene Terephthalate”, *Appl Biochem Biotechnol*, 2020, doi: 10.1007/s12010-020-03358-y.
- [86] K. Yamada-Onodera, H. Mukumoto, Y. Katsuyaya, A. Saiganji, y Y. Tani, “Degradation of polyethylene by a fungus, *Penicillium simplicissimum* YK”, *Polym Degrad Stab*, vol. 72, núm. 2, pp. 323–327, may 2001, doi: 10.1016/S0141-3910(01)00027-1.
- [87] T. Brueckner, A. Eberl, S. Heumann, M. Rabe, y G. M. Guebitz, “Enzymatic and chemical hydrolysis of poly(ethylene terephthalate) fabrics”, *Polymer Science: Part A: Polymer Chemistr*, vol. 6435–6443, 2008, doi: 10.1002/pola.
- [88] A. Farzi, A. Dehnad, y A. Fotouhi, “Biodegradation of polyethylene terephthalate waste using *Streptomyces* species and kinetic modeling of the process”, *Biocatal Agric Biotechnol*, vol. 17, pp. 25–31, 2019, doi: 10.1016/j.bcab.2018.11.002.
- [89] U. Sepperumal, M. Markandan, y I. Palraja, “Micromorphological and chemical changes during biodegradation of Polyethylene terephthalate (PET) by *Penicillium* sp.”, *J Microbiol Biotechnol Res*, vol. 3, núm. 4, pp. 47–53, 2013.
- [90] Y. Morales-García, J. Hernández-Canseco, y G. Ramos-Castillo, “Cuantificación de *Penicillium* sp. por el método de goteo en placa”, *Revista Iberoamericana de Ciencias*, vol. 3, núm. 2, pp. 12–19, jun. 2016.
- [91] P. Rajeswari, P. A. Jose, R. Amiya, y S. R. D. Jebakumar, “Characterization of saltern based *Streptomyces* sp. and statistical media optimization for its improved antibacterial activity”, *Front Microbiol*, vol. 5, ene. 2015, doi: 10.3389/fmicb.2014.00753.

- [92] M. A. Trujillo-Roldán, E. Mancilla, C. Palacios-Morales, y M. Córdova-Aguilar, “A hydrodynamic description of the flow behavior in shaken flasks”, *Biochem Eng J*, vol. 99, pp. 61–66, 2015, doi: 10.1016/j.bej.2015.03.003.
- [93] J. Nielsen, C. Johansen, M. Jacobsen, P. Krabben, y J. Villadsen, “Pellet Formation and Fragmentation in Submerged Cultures of *Penicillium chrysogenum* and Its Relation to Penicillin Production”, *Biotechnol Prog.*, vol. 11, pp. 93–98, 1995.
- [94] U. K. LAEMMLI, “Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4”, *Nature*, vol. 227, núm. 5259, pp. 680–685, ago. 1970, doi: 10.1038/227680a0.
- [95] Infinita Lab, “ASTM D3418, ASTM E1356, ISO 11357 Differential Scanning Calorimetry”. Consultado: el 7 de diciembre de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://infinitalab.com/astm/differential-scanning-calorimetry-astm-d3418-astm-e1356-iso-11357/>
- [96] E. Olewnik-Kruszkowska, “Influence of the type of buffer solution on thermal and structural properties of polylactide-based composites”, *Polym Degrad Stab*, vol. 129, pp. 87–95, jul. 2016, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2016.04.009.
- [97] G. Ramer y B. Lendl, “Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy”, en *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Wiley, 2013. doi: 10.1002/9780470027318.a9287.
- [98] J. M. Brannon, “Influence of Glucose and Fructose on Growth of Fungi”, *Chicago Journals*, vol. 76, núm. 3, pp. 257–273, 2016.
- [99] S. Shirato y C. Nagatsu, “Fermentation Studies with *Streptomyces griseus*”, *Appl Microbiol*, vol. 13, núm. 5, sep. 1965.
- [100] K. Naguib, “GROWTH AND METABOLISM OF *ASPERGILLUS NIDULANS* EIDAM IN SURFACE CULTURE”, *Canadian Journal of Botany*, vol. 37, núm. 3, pp. 353–364, may 1959, doi: 10.1139/b59-027.
- [101] R. Krull *et al.*, “Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology”, *J Biotechnol*, vol. 163, núm. 2, pp. 112–123, ene. 2013, doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.06.024.
- [102] M. A. Trujillo-Roldán, E. Mancilla, C. Palacios-Morales, y M. Córdova-Aguilar, “A hydrodynamic description of the flow behavior in shaken flasks”, *Biochem Eng J*, vol. 99, pp. 61–66, 2015, doi: 10.1016/j.bej.2015.03.003.
- [103] I. Darah, G. Sumathi, K. Jain, y S. H. Lim, “Influence of Agitation Speed on Tannase Production and Morphology of *Aspergillus niger* FETL FT3 in Submerged

- Fermentation”, *Appl Biochem Biotechnol*, vol. 165, núm. 7–8, pp. 1682–1690, dic. 2011, doi: 10.1007/s12010-011-9387-8.
- [104] H. El-Enshasy, J. Kleine, y U. Rinas, “Agitation effects on morphology and protein productive fractions of filamentous and pelleted growth forms of recombinant *Aspergillus niger*”, *Process Biochemistry*, vol. 41, núm. 10, pp. 2103–2112, oct. 2006, doi: 10.1016/j.procbio.2006.05.024.
- [105] R. N. Edmondson, “Agricultural Response Surface Experiments Based on Four-Level Factorial Designs”, *Biometrics*, vol. 47, núm. 4, p. 1435, dic. 1991, doi: 10.2307/2532397.
- [106] T. Santos, J. R. Villanueva, y C. Nombela, “Production and catabolite repression of *Penicillium italicum* beta-glucanases”, *J Bacteriol*, vol. 129, núm. 1, pp. 52–58, ene. 1977, doi: 10.1128/jb.129.1.52-58.1977.
- [107] R. J. Beynon, C. P. Brown, y P. E. Butler, “The inactivation of streptomyces-derived proteinase inhibitors by mammalian tissue preparations.”, *Acta Biol Med Ger*, vol. 40, núm. 10–11, pp. 1539–46, 1981.
- [108] P. D. Nair, “Morphological changes of poly(ethylene terephthalate) on multiple steam sterilization”, *Clin Mater*, vol. 5, núm. 1, pp. 43–46, ene. 1990, doi: 10.1016/0267-6605(90)90070-C.
- [109] R. C. RIGHELATO, A. P. J. TRINCI, S. J. PIRT, y A. PEAT, “The Influence of Maintenance Energy and Growth Rate on the Metabolic Activity, Morphology and Conidiation of *Penicillium chrysogenum*”, *J Gen Microbiol*, vol. 50, núm. 3, pp. 399–412, mar. 1968, doi: 10.1099/00221287-50-3-399.
- [110] F. Diba, A. Bakar, A. Munir, y A. Hamid, “Induction and expression of cutinase activity during saprophytic growth of the fungal plant”, *Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, vol. 13, pp. 69–69, 2005.
- [111] T. S. Lin y P. E. Kolattukudy, “Induction of a Biopolyester Hydrolase (Cutinase) by Low Levels of Cutin Monomers in *Fusarium solani* f. sp. *pisii*”, *J Bacteriol*, vol. 133, núm. 2, pp. 942–951, feb. 1978, doi: 10.1128/jb.133.2.942-951.1978.
- [112] W. Köller, “Role of Cutinase in the Penetration of Apple Leaves by *Venturia inaequalis*”, *Phytopathology*, vol. 81, núm. 11, p. 1375, 1991, doi: 10.1094/Phyto-81-1375.
- [113] T. Fontes Pío y G. Alves, “Optimizing the production of cutinase by *Fusarium oxysporum* using response surface methodology”, *ELSEVIER*, 2017, doi: 10.1016/j.enzmictec.2007.05.008.

- [114] G. Fischer-Colbrie, S. Heumann, S. Liebming, E. Almansa, A. Cavaco-Paulo, y G. M. Guebitz, "New enzymes with potential for PET surface modification", *Biocatal Biotransformation*, vol. 22, núm. 5–6, pp. 341–346, dic. 2004, doi: 10.1080/10242420400024565.
- [115] C. P. Woloshuk y P. E. Kolattukudy, "Mechanism by which contact with plant cuticle triggers cutinase gene expression in the spores of *Fusarium solani* f. sp. *pisii*", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 83, núm. 6, pp. 1704–1708, mar. 1986, doi: 10.1073/pnas.83.6.1704.
- [116] E. Leao de Almeida, A. Felipe Carrillo Rincón, S. E. Nevalainen, S. Jackson, N. O'Leary, y A. Dobson, "Marine *Streptomyces* spp. isolates with synthetic polyesters-degrading activity", *Access Microbiol*, vol. 1, núm. 1A, mar. 2019, doi: 10.1099/acmi.ac2019.po0390.
- [117] N. Puspitasari, S.-L. Tsai, y C.-K. Lee, "Class I hydrophobins pretreatment stimulates PETase for monomers recycling of waste PETs", *Int J Biol Macromol*, vol. 176, pp. 157–164, abr. 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.026.
- [118] H. K. Marambe y J. P. D. Wanasundara, "Protein From Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.)", en *Sustainable Protein Sources*, Elsevier, 2017, pp. 133–144. doi: 10.1016/B978-0-12-802778-3.00008-1.
- [119] K. T. Madhusudhan y N. Singh, "Isolation and characterization of the major fraction (12 S) of linseed proteins", *J Agric Food Chem*, vol. 33, núm. 4, pp. 673–677, jul. 1985, doi: 10.1021/jf00064a026.
- [120] C. Groß, K. Hamacher, K. Schmitz, y S. Jager, "Cleavage Product Accumulation Decreases the Activity of Cutinase during PET Hydrolysis", *J Chem Inf Model*, vol. 57, núm. 2, pp. 243–255, feb. 2017, doi: 10.1021/acs.jcim.6b00556.
- [121] K. Ahmed Al-Tammar, O. Omar, A. M. Abdul Murad, y F. D. Abu Bakar, "Expression and characterization of a cutinase (AnCUT2) from *Aspergillus niger*", *Open Life Sci*, vol. 11, núm. 1, pp. 29–38, ene. 2016, doi: 10.1515/biol-2016-0004.
- [122] C. C. Pereira de Souza *et al.*, "Analysis of *Aspergillus nidulans* germination, initial growth and carbon source response by flow cytometry", *J Basic Microbiol*, vol. 51, núm. 5, pp. 459–466, oct. 2011, doi: 10.1002/jobm.201000242.
- [123] R. Wei *et al.*, "Biocatalytic Degradation Efficiency of Postconsumer Polyethylene Terephthalate Packaging Determined by Their Polymer Microstructures", *Advanced Science*, vol. 6, núm. 14, jul. 2019, doi: 10.1002/advs.201900491.
- [124] E. Pirzadeh, A. Zadhoush, y M. Haghghat, "Hydrolytic and thermal degradation of PET fibers and PET granule: The effects of crystallization, temperature, and

- humidity”, *J Appl Polym Sci*, vol. 106, núm. 3, pp. 1544–1549, nov. 2007, doi: 10.1002/app.26788.
- [125] T. B. Thomsen, C. J. Hunt, y A. S. Meyer, “Influence of substrate crystallinity and glass transition temperature on enzymatic degradation of polyethylene terephthalate (PET)”, *N Biotechnol*, vol. 69, pp. 28–35, jul. 2022, doi: 10.1016/j.nbt.2022.02.006.
- [126] Z. Chen, “The Crystallization of Poly(ethylene terephthalate) Studied by Thermal Analysis and FTIR Spectroscopy”, University of Birmingham, 2012.
- [127] S. Carvalho, “Consumo de agua embotellada en envases plásticos y sus consecuencias para la salud familiar y comunitaria.”, El bosque, 2020.
- [128] B. Knott, E. Erickson, E. Allen, J. Gado, y H. Austin, “Characterization and engineering of a two-enzyme system for plastics depolymerization”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 41, pp. 25476–25485, 2020, doi: 10.1073/pnas.2006753117.
- [129] MERCK, “Terephthalic acid for synthesis”. Consultado: el 20 de diciembre de 2023. [En línea]. Disponible en: https://www.merckmillipore.com/CO/es/product/Terephthalic-acid,MDA_CHEM-800762?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F
- [130] S. A. Ravichandran, V. P. Rajan, P. V. Aravind, A. Seenivasan, D. G. Prakash, y K. Ramakrishnan, “Characterization of Terephthalic Acid Monomer Recycled from Post-Consumer PET Polymer Bottles”, *Macromol Symp*, vol. 361, núm. 1, pp. 30–33, mar. 2016, doi: 10.1002/masy.201400269.
- [131] A. Singh *et al.*, “Techno-economic, life-cycle, and socioeconomic impact analysis of enzymatic recycling of poly(ethylene terephthalate)”, *Joule*, vol. 5, núm. 9, pp. 2479–2503, sep. 2021, doi: 10.1016/j.joule.2021.06.015.
- [132] O. B. Rudakov, L. V. Rudakova, y V. F. Selemenev, “Acetonitrile as tops solvent for liquid chromatography and extraction”, *Journal of Analytical Chromatography and Spectroscopy*, vol. 1, núm. 2, nov. 2018, doi: 10.24294/jacs.v1i2.883.
- [133] J. Garritsen y H. Johannes, “Purification of Terephthalic acid”, 1340, el 18 de abril de 1972
- [134] M. Barth, T. Oeser, R. Wei, J. Then, J. Schmidt, y W. Zimmermann, “Effect of hydrolysis products on the enzymatic degradation of polyethylene terephthalate nanoparticles by a polyester hydrolase from *Thermobifida fusca*”, *Biochem Eng J*, vol. 93, pp. 222–228, ene. 2015, doi: 10.1016/j.bej.2014.10.012.
- [135] D. J. Hillenga, H. Versantvoort, S. van der Molen, A. Driessen, y W. N. Konings, “*Penicillium chrysogenum* Takes up the Penicillin G Precursor Phenylacetic Acid by

- Passive Diffusion”, *Appl Environ Microbiol*, vol. 61, núm. 7, pp. 2589–2595, jul. 1995, doi: 10.1128/aem.61.7.2589-2595.1995.
- [136] M.-S. Jami *et al.*, “Catabolism of phenylacetic acid in *Penicillium rubens*. Proteome-wide analysis in response to the benzylpenicillin side chain precursor”, *J Proteomics*, vol. 187, pp. 243–259, sep. 2018, doi: 10.1016/j.jprot.2018.08.006.
- [137] N. Puspitasari, S.-L. Tsai, y C.-K. Lee, “Fungal Hydrophobin RolA Enhanced PETase Hydrolysis of Polyethylene Terephthalate”, *Appl Biochem Biotechnol*, 2020, doi: 10.1007/s12010-020-03358-y.
- [138] J. Müller, S. Hedwig, y K. Dresler, “Enzymatic Degradation of Poly(ethylene terephthalate): Rapid Hydrolyse using a Hydrolase from *T. fusca*”, *Bioprocess Biosyst Eng*, 2005, doi: 10.1002/marc.200500410.
- [139] M. Goto, N. Kamiya, M. Miyata, y F. Nakashio, “Enzymatic Esterification by Surfactant-Coated Lipase in Organic Media”, *Biotechnol Prog*, vol. 10, núm. 3, pp. 263–268, may 1994, doi: 10.1021/bp00027a005.
- [140] W.-J. Lu, S. A. Smirnov, y P. A. Levashov, “General characteristics of the influence of surfactants on the bacteriolytic activity of lysozyme based on the example of enzymatic lysis of *Lactobacillus plantarum* cells in the presence of Tween 21 and SDS”, *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 575, pp. 73–77, oct. 2021, doi: 10.1016/j.bbrc.2021.08.060.
- [141] B. H. J. Hofstee, “Immobilization of enzymes through non-covalent binding to substituted agaroses”, *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 53, núm. 4, pp. 1137–1144, ago. 1973, doi: 10.1016/0006-291X(73)90583-4.
- [142] Z. Ghalanbor *et al.*, “Binding of Tris to *Bacillus licheniformis*-Amylase Can Affect Its Starch Hydrolysis Activity”, *Protein Pept Lett*, vol. 15, núm. 2, pp. 212–214, feb. 2008, doi: 10.2174/092986608783489616.
- [143] Z. Chen, J. N. Hay, y M. J. Jenkins, “FTIR spectroscopic analysis of poly(ethylene terephthalate) on crystallization”, *Eur Polym J*, vol. 48, núm. 9, pp. 1586–1610, sep. 2012, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2012.06.006.