



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA

“TRATAMIENTO DE UNA VINAZA UTILIZANDO LACASAS DE *Trametes hirsuta* Bm2 INMOVILIZADAS EN ALGINATO DE CALCIO Y DIÓXIDO DE SILICIO”

PARA OPTAR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

IBQ. SERGIO JAVIER CANUL SANTIAGO

DIRECTORA:

DRA. SARA SOLÍS PEREIRA

CO-DIRECTORA:

DRA. ALCIONE GARCÍA GONZÁLEZ

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO


2021

C. SERGIO JAVIER CANUL SANTIAGO
PASANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
PRESENTE

De acuerdo al fallo emitido por su directora **Sara Elena Solís Pereira**, la codirectora **Alcione García González** y la comisión revisora integrada por, **Gerardo Rivera Muñoz** y **Susana Rincón Arriaga** considerando que cubre los requisitos establecidos en el Reglamento de Titulación de los Institutos Tecnológicos le autorizamos la impresión de su trabajo profesional con la TESIS:

"TRATAMIENTO DE UNA VINAZA UTILIZANDO LACASAS DE TRAMETES HIRSUTA Bm2 INMOVILIZADAS EN ALGINATO DE CALCIO Y DIÓXIDO DE SILICIO."

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®
"In Hoc Signo Vinces"



M.C. Alcione García González
Jefa de la División de Estudios de
Posgrado e Investigación



cop. Archivo
RDR/ra



Km. 5 Carretera Mérida-Progreso A.P. 911 C.P.
97118 Mérida Yucatán, México, Tels. 964-
50-00, Ext. 10001, 10401 10001, 10201
email: contacto@merida.tecnm.mx
web: itmerida.mx



DEDICATORIA

A mi padre Bonifacio y a mi hermano Angel,
por todo su apoyo y consejos, por todo el
esfuerzo que han hecho por ayudarme a cumplir
mis metas.

Sin ustedes esto no sería posible.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, la Dra. Sara Solís, por haberme dado la oportunidad de llevar a cabo este proyecto, por sus valiosos consejos y por compartir sus conocimientos conmigo, por exigirme y mostrarme que siempre se puede ser mejor. Gracias por su ayuda durante estos dos últimos años.

A mi coasesora la Dra. Alcione García, por permitirme hacer mi estancia en su laboratorio, por tratarme como parte de su familia, por sus consejos y sus grandes aportaciones a mi proyecto.

A mis revisores, la Dra. Susana Rincón y el M.C. Gerardo Rivera, por su disposición y aportes en mis tutoriales y en este documento.

A mis compañeros de generación y de laboratorio por su ayuda y por hacer más divertida esta etapa académica.

A mis compañeros del laboratorio de Físicoquímica de interfaces de la UANL por su ayuda, enseñanzas, y por hacer muy agradable mi estancia, en especial a Evelyn Becerra.

A mi novia Abril Valladares, por haberme convencido de emprender este camino, por sus consejos y por su apoyo incondicional en los momentos en que más lo necesitaba.

Al Instituto Tecnológico de Mérida y a la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como al Laboratorio de fisiología y Bioquímica Microbiana y al Laboratorio de Físicoquímica de interfaces y Biomateriales por las instalaciones y equipos brindados para la realización de este proyecto.

Al CONACYT por las becas brindadas.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
Índice de tablas.....	ix
Índice de figuras.....	ix
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
2.-ANTECEDENTES.....	3
2.1 Vinazas.....	3
2.1.1 Características.....	4
2.1.2 Impacto ambiental.....	5
2.2 Tratamiento de vinazas.....	8
2.2.1 Tratamientos fisicoquímicos.....	9
2.2.2 Tratamientos biológicos.....	11
2.3 Lacasas.....	13
2.3.1 Mecanismo de acción de la lacasa.....	14
2.3.2 Aplicaciones de las lacasas.....	17
2.4 Inmovilización de enzimas.....	17
3 JUSTIFICACIÓN.....	26

4 HIPÓTESIS	27
5 OBJETIVOS	28
5.1 Objetivo general	28
5.2 Objetivos específicos	28
6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	29
7 METODOLOGÍA.....	30
7.1 Procedencia y composición de la vinaza	30
7.2 Microorganismo y producción de lacasas	31
7.3 Determinación de actividad de lacasas.....	31
7.4 Determinación de la concentración de proteína	31
7.5 Determinación del contenido de fenoles totales	32
7.6 Determinación de la remoción de color.....	32
7.7 Tratamiento de una vinaza en placa con enzima libre.....	32
7.8 Inmovilización de lacasas en alginato de calcio con glutaraldehído	33
7.9 Cinética del tratamiento de una vinaza por lacasas libres e inmovilizadas en alginato de Ca ²⁺	34
7.10 Tratamiento de vinazas diluidas por lacasas libres e inmovilizadas en alginato de Ca ²⁺	34
7.11 Preparación de esferas de dióxido de silicio mesoporosas	34
7.12 Modificación del soporte con grupos amino	35

7.13 Caracterización del soporte	35
7.13.1 Difracción de Rayos X (DRX):	35
7.13.2 Caracterización por Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier con Reflexión Atenuada (ATR-FTIR):	36
7.13.3 Potencial ζ :.....	36
7.13.4 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)	36
7.13.5 Fisisorción de nitrógeno:	36
7.14 Determinación de las condiciones óptimas para la inmovilización de lacasas en SiO ₂	37
7.15 Cinética del tratamiento de vinazas diluidas por lacasas libres e inmovilizadas en SiO ₂	37
8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
8.1 Tratamiento de una vinaza en placa con la enzima libre	39
8.2 Inmovilización de lacasas de <i>T. hirsuta</i> Bm2 en alginato de calcio.....	40
8.3 Cinética del tratamiento de una vinaza por lacasas libres e inmovilizadas en alginato de calcio	49
8.4 Efecto de la concentración de vinaza en la remoción de fenoles	50
8.5 Obtención y caracterización del soporte SiO ₂ para la inmovilización de lacasas	52
8.6 Difracción de Rayos X	53
8.7 Caracterización por Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier con Reflexión Atenuada (ATR-FTIR).	54

8.8 Potencial ζ	55
8.9 Fisisorción de nitrógeno	56
8.10 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	58
8.11 Inmovilización de lacasas en SiO ₂	59
8.12 Cinética del tratamiento de una vinaza por lacasas libres e inmovilizadas en SiO ₂ .	67
9 COCLUSIONES.....	74
10 BIBLIOGRAFÍA.....	75
ANEXOS	98

Índice de tablas

Tabla 1.- Características de vinazas provenientes de diferentes materias primas	5
Tabla 2.- Límites máximos permisibles de los contaminantes para su descarga de aguas residuales de la industria destilera y textil.....	8
Tabla 3.- Desventajas y ventajas de los diferentes métodos de inmovilización	19
Tabla 4.- Composición de la vinaza “La Gloria”	30
Tabla 5.- ANOVA para la inmovilización de la enzima lacasa de <i>T. hirsuta</i> Bm2 en alginato de calcio	48
Tabla 6.- Potencial ζ para los soportes de SiO ₂ antes y después de la funcionalización con APTES	56
Tabla 7.- Diseño central compuesto para la inmovilización covalente de lacasas en SiO ₂ funcionalizado con grupos amino.....	60
Tabla 8.- ANOVA para la inmovilización de la lacasas del extracto crudo en EDSM-A...	61
Tabla 9.- Comparación de las lacasas libres e inmovilizadas en el tratamiento de una vinaza al 90%.....	72

Índice de figuras

Figura 1.- Producción global de biocombustibles	3
Figura 2.- Estructura básica de melanoidinas de glucosa-glicina.(Cämmerer <i>et al.</i> , 2002) ..	6
Figura 3.- Representación gráfica de la estructura de un compuesto fenólico	7
Figura 4.- Esquema del complejo mononuclear y trinuclear de Cu presente en la lacasa ..	14
Figura 5.- Mecanismo de acción de la enzima lacasa. Se indican mediante flechas el flujo de electrones y la entrada del sustrato y de oxígeno	15

Figura 6.- Mecanismo de reducción de O ₂ a agua por las lacasas.....	16
Figura 7.- Clasificación de los métodos de inmovilización según el tipo de unión enzima-soporte	18
Figura 8.- Proceso clásico para el atrapamiento enzimático en hidrogeles.....	20
Figura 9.- Representación esquemática del gel de alginato de calcio formado por la interacción del ion Ca ⁺² con los grupos con carga negativa de los monómeros de ácido manurónico (M) y gulurónico (G).....	21
Figura 10.- Inmovilización covalente de una enzima sobre un soporte: A) Residuo de aminoácido activo, B) Grupo activo del soporte	22
Figura 11.- Pasos para la síntesis de MSM; a) micelas formadas por pluronic, b) auto ensamblaje del TEOS en las micelas, c) MSM resultante después de la remoción de la plantilla.....	23
Figura 12.- Pasos para la unión covalente de una enzima en una EDSM. A) Proceso de silanización, B) Activación de los grupos funcionales y C) formación de bases de Schiff entre enzima-glutaraldehído	25
Figura 13.- Secuencia de pasos para la inmovilización de lacasas de <i>T. hirsuta</i> Bm2 y su evaluación para el tratamiento de una vinaza.....	29
Figura 14.- Halos de oxidación de vinazas diluidas al ser tratadas con lacasa libre de <i>T. hirsuta</i> Bm-2 a 40°C y pH 4.5	40
Figura 15.- Esferas de Alginato de calcio con lacasas de <i>T. hirsuta</i> Bm2 entrecruzadas con glutaraldehído.....	41
Figura 16.- Actividad de lacasas en esferas de alginato de calcio al aplicar el diseño factorial 2 ³	42
Figura 17.- Actividad retenida de lacasas en esferas de-alginato de calcio.....	44

Figura 18.- Diagrama de Pareto estandarizado	45
Figura 19.- Efectos principales de los factores: cantidad de enzima, porcentaje de glutaraldehído y tiempo de activación.....	46
Figura 20.- Remoción de fenoles de una vinaza al 25% (p/v) por lacasas libres e inmovilizadas en alginato de calcio a 40°C y 150 rpm.	49
Figura 21.- Efecto de la concentración de vinaza en la remoción de fenoles por lacasas libres e inmovilizadas en alginato de calcio durante 72 horas a 40°C y 150 rpm.....	50
Figura 22.- Absorbancia a 475 nm (medición de color) en vinazas diluidas al 25, 50, 70 y 90 % tratadas con las lacasas libres e inmovilizadas y perlas de alginato sin enzima durante 72 horas a 40 °C y 150 rpm; EC re refiere al extracto crudo y EIPA a las enzimas inmovilizadas en alginato de calcio	52
Figura 23.- Difracción de rayos X de muestras de SiO ₂ . a) SiO ₂ sintetizado; b) patrón de difracción de cristobalita Amscd 0010753	54
Figura 25.- Isotermas de adsorción y desorción de nitrógeno de las EDSM y EDSM-A ...	57
Figura 27.- Superficie de respuesta para la inmovilización de lacasas	62
Figura 28.- Cinéticas de la remoción de fenoles de una vinaza diluida, a) 25%; b) 50%; c) 70%; d) 90% , tratadas con (▲) lacasa libre, (●) lacasa inmovilizada en SiO ₂ , (○) esferas de SiO ₂ -NH ₂ (soporte), (■) y control, a 40 °C y 150 rpm.	68
Figura 29.- Cinéticas de decoloración de una vinaza diluida, a) 25%; b) 50%; c) 70%; d) 90% , tratadas con (▲) lacasa libre, (●) lacasa inmovilizada en SiO ₂ , (○) esferas de SiO ₂ -NH ₂ (soporte), (■) y control, a 40 °C y 150 rpm.	71
Figura 30.- Decoloración de diferentes concentraciones de vinazas después de 72 h de tratamiento con diferentes sistemas de remoción a 40 °C y 150 rpm. a) control; b)	

micropartículas mesoporosas de SiO₂-NH₂ (soporte); c) lacasa inmovilizada SiO₂; d) Lacasa libre..... 72

RESUMEN

En la actualidad en México se generan grandes volúmenes de efluentes altamente contaminantes llamados vinazas que, por su alto contenido de fenoles y alta coloración, así como otros compuestos recalcitrantes son muy dañinos en los suelos y cuerpos de aguas donde son vertidos.

Las lacasas fúngicas son una alternativa ecoamigable para el tratamiento de vinazas ya que son enzimas altamente inespecíficas que pueden degradar diversos contaminantes. Sin embargo, su aplicación es limitada debido a que las enzimas suelen ser sensibles a inhibición, poco estables. La inmovilización covalente de lacasas ha sido eficaz para mejorar la recuperación, estabilización y reutilización de las enzimas.

En este estudio primeramente se obtuvo el extracto enzimático en un cultivo sumergido del hongo *T. hirsuta* Bm2 en salvado de trigo. Los extractos mostraron halos de oxidación en diferentes concentraciones del efluente en placa. Las lacasas fueron inmovilizadas en alginato de calcio empleando un diseño factorial 2^3 y usando como factores la concentración de enzima, el glutaraldehído y el tiempo de inmovilización. La actividad máxima inmovilizada fue de 560 U y la actividad de lacasa retenida en las esferas fue de 15 y 20%. Posteriormente se sintetizó, funcionalizó y caracterizó el soporte mesoporoso SiO_2 . Para la optimización del proceso realizó un diseño central compuesto con puntos axiales (2^{2+*}). La caracterización del soporte se llevó a cabo por DRX, SEM, FTIR, potencial Zeta, BHJ y BET. El soporte sintetizado contenía micropartículas con un tamaño de 2- 4.35 μm , con tamaño, área superficial y volumen de poro de 9.86 nm, 4.5162 m^2/g y 0.0130 cm^3/g , respectivamente. La máxima actividad de lacasa inmovilizada fue de 6,700 U/ g de soporte. El tratamiento de vinazas se realizó en un rango de concentraciones de 10 a 90% usando las enzimas inmovilizadas y las enzimas libres. Las enzimas inmovilizadas en alginato lograron remover hasta 30% de fenoles en una vinaza al 90% pero no hubo decoloración y las enzimas inmovilizadas en SiO_2 removieron el 51.87% de los fenoles y lograron reducir el 63% del color, sin embargo, esto fue debido en parte a eventos de adsorción y absorción al soporte. El sistema lacasa- SiO_2 resultó ser más eficiente y estable que la enzima libre y el sistema lacasa-alginato, sin embargo, será necesario realizar otros estudios para mejorar la eficiencia del biocatalizador.

ABSTRACT

Currently in Mexico, large volumes of highly polluting effluents called vinasses are generated which, due to their high content of phenols and high coloration, as well as other recalcitrant compounds are very harmful in the soils and bodies of water where they are discharged.

Fungal laccases are an eco-friendly alternative for the treatment of stillage as they are highly nonspecific enzymes that can degrade various pollutants. However, its application is limited because the enzymes are usually sensitive to inhibition, not very stable. Covalent immobilization of laccases has been effective in enhancing the recovery, stabilization, and reuse of enzymes.

In this study, the enzyme extract was first obtained in a submerged culture of the fungus *T. hirsuta* Bm2 in wheat bran. The extracts appear oxidation halos at different concentrations from the plaque effluent. Laccases were immobilized in calcium alginate using a 2^3 factorial design, and using enzyme concentration, glutaraldehyde, and immobilization time as factors. The maximum immobilized activity was 560 U and the laccase activity retained in the spheres was 15 and 20%. Subsequently, the SiO₂ mesoporous support was synthesized, functionalized, and characterized. To optimize the process, he made a central composite design with axial points (2^{2+*}). The characterization of the support was carried out by XRD, SEM, FTIR, potential Zeta, BHJ, and BET. The synthesized support contained microparticles with a size of 2-4.35 μm , with size, surface area and pore volume of 9.86 nm, 4.5162 m² / g and 0.0130 cm³ / g, respectively. The maximum activity of immobilized laccase was 6,700 U / g of support. The vinasse treatment was carried out in a concentration range of 10 to 90% using the immobilized enzymes and the free enzymes. The enzymes immobilized in alginate managed to remove up to 30% of phenols in a 90% vinasse but there was no discoloration and the enzymes immobilized in SiO₂ removed 51.87% of the phenols and managed to reduce 63% of the color, however, this was due in part to adsorption events to the support. The laccase-SiO₂ system turned out to be more efficient and stable than the free enzyme and the laccase-alginate system, however, other studies are required to improve the efficiency of the biocatalyst.

1.- INTRODUCCIÓN

Las lacasas (benzenediol: oxigen oxidoreductasas E.C.1.10.3.2) son enzimas multicobre producidas por plantas, hongos, insectos, bacterias y arqueas (Fernández *et al.*, 2012; Kandasamy *et al.*, 2016). Estas enzimas catalizan la reducción de cuatro electrones por oxígeno molecular a agua (Thurston y Billal, 1996) y pueden actuar sobre una amplia gama de sustratos de diferente estructura química (Bayramoglu *et al.*, 2019; Taheran *et al.*, 2017). Por su carácter inespecífico, las lacasas se proyectan como enzimas que pueden ser usadas para la remoción de mezclas de compuestos contaminantes, siendo amigables con el medio ambiente y con gran potencial biotecnológico en diversos procesos de biorremediación. Sin embargo, la aplicación de las lacasas puede estar limitada por las propiedades de las enzimas que suelen ser altamente sensibles a solventes, pH, temperatura, inhibición, baja estabilidad y altos costos de producción (Fortes *et al.*, 2017; Gonzalez-Coronel *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2015).

La inmovilización de lacasas en soportes adecuados les confiere beneficios como el aumento en la estabilidad, fácil recuperación del sistema de reacción, resistencia a la inhibición y la temperatura entre otras (Dzionic *et al.*, 2016). Se han usado diversas técnicas de inmovilización con diversos soportes, en donde varios parámetros deben ser considerados para mejorar las propiedades de las enzimas inmovilizadas (Lettera *et al.*, 2016). Entre las estrategias desarrolladas, la inmovilización en alginato de calcio es de fácil de manejo, mantiene estable a la enzima, tiene bajo costo y no representa riesgos para la salud. La transformación de fenoles por lacasas atrapadas en alginato de calcio ha sido exitosamente realizada durante el tratamiento de bisfenol A y la decoloración de tintes textiles (Varga *et al.*, 2019). Por otra parte, el soporte mesoporoso SiO₂ presenta alta área de superficie específica, estabilidad mecánica, baja densidad, alta porosidad. Este sistema ha demostrado ser una alternativa promisorio para mejorar propiedades, estabilidad y actividad catalítica de las lacasas (Amin *et al.*, 2018; Patel *et al.*, 2014). Las lacasas inmovilizadas han recibido atención debido a su eficiencia en la degradación de compuestos recalcitrantes que incluyen tintes (Pezzella *et al.*, 2014), antibióticos (Yang *et al.*, 2016), pesticidas (Vera *et al.*, 2019) y fenoles (Ammann *et al.*, 2013), entre otros.

En México y en otros países productores de azúcar de caña se generan efluentes conocidos como vinazas. Estos presentan color oscuro que bloquean el paso de la luz afectando la

fotosíntesis y oxigenación al ser vertidos en cuerpos de agua. Debido a la elevada concentración de compuestos tóxicos como los fenoles, las vinazas también ocasionan en los suelos severas consecuencias ambientales como la inhibición de la germinación de semillas y el deterioro en los vegetales (Robles-González *et al.*, 2012). Muchos métodos han sido desarrollados para el tratamiento de efluentes industriales como la adsorción, ultrasonido, separación con membranas, ozonación y floculación, pero son caros, su acción es limitada y se generan subproductos indeseables (Rajasulochana y Preethy, 2016). En este contexto, la biodegradación de contaminantes utilizando enzimas como las lacasas, representa un método inocuo en el que no se generan subproductos indeseables. En la mayor parte de los reportes con enzimas inmovilizadas se ha utilizado una enzima purificada en donde se ha probado que es posible llevar a cabo los procesos de biorremediación. Los hongos de la podredumbre blanca generalmente contienen familias de genes lacasas que codifican isoenzimas que difieren en sus propiedades catalíticas (Hoshida *et al.*, 2001). Considerando que las lacasas son secretadas durante en el extracto crudo, es posible que mediante la inmovilización del complejo enzimático lacasas se logre incrementar el número de moléculas de sustrato sobre las que actúan las enzimas, obteniendo así un biocatalizador más eficiente en el proceso. En base a lo anterior en este estudio se pretende inmovilizar el complejo multienzimático de lacasas que produce *Trametes hirsuta* Bm-2 (Tapia-Tussell *et al.*, 2015; Zapata-Castillo, 2012) en alginato de calcio y dióxido de silicio con el fin de remover fenoles de vinazas industriales.

2.-ANTECEDENTES

2.1 Vinazas

El daño ambiental por la quema de energéticos fósiles ha generado que países desarrollados busquen nuevas fuentes sustentable y una solución frente a la gran demanda de energéticos (Fernández y Venegas, 2017). Debido a esto la producción mundial de biocombustibles está creciendo constantemente de alrededor de 1 billón de L en 1981 a más de 130 billones de L en 2016 (Figura 1). Durante este período, la producción mundial de etanol y biodiesel ha aumentado en un asombroso 10,458% y 26,335%, respectivamente y se proyecta que la producción mundial de biocombustibles alcanzará los 200 mil millones de L en 2020, con participaciones del etanol y biodiesel del 75% y 25%, respectivamente (Energy Information Administration (EIA), 2017)

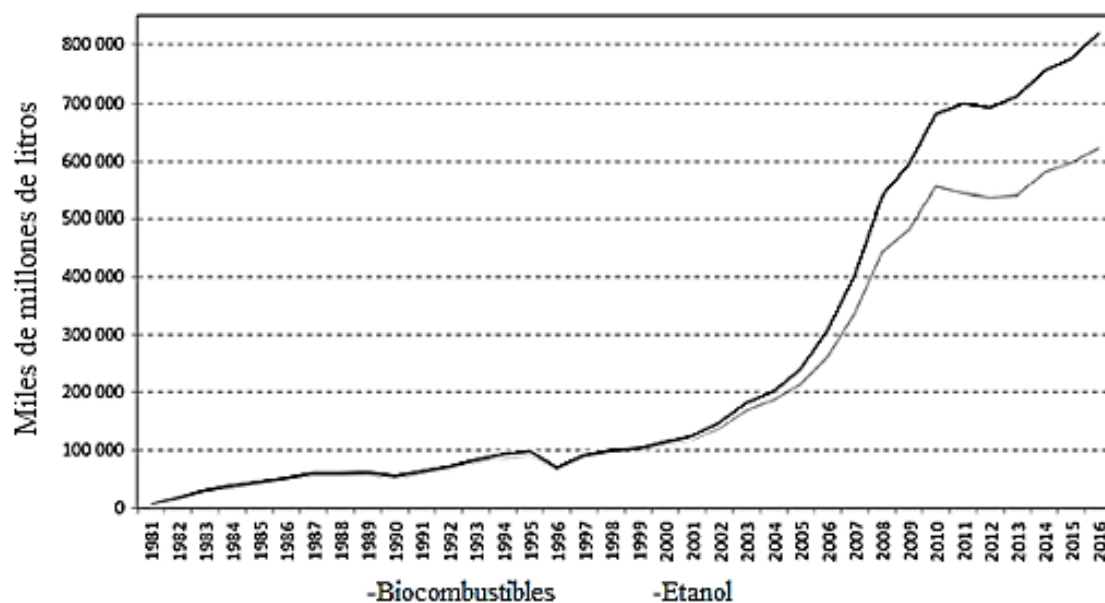


Figura 1. Producción global de biocombustibles

La producción de etanol como biocombustible está en incremento y abarca aproximadamente el 75% del volumen total de biocombustibles generados en el 2016, evidenciando que el etanol es la energía alterna con mayor demanda en la actualidad (Figura 1).

En México de acuerdo con la OCDE-FAO en el año 2014 se produjeron 1500 millones de litros de etanol, con las industrias azucareras contribuyendo en 600 millones de litros y el resto provenientes de industrias de bebidas alcohólicas y otros productores (Galicía-Medina *et al.*, 2018). Considerando que por cada litro de etanol producido se generan alrededor de 9-14 L de vinazas (Carrilho *et al.*, 2016), como subproducto de todos los efluentes producidos desde la recolección de la materia prima hasta la destilación del etanol, en el año 2014 se produjeron 21,000 millones de litros de vinazas, lo que implica un gran impacto ambiental.

2.1.1 Características

Las vinazas se definen como efluentes o aguas residuales generados de los procesos de fermentación y destilación de la producción de alcohol para bebidas o biocombustibles. Debido a su composición la disposición de las vinazas ha sido uno de los grandes retos que se encuentran en la producción del etanol. La composición de estos efluentes varía dependiendo de la materia prima y del proceso de destilación utilizado para su producción, por lo que la cantidad de compuestos presentes en cada efluente varía (Tabla 1) (España-Gamboa *et al.*, 2011). Todas las vinazas se caracterizan por ser líquidos de color café oscuro y de fuerte olor, con un pH ácido que va desde los 3.5-5.0, gran contenido de materia orgánica e inorgánica evidenciado por sus altos valores de DBO (demanda bioquímica del oxígeno) y DQO (demanda química del oxígeno), estos efluentes también presentan altos contenidos de compuestos fenólicos y melanoidinas, así como una gran cantidad de sales como potasio, calcio, magnesio, sulfatos, fósforo, nitrógeno y concentraciones significantes de metales pesados como cobre, zinc, arsénico, cadmio y mercurio, los cuales contaminan el suelo y los cuerpos de agua a los que son vertidos (Fuess y Garcia, 2014).

Tabla 1.- Características de vinazas provenientes de diferentes materias primas

Parámetros	Vinaza			
	Caña de azúcar	Uva (vino)	Remolacha	Sorgo dulce
pH	4.46-4.8	3-4.2	4.3-5.35	4.5
DBO g/L	39.5	14.54-16.3	27.5-44.9	46
DQO g/L	84.9-95	26-50.2	55.5-91.1	79.9
Fosfatos (mg/L)	1-190	65-118.4	160-163	1990
TS (g/L)	25.8	13	-	-
Fenoles (mg/ml)	6	0.029-0.474	-	0.45

Fuente: España-Gamboa *et al.*, 2011

2.1.2 Impacto ambiental

Los grandes volúmenes de vinazas generados son preocupantes por el gran impacto que genera en el ecosistema en los cuales son vertidos, por ejemplo: la descarga descontrolada de las vinazas en los suelos puede deteriorar gravemente la estructura del suelo, la porosidad y la fertilidad (Tejada y Gonzalez, 2005). Los compuestos fenólicos y polifenólicos presentes en las vinazas inhiben la germinación de las semillas causando daños en varios cultivos y produciendo un impacto negativo en la actividad microbiana del suelo (Robles-González *et al.*, 2012).

Por otra parte, las vinazas cuando son desechadas en los cuerpos de agua, provocan malos olores y contribuyen a diseminar enfermedades endémicas como la malaria, la amibiasis y la esquistosomiasis, por la ausencia de depredadores y/o vectores, por si fuera poco, la alta coloración de las vinazas impide la entrada de luz, provocando la disminución del oxígeno disuelto debido a la reducción de la actividad fotosintética y por el aumento de la actividad microbiana, lo que crea condiciones inadecuadas para la vida acuática (España-Gamboa *et al.*, 2011).

La coloración característica de las vinazas está asociada con las altas concentraciones de compuestos tóxicos y recalcitrantes como los compuestos fenólicos y melanoidinas. Las melanoidinas son compuestos formados durante los procesos de cristalización donde las

reacciones entre azúcares y proteínas, caramelos de azúcares y furfurales de la hidrólisis ácidas se ven favorecidas, estas reacciones son conocidas como reacciones de Maillard (Prasad *et al.*, 2018). Debido a que las reacciones de Maillard generalmente son azarosas y pueden intervenir diferentes compuestos durante su reacción, los productos que se generan varían, por lo que no se puede establecer su estructura química con precisión, sin embargo, (Cämmerer *et al.*, 2002) propusieron una estructura química basada en la reacción de glucosa y glicina (Figura 2). La fórmula empírica de las melanoidinas es: $C_{17-18}H_{26-27}O_{10}N$, y sus pesos moleculares varían entre 5,000-40,000 kDa, siendo los polímeros con mayor peso molecular los que presentan mayor coloración (Ritu y Sanjeev, 2017)

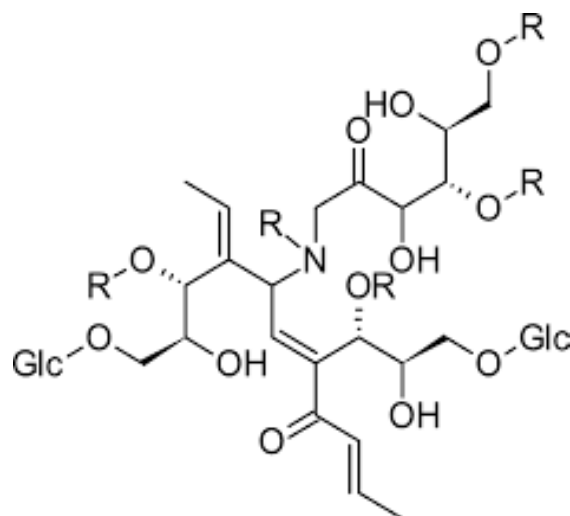


Figura 2.- Estructura básica de melanoidinas de glucosa-glicina.(Cämmerer *et al.*, 2002)

Los efectos de las melanoidinas *in vitro* han demostrado sus propiedades como compuestos tóxicos, mutagénicos, carcinogénicos y citotóxicos. Además, los peligros para la salud de las melanoidinas se han investigado en el contexto de su capacidad para promover reacciones de glicación *in vivo*, que están implicadas en la progresión de diversos tipos de enfermedades, como las complicaciones cardiovasculares, la diabetes mellitus y la enfermedad de Alzheimer (Somoza, 2005). La glicosilación excesiva resulta en la destrucción de aminoácidos esenciales, inactivación de las enzimas, inhibición de la unión de moléculas reguladoras, anomalías en el ADN, entre otras (Ritu y Sanjeev, 2017).

Otro de los problemas que caracterizan a las melanoidinas son su alta resistencia al ataque microbiano, y los procesos biológicos convencionales, como el proceso de tratamiento con lodos activados, son insuficientes para tratar estos compuestos presentes en las vinazas generadas por las destilerías y las industrias de fermentación, siendo un problema medioambiental (Mohana *et al.*, 2007).

En cuanto a los fenoles son definidos como compuestos formados por un anillo aromático (benceno) y un grupo hidroxilo unido a cualquier carbono del anillo aromático con hibridación Sp^2 , Figura 3.

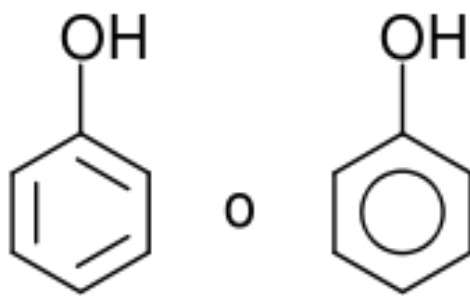


Figura 3.- Representación gráfica de la estructura de un compuesto fenólico

Muchos de estos compuestos fenólicos no son fácilmente biodegradables y son tóxicos para los microorganismos, incluso a bajas concentraciones. Las altas concentraciones de fenoles pueden inhibir incluso a los microorganismos que son capaces de usar compuestos aromáticos como su única fuente de carbono y energía. Estos compuestos son tóxicos e incluso pueden ser letales para los peces a concentraciones relativamente bajas de 5 a 25 mg/L, los compuestos fenólicos también contribuyen a los problemas de sabor en aguas bebibles y de aguas destinadas al procesamiento de alimentos (Prasad *et al.*, 2018). En México la norma mexicana NOM-064-ECOL-1994 establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de la industria de la destilería (Tabla 2) sin embargo no define los límites máximos permisibles para concentración de fenoles, sin embargo la NOM-CCA-014-

ECOL/1993 (Tabla 2) establece los límites máximos permisibles de los contaminantes en las aguas residuales de la industria textil, donde la concentración de fenoles presentes en las vinazas sin tratar es aproximadamente 30,000-60,000 veces más concentrada que los que estipula esta norma mexicana. Por esta razón los fenoles son los compuestos más importantes a eliminar durante el tratamiento de vinazas.

Tabla 2.- Límites máximos permisibles de los contaminantes para su descarga de aguas residuales de la industria destilera y textil.

Parámetros	Ind. Destilera	Ind. Textil
	NOM-064-ECOL/1994	NOM-CCA-014-ECOL/1993
pH	6.0-9.0	6.0-9.0
DBO (mg/L)	200-240	100-120
DQO (mg/L)	260-360	200-240
STS	200-240	100-120
Fenoles (mg/L)	-	0.1-0.2

2.2 Tratamiento de vinazas

Las vinazas representan un peligro potencial para el medio ambiente cuando son vertidas en los suelos y cuerpos de agua por sus altas concentraciones de compuestos tóxicos y recalcitrantes como las melanoidinas y compuestos fenólicos, así como por el color característicos que estos presentan, es por ello que antes de ser vertidos deben ser sometidos a tratamientos que tienen como fin remover o degradar o al menos transformar la mayoría de los compuestos tóxicos a compuestos que puedan ser susceptibles a la biodegradación. Actualmente existen una gran cantidad de técnicas que han sido exploradas y practicadas, estas técnicas son clasificadas principalmente en tratamientos fisicoquímicos y biológicos, algunas de las cuales se describen a continuación.

2.2.1 Tratamientos fisicoquímicos

Adsorción

El fenómeno de adsorción involucra interacciones químicas entre el soluto y los grupos químicos que se encuentran en la superficie del compuesto adsorbente, entre los cuales destacan las interacciones electrostáticas, las fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno y uniones de intercambio iónico e interacciones hidrofóbicas (Figaro *et al.*, 2009)

El carbón activado es uno de los principales adsorbentes empleados para el tratamiento de los contaminantes orgánicos de las aguas residuales, debido a su gran área superficial, su estructura microporosa y su alta capacidad de adsorción. Satyawali y Balakrishnan (2007) utilizaron un reactor anaeróbico seguido por un post-tratamiento con carbón activado hecho con bagazo y lograron una decoloración del 50.3% y una reducción de DQO del 23.6% del efluente de una vinaza, sin embargo, estas eficiencias fueron más bajas que las obtenidas con carbón activado comercial, que van del 93-95% para la eliminación del color y de 76.88% de para la reducción de DQO. El carbón activado ha demostrado ser muy eficiente en la adsorción de melanoidinas y polifenoles en vinazas, cuando es combinado con otros tratamientos, sin embargo, su uso ha sido restringido debido a su alto costo (Sowmeyan y Swaminathan, 2008).

Coagulación/Floculación

La coagulación es la desestabilización de las partículas coloidales mediante la neutralización de las fuerzas que las mantienen separadas mediante el uso de agentes coagulantes (por ejemplo, sílice activada, bentonita, polielectrolitos, almidón, entre otros.). Una vez desestabilizadas las cargas de los coloides, las partículas chocan para formar partículas más grandes (flóculos), por otra parte, la floculación es la acción de los polímeros para formar puentes entre los flóculos, resultando grandes aglomerados o grumos. En el tratamiento de las vinazas, se utilizan varios coagulantes como el sulfato de aluminio ($AlSO_4$), el cloruro férrico ($FeCl_3$), el sulfato ferroso ($FeSO_4$), el alumbre, el aluminio, las sales de calcio, el cloruro de polialuminio (PACl), etc. (Prajapati y Chaudhari, 2015). Sin embargo, los coagulantes son específicos del pH y su efectividad depende de su tipo, concentración y

características de las aguas residuales a tratar, por lo que su empleo se ve limitado (Chowdhary *et al.*, 2018)

Procesos avanzados de oxidación

La oxidación Fenton, y la ozonación son procesos de oxidación avanzada que pueden ser usados para el tratamiento de aguas residuales provenientes de las destilerías (Ghosh y Ghangrekar, 2019). Durante los procesos Fenton se llevan una serie de reacciones de oxidación a través de la catálisis del H_2O_2 por el ion Fe^{2+} en condiciones ácidas, generando radicales hidroxilos (-OH) con un potencial de oxidación extremadamente alto, cuando los compuestos electronegativos se radicalizan y reaccionan con el oxígeno conducen a la mineralización de los componentes asociados con el color y a la mineralización de los compuestos recalcitrantes presentes en las vinazas (de Heredia *et al.*, 2005). Ioannou y Fatta-Kassinou (2013) demostraron que el proceso de oxidación foto solar de Fenton elimina de manera significativa los valores de DQO hasta un 70%, y el color en un 75%, también demostró que el proceso de foto Fenton es más efectivo como tratamiento de pulido para las aguas residuales de la industria vinera.

El ozono es un oxidante fuerte, ampliamente utilizado como desinfectante en la producción de agua potable. Una molécula de ozono, consta de tres moléculas de oxígeno, es soluble en agua y está disponible para una reacción inmediata con un compuesto orgánico presente en el agua (Sreethawong y Chavadej, 2008). El ozono, en presencia de radiación UV y peróxido de hidrógeno, aumenta la eficiencia de la ozonización simple debido a la generación de radicales libres, como los radicales hidroxilos, que son muy reactivos y oxidantes (Benitez *et al.*, 2003). Sangave *et al.*, (2007) investigaron el efecto del ozono en el tratamiento pre y post aeróbico para vinazas diluidas al 10%. El tratamiento con ozono solo (sin tratamiento aeróbico) tuvo un efecto bajo en la reducción de la DQO (27%). Sin embargo, la combinación de tratamientos dio como resultado reducciones de DQO del 79% y una decoloración completa del efluente, en comparación con una reducción de la DQO del 34,9% en la muestra que no recibió el tratamiento de ozonización, esto sugiere que el uso de los procesos de ozonación debe manejarse como proceso secundario para el tratamiento de aguas residuales.

2.2.2 Tratamientos biológicos

Los tratamientos físicos y químicos son eficientes para la decoloración y la remoción de fenoles de las vinazas, cuando son usados como un post-tratamiento, sin embargo, sufren de serios inconvenientes, como los altos costos asociados con los materiales y la formación de subproductos que son tóxicos para el medio ambiente.

Es por eso que los usos de tratamientos biológicos surgen como una alternativa como primer paso para el tratamiento de las aguas residuales.

Tratamientos anaeróbicos

La digestión anaeróbica ha sido uno de los sistemas más empleados para el tratamiento de vinazas debido a los bajos costos operativos, los ahorros de aireación, la baja producción de lodos y la obtención de subproductos como gas metano (Jiménez *et al.*, 2006). Hoy en día, el tratamiento anaeróbico de vinazas se usa ampliamente como primer paso, ya que tiene eficiencias de remoción de DQO de 90% y recuperación de energía de 85 a 95% como biogás. Sin embargo, los niveles altos de potasio, metales pesados, sulfatos o compuestos fenólicos presentes en las vinazas pueden producir deficiencias de remoción de DQO durante la digestión anaeróbica (Wilkie *et al.*, 2000). Las melanoidinas que colorean las vinazas son difíciles de degradar a través de los tratamientos anaeróbicos, por lo que es necesario emplear métodos posteriores para la refinación de los efluentes, mayormente estos tratamientos son los aeróbicos y fisicoquímicos (Kannan *et al.*, 2006).

Tratamientos aeróbicos

Los tratamientos aeróbicos en comparación con la descomposición química (oxidación Fenton, ozonación, entre otros) son una alternativa respetuosa con el medio ambiente y competitiva en costos para la remoción del color residual y particularmente para la remoción de sustancias tóxicas como fenoles y polifenoles presentes en las vinazas después de los tratamientos anaeróbicos. Entre los microorganismos que más se emplean para el tratamiento aeróbico de las vinazas se encuentran los hongos filamentosos (*Penicillium decumbens*, *Aspergillus* sp., *Aspergillus niger*, *Flavodon flavus*), los hongos de la podredumbre blanca (*Phanerochaete* sp., *Phanerochaete chysosporium*, *Trametes versicolor*, *Coriolus* sp.),

levaduras (*Citeromyces* sp.) y bacterias (*Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp, bacterias acetogénicas), (España-Gamboa *et al.*, 2011; Robles-González *et al.*, 2012).

Dahiya *et al.*, (2001) empleó la bacteria *Pseudomonas fluorescens* inmovilizada en un carrier poroso de celulosa para el tratamiento de vinazas, y logró alcanzar un 76% de remoción de melanoidinas en un efluente no esterilizado y un 90% cuando el efluente fue esterilizado. esta diferencia puede ser ocasionado debido a que la estabilidad de las melanoidinas cambia con el pH y temperatura originando que las melanoidinas de alto peso molecular se degraden a melanoidinas de bajo peso molecular. Sirianuntapiboon *et al.*, (2004) demostraron que el empleo de la cepa BP103, una bacteria acetogénica, logró reducir un 32.3% y un 73.5% del color de una vinaza cruda proveniente de la destilación de azúcar de caña y de una vinaza tratada anaeróbicamente, respectivamente. En ambos casos los efluentes fueron suplementados con 3.0% de glucosa, 0.5% de extracto de malta, 0.1% KH_2PO_4 , 0.05% de KCl y 0.05% de $\text{MgSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$. De igual forma demostraron que sin estos suplementos la eficiencia de la decoloración disminuía. Este efecto fue observado de nueva cuenta cuando la cepa fue evaluada en un reactor *batch* por 7 días usando una dilución del 10% de la vinaza tratada anaeróbicamente suplementada solamente con 30 g/L de glucosa (Tondee y Sirianuntapiboon, 2008)

Además de las bacterias se han empleado hongos de la podredumbre blanca para el tratamiento de vinazas. Los hongos de la podredumbre blanca son un grupo de hongos, principalmente basidiomicetos, capaces de degradar compuestos recalcitrantes como la lignina y sus derivados a monómeros de carbohidratos solubles (CO_2 y H_2O) como parte de su metabolismo natural (Singh y Kumar, 2010). Estos hongos se caracterizan por su capacidad de adaptarse a condiciones medioambientales severas y por su notable de capacidad de sintetizar enzimas lignocelulolíticas (lacasas, lignino-peroxidasas y manganeso peroxidasas) que les permite actuar sobre un amplio rango de sustratos fenólicos y aromáticos como los presentes en las vinazas (Ward *et al.*, 2004)

España-Gamboa *et al.*, (2016) analizaron la remoción de fenoles y el color de una vinaza diluida en agua en una relación 1:10 en un biorreactor de aire comprimido utilizando el hongo *Trametes versicolor*. Después de 25 días de fermentación obtuvieron un 80% de remoción de fenoles, el 17% de remoción de color y un 60% de reducción de la DQO.

La capacidad de los hongos de la podredumbre blanca para degradar la lignina es dependiente de la producción de sistemas enzimáticos ligninolíticos extracelulares, el cual está comprendido principalmente por lacasas, lignina peroxidasa (LiP), magnesio peroxidasa (MnP) y oxidasas generadoras de peróxido de hidrógeno, siendo las más estudiadas las enzimas lacasas (Hatakka, 1994);

2.3 Lacasas

Las lacasas (ρ -difenol: oxígeno óxido reductasas, EC 1.10.3.2) son miembros de un grupo de proteínas conocidas como oxidasas azules multicobre. Las lacasas son enzimas con la capacidad de catalizar la oxidación de una amplia gama de compuestos aromáticos como mono-, di y polifenoles, fenoles sustituidos, aminas aromáticas, metoxifenoles, ascorbato y de compuestos recalcitrantes, mediante la subsecuente reducción de oxígeno molecular a agua (Burton, 2003; Kandasamy *et al.*, 2016; You *et al.*, 2013).

El conocimiento actual de las propiedades fisicoquímicas y estructurales de las lacasas está basado en estudios de enzimas purificadas. En este sentido, más de 100 lacasas fúngicas han sido purificadas. A partir de estas investigaciones se ha observado que la mayoría de las lacasas son proteínas globulares monoméricas con un peso molecular entre 60 y 80 kDa, presentan un pH óptimo de 4.0 que puede variar dependiendo del sustrato, con un punto isoelectrico de 3-4.8 y una temperatura óptima de 40-50 °C. Las lacasas generalmente son glicosiladas con un contenido de carbohidratos entre el 15 y 20% de su peso molecular, la cual es responsable de la secreción, susceptibilidad proteolítica, actividad, retención del cobre y estabilidad térmica (Giardina y Faraco, 2010; Madhavi y Lele, 2009; Park y Park, 2008).

Estructuralmente las lacasas contienen al menos cuatro átomos de Cu coordinados en el sitio activo, un cobre tipo 1 (T1) o azul; un cobre tipo 2 (T2) y dos cobres tipo 3 (T3) ordenados en un grupo trinuclear (Figura 4). La mayoría de las lacasas obtienen su absorción máxima alrededor de 600 nm debido al Cu T1, el cual es responsable del color azul de la enzima, y de 320 nm por los dos Cu T3. El Cu T1 funciona como el principal receptor de electrones y desempeña un papel importante en las propiedades físicas y químicas de las lacasas. Se han aislado algunas lacasas que carecen del espectro de absorción característico del sitio T1, en

lugar de Cu contiene Mg en el sitio 1, y tienen características atípicas, estas enzimas generalmente son llamadas lacasas blancas o amarillas (Burton, 2003; Fernández-Fernández *et al.*, 2012; Haibo *et al.*, 2009)

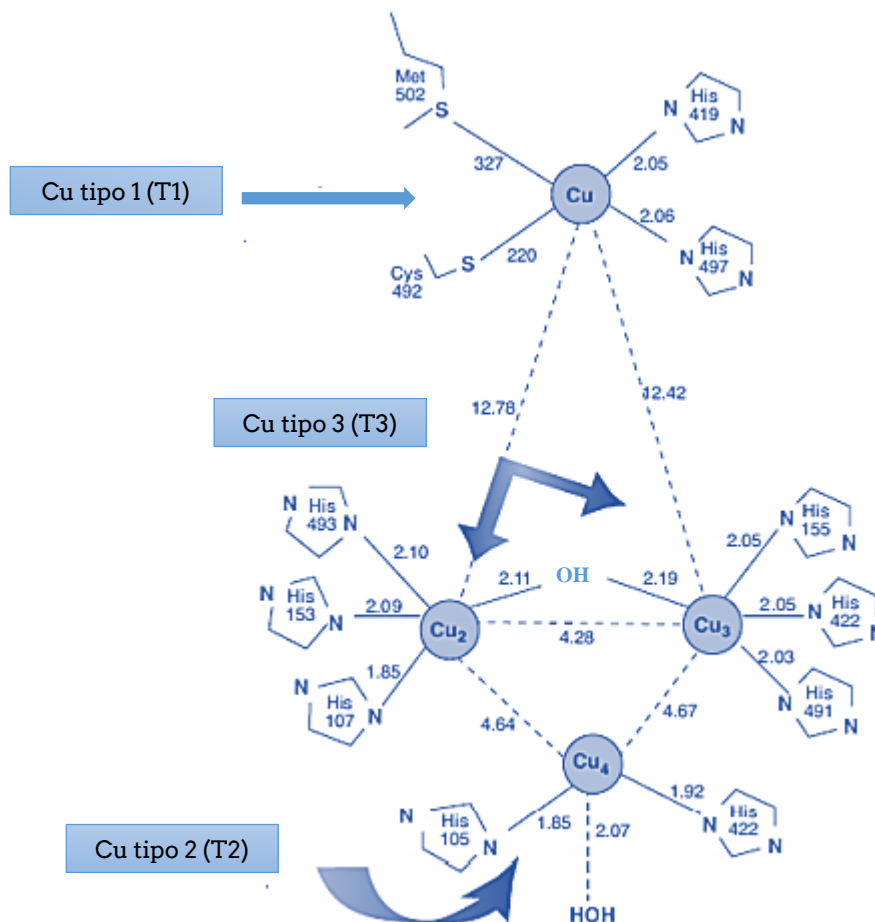


Figura 4. Esquema del complejo mononuclear y trinuclear de Cu presente en la lacasa

2.3.1 Mecanismo de acción de la lacasa

La capacidad catalítica de la enzima lacasa está asociada al potencial redox del cobre T1 (420 a 790 mV) que por su ubicación en la superficie del sitio activo es el principal sitio de aceptación de electrones. En su estado nativo la lacasa cuenta con cuatro cobres en estado completamente oxidado Cu^{+2} , lo que le permite al cobre T1 la oxidación individual de cuatro moléculas (sustrato) para la obtención de cuatro electrones, los cuales son transferidos de manera acoplada a cada uno de los cobres del clúster trinuclear (T2/T3), a través de un

tripeptido de His-Cys-His, alcanzando su máximo estado de reducción Cu^{+1} , los cobres totalmente reducidos son oxidados por el oxígeno molecular mediante un proceso de dos pasos hasta la obtención de agua, obteniéndose de nueva cuenta el estado nativo de la enzima con cuatro cobres divalentes Cu^{+2} . El paso limitante es el proceso de reducción del sustrato por el Cu T1 (Giardina y Faraco, 2010; Madhavi y Lele, 2009; Majeau *et al.*, 2010; Solomon *et al.*, 2008).

En general la catálisis de las lacasas se puede resumir en tres pasos (Figura5):

1. Reducción del cobre tipo 1 mediante la oxidación del sustrato
2. Transferencia interna del electrón ganado por el cobre tipo 1 hacia los cobres tipo 2 y 3 del sitio trinuclear a través del tripeptido His-Cys-His
3. Reducción del oxígeno molecular a agua en el sitio trinuclear

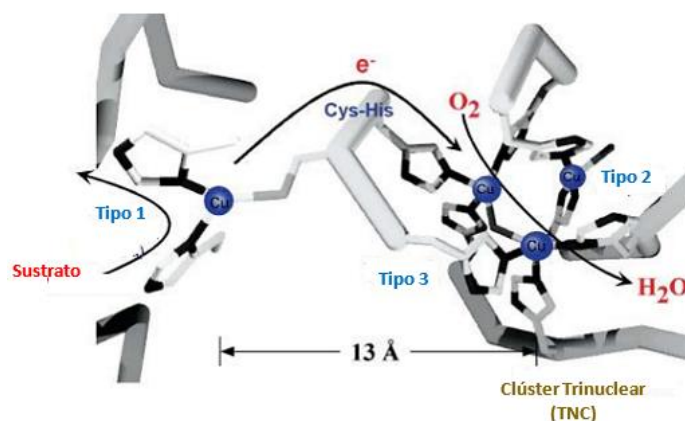


Figura 5.- Mecanismo de acción de la enzima lacasa. Se indican mediante flechas el flujo de electrones y la entrada del sustrato y de oxígeno.

El proceso de reducción del oxígeno molecular a agua se lleva a cabo en el centro trinuclear T2/T3 mediante dos pasos secuenciales de dos electrones, generando en primer lugar un intermediario peróxido (IP) y posteriormente un intermediario nativo (IN). Primeramente, el centro trinuclear T2/T3 en su forma nativa, con sus moléculas de cobre totalmente oxidadas (Figura 6A), oxida 4 sustratos para alcanzar un estado completamente reducido (Figura 6B), los cuales reaccionan con el oxígeno molecular cediéndole dos electrones dando lugar a un intermediario peroxidado (IP) (Figura 6C), concluyendo la primera etapa de transferencia de

electrones, en una segunda etapa dos electrones son transferidos al IP formando un intermediario nativo (IN) (Figura 6D), el IN, se reduce rápidamente por acción del sustrato o en ausencia del mismo, en este último el IN se descompone a la forma nativa a una velocidad demasiado lenta para ser relevante en el ciclo catalítico, por lo que el IN parece ser la forma catalíticamente completamente oxidada de la enzima. De hecho, la descomposición de IN se produce a través de pasos sucesivos asistidos por protones e implica una gran reestructuración estructural del ligando del puente μ_3 -oxo de adentro hacia afuera del grupo que conduce a la enzima en reposo o en estado nativo. De esta forma, el átomo de O restante del O_2 está unido como OH^- a Cu tipo 2 fuera del grupo, y los dos centros de Cu tipo 3 están unidos por un ligando OH^- (Arora y Sharma, 2010; Giardina y Faraco, 2010; Solomon *et al.*, 2008).

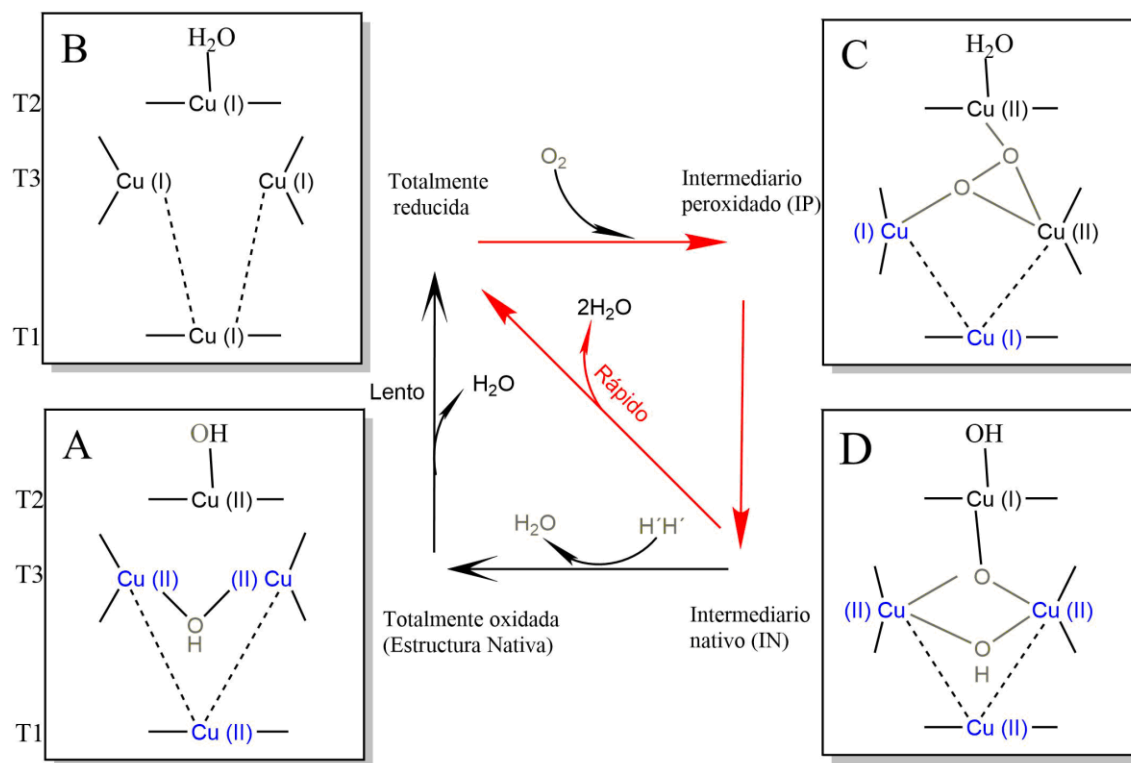


Figura 6.- Mecanismo de reducción de O_2 a agua por las lacasas. Las flechas rojas indican los pasos que toman lugar en el ciclo catalítico; las flechas negras indican los pasos que se han observado que pueden experimentar, pero no forma parte del ciclo catalítico. El intermediario peroxidado es una especie reducida por $2e^-$ y el intermediario nativo es una especie reducida por $4e^-$. Adaptado de Giardina *et al.*, 2010

2.3.2 Aplicaciones de las lacasas

Las lacasas tienen un gran potencial biotecnológico debido a su gran capacidad de degradar un amplio rango de sustratos que son empleados o producidos en muchos sectores industriales. Su capacidad de degradar compuestos fenólicos la hace apropiada para la decoloración de tintes y para la degradación de compuestos xenobióticos durante el tratamiento de aguas residuales. En las dos últimas décadas los estudios en el campo de la electrobioquímica, en este sentido las lacasas han sido empleadas para el desarrollo de biosensores, que permitan la detección de fenoles en aguas residuales y en la industria alimenticia. Las lacasas también han sido empleadas para el blanqueo en la industria de pulpa y papel, deslignificación y para la producción de nuevos productos de papel (Fernández-Fernández *et al.*, 2012; Mayolo-deloisa *et al.*, 2020; Noman, Al-Gheethi *et al.*, 2019).

La decoloración de tintes presentes en los efluentes textiles es una de las aplicaciones más prometedoras del tratamiento de aguas residuales por lacasas. Algunos de los experimentos exitosos se han llevado a cabo a escala laboratorio mediante el empleo de enzimas libres y purificadas en efluentes sintéticos mostrando un alto porcentaje de decoloración, como en el reportado por Zapata-Castillo (2012) que logró remover el 96% del color del índigo carmín y un 92% del color de un efluente textil en 24 horas empleando las lacasas presentes en el extracto crudo de *Trametes hirsuta* Bm2.

Si bien las lacasas muestran un alto potencial en la biorremediación su empleo industrial aún se ve limitada por su sensibilidad a solventes, pH, temperatura, inhibición, baja estabilidad y altos costos de producción (Fortes *et al.*, 2017; Gonzalez-Coronel *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2015).

2.4 Inmovilización de enzimas

La inmovilización es un tema muy amplio que podría decirse que es parte ciencia y parte arte. Existen un gran número de factores alrededor de la enzima que se tienen que considerar para escoger una estrategia de inmovilización, incluyendo: tolerancia enzimática al entorno químico o físico de la inmovilización, los grupos funcionales en la superficie de la proteína, el tamaño de la enzima, la carga de la enzima y/o punto isoeléctrico (pI), polaridad de la proteína (regiones hidrofóbicas e hidrofílicas) y las necesidades de transporte del sustrato/

producto (Minteer y Moehlenbrock, 2017). Existen muchos métodos de inmovilización como atrapamiento, encapsulación, adsorción, unión covalente al soporte y entrecruzamiento, clasificados de acuerdo al tipo de unión física o química de la enzima al soporte (Figura 7) (Fernández-Fernández *et al.*, 2012).

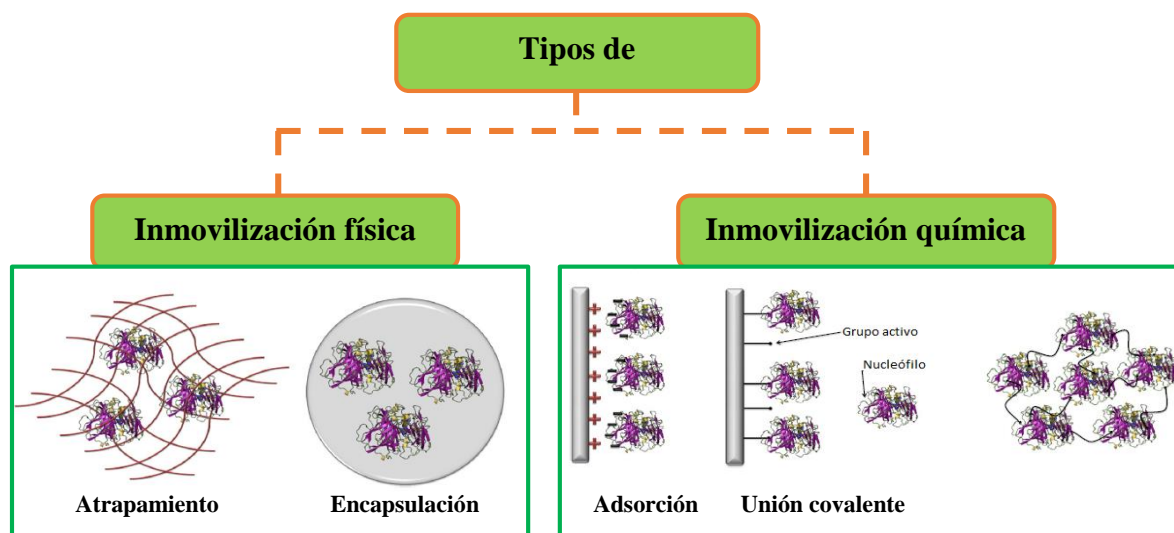


Figura 7.- Clasificación de los métodos de inmovilización según el tipo de unión enzima-soporte.

Si bien, cada uno de estos métodos presentan diferentes ventajas y desventajas (Tabla3), todas están encaminadas al mejoramiento de la enzima y proporcionan una serie de ventajas generales como: facilidad para separarlas del producto minimizando o eliminando de esta forma la contaminación proteica, permite la recuperación y reutilización de enzimas costosas, mejora la estabilidad de la enzima, tanto en condiciones de almacenamiento como operativas, por ejemplo, desnaturalización por calor, por disolventes orgánicos o inhibición por altas concentraciones de sustratos, permite la reutilización y la mejora de la estabilidad enzimática se ve reflejada en una mayor productividad del catalizador (Kg de producto/ Kg de enzima) (Sánchez Ramírez *et al.*, 2014; Sheldon, 2007)

Tabla 3.- Desventajas y ventajas de los diferentes métodos de inmovilización

Método	Fundamento	Ventaja	Desventaja
<i>Inmovilización física</i>			
<i>Atrapamiento</i>	Retención en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa (poliacril-amina, colágeno, alginato, etc.)	La enzima no sufre alteraciones químicas. Proporcionan mayor estabilidad.	La enzima puede desprenderse del soporte.
<i>Encapsulación</i>	La enzima está cubierta por una membrana semipermeable que permite el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no de enzima.	Se puede encapsular simultáneamente una gran variedad de enzimas.	Rotura de las capsulas.
<i>Inmovilización química</i>			
<i>Unión covalente</i>	Activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las enzimas.	La unión enzima-soporte es muy fuerte. Mayor estabilidad.	Pérdida de actividad enzimática. Requiere la protección del centro activo de la enzima para evitar su alteración.
<i>Adsorción</i>	Unión mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y por puentes de hidrógeno.	Retención de actividad enzimática, preparación sencilla.	La unión soporte-enzima es muy débil, se forman derivados poco estables.
<i>Entrecruzamiento</i>	Reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de enzimas.	Gran estabilidad de la enzima debido a la rigidez de la estructura.	Pérdida de actividad enzimática.

La técnica de atrapamiento es uno de los métodos más simples y económicos para la inmovilización de enzimas (Wei *et al.*, 2002). Por definición, el atrapamiento enzimático se refiere a los procesos por los cuales las enzimas están incrustadas en una matriz formada por medios químicos o físicos como la reticulación o la gelación. Convencionalmente, el atrapamiento enzimático se lleva a cabo mediante la dispersión de enzima en una solución que contiene el monómero/polímero, seguido de la dispersión de la solución enzima-monómero/polímero en un medio inmiscible y su consecuente solidificación por medios químicos o físicos (Figura 8) (Cao, 2005).

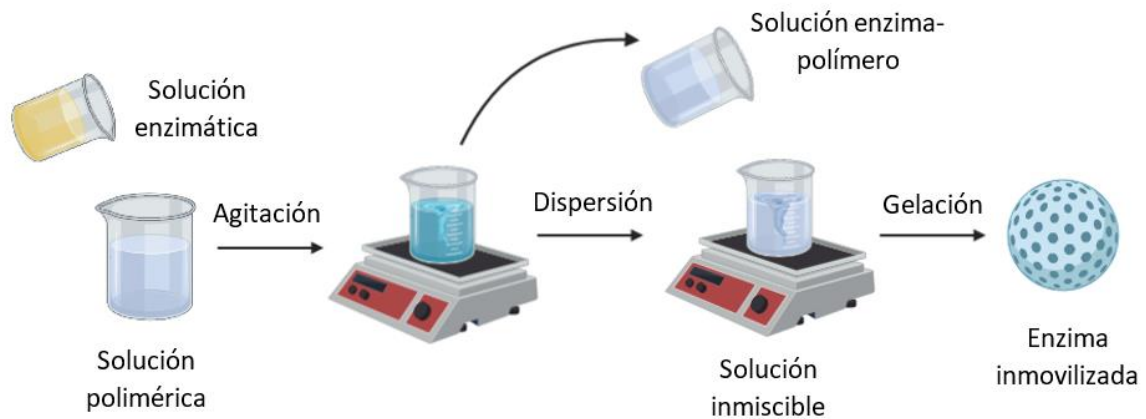


Figura 8.- Proceso clásico para el atrapamiento enzimático en hidrogeles

Entre los polímeros más usados para la formación de matices durante el atrapamiento enzimático se encuentran los hidrogeles: poliacril-amina, quitosano, alginato, gelatina, celulosa, almidón, polivinil-alcohol, κ -carregina, entre otros. (Fernández-Fernández *et al.*, 2012; Sheldon, 2007). El alginato es un biopolímero conformado por los ácidos manurónico y gulurónico que en presencia de ion calcio gelifica, formando una matriz insoluble (Figura 9), que por su bajo costo, su compatibilidad con muchas enzimas, su tolerancia a altas temperaturas y sus propiedades no tóxicas se sitúa como la matriz más conveniente para el atrapamiento de enzimas (Eş *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2017).

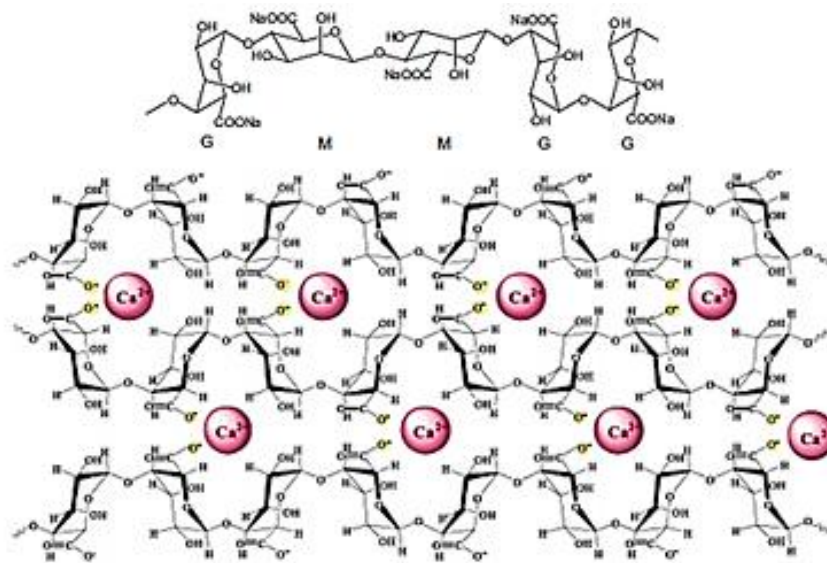


Figura 9.- Representación esquemática del gel de alginato de calcio formado por la interacción del ion Ca^{+2} con los grupos con carga negativa de los monómeros de ácido manurónico (M) y gularónico (G)

Uno de los inconvenientes intrínsecos del atrapamiento es el desprendimiento de las enzimas del soporte, para solucionar este problema se emplea una variación del método convencional de gelificación, que consiste en el entrecruzamiento in situ después del atrapamiento de la enzima mediante el empleo de agentes entrecruzantes, durante este método se pueden llevar a cabo el entrecruzamiento entre las propias enzimas o entre la enzima y el soporte e incluso entre las moléculas de la matriz (Bhushan *et al.*, 2015; Cao, 2005; Kumar *et al.*, 2017; Noreen *et al.*, 2016; Minter y Moehlenbrock, 2017). Diversas investigaciones han demostrado que el empleo de glutaraldehído como agente entrecruzante reduce el desprendimiento de la enzima obteniendo un mayor ciclo de reuso, por ejemplo Bhushan *et al.* (2015), mejoraron la estabilidad de la enzima xilanasa de *Aspergillus flavus* MTCC 930 por medio de su encapsulación en alginato de calcio y su posterior entrecruzamiento con glutaraldehído logrando una mejora en el porcentaje de actividad retenida después de 5 ciclos de reuso. Noreen *et al.* (2016) inmovilizó las lacasas de *Trametes versicolor* IBL-04 en alginato de calcio entrecruzadas con glutaraldehído, lo que les permitió retener el 68% de la actividad después de tres ciclos de reuso. Kumar *et al.* (2017) inmovilizó la enzima xilanasa de *Bacillus licheniformis* en alginato de calcio entrecruzadas con glutaraldehído permitiéndole mantener

un mayor porcentaje de actividad en comparación con la enzima atrapada en alginato de calcio después de 5 ciclos.

Los métodos de inmovilización de enzimas por atrapamiento o adsorción son más sencillos y económicos, pero presentan pérdidas de actividad a largo plazo ya que la unión enzima-soporte es muy débil. En el caso de enzimas lignocelulolíticas, pueden presentarse problemas de difusión. Por otro lado, los métodos de unión covalente son relativamente más difíciles de preparar y costosos, pero permiten obtener biocatalizadores más estables y duraderos (Sánchez Ramírez *et al.*, 2014). La unión covalente de una enzima a un portador se basa en la reacción química entre los residuos activos de aminoácidos nucleofílicos (AAR) situados en la superficie de la enzima (A) y los grupos activos que están unidas a la superficie del portador (B), o viceversa (Figura 10). Para lograr un enlace eficiente, la funcionalidad del portador y/o la enzima debe activarse antes de la inmovilización. A menudo, los portadores se activan antes de su uso para la unión enzimática (Cao, 2005).

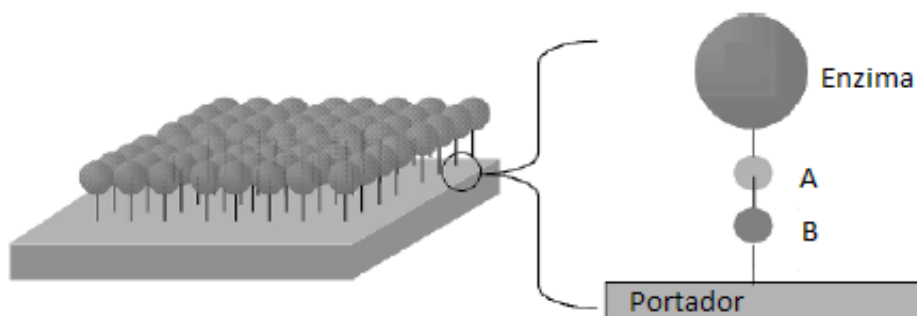


Figura 10.-Inmovilización covalente de una enzima sobre un soporte: A) Residuo de aminoácido activo, B) Grupo activo del soporte

Un portador se define como un compuesto, que consiste de un componente físico fuertemente relacionado con las características físicas del portador, por ejemplo, tamaño de partícula, área superficial, tamaño de poro, volumen y distribución de los poros, la morfología, la estabilidad mecánica, el factor de hinchazón, entre otros, y de un componente químico relacionado con la composición química, química de la superficie, funcionalidad activa y otras funciones inertes de anclaje. Se ha encontrado que la actividad específica (U/mg de proteína), la

actividad volumétrica (U/g del soporte) y la selectividad de la enzima inmovilizada, no solo depende de la naturaleza química del portador, sino también de la naturaleza física, es por ello que es necesario emplear un portador que pueda cumplir con la mayoría de estas características (Aparicio y Sinisterra, 1993; Cao, 2005; Patel *et al.*, 2014)

Los materiales de sílice mesoporoso (MSM) por sus características propias han atraído mucha atención como un soporte prometedor para la inmovilización de enzimas, entre estas características destacan: su alta área superficial, alto volumen y tamaño de poros modificables (2-50 nm), su presencia benigna en el medioambiente, su alta biocompatibilidad, resistencia a disolventes orgánicos y ataques microbianos, constante dieléctrica y densidad baja, cabe destacar que las nanopartículas de silicio son aprobadas por la FDA como aditivo en alimentos (Kim *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2019; Patel *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2007)

La formación MSM generalmente se llevan a cabo por el método de auto ensamblaje, este método se basa en el empleo de un surfactante como plantilla (Pluronic123), cuyo objetivo es la creación de los poros y de la estructura del materia mediante la formación de micelas (Figura 11a), posterior a la creación de micelas se agrega un precursor, generalmente el Tetraetilortosilicato (TEOS), el precursor es hidrolizado y se genera la condensación y polimerización del precursor alrededor de las micelas, generando una red alrededor de la plantilla (Figura 11b), ya obtenido el material híbrido orgánico-inorgánico, la plantilla se elimina por calcinación o por solventes generando un material poroso (Figura 11c) (Kim *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2019; Wang y Zeng, 2011).

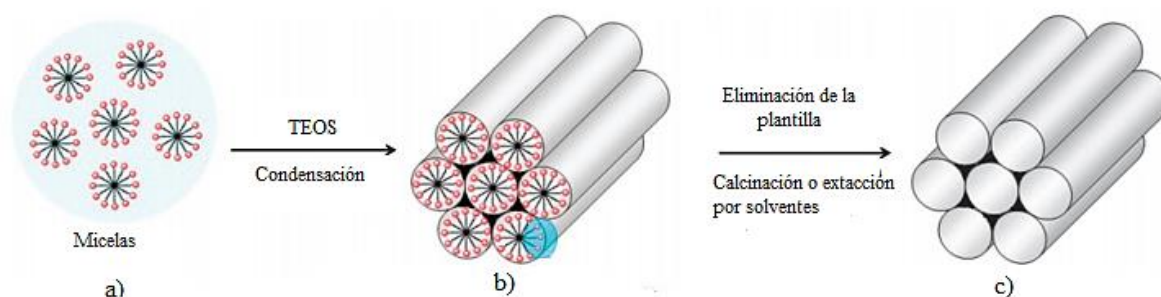


Figura 11.- Pasos para la síntesis de MSM; a) micelas formadas por pluronic, b) auto ensamblaje del TEOS en las micelas, c) MSM resultante después de la remoción de la plantilla

La unión covalente de enzimas soporte mesoporosos se puede dividir en tres pasos: 1) Procesos de silanización por el método de anclaje, el cual consiste en la unión de los grupos silanol presentes en la superficie de las esferas de dióxido de silicio mesoporosos (EDSM) con los grupos metoxi o etoxi de moléculas precursoras como el tetraetilortosilicato (TEOS) (Figura 12 A); 2) Activación de los grupos funcionales del precursor mediante agentes entrecruzantes como glutaraldehído (Figura 12 B) y 3) unión covalente de la enzima con los grupos funcionales activados del soporte mediante la formación de enlaces tipo peptídico, bases de Schiff, (Figura 12 C) (Kumar *et al.*, 2019; Osma *et al.*, 2010).

Estudios revelan que la inmovilización covalente permite un mayor ciclo de reuso de la enzima comparado con otros tipos de técnicas de inmovilización, por ejemplo: Hua,*et al.*, en el año 2009 implementaron un sistema de inmovilización de lacasas empleando como matriz encapsulante nanopartículas magnéticas de quitosano, para medir su efectividad compararon el sistema enzimático de lacasas libres y el sistema de lacasas encapsuladas a las mismas condiciones y utilizando como sustrato ABTS. Los resultados obtenidos mostraron una velocidad máxima de $5.29 \pm .042$ y de 4.25 ± 0.58 para el sistema de lacasas libres y del sistema de lacasas inmovilizadas respectivamente, en cuanto a la afinidad de ambos sistemas al sustrato hubo una disminución de la afinidad al sustrato por el sistema de enzimas inmovilizadas con un valor de K_m igual a 140.6 ± 3.6 , mientras que el sistema de lacasas libres tiene un valor de K_m igual a 31.1 ± 2.3 . Esto debido a los cambios de conformación producidos en la enzima durante el proceso de inmovilización. Uno de los datos más importantes obtenidos por Hua *et al.*, es la conservación de la actividad del sistema inmovilizado durante 10 ciclos de uso.

Wang y Zeng, (2011) inmovilizaron lacasas utilizando como soporte nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 con sílica mesoporosa y midieron su actividad mediante el empleo de catecol como sustrato y determinaron que la actividad después de la inmovilización se redujo un 18.5% con respecto a la enzima libre, sin embargo, lograron mantener la actividad de la enzima durante 10 ciclos.

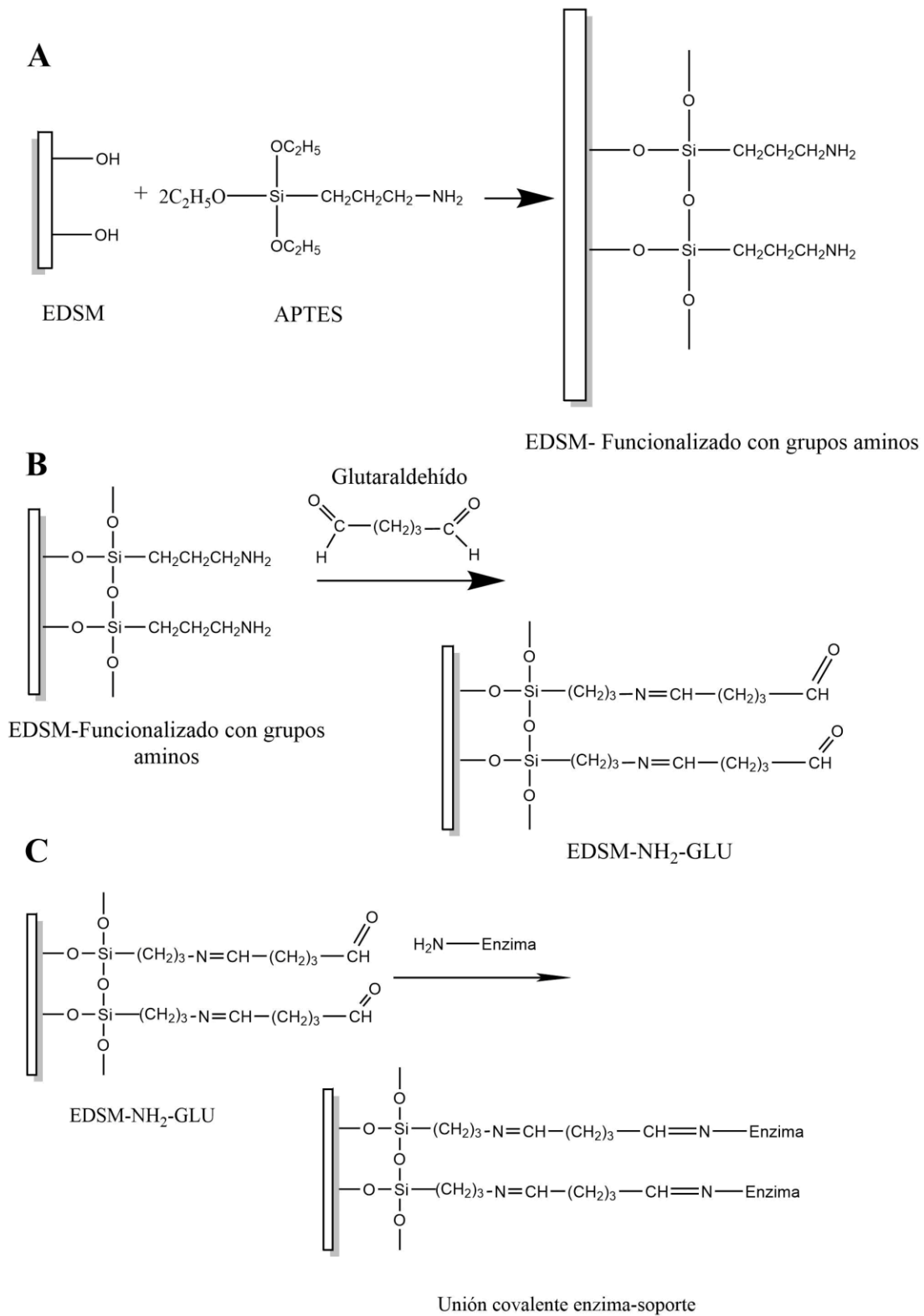


Figura 12.- Pasos para la unión covalente de una enzima en una EDSM. A) Proceso de silanización, B) Activación de los grupos funcionales y C) formación de bases de Schiff entre enzima-glutaraldehído.

3 JUSTIFICACIÓN

La necesidad de generar nuevos biocombustibles que sean amigables con el medio ambiente, ha llevado a la producción de una gran cantidad de etanol hidratado a partir de la caña de azúcar, sin embargo, durante la producción del alcohol se generan grandes cantidades de aguas residuales que se caracterizan por su alto contenido de materia orgánica, pH ácido y una coloración café oscuro. Estas aguas residuales son comúnmente conocidas como vinazas y representan un riesgo ambiental debido a su alta concentración de fenoles y melanoidinas. Para resolver esta problemática se han empleado hongos de la podredumbre blanca. El hongo *Trametes hirsuta* Bm2 produce lacasas que han demostrado remover fenoles y tintes, sin embargo, son sensibles a inhibición por altas concentraciones de fenoles. Es por ello que en este estudio se establecerán las condiciones para la inmovilización de las lacasas en alginato de calcio y dióxido de silicio con glutaraldehído para el tratamiento de una vinaza.

4 HIPÓTESIS

Las lacasas inmovilizadas en alginato de calcio y dióxido de silicio con glutaraldehído serán capaces de decolorar y remover los fenoles presentes en una vinaza provenientes de la destilación de melaza de caña de azúcar.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Inmovilizar lacasas de *Trametes hirsuta* Bm2 en alginato de calcio y dióxido de silicio con glutaraldehído para el tratamiento de una vinaza proveniente de la destilación de melaza de caña de azúcar.

5.2 Objetivos específicos

- Producir lacasas mediante la fermentación sumergida de *Trametes hirsuta* Bm2 en salvado de trigo.
- Evaluar cualitativamente en placas la capacidad del extracto crudo para oxidar los compuestos fenólicos presentes en diferentes diluciones de vinazas.
- Establecer las condiciones de inmovilización de las lacasas en alginato de calcio entrecruzadas con glutaraldehído mediante un diseño factorial 2^3 .
- Sintetizar y modificar las esferas de SiO_2 (soporte) para la inmovilización de las lacasas.
- Caracterizar el soporte antes y después de la modificación química.
- Optimizar las condiciones de inmovilización covalente de las lacasas en el soporte de SiO_2 mediante un diseño central compuesto 2^{2+*} .
- Cuantificar para ambos sistemas la actividad enzimática de las lacasas libres e inmovilizadas
- Tratar el efluente de una vinaza con las enzimas libres e inmovilizadas

6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

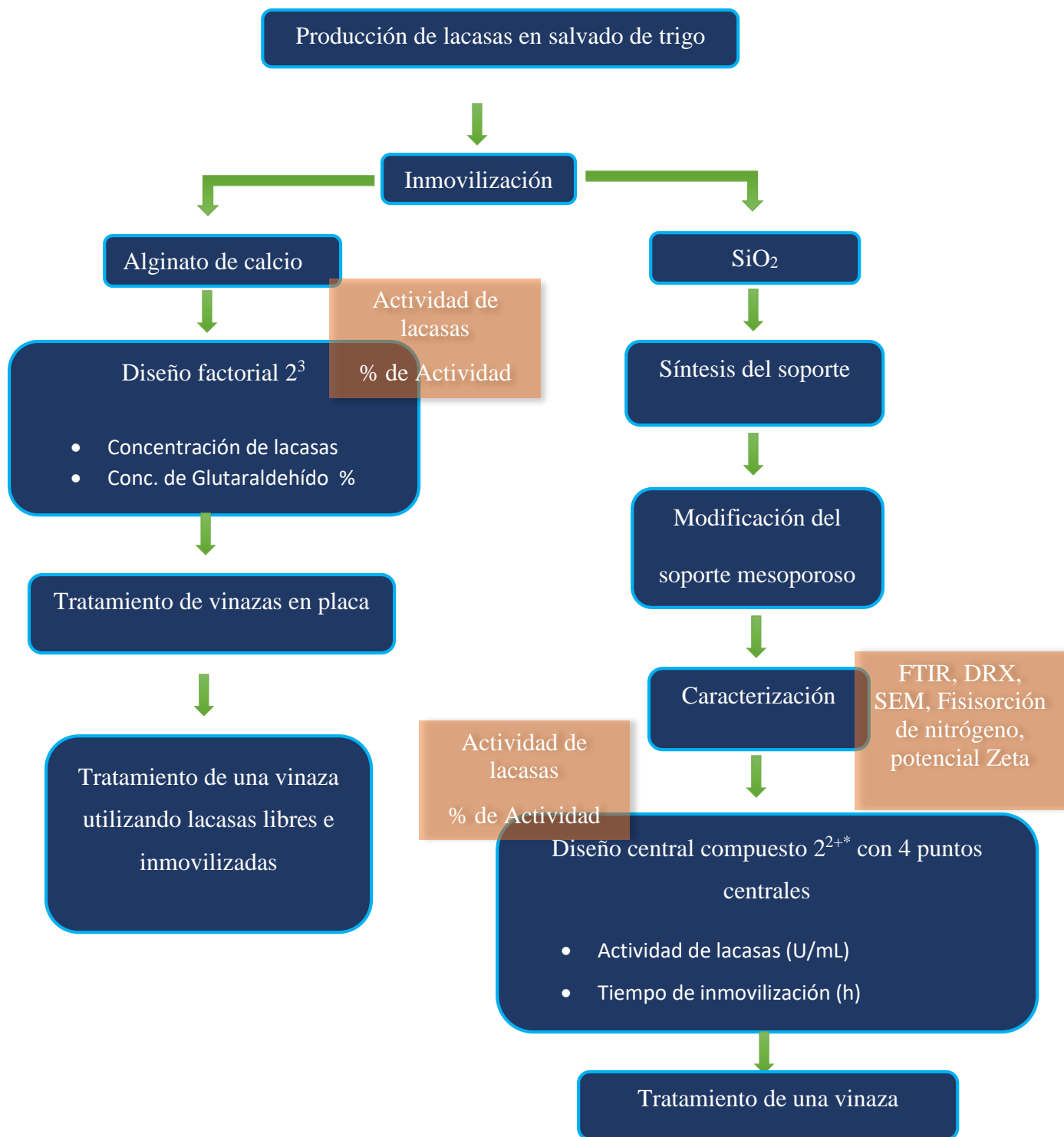


Figura 13.- Secuencia de pasos para la inmovilización de lacasas de *T. hirsuta Bm2* y su evaluación para el tratamiento de una vinaza

7 METODOLOGÍA

7.1 Procedencia y composición de la vinaza

La vinaza empleada en este estudio fue proporcionada por el ingenio azucarero “La Gloria”, localizado en el municipio Úrsulo Galván, Veracruz, México. “La Gloria” produce al año aproximadamente 30 millones de litros de etanol hidratado a partir de la fermentación de la melaza de caña de azúcar (*Saccharum officinarum L.*), generando aproximadamente 1 millón de litros de vinaza por día. Las características físicas y químicas de estos efluentes (Tabla 4), en particular las concentraciones de fenoles totales se encuentran en el rango descrito por Acharya *et al.*, (2008), quien los clasifica como aguas residuales altamente contaminantes.

Tabla 4.- Composición de la vinaza “La Gloria”

Parámetro	Vinaza "La Gloria"
pH	4.39 ± 0.006
Color *	1.3 ± 0.12
Fenoles totales **	10,834 ± 1,476
DQO	110,065 ± 11,486
SO ₄ ²⁻	5,300 ± 1,416
SO ₄ ²⁻	241 ± 114
N _{total}	1,720 ± 217
N-NH ₃	68 ± 9
N _{orgánico}	1652 ± 219
PO ₄ ³⁻	415 ± 67
Ácido acético	433 ± 100
Ácido propiónico	36 ± 9
Ácido butírico	301 ± 49

^a Todos los valores están en mg/L a excepción del pH y color

* Absorbancia a 475 nm

** Expresado en ácido gálico

7.2 Microorganismo y producción de lacasas

Se usó la cepa de *Trametes hirsuta* Bm2, aislada de desechos de madera del estado de Yucatán que forma parte de la colección del Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Microbiana del Instituto Tecnológico de Mérida (Tapia-Tussel *et al.*, 2011). Para la producción de lacasas en salvado de trigo, primeramente, se creció el hongo en placas con 2 % (p/v) de extracto de malta (EM) y 2 % (p/v) de agar bacteriológico por 4 días a 35°C. Posteriormente la obtención del inóculo para la producción de lacasas se realizó una suspensión micelial que fue preparada inoculando 1cm² de micelio en un matraz Erlenmeyer de 125 ml que contenía 50 ml de medio YMPG líquido (**Anexo 1**), el medio se incubó por 4 días a 35°C y 150 rpm. El micelio resultante fue homogenizado con el Ultraturrax y 1 ml de este micelio se utilizó como inóculo para la producción de lacasas en matraces Erlenmeyer de 250 ml, que contenían 50 ml de medio con salvado de trigo al 2% (p/v) en amortiguador de fosfatos 60 Mm pH 6. Los matraces fueron incubados a 35°C por 7 días a 150 rpm. Para obtener el extracto crudo las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm por 15 min a 10 °C con el fin de separar la biomasa del medio y posteriormente el sobrenadante fue filtrado a vacío para remover los restos de salvado de trigo y de micelio que no se pudieron remover con la centrifugación. En el extracto crudo se cuantificó la actividad enzimática y la cantidad de fenoles. Los extractos se almacenaron a 4°C.

7.3 Determinación de actividad de lacasas

La actividad de lacasa se determinó por espectrofotometría usando ABTS (2,2'-azinobis [ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico]) 0.5 mM en buffer acetatos 1 M pH 4.5 (Johannes *et al.*, 2000). Se midió el incremento en la absorbancia a 420 nm y la actividad fue calculada a partir del coeficiente de extinción molar (ϵ) de 36,000 M⁻¹ cm⁻¹. Una unidad de actividad de lacasa es la cantidad de la enzima que oxida 1 μ mol de ABTS/ml/min, bajo las condiciones de ensayo.

7.4 Determinación de la concentración de proteína

La proteína se determinó por el método de Bradford (1976). Se adicionaron 100 µl de muestra y 1000 µl del reactivo de Bradford. La solución se agitó y después de 2 minutos en reposo a temperatura ambiente, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. La concentración de proteína en las muestras se determinó extrapolando los valores de absorbancia a una curva estándar de albúmina sérica bovina a una concentración de entre 10-200 µg/ml (**Anexo 2**).

7.5 Determinación del contenido de fenoles totales

Se determinó por medio de la técnica de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). La mezcla de reacción consistió en 100 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu (1:9), 20 µL de muestra, 1500 µl de agua se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se agregó 300 µl de Na₂CO₃ al 7.5% (p/v), se incubó a 40°C por 30 min. La absorbancia se leyó a 765 nm y se extrapolo a una curva patrón realizada con ácido gálico de 0.05-0.5 mg/ml (**Anexo 3**).

7.6 Determinación de la remoción de color

El porcentaje de decoloración se determinó leyendo la absorbancia de la muestra (en dilución 10⁻¹) en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 475 nm. Los resultados de la decoloración se expresaron en porcentaje con respecto a los controles de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Decoloración} = \frac{A_i - A_f}{A_i} \times 100$$

Donde, A_i es la absorbancia inicial y A_f es la absorbancia final

Como blanco se utilizó agua destilada y como control positivo se usaron muestras de las diluciones de vinazas sin tratar.

7.7 Tratamiento de una vinaza en placa con enzima libre

La capacidad de las enzimas lacasas libres para tratar una vinaza se determinó cualitativamente en placas que contenían diluciones diferentes de vinazas, estas diluciones son: 5, 10, 15, 20, 25 y 50% (v/v) a cada una de las diluciones se les añadió 2% (p/v) de agar,

5 ml de buffer acetatos 0.05M pH 4.5 y aforados hasta un volumen de 40 ml con agua destilada. Los medios fueron esterilizados durante 15 minutos a 121 °C y 15 psi. La inoculación del extracto crudo se llevó a cabo en pequeños pozos formados con ayuda de un sacabocado en las placas. Las placas inoculadas fueron incubadas a 35 °C hasta observar claramente los halos de oxidación.

7.8 Inmovilización de lacasas en alginato de calcio con glutaraldehído

Para encontrar las mejores condiciones de inmovilización de lacasas en alginato de calcio entrecruzadas con glutaraldehído se realizó un diseño factorial 2^3 (**Anexo 4**), los factores evaluados (variables independientes) fueron: concentración de lacasas, concentración de glutaraldehído en % (p/v) y el tiempo de inmovilización. Como variable de respuesta (variable dependiente) se consideraron la actividad de lacasas y el porcentaje de actividad retenida.

Los experimentos se llevaron por duplicado y las respuestas obtenidas fueron expresados como el promedio \pm la desviación estándar, para conocer cuál de los factores tenía un mayor efecto en las variables de respuesta se utilizó el programa STAT GRAPHICS y se obtuvieron las gráficas de interacciones principales y la gráfica de Pareto, también se realizó el análisis de varianza (ANOVA), con el mismo programa, con un nivel de confianza del 95% para identificar las diferencias significativas entre los tratamientos realizados.

Para la inmovilización se siguió la metodología de (Wang *et al.*, 2008). La solución de alginato se realizó diluyendo el alginato de sodio en una solución que contenía cierta cantidad de enzima (dependiendo del tratamiento) diluida en agua destilada hasta tener una concentración del 2% (p/v) de alginato de calcio. La mezcla fue vertida en una jeringa de 3 ml y posteriormente fue goteada en una solución fría de CaCl_2 0.02M con agitación suave, las perlas resultantes fueron almacenadas por 2 horas a 4°C. Las esferas fueron lavadas dos veces con agua destilada para remover las enzimas que no fueron encapsuladas y posteriormente secadas para someterlas al entrecruzamiento durante el tiempo y en una solución de glutaraldehído-Buffer acetatos pH 4.5 establecidos en el diseño experimental. Después del entrecruzamiento las perlas fueron lavadas dos veces con agua destilada para

remover el exceso de glutaraldehído. Por ultimo las perlas fueron filtradas con ayuda de un colador y almacenadas en Buffer fosfato 0.05 M pH 6 a una temperatura de 4 °C.

7.9 Cinética del tratamiento de una vinaza por lacasas libres e inmovilizadas en alginato de Ca²⁺

La cinética del tratamiento de una vinaza se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 5 ml de una solución al 25% (v/v) de una vinaza, a los cuales se inocularon 0.250 ml del extracto crudo con una actividad de 3187.963 U/ml, los matraces fueron incubados a 40°C a 150 rpm por 120 hrs, cada 24 h. se determinó el porcentaje de fenoles y de color removidos. Para el tratamiento con la enzima inmovilizada el procedimiento fue el mismo, solamente que se agregó el número de perlas equivalente al volumen utilizado para el tratamiento con enzima libre.

Para ambos casos la dilución de vinazas contenía 1.25 ml de vinaza, 0.5 ml de Buffer acetatos 1M pH 4.5 y 3.25 ml de agua destilada.

7.10 Tratamiento de vinazas diluidas por lacasas libres e inmovilizadas en alginato de Ca²⁺

El tratamiento se llevó a cabo en matraces de 250 ml que contenían 5 ml de una solución de vinaza al 25, 50, 70 y 90 %, a los cuales se agregó 0.250 ml de extracto crudo con una actividad de 3187.963 U/ml y para el control 0.250 ml de agua destilada, para la enzima inmovilizada se empleó el número de perlas equivalentes a 0.250 ml de enzima inmovilizada. De igual forma se realizó el tratamiento de las vinazas empleando perlas de alginato de calcio sin enzima como control, para determinar efectos de adsorción y/o absorción en las esferas. Los matraces fueron incubados a 40°C a 150 rpm durante 72 horas. Al finalizar el tratamiento se determinó el porcentaje de fenoles y la cantidad de color removido.

7.11 Preparación de esferas de dióxido de silicio mesoporosas

La síntesis del SiO₂ se realizó mediante el método modificado de Sol-Gel reportado por (Zhu *et al.*, 2007) utilizando el Tetraetilortosilicato (TEOS) como precursor. Para la síntesis del soporte del SiO₂ se mezclaron 4 g de Pluronic P123 (EO₂₀PO₇₀EO₂₀) como plantilla con 5 g de KCl, ambas fueron diluidas a temperatura ambiente en una solución que contenía 120 ml de H₂O más 23.6 g de HCl (37%), la mezcla se agitó hasta su total homogenización y transparencia, posteriormente se añadió 3 g de mesitileno y se dejó en agitación lenta por 2 hrs. Seguidamente se agregaron 8.5 g del precursor TEOS a la misma solución y se agitó durante 10 minutos. La mezcla resultante se mantuvo en condiciones estáticas por 24 h a 35 °C y posteriormente se incrementó a 100 °C durante otras 24 h. Por último, los precipitados obtenidos fueron filtrados, lavados en agua destilada y secados a 100 °C durante 2 h, para después ser calcinados a una temperatura de 510 °C por 8 h con el fin de remover la plantilla y obtener las esferas de SiO₂ mesoporoso (EDSM).

7.12 Modificación del soporte con grupos amino

Para la modificación química del SiO₂ sintetizado, se mezclaron 50 ml de tolueno con 1.5 ml de APTES (3-aminopropil) trietoxisilano y 0.5 g del soporte (EDSM). La suspensión se agitó a 60°C durante 20 h, seguidamente la muestra fue lavada una vez con tolueno y dos veces con acetona, la muestra final se secó a vacío a 60 °C por 24 h para obtener el soporte modificado con grupos aminos (EDSM-A)

7.13 Caracterización del soporte

La caracterización del soporte sintetizado (EDSM) y el aminado (EDSM-A) se realizó por medio de diferentes técnicas instrumentales para corroborar que el soporte sintetizado fuera SiO₂ y verificar la presencia de grupos amino en el soporte (EDSM-A). Las técnicas empleadas se describen a continuación:

7.13.1 Difracción de Rayos X (DRX):

La difracción de Rayos X se utilizó para determinar si el soporte sintetizado (SiO₂) correspondía con el patrón de difracción del SiO₂ puro. El equipo usado fue un Difractómetro de Rayos X marca Siemens y modelo D-500, la corrida de la muestra se realizó a temperatura

ambiente y presión constante, con un voltaje de 35 Kv y 25 mA en un tiempo de 30 minutos y a un ángulo de 5 a 90°.

7.13.2 Caracterización por Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier con Reflexión Atenuada (ATR-FTIR):

Se usó la técnica espectroscópica de infrarroja con el fin de observar las vibraciones de los enlaces de Si-O correspondiente al SiO₂, así como las vibraciones de los enlaces N-H debido a la funcionalización del soporte de SiO₂ con el APTE. Se utilizó un equipo marca Perkin Elmer modelo Spectrum One, en el que se realizaron 8 escaneos a temperatura ambiente, con un parámetro de onda de 650-4000 cm⁻¹.

7.13.3 Potencial ζ:

La carga superficial de los soportes obtenidos (EDSM y EDSM-A) fue determinado por el potencial ζ con el equipo Nano Zetasizer Malvern, para ello se realizó una solución de 10 ppm de SiO₂ en agua ultra pura y se llenó la cubeta hasta el nivel establecido por el equipo, la muestra fue medida a 25 °C. El número de corridas y la duración de la medición fue optimizado automáticamente por el software del equipo.

7.13.4 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

La morfología del soporte de SiO₂ y del soporte aminado se determinó por SEM. Esta caracterización se realizó en un Microscopio Electrónico de Barrido, para su análisis, ambas muestras fueron sometidas a ultravacío (10⁻⁵ Pa) en la cámara de observación, un voltaje de 3.0 kV y observadas a una magnificación de 1000x a 30000x aumentos. Para su observación las muestras fueron colocadas sobre una cinta adhesiva de carbono.

7.13.5 Fisorción de nitrógeno:

Para determinar el área superficial, volumen y la distribución de los poros presentes en los soportes obtenidos (EDSM y EDSM-A) se realizaron pruebas de fisorción de nitrógeno en un equipo marca Quantachome modelo Autosorb-1. Para su caracterización las muestras

fueron sometidas a una temperatura de desgasificación de 200 °C y a una temperatura de 510 °C para su calcinación.

7.14 Determinación de las condiciones óptimas para la inmovilización de lacasas en SiO₂

Para determinar las condiciones óptimas de la inmovilización de lacasas de *T. hirsuta* Bm2 en EDSM-A así como la influencia de las variables independientes: Actividad enzimática y el tiempo de inmovilización con glutaraldehído, se estableció un diseño central compuesto rotatable 2² (DCC) con 4 puntos centrales (**Anexo 4**). Como variable de respuesta (variable dependiente) se consideraron la actividad de lacasas y el porcentaje de actividad retenida.

Para la inmovilización de la enzima se colocaron 100 mg del soporte aminado (EDSM-A) en una solución de 10 mL de buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7) con una concentración final de glutaraldehído del 12% (v/v), la suspensión fue agitada lentamente a temperatura ambiente por 6 horas, para después lavarlo utilizando agua destilada. Los soportes resultantes fueron esferas de SiO₂ mesoporosas modificadas con grupos amino y activadas con glutaraldehído (EDSM-AG). Este soporte fue usado para la inmovilización de la enzima, para lo cual 100 mg de EDSM-AG fueron suspendidos en 15 ml de una solución específica de actividad enzimática (**Anexo 4**) de acuerdo al punto en que se estuviera trabajando en el CCD. El soporte (EDSM-AG) y la enzima se agitaron lentamente a temperatura ambiente durante el tiempo establecido en el CCD. Posteriormente, las esferas de dióxido de silicio modificado con grupos amino y con lacasas inmovilizadas (EDSM-AGI) fueron separadas y luego lavadas con buffer de fosfatos 0.1M (pH 7). El procedimiento de lavado se realizó 3 veces. Finalmente, las esferas inmovilizadas y los lavados fueron utilizados para medir la actividad enzimática de lacasas.

7.15 Cinética del tratamiento de vinazas diluidas por lacasas libres e inmovilizadas en SiO₂

El tratamiento se llevó a cabo en matraces de 250 ml que contenían 5 ml de una solución de vinaza al 25, 50, 70 y 90 %, a los cuales se les agregó 0.210 ml de extracto crudo con una actividad de 3187.963 U/ml para obtener una actividad total de 670 U/5 ml de reacción, para

la enzima inmovilizada se empleó 100 mg, en peso seco, del sistema lacasa-soporte equivalentes a 670U. Como control para el extracto crudo y la enzima inmovilizada se emplearon 0.210 ml de agua destilada y 100 mg del soporte de SiO₂-NH₂ sin enzima, respectivamente. Los matraces fueron incubados a 40°C a 150 rpm durante 96 horas. Al finalizar el tratamiento se determinó el porcentaje de fenoles y la cantidad de color removido.

8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Tratamiento de una vinaza en placa con la enzima libre

En estudios previos se determinó la capacidad de hongos de la podredumbre blanca para remover tintes sintéticos donde fue seleccionado el hongo *Trametes hirsuta* Bm2 por su mayor eficiencia en la decoloración (Tapia-Tussell, 2011). Asimismo, se evaluó la capacidad del hongo en un efluente sintético con mezcla de fenoles y un efluente real (vinaza) se logró remover fenoles y reducir el color (Tapia-Tussell, *et al*, 2015; Calderón-Martínez, 2017), esta acción fue atribuida a eventos de adsorción de fenoles a la pared del hongo y a las lacasas excretadas durante el cultivo. Asimismo, se ha establecido que las lacasas producidas por el hongo *Trametes hirsuta* Bm2 se inhiben por altas concentraciones de fenoles (Zapata-Castillo, 2012). Con base a lo anterior se evaluó la capacidad de extractos crudos de lacasas para oxidar diferentes concentraciones de vinazas (5, 10, 15, 20, 25 y 50 % v/v) en placa.

En la Figura 14 se observa la presencia de halos de oxidación debido a la acción enzimática de las lacasas de *T. hirsuta* Bm2 sobre los compuestos fenólicos presentes en todas las soluciones de vinazas empleadas. También se pueden observar diferencias en el tamaño de los halos, los cuales disminuyen su tamaño a medida que aumenta la concentración de las vinazas. Este hecho indica que las enzimas presentes en el extracto son inhibidas por el aumento en la concentración de compuestos fenólicos presentes en las vinazas. Sin embargo, es importante señalar que aún a la concentración del 50 % de vinazas las lacasas generan halos de oxidación, demostrando el potencial de estas en la degradación de fenoles presentes en soluciones de vinazas altamente concentradas.

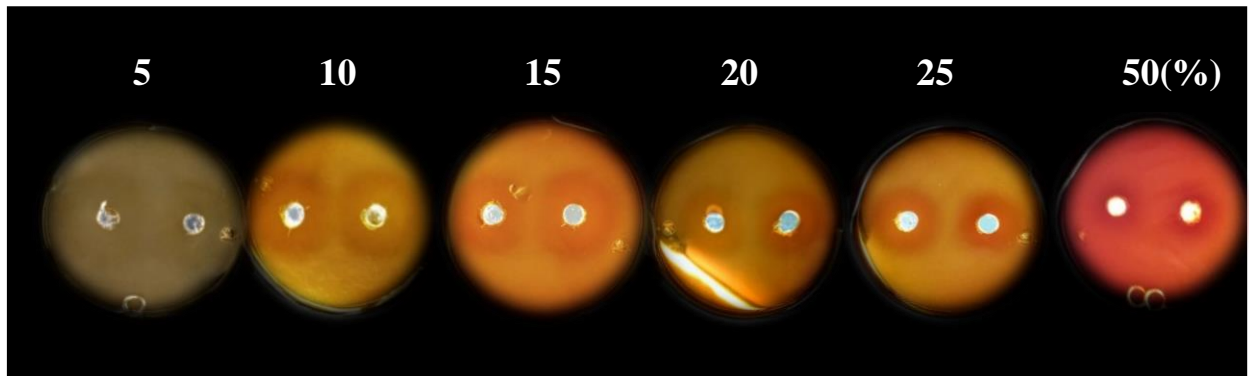


Figura 14.- Halos de oxidación en medios con vinazas diluidas al ser tratadas con lacasas libres de *T. hirsuta* Bm-2 a 40°C y pH 4.5

8.2 Inmovilización de lacasas de *T. hirsuta* Bm2 en alginato de calcio

La inmovilización de enzimas en esferas de alginato de calcio ha sido empleada para diferentes propósitos, que van desde la síntesis de medicamentos y corrección de diversas enfermedades genéticas hasta la biorremediación del agua, aire y suelos contaminados mediante la eliminación de contaminantes recalcitrantes (Dwevedi, 2016). Una enzima inmovilizada proporciona múltiples ventajas, entre las que destaca la fácil separación del producto, reutilización, aumento de estabilidad a condiciones extremas como los valores de pH, temperatura y de sustancias inhibitorias (Datta *et al.*, 2013). Es importante señalar que para el tratamiento de vinazas que contienen mezclas heterogéneas de compuestos, es deseable el uso de sistemas multienzimáticos inespecíficos como las lacasas, por lo que podría ser conveniente inmovilizar el extracto crudo y no las enzimas individuales.

El alginato de calcio es un soporte inocuo y fácil de manejar, sin embargo, un serio inconveniente es la fragilidad de las esferas que pueden dañarse y liberar la enzima inmovilizada. Una alternativa es el uso del glutaraldehído como agente entrecruzante que proporciona mayor estabilidad al sistema inmovilizado. En este trabajo se evaluaron algunos

parámetros para establecer la mejor condición de inmovilización de lacasas en alginato de calcio entrecruzadas con glutaraldehído empleando un diseño factorial 2^3 . Los factores: actividad enzimática (U/ml), concentración del glutaraldehído (% p/v) y tiempo de inmovilización (h), fueron evaluadas a partir de las variables de respuesta (actividad de lacasas y porcentaje de actividad retenida). Con los valores obtenidos se realizó un análisis estadístico para elegir el mejor tratamiento para utilizarlo posteriormente en el tratamiento de una vinaza. El diseño factorial permitió obtener perlas de tamaño homogéneo de aproximadamente 3 mm de diámetro (Figura 15), resultados semejantes fueron obtenidos por Daâssi *et al.*, (2014), al utilizar las mismas concentraciones de alginato de calcio y CaCl_2 empleadas en este trabajo, 2% (p/v) en ambos casos. Calderón-Martínez, 2017 señaló que las esferas de alginato de calcio de 3 mm con el micelio inmovilizado de *T. hirsuta* fueron las más eficientes para remover el 60% de una mezcla de los fenoles. Por su parte Varga *et al.*, (2019) obtuvo esferas de alginato de calcio con un diámetro de 3mm que le permitieron obtener una eficiencia del 96% inmovilizando lacasas comerciales de *T. versicolor*.



Figura 15.- Esferas de Alginato de calcio con lacasas de *T. hirsuta* Bm2 entrecruzadas con glutaraldehído

En cuanto a la actividad de las lacasas retenida después de la inmovilización en alginato de calcio entrecruzadas con glutaraldehído, se observó la presencia de dos grupos de resultados, uno constituido por los tratamientos 1, 2, 5 y 6 (Verdes) y el segundo grupo constituido por los tratamientos 3, 4, 7 y 8 (Azules) (Figura 16). En el primer grupo se utilizó una menor actividad enzimática para inmovilizar que en el segundo grupo, 1593.5 U/ml y 2,390.25 U/ml respectivamente, sin embargo, se retuvo una mayor cantidad de actividad en el primer grupo, estos resultados sugieren que el factor de concentración de lacasas influye de manera significativa para obtener una mejor respuesta durante la inmovilización

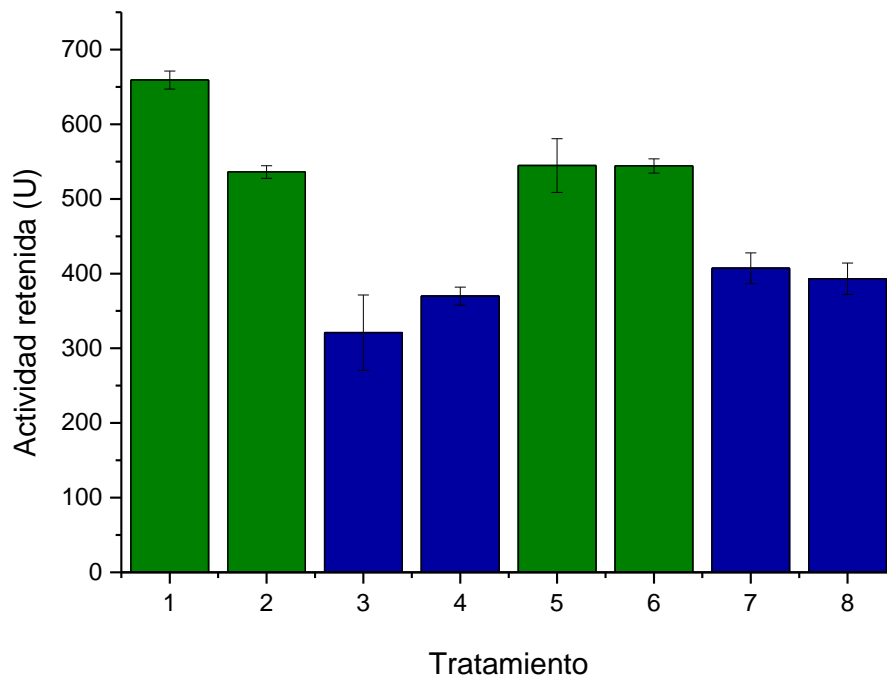


Figura 16.- Actividad de lacasas en esferas de alginato de calcio al aplicar el diseño factorial 2^3

La Figura 17 muestra que la actividad de lacasas retenida en las esferas fue entre 15 y 20%, lo que indica que las condiciones químicas generadas durante la inmovilización por el uso del glutaraldehído afectaron drásticamente la actividad de lacasas reduciendo hasta 80% la actividad. El empleo de sustancias entrecruzantes durante la inmovilización ha demostrado

la posibilidad de evitar el desprendimiento de las enzimas de la matriz (Cao, 2005; S. Kumar *et al.*, 2017; Minter y Moehlenbrock, 2017; Noreen *et al.*, 2016). Sin embargo, también se ha observado que la adición del glutaraldehído puede ocasionar efectos negativos, por ejemplo: Dwevedi, (2016) señaló que los métodos de inmovilización de unión covalente a matrices conduce a cambios drásticos en las propiedades conformacionales y catalíticas de la enzima. Las condiciones de inmovilización pueden tener efectos drásticos en la enzima debido a la presencia de grupos aminos similares en el sitio activo que participan durante la interacción de la enzima con el agente entrecruzante y la matriz y/o enzima.

Roy y Abraham, (2006) notaron un descenso del 23 % de la actividad de las lacasas de *Trametes versicolor* durante la formación de CLEC (cross-linked enzymes crystals). Los autores sugirieron que la inactivación de las enzimas fue provocada por el alto nivel de enlaces covalentes al azar y por la rigidez de las moléculas de enzimas después del entrecruzamiento con el glutaraldehído, lo cual impide los cambios conformacionales adecuados del sitio activo y ocasionan que el sustrato no interactúe con el sitio catalítico. Wang *et al.*, (2008) observaron que al aumentar la concentración de glutaraldehído hasta un 0.9 % durante la inmovilización de una lacasa comercial en alginato/ mezcla gelatina con PEG el porcentaje de decoloración disminuyó, este resultado fue atribuido a la inactivación parcial de la lacasa por el uso del glutaraldehído durante el entrecruzamiento.

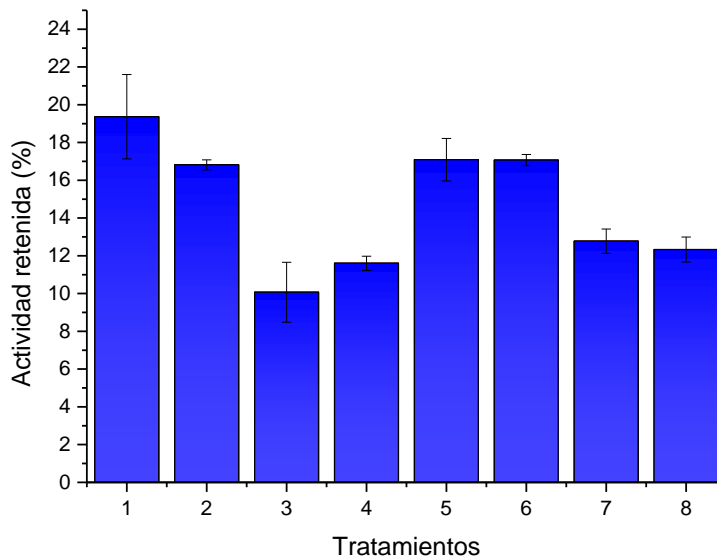


Figura 17.- Actividad retenida de lacasas en esferas de-alginato de calcio.

En la Figura 17 podemos observar que los tratamientos realizados arrojaron porcentajes de actividad retenida diferentes, lo que sugiere que al menos uno de los factores empleados ocasiona un efecto significativo en la variable de respuesta. Para conocer cuál de los factores representa algún efecto positivo o negativo en la variable de respuesta y confirmar la observación propuesta en la primera variable de respuesta (la disminución de la concentración de lacasas es un factor que tiene un efecto significativo sobre la actividad de lacasas inmovilizadas) se obtuvo la gráfica de Pareto estandarizada y la gráfica de efectos principales, respectivamente, utilizando el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI.II.

En la Figura 18 se describe el diagrama de Pareto estandarizado para la variable de respuesta correspondiente al porcentaje de actividad enzimática retenida, cuyas variables: actividad enzimática y la interacción de la concentración de enzima y el tiempo de inmovilización mostraron efectos significativos.

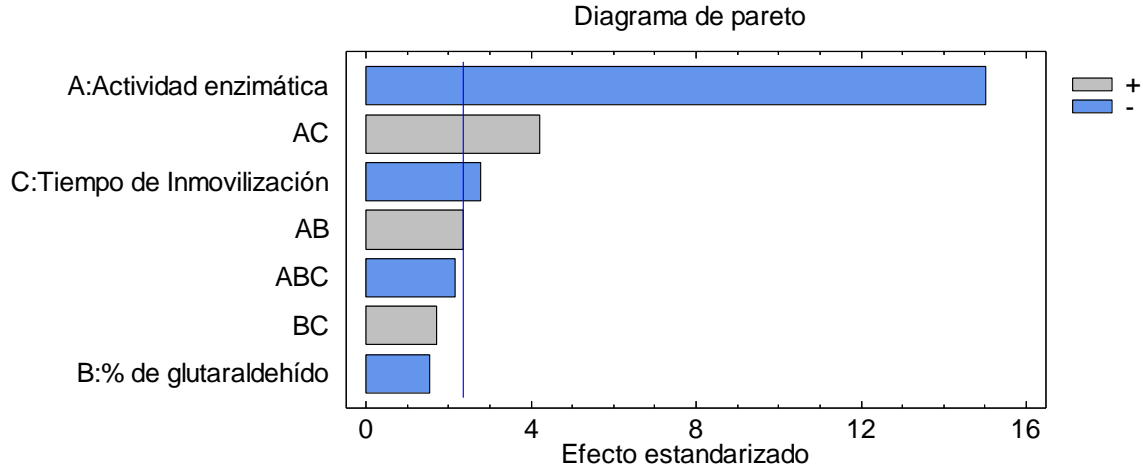


Figura 18.- Diagrama de Pareto estandarizado en donde se observan los efectos de los factores: cantidad de enzima, tiempo de activación y el porcentaje de glutaraldehído, así como sus interacciones sobre porcentaje de actividad retenida de las lacasas inmovilizadas.

De igual forma el diagrama nos permite observar que la concentración de enzimas ejerce efecto negativo sobre la variable de respuesta, es decir, a medida que aumenta la actividad enzimática empleada, el porcentaje de actividad retenida disminuye, a diferencia de la interacción de las variables actividad enzimática y tiempo de activación, los cuales ejercen un efecto positivo. Para observar mejor estos efectos se decidió realizar un diagrama de efectos principales para las variables estudiadas.

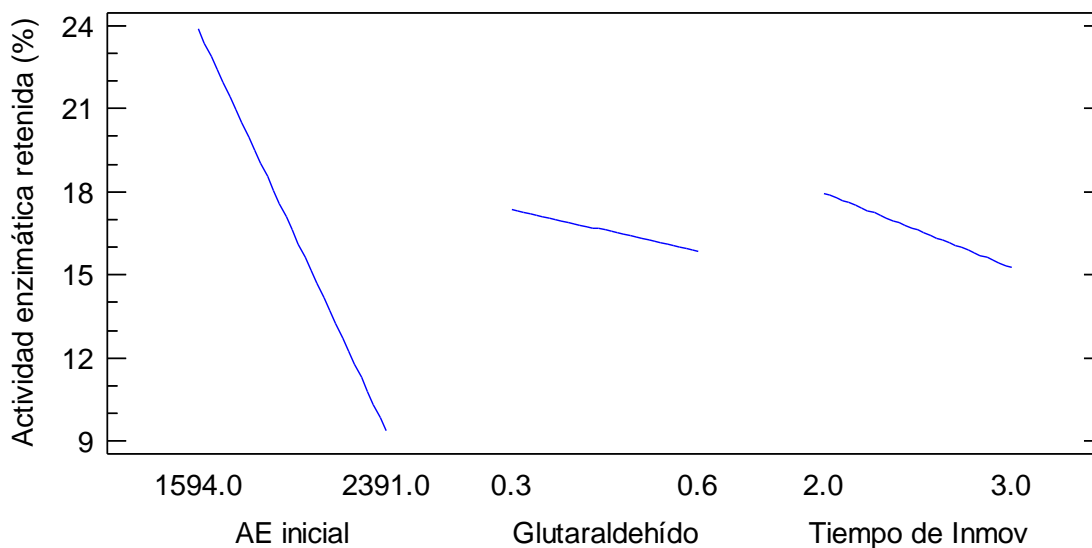


Figura 19.- Efectos principales de los factores: cantidad de enzima, porcentaje de glutaraldehído y tiempo de activación

El diagrama de efectos principales (Figura 19) nos muestra de una manera más clara como influyen individualmente las variables independientes empleadas sobre el porcentaje de actividad retenida. Se puede observar que al aumentar el porcentaje de glutaraldehído y el tiempo de inmovilización la variable de respuesta disminuye, para ambas variables independientes podemos observar que presentan una pendiente muy pequeña por lo que no son significativas, este hecho coincide con el diagrama de Pareto en la que ninguna es significativa. Por el contrario, para la concentración de enzimas podemos asumir por el tamaño de su pendiente que es la única variable que proporciona respuestas significativas, de igual forma se observa que mientras la concentración de enzima disminuye el porcentaje de actividad retenida aumenta, esto revela una relación inversamente proporcional con la variable de respuesta. El hecho que disminuyera la actividad de las esferas al aumentar la concentración de lacasas podría ser debido al uso de una concentración del 2 % (P/V) de alginato de sodio para formar las perlas, resultando en un tamaño de poro muy grande que pudo haber permitido la difusión de las enzimas encapsuladas a la solución de cloruro de calcio.

Este hecho coincide con Bilal y Asgher, (2015) que inmovilizaron diferentes concentraciones de MnP (0.2 – 0.7 mg/ml) en alginato de calcio para ser usadas en la decoloración y destoxificación de tintes. En este estudio se observó que a concentraciones superiores a 0.2 mg/ml de MnP la eficiencia de la inmovilización aumentó hasta una concentración de 0.5 mg/ml donde obtuvieron su máxima eficiencia, sin embargo, a concentraciones más altas la eficiencia disminuyó. Este resultado fue atribuido a que a bajas concentraciones las enzimas no logran saturar los sitios de unión al soporte y que concentraciones de enzima arriba del óptimo pueden ocurrir impedimentos estéricos ocasionando una disminución en la eficiencia de inmovilización

Daâssi *et al.*, (2014) por su parte utilizaron una relación de enzima-alginato de 1:4 - 1:10 y observaron que al disminuir la relación de enzima-alginato la eficiencia de inmovilización aumentaba. La disminución de la actividad provocada por el aumento de la relación enzima-alginato fue relacionada con el tamaño pequeño de las perlas donde la eficiencia de carga podría ser relativamente limitada ocasionando la disminución en el rendimiento de inmovilización.

Tomando en cuenta la finalidad del diseño factorial 2^3 para la inmovilización de lacasas entrecruzadas con glutaraldehído para su posterior empleo para el tratamiento de una vinaza, se determinó mediante el análisis estadístico ANOVA, con un nivel de confianza del 95%, si al menos uno de los tratamientos realizados era significativamente diferente.

Tabla 5.- ANOVA para la inmovilización de la enzima lacasa de *T. hirsuta* Bm2 en alginato de calcio

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Cantidad de la enzima	144.0	1	144.0	115.20	0.0000
B:% de Glutaraldehído	0.25	1	0.25	0.20	0.6666
C:Tiempo de Activación	0.25	1	0.25	0.20	0.6666
INTERACCIONES					
AB	4.0	1	4.0	3.20	0.1114
AC	9.0	1	9.0	7.20	0.0278
BC	0.25	1	0.25	0.20	0.6666
ABC	4.0	1	4.0	3.20	0.1114
RESIDUOS	10.0	8	1.25		
TOTAL (CORREGIDO)	171.75	15			

Como se puede observar en la Tabla 5 los tratamientos no fueron estadísticamente significativos, debido a que el valor de p de la interacción de los tres factores es mayor que al alfa establecido de 0.5%, sin embargo, es importante mencionar que los análisis estadísticos sirven como una herramienta para seleccionar el tratamiento que convenga. Si bien todos los tratamientos hechos arrojan valores menores al 20% de actividad retenida, el tratamiento uno es el que obtuvo un mayor porcentaje de actividad retenida, empleando una menor cantidad de enzima, una menor cantidad de glutaraldehído y una menor cantidad de tiempo de interacción de la enzima con el glutaraldehído, lo que ahorra tiempo y reactivos. Esas condiciones de inmovilización de lacasas fueron seleccionadas para llevar a cabo el tratamiento de una vinaza de melaza de caña de azúcar.

8.3 Cinética del tratamiento de una vinaza por lacasas libres e inmovilizadas en alginato de calcio

Se utilizó una vinaza diluida al 25%, para determinar la cinética de remoción de fenoles y decoloración de una vinaza por 5 días a 150 rpm y 40°C utilizando lacasas libres e inmovilizadas en las perlas de alginato. En la Figura 20 se observa una elevada remoción de fenoles por las lacasas libres que fueron capaces disminuir el 70% de la concentración de fenoles a las 72 hrs. A diferencia, las lacasas inmovilizadas removieron el 39.67% de fenoles a las 96 horas. Este resultado podría ser debido a problemas de difusión del efluente hacia el interior de las perlas, lo que ocasiona la disminución de la acción de las enzimas del interior de la esfera y que solo las enzimas inmovilizadas en la superficie hayan podido interactuar con los compuestos fenólicos. Sin embargo, es importante señalar que las esferas aun cuando solo retienen el 20% de la actividad lacasas lograron remover el 40% de fenoles. Este hecho sugiere que el alginato podría proporcionar un efecto protector en las enzimas limitando el efecto inhibitorio que ejercen los fenoles a las enzimas.

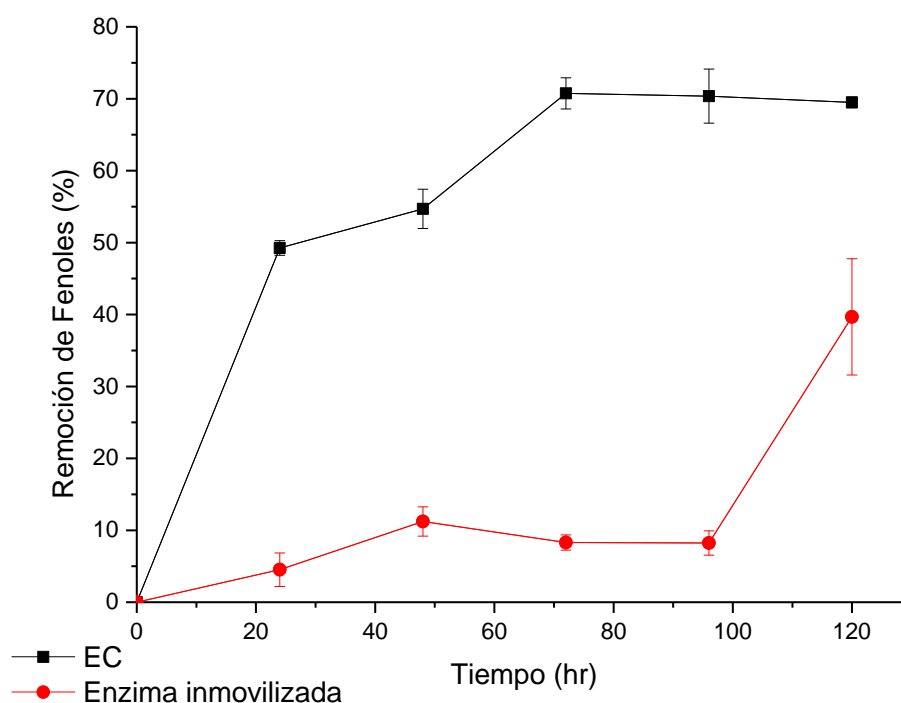


Figura 20.- Remoción de fenoles de una vinaza al 25% (p/v) por lacasas libres e inmovilizadas en alginato de calcio a 40°C y 150 rpm.

8.4 Efecto de la concentración de vinaza en la remoción de fenoles

Para este estudio se utilizaron concentraciones de vinazas del 25, 50, 70 y 90% durante 72 horas que fue el tiempo en que las enzimas libres removieron el mayor porcentaje de fenoles de una vinaza al 25%, para este experimento se establecieron las mismas condiciones utilizadas para tratar la vinaza al 25%.

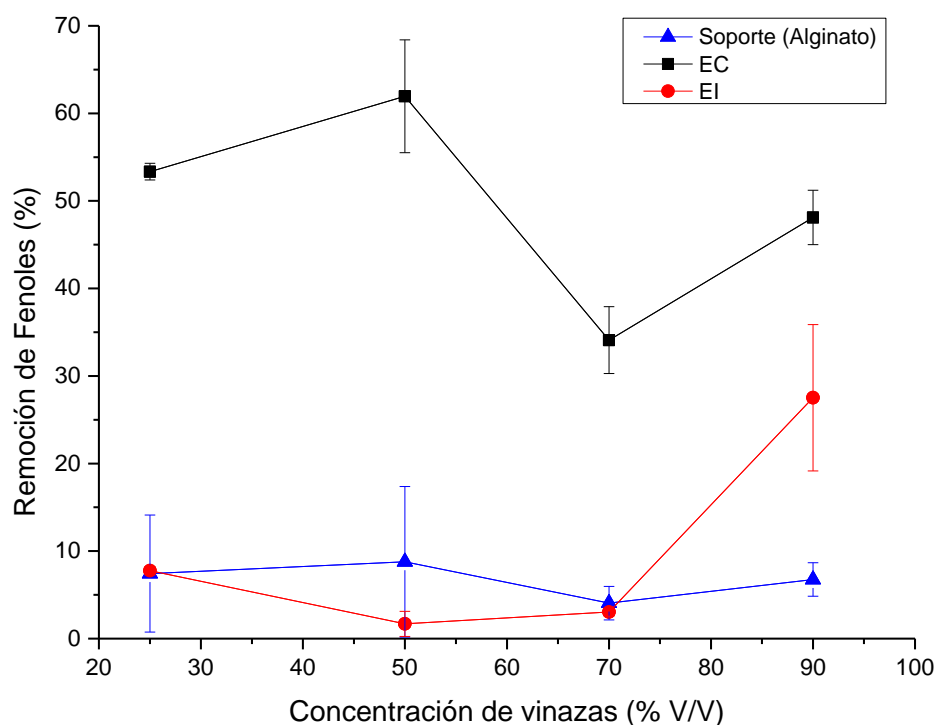


Figura 21.- Efecto de la concentración de vinaza en la remoción de fenoles por lacasas libres e inmovilizadas en alginato de calcio durante 72 horas a 40°C y 150 rpm

En la Figura 21 se puede observar que las enzimas libres lograron remover fenoles a diferentes concentraciones de vinazas. La máxima remoción ocurrió a las 72 h y fue de 63% cuando se usó una vinaza diluida al 50% y fue de llamar la atención que hubo una remoción del 43% de fenoles aun cuando se usó la vinaza al 90%. La eficiencia del uso del extracto crudo fue mayor que el obtenido en estudios previos durante el tratamiento de vinazas con *T.*

hirsuta donde se determinó que este hongo es capaz de remover fenoles de vinazas durante el tratamiento fúngico por adsorción de fenoles al micelio y por acción de las lacasas (Tapia-Tussell *et al.*, 2015). En dicho estudio se encontró que el hongo puede remover fenoles de una vinaza usando diluciones entre el 5 y 20%. La máxima decoloración se obtuvo con una vinaza al 10% donde disminuyó 80% la concentración de fenoles a las 48 horas, mientras que cuando empleó una vinaza al 20% (p/v) el porcentaje de remoción fue del 60% a las 192 horas. España-Gamboa, (2015) por su parte utilizó al hongo de *Trametes versicolor* para la remoción de una vinaza esterilizada y no esterilizada que contenía 1.122 ± 0.059 mg/ml de fenoles, equivalente a la concentración de fenoles presentes en una solución del 17% (V/V) de la vinaza utilizada en este estudio, y obtuvieron un 67 ± 19 % y 64 ± 0.21 % de remoción de fenoles en condiciones estériles y no estériles respectivamente al sexto día.

Además, se puede observar que en el tratamiento de las vinazas diluidas al 25, 50 y 70 % con las enzimas inmovilizadas los porcentajes de remoción de compuestos fenólicos fueron inferiores al 10 %. Este resultado fue similar al obtenido cuando se emplearon las perlas de alginato de calcio sin enzima inmovilizada, indicando que la disminución en la concentración de fenoles fue debida a la adsorción. También se observó que durante el tratamiento de la vinaza al 90 % se logró remover el 30 % de los fenoles. No es clara la respuesta a este resultado, pero podría ser atribuido a la heterogeneidad tanto del efluente como del sistema. Sin embargo, es un resultado interesante considerando que la suma total de la actividad presente en cada perla corresponde solamente al 20 % de la actividad que presenta el volumen de enzima libre.

El color en las vinazas ha sido relacionado con la presencia de melanoidinas que son tóxicas y también ocasionan serios problemas al medio ambiente, por lo cual es importante la disminución o eliminación de los efluentes. En la Figura 22 se observa que en los tratamientos con enzimas libres e inmovilizadas no hubo disminución significativa del color, inclusive, se puede observar un pequeño aumento en el color medido por absorbancia a 475 nm con respecto al control. Este resultado podría indicar que las lacasas de *T. hirsuta* Bm2 podrían no tener la habilidad para actuar sobre las melanoidinas presentes en las vinazas que son en gran parte responsables del color. Por otro lado, el aumento en la coloración podría deberse a cambios conformacionales que hubieran ocurrido en las melanoidinas durante el

tratamiento enzimático. Estos resultados coinciden con los obtenidos por España-Gamboa, (2015) quienes llevaron a cabo el tratamiento de una vinaza al 10% (P/V) con *A. versicolor* y *T. versicolor*. Los resultados mostraron que la remoción de los compuestos fenólicos no está relacionada con la pérdida de color, ya que, aunque la eficiencia de remoción de fenoles fue alta, el color se incrementó con respecto al tiempo.

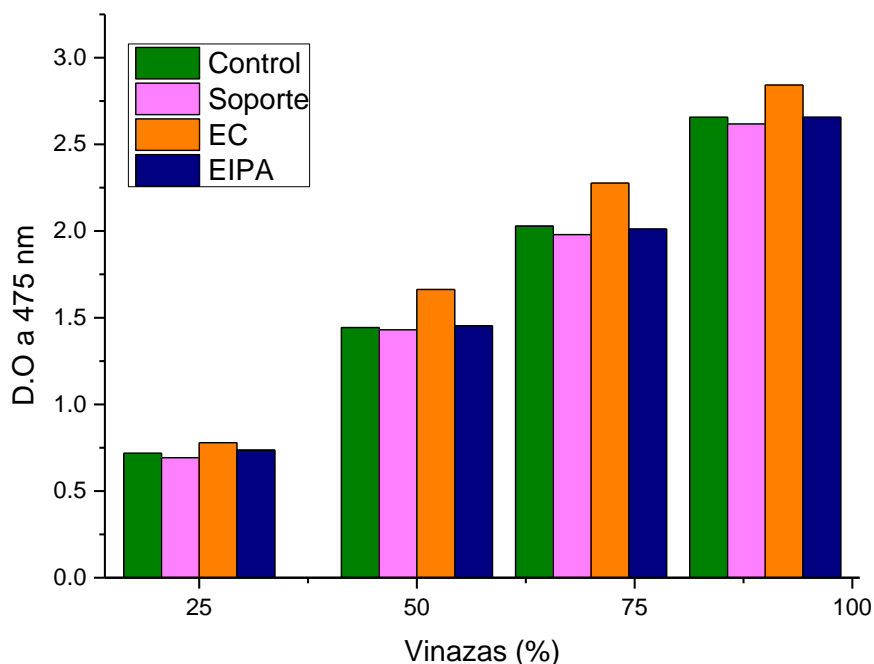


Figura 22.- Absorbancia a 475 nm (medición de color) en vinazas diluidas al 25, 50, 70 y 90 % tratadas con las lacasas libres e inmovilizadas y perlas de alginato sin enzima durante 72 horas a 40 °C y 150 rpm; EC (extracto crudo) y EIPA (enzimas inmovilizadas en alginato de calcio)

8.5 Obtención y caracterización del soporte SiO₂ para la inmovilización de lacasas

Para la inmovilización de lacasas de *T. hirsuta* Bm-2 en el soporte mesoporoso de SiO₂, se requirió llevar a cabo la síntesis del soporte, su funcionalización con grupos amino y la caracterización del mismo para determinar sus propiedades estructurales y funcionales. El

SiO₂ es un material que puede presentar toxicidad, dependiendo de la estructura cristalina que presente, algunos de los estudios indican que el SiO₂ amorfo es inerte, mientras que el SiO₂ cristalino es tóxico. Johnston *et al.*, (2000) concluyeron en su estudio que la inhalación crónica del SiO₂ amorfo no provoca el desarrollo de efectos mutagénicos en los pulmones de las ratas y no es biopersistente por su baja solubilidad en agua. A diferencia, la inhalación de SiO₂ cristalino provoca citotoxicidad, cambios mutagénicos, eventos genotóxicos secundarios y presenta una gran biopersistencia.

8.6 Difracción de Rayos X

Para conocer el grado de cristalinidad del SiO₂ sintetizado en este trabajo (EDSM), se analizó mediante la técnica de difracción de rayos X (DRX). El difractograma de rayos X obtenido (Figura 23) muestra coincidencia en sus señales con los picos característicos del patrón de difracción de SiO₂ puro de cristobalita (AMCSD 0010753), también se puede observar un ensanchamiento del pico en el ángulo $2\theta = 21.48^\circ$, el cual es característico del SiO₂ amorfo (Ji *et al.*, 2006). El pico ensanchado a 21.48° y el ruido observado en el difractograma permitieron corroborar que el soporte sintetizado (EDSM) es SiO₂ con una estructura amorfa, debido a que durante su síntesis no se alcanzó a la temperatura de cristalización. Este resultado es relevante ya que nos permite el empleo del SiO₂ para la inmovilización de lacasas y su posterior aplicación para el tratamiento verde de una vinaza de caña de azúcar.

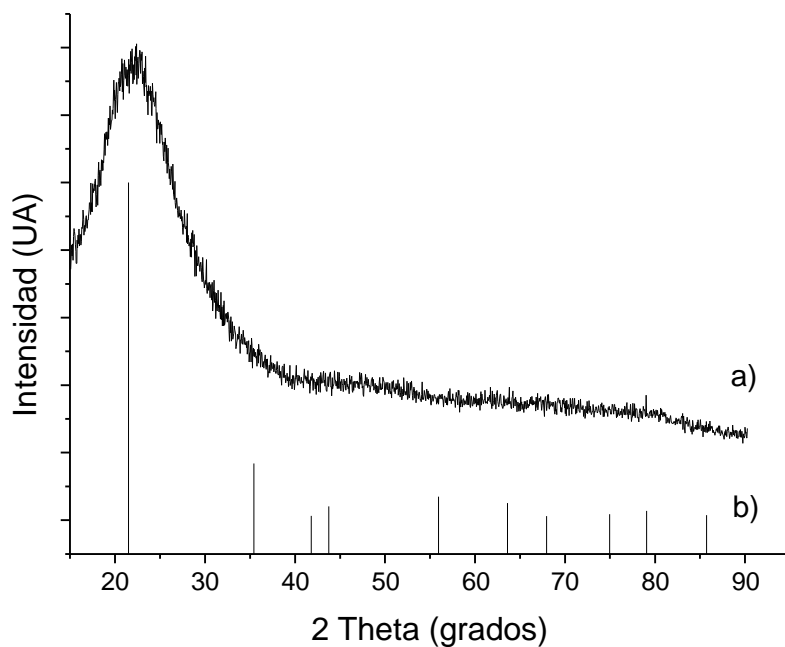


Figura 23.- Difracción de rayos X de muestras de SiO₂. a) SiO₂ sintetizado; b) patrón de difracción de cristobalita Amscd 0010753

8.7 Caracterización por Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier con Reflexión Atenuada (ATR-FTIR).

La funcionalización del soporte es una de las etapas más importantes durante el proceso de inmovilización covalente de enzimas. Una buena funcionalización del soporte nos permite la formación de un mayor número de enlaces covalentes y por lo tanto un mayor porcentaje de inmovilización. Para conocer si el soporte sintetizado EDSM se funcionalizó de manera correcta se caracterizó mediante ATR-FTIR, el cual nos permite observar los estiramientos y flexiones de los grupos presentes en la superficie de SiO₂.

En la Figura 24 se pueden observar los espectros de FTIR para las muestras de EDSM y EDSM-A. Todas las identificaciones químicas fueron hechas de acuerdo a la literatura (Wang y Zeng, 2011; Wang *et al.*, 2018). En los espectros se pueden observar picos a 1084 cm⁻¹ y 800 cm⁻¹ los cuales son atribuidos a las vibraciones de estiramientos simétricos y asimétricos de los enlaces Si-O-Si, respectivamente. De igual forma se puede observar un pico de absorción localizado a 965 cm⁻¹ el cual puede ser asignado a las vibraciones de estiramiento de Si-O en los enlaces del grupo Silanol (Si-OH), la deficiencia de este pico en el espectro

EDSM-A puede indicar que los hidrógenos del grupo silanol fueron desplazados durante la unión covalente del APTES con el soporte inmovilizado, indicando que se llevó a cabo la funcionalización con grupos aminos en el soporte, sin embargo, no se pudieron observar los picos de adsorción a 3300 cm^{-1} y 1647 cm^{-1} correspondientes a vibraciones de estiramiento y flexión de los enlaces N-H.

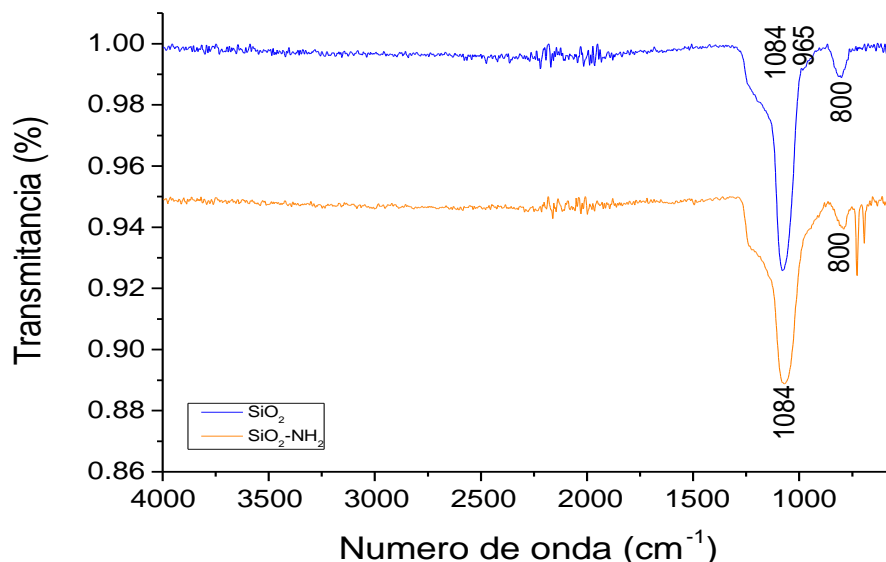


Figura 24.- Espectro de FTIR del SiO₂ sintetizado (SiO₂) y después de su funcionalización con grupos aminos (SiO₂-NH₂)

Debido a la ausencia de los picos característicos de estiramiento y flexión de los enlaces N-H en el FTIR y con el fin de elucidar la presencia de los grupos aminos en la superficie del soporte EDSM se utilizaron las técnicas analíticas de potencial ζ

8.8 Potencial ζ

El potencial ζ es una propiedad de los materiales que mide el potencial electrocinético que existe entre la capa de Stern y la capa difusa, la relación entre potencial ζ y potencial superficial depende del nivel de iones en la solución, en agua la gran doble capa hace que el potencial ζ sea una buena aproximación del potencial superficial, lo que hace posible determinar la carga superficial de un coloide. La carga de un coloide puede estar asociada

con la disociación o ionización de los grupos presentes en la superficie del coloide (Kim y Lawler, 2005; Mayoral *et al.*, 2014). Debido a esto es posible establecer por medio del cambio de los valores de potencial ζ si el soporte logro funcionalizarse con los grupos aminos.

Tabla 6.- Potencial ζ para los soportes de SiO₂ antes y después de la funcionalización con APTES.

Muestra	T (°C)	Potencial Z
SiO ₂	25	-39.7 mV
SiO ₂ -Aminado	25	15 mV

En la Tabla 6 pueden observarse los valores de potencial ζ obtenidos de los soportes EDSM y EDSM-A a 25°C y disueltas en agua ultra pura a pH 7.4. La carga negativa (-39.7 mV) del SiO₂ es atribuida a la desprotonación de los grupos silanol presentes en la capa superficial del soporte, este resultado es similar con lo reportado por Kim *et al.*, (2005), quien sintetizó nano partículas de dióxido de silicio y obtuvo un potencial ζ de (-38.5 mV) a las mismas condiciones que nuestra muestra tratada. Por otra parte, el cambio de carga obtenida en el soporte EDSM-A (15 mV) es atribuido a la protonación generada por la interacción de los grupos amino en el medio acuoso. Resultados similares fueron obtenidos por (Costa-Puerani *et al.*, 2018) al funcionalizar nanoparticulas de SiO₂ con dos diferentes aminas (APTMS y AEAEAPTMS), los autores concluyen que la funcionalización con ambos grupos aminos disminuye el carácter ácido del soporte lo que ocasiona un cambio en la polaridad de la carga.

8.9 Fisisorción de nitrógeno

En estudios recientes se ha demostrado la importancia del área superficial, la distribución del tamaño y el volumen de los poros en los soportes empleados para la inmovilización de enzimas. Los soportes microporosos como la cristobalita tienen un tamaño menor a 2 nm por lo que su tamaño impide la inmovilización de macromoléculas como las enzimas, los mesoporosos tienen un tamaño similar al de la enzima por lo cual han demostrado una mayor

eficiencia en la inmovilización, por otro lado, los soportes con macroporos tienen poros muy grandes que ocasionan impedimentos estéricos evitando una buena inmovilización. Es por ello que el conocimiento del área superficial y el tamaño y volumen de los poros son características fundamentales en los soportes empleados para la inmovilización. Para conocer la porosidad de las esferas de SiO₂ antes y después de su funcionalización se empleó el método de Fisorción de nitrógeno, BET y BHJ.

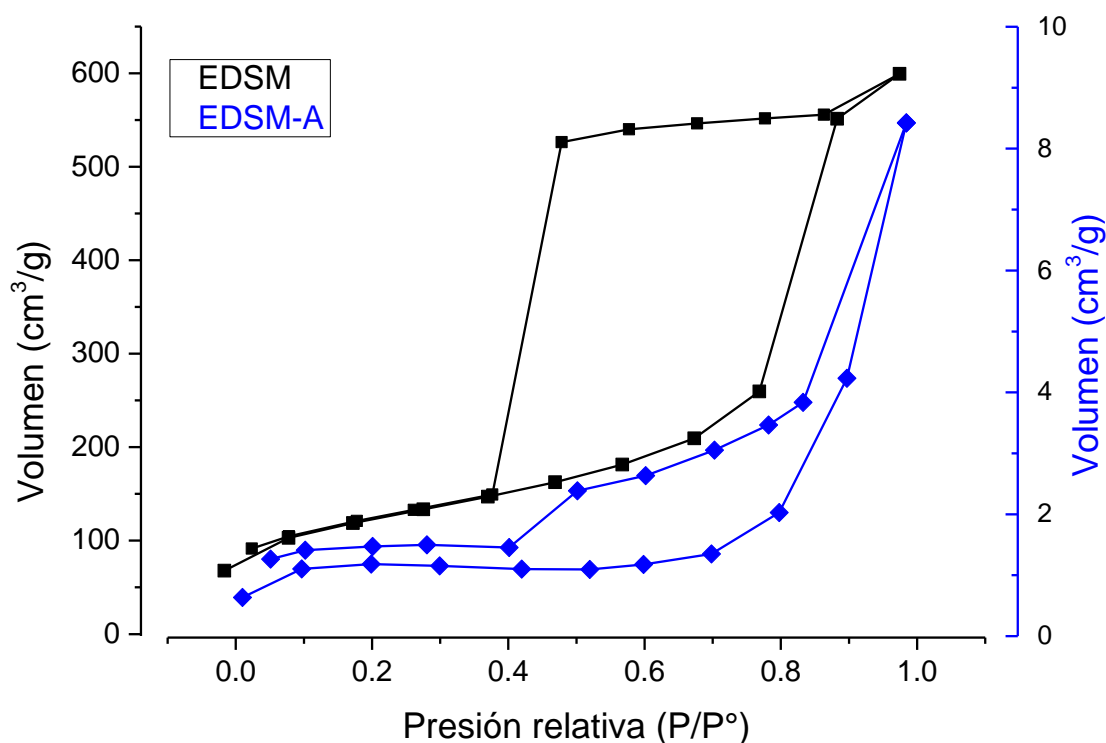


Figura 24.- Isotermas de adsorción y desorción de nitrógeno de las EDSM y EDSM-A

En la Figura 25 se muestran las isotermas de adsorción y desorción de nitrógeno para los soportes EDSM y EDSM-A. Ambas muestras presentan una isoterma de tipo IV con un lazo de histéresis tipo H2 para las EDSM, propios de materiales con poros en forma de tintero, y una histéresis tipo H3 para las EDSM-A, los cuales son característicos de materiales con una distribución de poros en forma de rendija (Rodríguez-Reynoso, 2010), que de acuerdo a la

clasificación de la IUPAC son típicos de materiales mesoporosos, estos resultados son consistentes con lo reportado por Fang *et al.*, (2011) y Zhu *et al.*, (2007).

La distribución del tamaño de poro para ambos materiales se realizó por el método propuesto por Barret *et al.* en 1951, obteniendo una distribución de tamaño de poro de 3.43 nm para las EDSM y de 9.86 nm para las EDSM-A. Del análisis BET se obtuvo un área superficial de 418.5 m²/g para las EDSM y de 4.5162 m²/g; con un volumen de poro de 0.8528 cm³/g para las EDSM y 0.0130 cm³/g para las EDSM-A. Estos resultados muestran los efectos de la funcionalización sobre el soporte EDSM con grupos aminos, desde los cambios morfológicos del soporte, deducido del cambio en el tipo de histéresis, hasta la disminución del volumen adsorbido de nitrógeno y el aumento en la distribución del tamaño de partículas del soporte EDSM-A, lo que puede deberse a la oclusión de algunos poros durante la funcionalización con el APTES, resultados similares fueron obtenidos por Zhu *et al.*, (2007) y Yang *et al.*, (2016).

8.10 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La importancia en la morfología y el tamaño de partícula está relacionada con el control y la reducción del proceso, así como la reutilización de los catalizadores. En un sistema heterogéneo es primordial que el sistema enzima-soporte tengan un tamaño mayor que los sustratos o productos con el fin de facilitar la separación de los catalizadores (Cao, 2005).

En la figura 26 se pueden observar la morfología y tamaño de las partículas sintetizadas antes (a) y después de su funcionalización (b), se puede observar que para ambos materiales la forma de las partículas son esferas con diámetro entre 1.82-3.71 μm y de 2.02-4.35 μm, respectivamente, resultados similares fueron obtenidos por Alvarado-Ramírez (2015) y Zhu *et al.*, (2007).

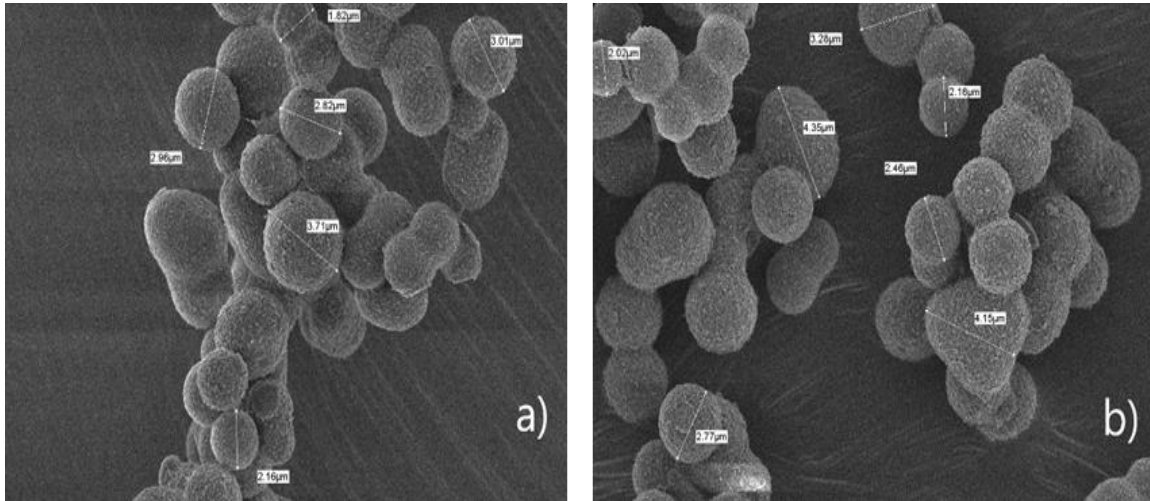


Figura 26.- Imágenes SEM de la morfología y tamaño del soporte antes y después de su funcionalización. a) SiO₂; b) SiO₂-NH₂

8.11 Inmovilización de lacasas en SiO₂

Para la inmovilización de lacasas en SiO₂ se desarrolló un diseño central compuesto con 4 puntos centrales y dos puntos axiales, donde la variable de respuesta fue la actividad enzimática retenida. Los resultados obtenidos fueron analizados por la metodología de superficie de respuesta (MSR) y ajustados a un modelo de segundo orden usando el programa estadístico Design Expert 11.

La ecuación del modelo cuadrático que se ajusta a la curva de superficie de respuesta obtenida está dada por:

$$\text{Actividad enzimática} = 558.49 + 103.12x - 1.10y - 54.51xy - 146.46x^2 - 161.21y^2$$

Ecuación 1

Donde:

X = Actividad enzimática U/ml

Y= Tiempo de inmovilización

La Tabla 7 muestra el diseño experimental empleado, así como los valores de actividad enzimática obtenidos en cada una de las corridas realizadas.

Tabla 7.- Diseño central compuesto para la inmovilización covalente de lacasas en SiO₂ funcionalizado con grupos amino

Corrida	Actividad de lacasas (U/mL)	Tiempo de inmovilización (h)	Actividad Enzimática retenida (U/100 mg de soporte)
1	700	4	660.25
2	700	1	322.75
3	400	6	281.29
4	400	2	242.81
5	1000	2	642.46
6	250	4	47.08
7	1150	4	209.59
8	700	7	276.91
9	700	4	542.26
10	700	4	551.21
11	1000	6	376.05
12	700	4	559.95

Para conocer cuál de los factores empleados producen una curvatura y un efecto significativo en la variable de respuesta se realizó un análisis de varianza. El ANOVA (Tabla 8) de los resultados del diseño experimental muestra que la actividad de lacasa, así como, las interacciones de los factores y el modelo predicho por el MSR son estadísticamente significativos, de igual forma los factores cuadráticos muestran ser significativos por lo que ambos propician la curvatura en la variable de respuesta.

Tabla 8.- ANOVA para la inmovilización de la lacasas del extracto crudo en EDSM-A

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrados medios	Valor-F	Valor-P
Modelo	394768.77	5	78953.75	50.71	0.00008*
A-Actividad de lacasa	90381.60	1	90381.60	58.05	0.00027*
B-Tiempo de inmovilización	10.30	1	10.30	0.01	0.93783
AB	11883.21	1	11883.21	7.63	0.03274*
AA ²	167510.44	1	167510.44	107.58	0.00005*
B ²	197508.50	1	197508.50	126.85	0.00003*
Residuales	9342.29	6	1557.05		
Falta de ajuste	2908.59	3	969.53	0.45	0.73439
Error	6433.70	3	2144.57		
Total	404111.06	11			

$R^2 = 0.9769$; % C.V = 11.64; $\alpha = 0.05$; gl = grados de libertad

*Significativo

En la Figura 26 se muestra el gráfico de superficie de respuesta y el gráfico de contorno obtenido del análisis del DCC, en ellos se puede observar el comportamiento de la variable de respuesta frente a los factores: actividad de lacasas y tiempo de inmovilización. En los gráficos se puede observar que la actividad enzimática máxima retenida después de la inmovilización se obtuvo en los puntos centrales del diseño experimental; es decir, a un tiempo de 4 horas y una actividad enzimática de 700 U/ml. Debido a que el punto máximo se presenta ligeramente desplazado hacia la izquierda de los puntos centrales y considerando que el modelo ajustado es estadísticamente significativo se procedió a optimizar la actividad enzimática retenida. La optimización de la variable de respuesta se realizó maximizando la función de “deseabilidad” con el programa Desing Expert 11. Para validar si los puntos sugeridos por el programa eran los óptimos se realizó por triplicado la inmovilización de las lacasas utilizando los puntos 807 U/ml y 4 h, la respuesta obtenida al emplear estos puntos fue de 670 U/100 mg de soporte siendo superior a las 578 U/ 100 mg de soporte obtenidas con los puntos centrales, de esta forma se confirmó que las condiciones propuestas por el

programa son las óptimas. A partir de estos resultados, las inmobilizaciones posteriores se realizaron utilizando una concentración de lacasas de 807 U/ml y un tiempo de 4 horas.

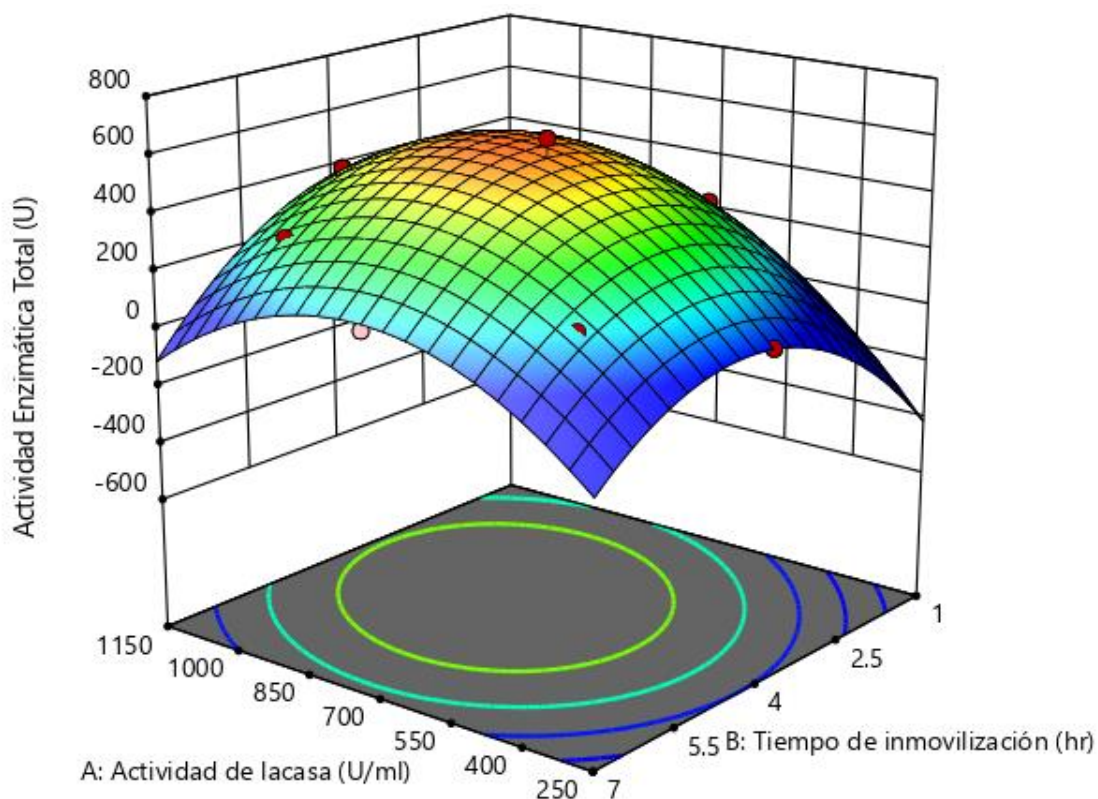


Figura 25.- Superficie de respuesta para la inmovilización de lacasas

Un análisis más detallado de la superficie de respuesta nos permite observar, que sucede cuando los valores de las variables empleadas aumentan, en este caso se puede observar que al ir aumentando el tiempo de inmovilización y la actividad de lacasa inicial hasta el punto central la variable de respuesta aumenta, sin embargo, si estos factores aumentan más allá del punto central, la actividad enzimática retenida disminuye. Efectos similares fueron observados por Yang *et al.* (2016) durante la inmovilización de lacasas comerciales en SiO₂ mesoporoso modificado con grupos aminos, este autor concluyó que a tiempos cortos el número de reacciones covalentes que se llevan a cabo entre el aldehído y la amina son muy pocas, por lo que al ir aumentando el tiempo las reacciones covalentes fueron creciendo hasta un punto en que los grupos aminos de las lacasas se saturaran, logrando una mayor cantidad

de actividad retenida, sin embargo, al incrementar más el tiempo de inmovilización las lacasas sufrieron cambios conformacionales e incluso su posible desnaturalización por la sobresaturación de la enzima con grupos aldehídos. En cuanto a los efectos de la concentración enzimática concluye que la actividad enzimática aumenta hasta el punto en que se saturan los grupos carbonilos presentes en la superficie del soporte, por otro lado, cuando la concentración supera el punto de saturación las lacasas empiezan a sobreponerse ocasionando cambios conformacionales en las enzimas y problemas de difusión del sustrato para alcanzar el sitio activo de las enzimas, disminuyendo la actividad enzimática retenida.

La metodología de superficie de respuesta también nos permitió obtener un sistema lacasa-soporte con alta actividad (670 U/100 mg de soporte) pero un bajo porcentaje de actividad retenida (5.2 %), para caracterizar mejor este sistema se añadieron dos criterios de evaluación al punto óptimo: el rendimiento y la eficiencia de inmovilización.

El rendimiento de inmovilización (Ecuación 2) fue definido como el porcentaje de la actividad teórica que se inmovilizó en el soporte sintetizado y la eficiencia de inmovilización (Ecuación 3) como el porcentaje de la relación entre la actividad retenida en el sistema inmovilizado y la actividad teórica retenida:

$$\text{Rendimiento de la inmovilización} = \frac{A_i - A_l}{A_i} \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

$$\text{Eficiencia de la inmovilización} = \frac{A_r}{A_i - A_l} \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

A_i = Actividad de lacasas antes de la inmovilización

A_l = Actividad de lacasas presente en los lavados

A_r = Actividad de lacasas retenida en el sistema inmovilizado

Al aplicar la ecuación (2) y (3) se encontró que el rendimiento de la inmovilización fue de 54.39 % y la eficiencia del 10.18 %, esto demuestra que el soporte sintetizado permitió inmovilizar un alto porcentaje de la actividad inicial de lacasas, sin embargo, solo la décima parte de esta actividad es observada en el sistema lacasa-SiO₂, ambos valores suelen estar influenciado por las características químicas y físicas del soporte.

En muchos estudios se ha establecido que la cantidad máxima de enzima que puede formar una monocapa en un m² de soporte es de 2 mg, es decir se puede inmovilizar hasta 2 mg de enzima por m² de soporte, si bien esta cantidad puede variar de enzima a enzima, esta relación es válida para muchas enzimas (Cao, 2005). La cantidad de proteína empleada en este trabajo fue de 0.048 mg, por lo que la superficie necesaria para inmovilizarla completamente es de 0.024 m²/g de soporte una cantidad muy inferior a los 4.5162 m²/g de soporte que nos proporciona nuestras partículas, sin embargo el rendimiento de inmovilización alcanzado fue de 54.39 %, esto sugiere que aunque las partículas obtenidas tienen una alta superficie la mayor parte es inaccesible para la enzima, esto se puede deber en gran medida a que el tamaño promedio de poro del soporte (9.86 nm) puede ser muy cercano al tamaño de la lacasa (65 kDa) lo cual limita la entrada de la enzima a los poros. Li *et al.*, (2017); Ispas *et al.* (2009) y Wang y Caruso (2005) mencionan que los materiales con tamaño de poro entre 2-8 nm, solo pueden ser utilizados para la inmovilización de enzimas con un tamaño relativamente pequeño, por ejemplo: citocromo *c* (13,000 Da), lisosima (13,930 Da) y a-quimiotripsina (21,600 Da), ya que limitan la entrada de enzimas con alto peso molecular como alcohol deshidrogenasa (42 kDa), glucosa oxidasa (160 kDa), y catalasa (42 kDa) las cuales tienen un tamaño alrededor de 10 nm. Wang y Caruso (2005) emplearon cinco soportes con diferente tamaño de poro, BMS (10-40); NS (sin poros); MS-12(2); MS-16 (2.3) y SBA-15 (6.8), para la inmovilización de cinco enzimas con diferente peso molecular (12-250 kDa), para cada una de las enzimas se observó que al emplear el soporte BMS se pudo inmovilizar 15,10 y 5 veces más enzimas que en los soportes NS, MS y BSA-15, respectivamente, y que la cantidad de enzima inmovilizada disminuye a medida que el peso molecular de la enzima aumenta, la alta cantidad de enzima inmovilizada por BMS (397-75 mg/g de soporte) fue atribuida al gran tamaño de sus poros en comparación al tamaño de los otros materiales. Por otra parte, Li *et al.*, (2017), compararon dos materiales para la inmovilización de catalasa y observaron que el soporte MMSM-5IPA@PDA con un diámetro de poro de 10.9 nm permitió

una alta actividad enzimática en comparación a la obtenida con MMSM-1IPA@PDA con un diámetro de poro de 6.6 nm, estos resultados sugirieron que un tamaño de poro grande es muy importante para la carga enzimática, mientras que un poro pequeño restringe el acceso de las biomoléculas y disminuye el rendimiento de la inmovilización.

Por otra parte, la eficiencia de inmovilización obtenida fue del 10.18 %, este resultado puede ser atribuido a la química de reacción de la inmovilización y de las características físicas del soporte. Por ejemplo, se ha visto que altas concentraciones de glutaraldehído en relación con la cantidad de enzimas conduce a reacciones intermoleculares que producen cambios de conformación y aglomeración intermolecular, en ambos casos la pérdida de actividad es inevitable, efectos similares ocurren por la densidad de unión en los soportes y a los enlaces multipunto enzima-soporte, se ha observado que las uniones covalentes de enzimas a soportes generalmente se da con la interacción del grupo aldehído de la superficie del carrier con el grupo ϵ -amino de la lisina, el grupo guanidino de la arginina, el grupo imidazol de la histidina, el grupo fenol de la tirosina, el grupo sulfhidril de la cisteína, los grupos amino terminales de la glutamina y asparagina, el grupo indol del triptófano, con la prolina, fenilalanina, serina y glicina (Bowes *et al.*, 1966; Cheung y Nimni, 1982; Habeeb y Hiramoto, 1968; Hopwood, 1972; Migneault *et al.*, 2004). Considerando que las lacasas presentan en su sitio activo residuos de histidina, es posible que las reacciones entre el soporte y las enzimas se hayan llevado en el sitio activo causando su desactivación, sin embargo, se han realizado muchos estudios sobre la inmovilización de lacasas comerciales en dióxido de silicio mesoporoso utilizando glutaraldehído como agente de entrecruzamiento en los cuales no se observaron cambios drásticos en la actividad de las enzimas inmovilizadas, por ejemplo; Zhu *et al.* en el 2007 empleó 0.6 mg/ml de lacasas, 1.25% de glutaraldehído y un tiempo de una hora de inmovilización obteniendo 0.271 U/mg de soporte y un 56.9 % de actividad retenida; Alvarado-Ramírez en el 2015 empleó una concentración de 0.46 mg /ml de enzima, 12% de glutaraldehído y un tiempo de 12 h de inmovilización y obtuvo un porcentaje de actividad retenida de 56.94% y una actividad de 52.86 U/100 mg de soporte, esto indica que la reacción entre el glutaraldehído y las lacasas no se llevaron a cabo en los sitios activos y que las concentraciones entre 1.25 – 12% de glutaraldehído aunque puedan generar cambios conformacionales y reacciones intra e intermoleculares. Estos efectos no parecen afectar drásticamente la actividad de la enzima inmovilizada, por lo que la baja

eficiencia obtenida se atribuye a los problemas de difusión generados por la forma de tintero y el tamaño relativamente pequeño de los poros presentes en nuestro soporte. Los resultados obtenidos coinciden con los estudios realizados por otros investigadores sobre el efecto que tiene el tamaño de poro en relación con la cantidad de actividad enzimática que se expresa, por ejemplo, González-Delgado *et al.*, en el 2018 empleó diferentes soportes con diferente tamaño de poro, LP-SBA-15 (12.8 nm); ULP-SBA-15 (20.6 nm); LP-FDU-12 (13 nm) y Sipernat 50S (20-600 nm) para la inmovilización covalente de β -galactosidasa y obtuvo una mayor producción de oligosacáridos con ULP-SBA-15 aun cuando la carga enzimática fue menor a todos los demás. Ante este hecho, los autores sugirieron que la carga enzimática no es el único parámetro que puede afectar la eficiencia de la inmovilización, sino que también depende de otros factores como el tamaño y la forma de poro. Por ejemplo: los autores sugieren que los rendimientos más bajos obtenidos por los soportes SBA-15 y LP-FDU-12 están relacionados por la presencia de diámetros de poro demasiado pequeños o poros con entradas pequeñas a pesar de la presencia de grandes cavidades dentro de estos, por lo que este último provocaría una restricción de difusión de cuello de botella y en algunos casos produciría el taponamiento de los poros inhabilitando las enzimas del interior del poro. En cuanto a los otros materiales ULP-SBA-15, LP-SBA-15 y Sipernat, concluyen que la alta producción de galacto-oligosacaridos obtenida por estos materiales es debido a la presencia de poros suficientemente grandes para que el sustrato pueda acceder libremente hasta las enzimas inmovilizadas en el interior del poro. Por otro lado, Yan y Jin estudiaron el impacto del tamaño de poro en las partículas de SBA-15 sobre la actividad de la lipasa pancreática porcina (LPP) con una dimensión de (4.6 x 2.6 x 1.1 nm³) y demostraron que con un tamaño de poro menor a 9.4 ocurrían restricciones significantes de difusión, pero al emplear diámetros de poros mayores a 10.9 nm las restricciones de difusión disminuían (Gholamzadeh *et al.*,2017)

8.12 Cinética del tratamiento de una vinaza por lacasas libres e inmovilizadas en SiO₂

En este estudio se evaluó la capacidad de las lacasas libres e inmovilizadas para el tratamiento de vinazas con una concentración de 25, 50, 70 y 90% (V/V) con un contenido de fenoles totales de 0.81, 1.51, 2.1 y 2.70 mg equivalentes de ácido gálico/ mL, respectivamente.

En la figura 28 se presentan las cinéticas de remoción de fenoles para las diferentes soluciones de vinazas tratadas por las lacasas libres, lacasas inmovilizadas en SiO₂. En todas las soluciones tratadas se puede observar que el máximo porcentaje de remoción de fenoles se alcanzó a las 72 horas. Por otro lado, se observa que el porcentaje máximo de remoción obtenido por la lacasa libre en vinazas al 25, 50, 70 y 90 % fue de 61.75, 56.34, 46.32 y 33 %, respectivamente en contraste con el sistema lacasa-SiO₂ que alcanzó un mayor porcentaje de remoción, 69.97; 63.24; 57.59 y 51.86%. Estos resultados pueden ser debido a efectos de adsorción por parte del soporte debido a su alta área superficial y su volumen de poro. Efectos similares fueron observados por Wu *et al.*, (2019) durante la degradación del 2,4-diclorofenol por enzimas activas e inactivas inmovilizadas en Fe₃O₄-NH₂@MIL-101, obteniendo un porcentaje de remoción del 67% con la enzima activa y del 58% de remoción con la enzima inactivada, lo que indica que solo el 9% de remoción fue debido a la acción de la lacasa. Por su parte Chen *et al.*, (2018) observó que el 16% de remoción de 2,4-diclorofenol fue debido al soporte Fe₃O₄-m(PDA/DAS) cuyo efecto fue atribuido a la su alta área superficial específica y a la morfología nanoporosa del material. En la figura 28 se observa que el porcentaje de remoción para la enzima libre disminuye considerablemente a medida que la concentración de vinazas aumenta, en comparación con la enzima inmovilizada cuyo porcentaje de inmovilización se ve ligeramente disminuida, esto puede ser atribuido a la mayor estabilidad de la enzima inmovilizada por las uniones multipunto al soporte, lo que permite que los sitios activos se mantengan con las misma forma conformacional aun a altas concentraciones de fenoles en comparación a la enzima libre que muestra efectos de inhibición (Bayramoglu y Arica, 2009; Chen *et al.*, 2018). Efectos similares fueron observados por Liu *et al.*, (2020) cuando emplearon enzimas libres e inmovilizadas para el tratamiento de p-clorofenol, las enzimas libres fueron fuertemente inhibidas a medida que las

concentraciones aumentaban, en contraste con las enzimas inmovilizadas que permanecieron estables hasta concentraciones de 10 mg/ml de p-clorofenol.

Por otro lado, se observa que a partir de las 72 horas tanto la enzima libre como la enzima inmovilizada disminuyen su actividad, lo cual podría atribuirse a la presencia de radicales en el medio de reacción que conducen a desnaturalización enzimática o inhibición por producto, en el caso de la enzima inmovilizada puede ser debido a la acumulación del producto en los poros del soporte limitando los procesos de difusión e inhibiendo los procesos catalíticos (Gholamzadeh *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2020)

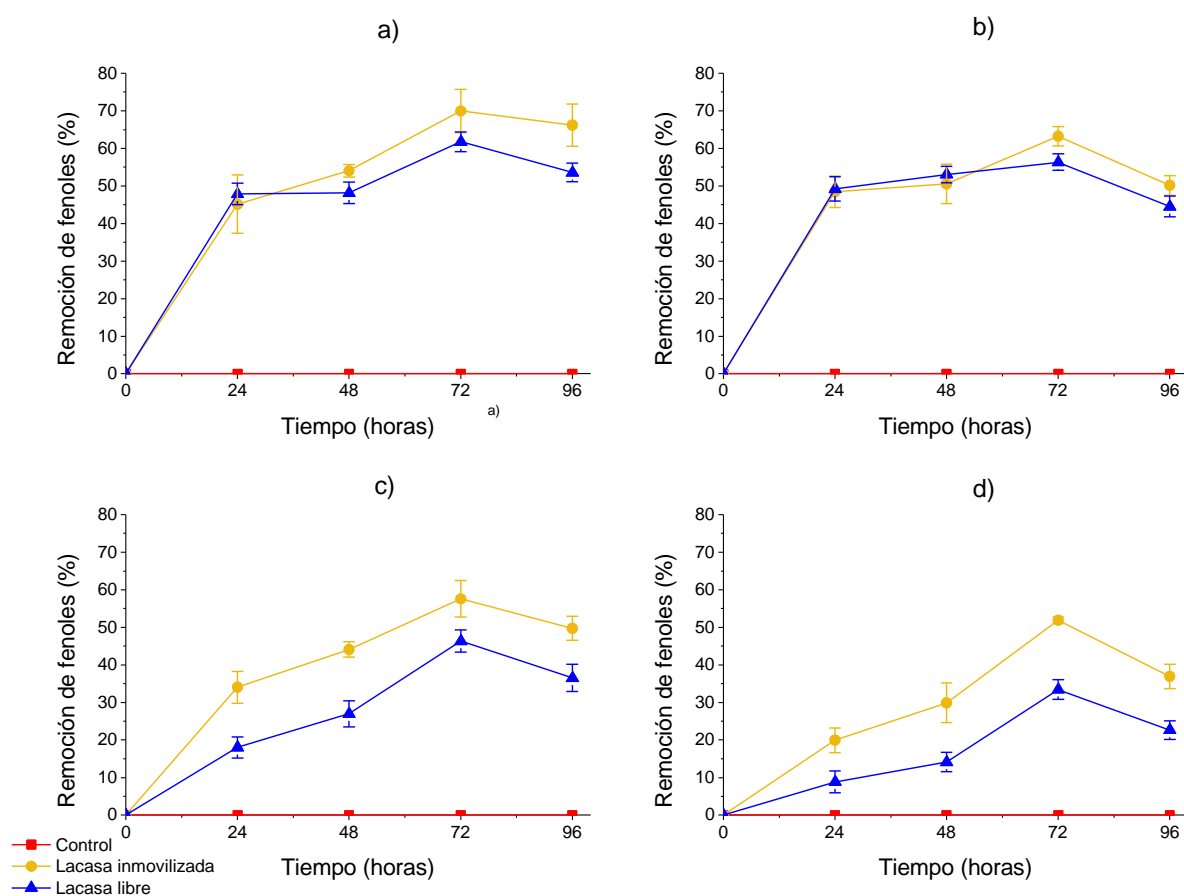


Figura 28.- Cinéticas de la remoción de fenoles de una vinaza diluida, a) 25%; b) 50%; c) 70%; d) 90% , tratadas con lacasa libre (▲), lacasa inmovilizada en SiO₂ (●), y control, vinaza no tratada (■), a 40 °C y 150 rpm.

Uno de los principales problemas en las vinazas de caña de azúcar es su alta coloración debido a la alta concentración de melanoidinas, la presencia de estos compuestos en los efluentes ha adquirido una mayor importancia debido a los daños que puede provocar al medio ambiente, por lo que es necesario buscar alternativas económicas para disminuir su concentración.

En este estudio se evaluó la capacidad de las enzimas libres e inmovilizadas para la remoción de color en diferentes soluciones de vinazas (25,50,70 y 90 %). En la Figura 29 se presentan las cinéticas de remoción obtenidas tras 96 horas de tratamiento con los tres sistemas diferentes, en ellos se observa que la enzima libre fue incapaz de remover el color, en contraste Georgiou *et al.*, (2016); Singh *et al.*, (2015); Toomsan *et al.*, (2020) han demostrado que las lacasas comerciales de *T. versicolor*, flavourstar de *Myceliophthora* y las lacasas no comerciales de *Megasporoporia* son capaces de remover un 80-50 % del color de una vinaza al 5 %, y un 24-20 % de remoción en vinazas al 20 %, sin embargo, no dieron ninguna razón por la cual la remoción de color disminuye a altas concentraciones. Los resultados obtenidos en este trabajo permiten descartar una posible inhibición de las lacasas por las altas concentraciones de melanoidinas, ya que incluso a altas concentraciones de vinazas logran remover un alto contenido de fenoles No es claro porqué a bajas concentraciones de vinazas hay una menor remoción de fenoles, aunque es posible que a concentraciones menores al 20% la cantidad de fenoles sea baja para formar el complejo enzima-fenol, pero al ir incrementando la concentración de vinaza aumenta la concentración de fenoles lo suficiente para formar este complejo. Los resultados sugieren también que las lacasas de *T. hirsuta* Bm2 tienen afinidad por los fenoles, pero no por las melanoidinas. Por otro lado, se puede apreciar un alto porcentaje de remoción de color del 47-36 % cuando se empleó la enzima inmovilizada, esto puede ser debido al volumen de poro y área superficial del soporte, lo cual permite la adsorción del color. De igual forma no se aprecia ningún incremento de color en el control.

En la Figura 30 puede apreciarse de forma visual el grado de decoloración logrado en las vinazas después de 72 horas de tratamiento con los diferentes sistemas.

Los resultados obtenidos de las cinéticas de remoción de fenoles y de color demuestra que el hongo de *T. hirsuta* Bm2 produce lacasas capaces de degradar los compuestos fenólicos

presentes en vinazas altamente concentradas, por otra parte, las lacasas de *Trametes hirsuta* Bm2 inmovilizada en SiO₂ ha demostrado ser un sistema más eficiente para la remoción de fenoles y de color que en su forma libre, así como de las enzimas y hongos empleados en algunos estudios reportados hasta ahora, por ejemplo: Georgiou *et al.*, (2016) logró un 18 % de decoloración de una vinaza al 20 % empleando una lacasa inmovilizada en vidrio y un 24 % de remoción de color empleando una lacasa comercial libre, Singh *et al.*, (2015) obtuvo un máximo de remoción de color del 50 % empleando una lacasa inmovilizada en alúmina en comparación con la enzima libre que removió el 28 % del color de una vinaza diluida al 5%, de igual forma se ha investigado la capacidad de los hongos para el tratamiento de vinazas, España-Gamboa *et al.*, (2017) logró remover tras 6 días de tratamiento el 67±19% del contenido de fenoles de una vinaza con una concentración de 1.122 mg/ml de fenoles, sin embargo, obtuvieron resultados negativos de decoloración. Ahmed *et al.*, (2018) empleó las cepas de *Pycnoporus* sp y *Trametes* sp, los cuales removieron tras 10 días de tratamiento el 78 % y el 86 % del contenido total de fenoles, respectivamente, en cuanto a la remoción de color logro un 51 % con *Pycnoporus* sp y un 40 % con *Trametes* sp., en ambos casos se empleó una vinaza al 10%. Tapia-Tussell *et al.*, (2015) evaluó la capacidad del hongo *Trametes hirsuta* Bm2 para el tratamiento de una vinaza al 20 % y observó que el mayor porcentaje de remoción de fenoles fue del 58.8 % y el porcentaje de decoloración del 35.5 % tras 192 horas de tratamiento.

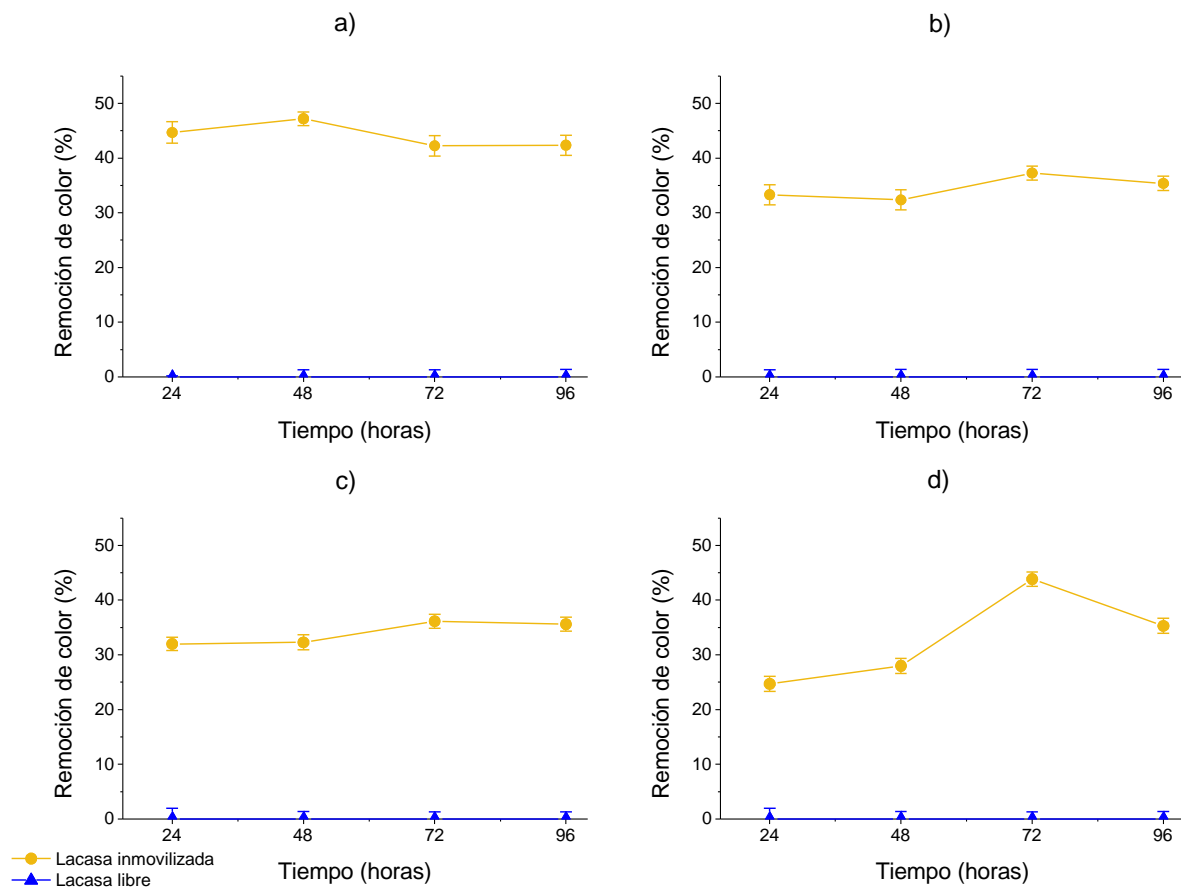


Figura 19.- Cinéticas de decoloración de una vinaza diluida, a) 25%; b) 50%; c) 70%; d) 90% , tratadas con lacasa libre, (▲), lacasa inmovilizada en SiO₂, (●) a 40 °C y 150 rpm.

En la Tabla 9 se muestra una comparación de los resultados obtenidos por los dos sistemas de inmovilización estudiados se evaluó la eficiencia de dos sistemas de lacasas inmovilizadas en el tratamiento de una vinaza de caña de azúcar.

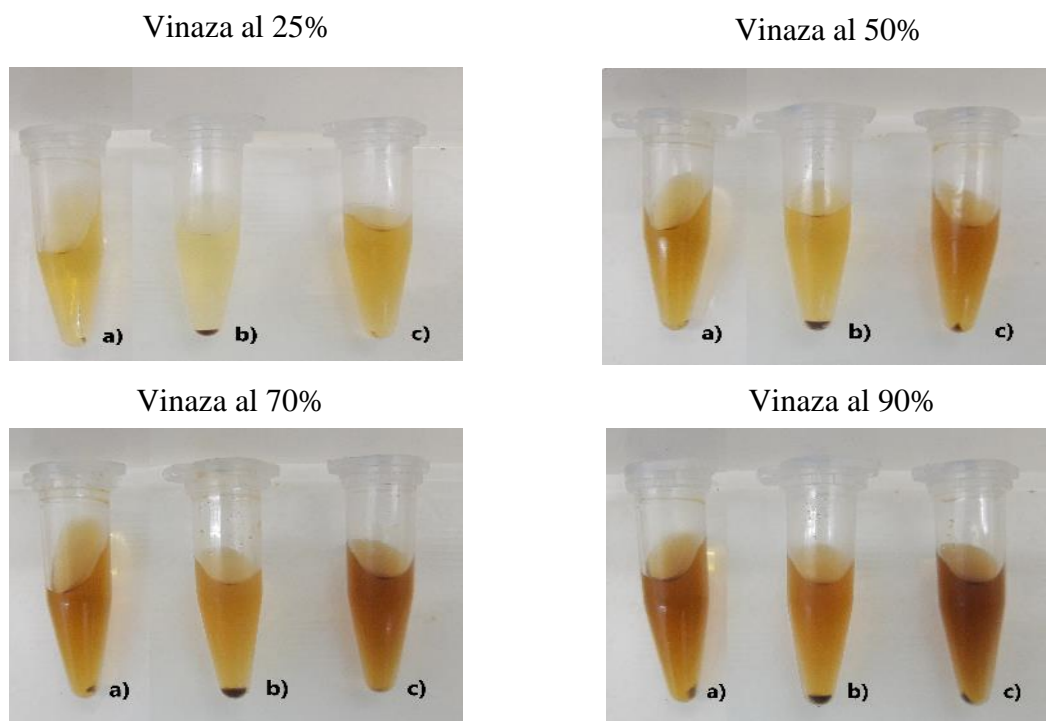


Figura 30. Decoloración de diferentes concentraciones de vinazas tras 72 h de tratamiento con diferentes sistemas de remoción a 40 °C y 150 rpm. a) control; b) lacasa inmovilizada SiO₂; c) Lacasa libre.

Tabla 9. Comparación de las lacasas libres e inmovilizadas en el tratamiento de una vinaza al 90%.

Sistema	Lacasa retenida (%)	Actividad de lacasa* (U)	Remoción de fenoles (%)	Decoloración (%)	Tiempo de tratamiento (h)
L- libre	-	670	33.43	0	72
L-alginato de Ca ²⁺	19.4 ± 3.57	670	27.52	0	96
L- SiO ₂	5.54 ± 0.482	670	51.8 ± 0.88	43.83 ± 1.32	72

*Actividad empleada para el tratamiento de una vinaza al 90%

En la Tabla 9 se observa que el método de inmovilización por atrapamiento en alginato de calcio y su posterior entrecruzamiento con glutaraldehído fue capaz de retener 3.5 veces más la actividad de la lacasa que la lograda con la inmovilización covalente en SiO₂, sin embargo, este último removió 1.88 veces más de la cantidad de fenoles y permitió un 46.83 % de decoloración de una vinaza al 90 %. Lo anterior podría ser atribuido a su alta área superficial,

volumen y diámetro de poro, que permiten una mejor difusión de la vinaza hacia el centro activo de la enzima inmovilizada y propicia efectos de adsorción que se ven reflejado en el porcentaje de remoción de fenoles y decoloración. Los resultados muestran que la inmovilización en SiO₂ es un mejor sistema que el de alginato de calcio y con un mayor potencial para el tratamiento de vinazas. También se observó que la enzima libre muestra un gran potencial para el tratamiento de vinazas, sin embargo, carece de un soporte para su posible reutilización, lo que le representa una desventaja en comparación con la enzima inmovilizada en SiO₂ que además resultó ser más estable a concentraciones altas de vinazas.

9 COCLUSIONES

El hongo de *Trametes hirsuta* Bm2 produce lacasas capaces de remover un 61 % de fenoles en vinazas al 25 % y un 33 % en vinazas al 90 %.

Se establecieron las mejores condiciones para la inmovilización del extracto enzimático de lacasas en alginato de calcio. El sistema lacasa-alginato de calcio fue capaz de remover el 27.52 % de fenoles en una vinaza al 9 %, sin embargo, no hubo decoloración.

Se optimizaron las condiciones para la inmovilización covalente de lacasas en SiO₂. El sistema lacasa-SiO₂ fue capaz de remover el 51.86 % y 47.83 %, de los fenoles y el color presente en una vinaza al 90 %, respectivamente. Estos resultados fueron mejores que los obtenidos con la lacasa libre en las mismas condiciones, debido a efectos de adsorción al soporte.

La enzima inmovilizada en SiO₂ demostró una mayor estabilidad que la lacasa libre durante el tratamiento de diferentes soluciones de vinazas, esto debido a la unión multipunto de la enzima al soporte.

El sistema lacasa-SiO₂ demostró un alto porcentaje de decoloración y degradación de fenoles durante el tratamiento de una vinaza al 90%, esto sugiere que el sistema desarrollado tiene un buen potencial para el tratamiento de vinazas de caña de azúcar, sin embargo, aún se requiere mejorar el diseño del soporte para obtener un mejor coeficiente de difusión y una mayor decoloración y degradación de fenoles basas en la acción de las lacasas.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, las perspectivas hacia el futuro se enfocan en el mejoramiento del tamaño y forma del poro con el fin de conseguir un mejor sistema lacasa-SiO₂. Otro punto de interés es evaluar la eficiencia de la inmovilización empleando la enzima purificada en lugar del extracto crudo, encontrar las mejores condiciones para el tratamiento de las vinazas, así como la evaluación de la actividad de la enzima inmovilizada tras los ciclos de reúso y de almacenamiento.

10 BIBLIOGRAFÍA

- Acharya, B. K., Mohana, S., & Madamwar, D. (2008). Anaerobic treatment of distillery spent wash – A study on upflow anaerobic fixed film bioreactor. *Bioresource Technology*, 99, 4621–4626. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.060>
- Ahmed, P. M., Pajot, H. F., De Figueroa, L. I. C., & Gusils, C. H. (2018). Sustainable bioremediation of sugarcane vinasse using autochthonous macrofungi. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(4), 5177–5185. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.08.007>
- Alvarado Ramírez, L. (2015). *Inmovilización de lacasa en esferas de SiO₂ para la degradación de rojo congo*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Amin, R., Khorshidi, A., Fallah, A., Rezaei, S., & Ali, M. (2018). Immobilization of laccase on modified Fe₃O₄@SiO₂@Kit-6 magnetite nanoparticles for enhanced delignification of olive pomace bio-waste. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.086>
- Ammann, E. M., Gasser, C. A., Hommes, G., & Corvini, P. F. (2013). Immobilization of defined laccase combinations for enhanced oxidation of phenolic contaminants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 1397–1406. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5055-y>

- Aparicio, J., & Sinisterra, J. V. (1993). Influence of the chemical and textural properties of the support in the immobilization of penicillin G-acylase from *Kluyvena citrophila* on inorganic supports. *Journal of Molecular Catalysis*, 80, 269–276.
- Arora, D. S., & Sharma, R. K. (2010). Ligninolytic Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1760–1788. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8676-y>
- Bayramoglu, Gülay, & Arica, M. Y. (2009). Immobilization of laccase onto poly (glycidylmethacrylate) brush grafted poly (hydroxyethylmethacrylate) films : Enzymatic oxidation of phenolic compounds. *Materials Science and Engineering C*, 29, 1990–1997. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.03.011>
- Bayramoglu, Gulay, Salih, B., Akbulut, A., & Arica, M. Y. (2019). Biodegradation of Cibacron Blue 3GA by insolubilized laccase and identification of enzymatic by product using MALDI-ToF-MS : Toxicity assessment studies by *Daphnia magna* and *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 170(December 2018), 453–460. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.014>
- Benitez, F., Real, F. J., Acero, J. L., Garcia, J., & Sanchez, M. (2003). Kinetics of the ozonation and aerobic biodegradation of wine vinasses in

- discontinuous and continuous processes. *Journal of Hazardous Materials*, *101*(2), 203–218. [https://doi.org/10.1016/S0304-3894\(03\)00175-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3894(03)00175-4)
- Bhushan, B., Pal, A., & Jain, V. (2015). Improved Enzyme Catalytic Characteristics upon Glutaraldehyde Cross-Linking of Alginate Entrapped Xylanase Isolated from *Aspergillus flavus* MTCC 9390. *Enzyme Research*, *2015*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/210784>
- Bilal, M., & Asgher, M. (2015). Dye decolorization and detoxification potential of Ca-alginate beads immobilized manganese peroxidase. *BMC Biotechnology*, *15*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0227-8>
- Bonnarme, P., & Jeffries, T. W. (1990). Mn(II) regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, *56*(1), 210–217.
- Bowes, J. H., Cater, C., & Leather, B. (1966). The reaction of glutaraldehyde with proteins and other biological materials. *Journal of the Royal Microscopical Society*, *85*(October 1965), 193–200.
- Burton, S. G. (2003). Laccases and phenol oxidases in organic synthesis – a review. *Current Organic Chemistry*, *7*, 1317–1331.
- Calderón Martínez, M. P. P. (2017). *Aplicación de un sistema inmovilizado en esferas de alginato de calcio en la remoción de fenoles*. Instituto Tecnológico de Mérida.

- Cämmerer, B., Jalyschko, W., & Kroh, L. (2002). Intact Carbohydrate Structures as Part of the Melanoidin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(7), 2083–2087.
- Cao, L. (2005). *Carrier-bound immobilized enzymes*. Wiley.
- Carrilho, E. N. V. M., Labuto, G., & Kamogawa, M. Y. (2016). Destination of vinasse, a residue from alcohol industry: Resource recovery and prevention of pollution. En *Environmental Materials and Waste*.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803837-6.00002-0>
- Chen, C., Sun, W., Lv, H., Li, H., Wang, Y., & Wang, P. (2018). Spacer Arm-facilitated tethering of laccase on magnetic polydopamine nanoparticles for efficient biocatalytic water treatment. *Chemical Engineering Journal*, *350*, 949–959. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.06.008>
- Cheung, D. T., & Nimni, M. E. (1982). Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde II. Reaction with monomeric and polymeric collagen. *Connective Tissue Research*, *10*, 201–216.
- Chowdhary, P., Raj, A., & Bharagava, R. N. (2018). Environmental pollution and health hazards from distillery wastewater and treatment approaches to combat the environmental threats: A review. *Chemosphere*, *194*, 229–246.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.163>
- Daâssi, D., Rodríguez-Couto, S., Nasri, M., & Mechichi, T. (2014a).

- Biodegradation of textile dyes by immobilized laccase from *Coriolopsis gallica* into Ca-alginate beads. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 90, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.02.006>
- Daâssi, D., Rodríguez-Couto, S., Nasri, M., & Mechichi, T. (2014b). Biodegradation of textile dyes by immobilized laccase from *Coriolopsis gallica* into Ca-alginate beads. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 90, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.02.006>
- Dahiya, J., Singh, D., & Nigam, P. (2001). Decolourisation of molasses wastewater by cells of *Pseudomonas fluorescens* immobilised on porous cellulose carrier. *Bioresource Technology*, 111–114.
- Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>
- de Heredia, J. B., Dominguez, J. R., & Partido, E. (2005). Physico-chemical treatment for the depuration of wine distillery wastewaters (vinasses). *Water Science and Technology*, 51(1), 159–166. <https://doi.org/10.2166/wst.2005.0020>
- Dwevedi, A. (2016). *Enzyme Immobilization*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-41418-8>
- Dzionic, A., Wojcieszynska, D., & Guzik, U. (2016). Natural carriers in

bioremediation: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 23, 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.07.003>

Energy Information Administration (EIA). (2017). No Title.

Eş, I., Vieira, J. D. G., & Amaral, A. C. (2015). Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(5), 2065–2082. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6390-y>

España-Gamboa, E. I. (2015). *Pre-tratamiento de vinaza de etanol hidratado por un microorganismo ligninolítico en un reactor de lecho fluidizado y su efecto al ser acoplado a un reactor UASB*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

España-Gamboa, E., Mijangos-Cortes, J., Barahona-Perez, L., Dominguez-Maldonado, J., Hernández-Zarate, G., & Alzate-Gaviria, L. (2011). Vinasses: Characterization and treatments. *Waste Management and Research*, 29(12), 1235–1250. <https://doi.org/10.1177/0734242X10387313>

España-gamboa, E., Vicent, T., Font, X., Dominguez-Maldonado, J., Canto-Canché, B., & Alzate-Gaviria, L. (2017). Pretreatment of vinasse from the sugar refinery industry under non-sterile conditions by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor and its effect when coupled to an UASB

- reactor. *Journal of Biological Engineering*, 11, 1–11.
<https://doi.org/10.1186/s13036-016-0042-3>
- España-Gamboa, E., Vicent, T., Font, X., Mijangos-Cortés, J., Canto-Cnaché, L., & Gaviria, A. (2016). Phenol and color removal in hydrous ethanol vinasse in an air-pulsed bioreactor using *Trametes Versicolor*. *Journal Biochem Technology*, 982–986.
- Fang, X., Chen, C., Liu, Z., Liu, P., & Zheng, N. (2011). A cationic surfactant assisted selective etching strategy to hollow mesoporous silica spheres. 1632–1639. <https://doi.org/10.1039/c0nr00893a>
- Fernández-Fernández, M., Sanromán, M. Á., & Moldes, D. (2012). Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnology Advances*, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.02.013>
- Fernández, A. P., & Venegas, J. A. V. (2017). Producción De Bioetanol En México: Implicaciones Socio-Económicas. *Revista Internacional Administracion & Finanzas*, 10(1), 13–24.
- Figaro, S., Avril, J. P., Brouers, F., Ouensanga, A., & Gaspard, S. (2009). Adsorption studies of molasse's wastewaters on activated carbon: Modelling with a new fractal kinetic equation and evaluation of kinetic models. *Journal of Hazardous Materials*, 161(2–3), 649–656.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.04.006>

- Fortes, C. C. S., Daniel-da-silva, A. L., Xavier, A. M. R. ., & Tavares, A. P. M. (2017). Optimization of enzyme immobilization on functionalized magnetic nanoparticles for laccase biocatalytic reactions. *Chemical Engineering & Processing: Process Intensification*, 117(March), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2017.03.009>
- Fuess, L. T., & Garcia, L. M. (2014). Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. *Journal of Environmental Management*, 145, 210–229.
- Galicia-Medina, C. M., Barrios-Estrada, C., Esquivel-Hernández, D. A., de Jesús Rostro-Alanís, M., Torres, J. A., & Parra-Saldívar, R. (2018). Current state of bioethanol fuel blends in Mexico. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 12(3), 338–347. <https://doi.org/10.1002/bbb.1842>
- Georgiou, R. P., Tsiakiri, E. P., Lazaridis, N. K., & Pantazaki, A. A. (2016). Decolorization of melanoidins from simulated and industrial molasses effluents by immobilized laccase. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4(1), 1322–1331. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2016.01.035>
- Gholamzadeh, P., Ziarani, G. M., & Badiei, A. (2017). Immobilization of lipases onto the SBA-15 mesoporous silica. *Biocatalysis and Biotransformation*, 0(0). <https://doi.org/10.1080/10242422.2017.1308495>
- Ghosh, S., & Ghangrekar, M. M. (2019). Comprehensive review on treatment

of high-strength distillery wastewater in advanced physico-chemical and biological degradation pathways. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(1), 527–546. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-1786-8>

Giardina, P., & Faraco, V. (2010). Laccases: a never-ending story. *Cell and Molecular Life Sciences*, 369–385. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0169-1>

Gonzalez-Coronel, L. A., Cobas, M., Rostro-alanis, M. D. J., Parra-saldívar, R., Hernandez-luna, C., Pazos, M., & Sanromán, M. Á. (2016). Immobilization of laccase of *Pycnoporus sanguineus* CS43. *New Biotechnology*, 39, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.12.003>

González-Delgado, I., Segura, Y., Martín, A., López-Muñoz, M.-J., & Morales, G. (2018). Microporous and mesoporous materials b-galactosidase covalent immobilization over large-pore mesoporous silica supports for the production of high galacto-oligosaccharides (GOS). *Microporous and Mesoporous Materials*, 257, 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2017.08.020>

Habeeb, A. F. S. A., & Hiramoto, R. (1968). Reaction of proteins with glutaraldehyde. *Archive of Biochemistry and Biophysics*, 16–26.

Haibo, Z., Yinglong, Z., Feng, H., Peiji, G., & Jiachuan, C. (2009). Purification

- and characterization of a thermostable laccase with unique oxidative characteristics from *Trametes hirsuta*. *Biotechnol letters*, 31, 837–843.
<https://doi.org/10.1007/s10529-009-9945-0>
- Hopwood, D. (1972). Theoretical and practical aspects of glutaraldehyde fixation. *Histochemical Journal*, 4(iv), 267–303.
- Hoshida, H., Hakukawa, T., & Morimasa, K. (2001). Isolation of Five Laccase Gene Sequences from the White-Rot Fungus *Trametes sanguinea* by PCR, and Cloning, Characterization and Expression of the Laccase cDNA in Yeasts. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(4), 372–380.
[https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80242-5](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80242-5)
- Ioannou, L. A., & Fatta-Kassinos, D. (2013). Solar photo-Fenton oxidation against the bioresistant fractions of winery wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 1(4), 703–712.
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.07.008>
- Ispas, C., Sokolov, I., & Andreescu, S. (2009). Enzyme-functionalized mesoporous silica for bioanalytical applications. 393, 543–554.
<https://doi.org/10.1007/s00216-008-2250-2>
- Jia, P. Y., Liu, X. M., Yu, M., & Luo, Y. (2006). Luminescence properties of sol – gel derived spherical $\text{SiO}_2@ \text{Gd}_2(\text{WO}_4)_3 : \text{Eu}^{3+}$ particles with core – shell structure. 424, 358–363.

<https://doi.org/10.1016/j.cplett.2006.04.088>

Jiménez, A. M., Borja, R., Martín, A., & Raposo, F. (2006). Kinetic analysis of the anaerobic digestion of untreated vinasses and vinasses previously treated with *Penicillium decumbens*. *Journal of Environmental Management*, 80(4), 303–310.

<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2005.09.011>

Johannes, C., Majcherczyk, A., & Johannes, C. (2000). Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 524–528.

<https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.524-528.2000>.Updated

Johnston, C. J., Driscoll, K. E., Finkelstein, J. N., Baggs, R., Reilly, M. A. O., Carter, J., & Gelein, R. (2000). *Pulmonary Chemokine and Mutagenic Responses in Rats after Subchronic Inhalation of Amorphous and Crystalline Silica*. 413, 405–413.

Kandasamy, S., Muniraj, I. K., Purushothaman, N., Sekar, A., Sharmila, D. J. ., Kumarasamy, R., & Uthandi, S. (2016). High level secretion of laccase (LccH) from a newly isolated white-rot basidiomycete , *Hexagonia hirta* MSF2. *Frontiers in Microbiology*, 7(May), 1–12.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00707>

Kannan, N., Karthikeyan, G., & Tamilselvan, N. (2006). Comparison of

treatment potential of electrocoagulation of distillery effluent with and without activated Areca catechu nut carbon. *Journal of Hazardous Materials*, 137(3), 1803–1809.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.05.048>

Kim, J, Hyeon, T., Lee, J., Kim, J., Kim, J., Jia, H., ... Hyeon, T. (2005). *Simple Synthesis of Hierarchically Ordered Mesocellular Mesoporous Silica Materials Hosting Crosslinked Enzyme Aggregates*. 701(7), 744–753.

<https://doi.org/10.1002/sml.200500035>

Kim, Jinkeun, & Lawler, D. F. (2005). Characteristic of Zeta Potential Distribution in Silica Particles. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 26(7), 1083–1089.

Kumar, S., Haq, I., Prakash, J., & Raj, A. (2017). Improved enzyme properties upon glutaraldehyde cross-linking of alginate entrapped xylanase from *Bacillus licheniformis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 24–33.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.104>

Kumar, V., Kaur, G., & Pickrell, G. R. (2019). Silica Nanospheres. In *Biomedical, Therapeutic and Clinical Applications of Bioactive Glasses* (pp. 521–544). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102196-5.00019-7>

Lettera, V., Pezzella, C., Cicatiello, P., Piscitelli, A., Guido, V., Galano, E., ...

- Sannia, G. (2016). Efficient immobilization of a fungal laccase and its exploitation in fruit juice clarification. *Food Chemistry*, *196*, 1272–1278. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.074>
- Li, D., Yi, R., Tian, J., Li, J., Yu, B., & Qi, J. (2017). Rational synthesis of hierarchical magnetic mesoporous silica microspheres with tunable mesochannels for enhanced enzymes immobilization. *The Royal Society of Chemistry*, 1–4. <https://doi.org/10.1039/c7cc04070a>
- Liu, J., Shen, X., Zheng, Z., Li, M., Zhu, X., Cao, H., & Cui, C. (2020). Immobilization of laccase by 3D bioprinting and its application in the biodegradation of phenolic compounds. *International Journal of Biological Macromolecules*, *164*, 518–525. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.144>
- Madhavi, V., & Lele, S. . S. (2009). Laccase: properties and applications. *BioResources*, *4*, 1694–1717.
- Majeau, J.-A., Brar, S. K., & Tyagi, R. D. (2010). Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technology*, *101*(7), 2331–2350. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.087>
- Mayolo-delosia, K., González-gonzález, M., & Rito-Palomares, M. (2020). Laccases in food industry: bioprocessing , potential industrial and biotechnological applications. *Frontiers in Bioengineering and*

- Biotechnology*, 8(March), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00222>
- Mayoral, J. B., Moreno, A. C., & Martín-martínez, E. S. (2014). Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. *Latin-American Journal of Physics Education*, 8(4), 1–6.
- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J., & Waldron, K. C. (2004). Glutaraldehyde : behavior in aqueous solution , reaction with proteins , and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, 37(5), 790–802.
- Minteer, S., & Moehlenbrock, M. J. (2017). Enzyme Stabilization and Immobilization. En *Enzyme stabilization and immobilization: methods and protocols* (1a ed., pp. 1–9). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6499-4>
- Mohana, S., Desai, C., & Madamwar, D. (2007). Biodegradation and decolourization of anaerobically treated distillery spent wash by a novel bacterial consortium. *Bioresource Technology*, 98, 333–339. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.12.024>
- Noman, E., Al-Gheethi, A., Mohamed, M., & Talip, B. (2019). Myco - remediation of xenobiotic organic compounds. *Topics in Current Chemistry*, 377(3), 1–41. <https://doi.org/10.1007/s41061-019-0241-8>
- Noreen, S., Asgher, M., Hussain, F., & Iqbal, A. (2016). Performance improvement of Ca-alginate bead laccase from *Trametes versicolor* IBL-

04. *BioResourcessource*, 11(1), 558–572.

Osma, J., Toca-Herrera, J., & Rodríguez-Cuoto, S. (2010). Biodegradation of a simulated textile effluent by immobilised-coated laccase in laboratory-scale reactors. *Applied Catalysis A: General*, 373, 147–153.
<https://doi.org/10.1016/j.apcata.2009.11.009>

Park, K. M., & Park, S.-S. (2008). Purification and characterization of Laccase from basidiomycete *Fomitella fraxinea*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 670–675.

Patel, S., Kalia, V. C., Biology, I., Choi, J., & Haw, J. R. (2014). Immobilization of Laccase on SiO₂ Nanocarriers Improves Its Stability and Reusability. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(5), 639–647.
<https://doi.org/10.4014/jmb.1401.01025>

Pezzella, C., Russo, M. E., Marzocchella, A., Salatino, P., & Sannia, G. (2014). Immobilization of a *Pleurotus ostreatus* laccase mixture on perlite and its application to dye decolourisation. *Biomedical Research International*, 2014, 1–11.

Prajapati, A. K., & Chaudhari, P. K. (2015). Physicochemical Treatment of Distillery Wastewater—A Review. *Chemical Engineering Communications*, 202(8), 1098–1117.
<https://doi.org/10.1080/00986445.2014.1002560>

- Prasad, R., Ahmed, P. M., Pajot, H. F., De Figueroa, L. I. C., Gusils, C. H., Carrilho, E. N. V. M., ... Miao, J. L. (2018). Chapter 19 - Economic Assessment of Ethanol Production. *Bioremediation Journal*, 10(4), 132–153. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803837-6.00002-0>
- Ritu, S., & Sanjeev, K. (2017). *Green Technologies and Environmental Sustainability* (Ritu Sinhg, Ed.). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-50654-8>
- Robles-González, V., Galíndez-Mayer, J., Rinderknecht-Seijas, N., & Poggi-Varaldo, H. M. (2012). Treatment of mezcal vinasses: A review. *Journal of Biotechnology*, 157(4), 524–546. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.09.006>
- Rodríguez Reynoso, F. (2010). Materiales en Adsorción y Catálisis. *Revista del Grupo Especializado de Adsorción de la RSQE*, 1–16.
- Roy, J. J., & Abraham, T. E. (2006). Preparation and characterization of cross-linked enzyme crystals of laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 38(1), 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2005.11.001>
- Sánchez Ramírez, J., Martínez Hernández, J. L., Segura Cenicerros, E. P., Contreras Esquivel, J. C., Medina Morales, M. A., Noé, A., & Iliná, A. (2014). Inmovilización de enzimas lignocelulolíticas en nanopartículas magnéticas. *Química Nova*, 37(3), 504–512.

- Sangave, P. C., Gogate, P. R., & Pandit, A. B. (2007). Combination of ozonation with conventional aerobic oxidation for distillery wastewater treatment. *Chemosphere*, 68(1), 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.12.053>
- Satyawali, Y., & Balakrishnan, M. (2007). Removal of color from biomethanated distillery spentwash by treatment with activated carbons. *Bioresource Technology*, 98(14), 2629–2635. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.016>
- Sheldon, R. A. (2007). Enzyme Immobilization : The Quest for Optimum Performance. *Advanced Synthesis y Catalysis*, 349(8–9), 1289–1307. <https://doi.org/10.1002/adsc.200700082>
- Singh, D., & Kumar, R. (2010). Ligninolytic Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(6), 1760–1788. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8676-y>
- Singh, N., Basu, S., Vankelecom, I., & Balakrishnan, M. (2015). Covalently immobilized laccase for decolourization of glucose-glycine maillard products as colourant of distillery wastewater. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 177, 76–89. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1729-5>
- Sirianuntapiboon, S., Phothilangka, P., & Ohmomo, S. (2004). Decolorization of molasses wastewater by a strain No.BP103 of acetogenic bacteria.

Bioresource Technology, 92(1), 31–39.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.07.010>

Solomon, E. I., Augustine, A. J., & Yoon, J. (2008). O₂ Reduction to H₂O by the multicopper oxidases. *The Royal Society of Chemistry*, 9226, 3921–3932. <https://doi.org/10.1039/b800799c>

Somoza, V. (2005). Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products: An update. *Molecular Nutrition & Food Research*, 663–672. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500034>

Sowmeyan, R., & Swaminathan, G. (2008). RETRACTED: Effluent treatment process in molasses-based distillery industries: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 152(2), 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.11.033>

Sreethawong, T., & Chavadej, S. (2008). Color removal of distillery wastewater by ozonation in the absence and presence of immobilized iron oxide catalyst. *Journal of Hazardous Materials*, 155(3), 486–493. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.11.091>

Sun, H., Yang, H., Huang, W., & Zhang, S. (2015). Immobilization of laccase in a sponge-like hydrogel for enhanced durability in enzymatic degradation of dye pollutants. *Journal of Colloid and Interface Science*, 450, 353–360. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.03.037>

Taheran, M., Naghdi, M., Brar, S. K., Knystautas, E. J., Verma, M., & Surampalli, R. Y. (2017). Degradation of chlortetracycline using immobilized laccase on Polyacrylonitrile-biochar composite nanofibrous membrane. *Science of the Total Environment*, 605–606, 315–321. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.185>

Tapia-Tussell, R. (2011). *Caracterización molecular del gen de la lacasa de un hongo ligninolítico con potencial biotecnológico*. Instituto Tecnológico de Mérida.

Tapia-Tussell, R., Pérez-Brito, D., Torres-Calzada, C., Cortés-Velázquez, A., Alzate-Gaviria, L., Chablé-Villacís, R., & Solís-Pereira, S. (2015a). Laccase gene expression and vinasse biodegradation by *Trametes hirsuta* strain Bm-2. *Molecules*, 20(8), 15147–15157. <https://doi.org/10.3390/molecules200815147>

Tapia-Tussell, R., Pérez-Brito, D., Torres-Calzada, C., Cortés-Velázquez, A., Alzate-Gaviria, L., Chablé-Villacís, R., & Solís-Pereira, S. (2015b). Laccase Gene Expression and Vinasse Biodegradation by *Trametes hirsuta* Strain Bm-2. *Molecules*, 20(8), 15147–15157. <https://doi.org/10.3390/molecules200815147>

Tejada, M., & Gonzalez, J. . (2005). Effects of application of a byproduct of the two-step olive oil mill process on maize yield. *European Journal of*

Agronomy, 96, 692–699.

Thurston, C. F., & Billal, F. (1996). Purification of laccase II from *Armillaria mellea* and comparison of its properties with those of laccase I. *Mycological Research*, 100(9), 1099–1105. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(96\)80220-6](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(96)80220-6)

Tondee, T., & Sirianuntapiboon, S. (2008). Decolorization of molasses wastewater by *Lactobacillus plantarum* No. PV71-1861. *Bioresource Technology*, 99(14), 6258–6265. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.12.028>

Toomsan, W., Siripattanakul, S., & Boonlue, S. (2020). Potential degradation and kinetics of melanoidin by using laccase from white rot fungus. *Applied Environmental Research*, 42, 1–10. <https://doi.org/10.35762/AER.2020.42.3.1>

Varga, B., Meiczinger, M., & Somogyi, V. (2019). Immobilization of laccase in alginate beads. *Hungarian Journal Of Industry and Chemistry*, 47(2), 17–23. <https://doi.org/10.33927/hjic-2019-16>

Vera, M., Nyanhongo, G. S., Guebitz, G. M., Pellis, A., & Rivas, B. L. (2019). Immobilization of *Myceliophthora thermophila* laccase on poly(glycidylmethacrylate) microspheres enhances the degradation of azinphos-methyl. *Applied Polymer Science*, 47417, 1–10.

<https://doi.org/10.1002/app.47417>

- Wang, D. P., & Zeng, H. C. (2011). Creation of interior space , architecture of shell structure , and encapsulation of functional materials for mesoporous SiO₂ spheres. *Chemistry of Materials*, *20*, 4886–4899.
- Wang, P., Fan, X., Cui, L., Wang, Q., & Zhou, A. (2008). Decolorization of reactive dyes by laccase immobilized in alginate/gelatin blent with PEG. *Journal of Environmental Sciences*, *20*(12), 1519–1522.
[https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62559-0](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62559-0)
- Wang, Q., Yuan, T., Liu, S., Fu, X., Yang, G., Chen, J., ... Lucia, L. A. (2018). Synthesizing Magnetic Support for Laccase Immobilization for the Purification of Pre-hydrolysis Liquor. *BioResources*, *13*(1), 1885–1894.
- Wang, Y., & Caruso, F. (2005). Mesoporous silica spheres as supports for enzyme immobilization and encapsulation. *Chemistry of Materials*, (1), 953–961. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/cm0483137>
- Ward, G., Hadar, Y., & Dosoretz, C. (2004). The biodegradation of lignocellulos by white rot fungi. En *Fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications* (pp. 1–15).
- Wei, Y., Dong, H., Xu, J., & Feng, Q. (2002). Simultaneous immobilization of horseradish peroxidase and hluucose oxidase in mesoporous sol- gel host materials. *ChemPhysChem*, *19104*(9), 802–808.

- Wilkie, A. C., Riedesel, K. J., & Owens, J. M. (2000). Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. *Biomass and Bioenergy*, *19*(2), 63–102.
[https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(00\)00017-9](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(00)00017-9)
- Wu, E., Li, Y., Huang, Q., Yang, Z., Wei, A., Hu, Q., ... Hu, Q. (2019). Laccase immobilization on amino-functionalized magnetic metal organic framework for phenolic compound removal. *Chemosphere*, *233*, 327–335.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.150>
- Yang, J., Lin, Y., Yang, X., Ng, T., Ye, X., & Lin, J. (2016). Degradation of tetracycline by immobilized laccase and the proposed transformation pathway. *Journal of Hazardous Materials*, *322*, 525–531.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.10.019>
- Yang, Y., Xu, Y., Yang, Y., Yang, H., & Yuan, H. (2016). Laccase Immobilized on Mesoporous SiO₂ and Its Use for Degradation of Chlorophenol Pesticides. *Russian Journal of Physical Chemistry*, *90*(10), 2044–2054.
<https://doi.org/10.1134/S0036024416100307>
- You, L., Liu, Z., Lin, J., Guo, L., & Huang, X. (2013). Molecular cloning of a laccase gene from *Ganoderma lucidum* and heterologous expression in *Pichia pastoris*. *Journal of Basic Microbiology*, 1–8.
<https://doi.org/10.1002/jobm.201200808>

Zapata-Castillo, P. (2012). *Lacasas de Trametes hirsuta Bm2: purificación, caracterización y aplicación en la remoción de tintes*. Instituto Tecnológico de Mérida.

Zhu, Y., Kaskel, S., Shi, J., Wage, T., & Pée, K. Van. (2007). Immobilization of Trametes versicolor Laccase on Magnetically Separable Mesoporous Silica Spheres. *Chemistry of Materials*, 19(5), 6408–6413.

ANEXOS

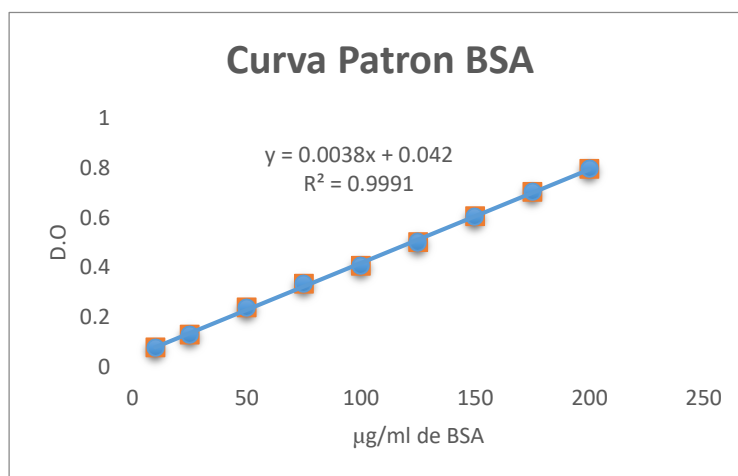
Anexo 1.- Composición del medio de cultivo YMPG (1L) (Bonnarme y Jeffries, 1990)

Componente	Cantidad (g)
Glucosa	10
Extracto de malta	10
peptona	2
Extracto de levadura	2
KH ₂ PO ₄	2
MgSO ₄ + 7H ₂ O	1
Hidrocloruro de tiamina	0.001

Se ajustó el pH a 4.5 con una solución concentrada de HCl. Los medios se esterilizaron a 121 °C 15 lb/in² por 15 min.

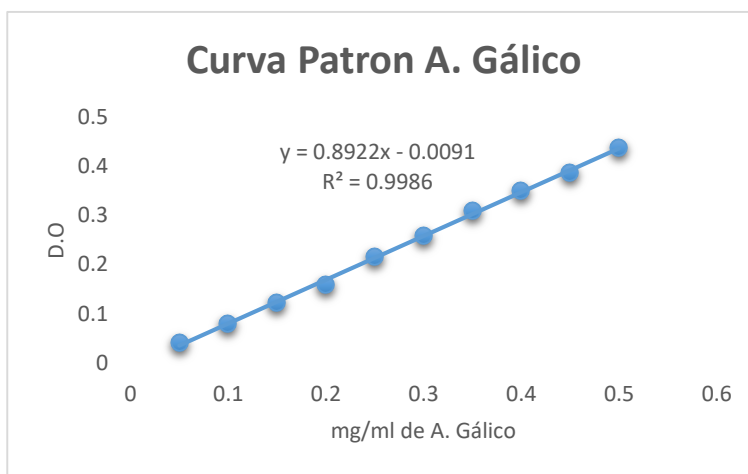
Anexo 2.- Curva estándar de BSA para cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

[Proteína (µg/ml)]	D.O
10	0.079
25	0.13
50	0.2395
75	0.334
100	0.4065
125	0.5015
150	0.6045
175	0.7025
200	0.7945



Anexo 3.- Curva estándar de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales.

[A.gálico (mg/ml)]	D.O
0.05	0.0405
0.1	0.08
0.15	0.123
0.2	0.1585
0.25	0.217
0.3	0.2585
0.35	0.3095
0.4	0.351
0.45	0.387
0.5	0.438



Anexo 4.- Factores y niveles para el diseño factorial 2^3 para la inmovilización de lacasas de *T. hirsuta*

Tratamiento	Glutaraldehído (%)	[Lacasas]	Tiempo de activación (h)	Variable de respuesta
T1	0.6	1:1	2	Actividad de lacasas/ Porcentaje de actividad retenida
T2	0.3	1:1	2	
T3	0.6	3:4	2	
T4	0.3	3:4	2	
T5	0.6	1:1	3	
T6	0.3	1:1	3	
T7	0.6	3:4	3	
T8	0.3	3:4	3	