



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA

TESIS

**“APLICACIÓN DE UN SISTEMA INMOVILIZADO EN ESFERAS DE
ALGINATO DE CALCIO EN LA REMOCIÓN DE FENOLES”**

PARA OPTAR AL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

ING. MARTHA PATRICIA PAOLA CALDERÓN MARTÍNEZ

ASESOR:

DRA. SARA ELENA SOLÍS PEREIRA

CO-ASESOR:

DRA. WENDY DEL ROSARIO ANCONA ESCALANTE

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO.

13 DICIEMBRE 2017

SEP

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Mérida

DEPENDENCIA: DIV. DE EST. DE POSG. E INV.
No. DE OFICIO: X-502/2017

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

MÉRIDA, YUCATÁN A 29 DE NOVIEMBRE DE 2017

C. CALDERON MARTÍNEZ MARTHA PATRICIA PAOLA
Pasante de Maestría en Ciencias de los
Alimentos y Biotecnología
P r e s e n t e.

De acuerdo al fallo emitido por su asesor la Dra. Sara Elena Solís Pereira, co-asesorada por la Dra. Wendy del Rosario Ancona Escalante y la comisión revisora integrada por el Dr. Gabriel Lizama Uc y el Dr. Víctor Manuel Moo Huchin, 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:

"APLICACIÓN DE UN SISTEMA INMOVILIZADO EN ESFERAS DE ALGINATO DE CALCIO EN LA REMOCIÓN DE FENOLES"

ATENTAMENTE
IN HOC SIGNO VINCES

M.C. DANIEL ARCÁNGEL LÓPEZ SAURI
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.p. Archivo
DALS/tja



S. E. P.
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE MÉRIDA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



SEP Instituto Tecnológico de Mérida, Km.5 Carretera Mérida-Progreso A.P 911
C.P 97118 Mérida Yucatán, México, Tels. 964-59-00, Ext. 10001, 10401
10601, 10201 e-mail: itm@itmerida.mx http://www.itmerida.mx



“La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡Qué importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste”

Marie Curie

DEDICATORIA

A Dios por darme la capacidad para cumplir todas las metas que he emprendido, por nunca abandonarme y darme la fortaleza para enfrentar todo lo que se me ha presentado a lo largo de mi vida.

A mis padres, Javier y Carmelita por su amor incondicional y por apoyarme en todo momento, por darme el mejor regalo de mi vida: la educación. Nunca olvidaré todos los sacrificios que han hecho por mí y por mis hermanas para darnos educación de calidad, por ustedes he llegado a donde estoy y gracias a ustedes en gran medida soy quien soy. Los amo y sé el dolor que ha sido dejarme ir para a cumplir esta meta, los tengo dentro de mi corazón en todo momento.

A mis hermanitas Claudia y Sarahí, mis “mujercitas”, por su cariño, motivación y por comprender mi ausencia en los días festivos y cumpleaños y por no estar presente físicamente cuando me llegaron a necesitar.

A mi prometido Jesús Manuel, el hermoso regalo que me dio esta tierra yucateca, por haberme acompañado durante mis estudios de maestría y apoyarme en todos los sentidos, por impulsarme a continuar cuando todo parecía imposible y estar a mi lado en los días buenos, en los malos y los peores. Te amo, te admiro y respeto.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, la Dra. Sara Solís, por su excelente guía durante este proyecto, por su gran paciencia y por siempre creer en mí, aun cuando yo no lo hacía. Gracias por compartir sus conocimientos y su tiempo conmigo, por exigirme y llevarme al límite para sacar lo mejor de mí, por su comprensión durante todo este tiempo, y por todos sus consejos.

A mi coasesora la Dra. Wendy Ancona, por sus consejos y aportaciones a mi proyecto, por su gran apoyo en este camino y su amistad.

A mis revisores, el Dr. Gabriel Lizama y el Dr. Víctor Moo, por la disposición y sus atinadas aportaciones para enriquecer este trabajo.

Al Instituto Tecnológico de Mérida y al Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Microbiana por las instalaciones y equipos brindados para la realización de este proyecto.

Al Dr. Jorge Tamayo por abrir las puertas de su laboratorio cuando se necesitó, por sus consejos y su amistad.

A mis compañeros de generación Nidia, Rubiel, Jair, Mónica, Carlos, Enrique y Santos por todo su apoyo durante este camino, por compartir risas y momentos de estrés.

A mis compañeros de laboratorio Pedro, Ingrid, Alejandrina y Soco por su amistad, y hacer amena la estancia.

A mis amigas Soco y Denisse por hacer más divertido mi último año, por todo su apoyo incondicional y su invaluable amistad.

Al Dr. Luis Cuevas por las facilidades brindadas al proporcionar el equipo de HPLC y a Abraham por el apoyo técnico.

A los chicos del laboratorio de Microbiología Aplicada y Molecular, Ezequiel, Gabo, Lenny, Raquel, Keith, Luis Felipe, Isela, Dr. Alex y Jesús por la amistad y las porras.

A mis amigos Calef, Gustavo, Ives y tantos más que me animaron a emprender esta aventura y me han acompañado todo este tiempo sin importar la distancia.

Al Tecnológico Nacional de México por el Programa “1000 Jóvenes en la ciencia”.

Al CONACYT por la beca brindada.

ÍNDICE

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Lignina	3
2.2 Hongos de la podredumbre blanca (HPB).....	4
2.3 Lacasas.....	5
2.3.1. Mecanismo de acción	8
2.3.2. Tratamiento de contaminantes ambientales	10
2.4 Inmovilización de enzimas y células	13
2.4.1 Inmovilización por atrapamiento	14
2.4.2 Inmovilización por inclusión en membranas	14
2.4.3 Inmovilización por adsorción.....	14
2.4.4 Inmovilización por unión covalente	15
2.4.5 Inmovilización por reticulado.....	16
2.5 Ventajas y desventajas de las diferentes técnicas de inmovilización	17
2.6 Alginato	18

2.7 Factores involucrados durante la inmovilización en esferas de alginato de calcio	20
2.7.1 Concentración de gel	20
2.7.2 Diámetro de esferas.....	21
2.7.3 Concentración de inóculo	21
2.7.4 pH	22
2.7.5 Temperatura	22
2.8 Efectos de la inmovilización por atrapamiento en alginato de calcio.....	23
2.9 Inmovilización de lacasas y células de hongos de la podredumbre blanca	25
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. HIPOTESIS	29
5. OBJETIVOS	30
5.1 Objetivo general	30
5.2 Objetivos específicos	30
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	31
7. METODOLOGÍA	32
7.1 Microorganismo.....	32
7.2 Estudio de crecimiento del hongo en medio suplementado con fenoles	32
7.3 Producción de lacasas y micelio por <i>Trametes hirsuta Bm2</i>	33
7.4 Determinación de actividad de lacasas	33
7.5 Determinación de la concentración de proteína	34
7.6 Determinación del contenido de fenoles totales.....	34
7.7 Determinación del contenido de fenoles por absorbancia.....	34
7.8 Tratamiento de fenoles por enzimas y células libres.....	35

7.9 Inmovilización de lacasas y células.....	35
7.10 Cuantificación de la biomasa liberada y retenida	36
7.11 Determinación del efecto del pH y temperatura en la remoción de fenoles con micelio inmovilizado.	37
7.12 Determinación de los ciclos de reuso.....	37
7.13 Cinéticas de remoción de fenoles y producción de lacasas en micelio libre e inmovilizado	38
7.14 Identificación del perfil de fenoles	38
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
8.1 Tolerancia del hongo a fenoles en medio sólido	39
8.2 Producción de lacasas en salvado de trigo	41
8.3 Capacidad de lacasas libres para remover fenoles.....	44
8.4 Capacidad de células libres para remover fenoles.....	45
8.5 Inmovilización de micelio de <i>T. hirsuta</i> Bm2	47
8.6 Efecto de la temperatura en la remoción de fenoles con el sistema inmovilizado	50
8.7 Efecto del pH en la remoción de fenoles con el sistema inmovilizado	54
8.8 Comparación del sistema libre y sistema inmovilizado con micelio de <i>Trametes hirsuta</i> Bm2	57
8.9 Ciclos de reuso	60
8.10 Perfil de fenoles por HPLC.....	63
9. CONCLUSIONES.....	66
10. BIBLIOGRAFÍA.....	67
ANEXOS	85

Anexo 1. Composición del medio de cultivo YMPG (1 L) (Bonnarme & Jeffries, 1990).....	85
Anexo 2. Curva estándar BSA para cuantificación de proteínas por ensayo de Bradford.	86
Anexo 3. Curva estándar ácido gálico para cuantificación de fenoles totales.	86
Anexo 4. Factores y niveles del diseño factorial 2^k	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Ventajas y desventajas de los tipos de inmovilización	17
Tabla 2.2. Aplicación de lacasas y células inmovilizadas en alginato	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. A) Estructura parcial de la lignina. B) Tipos de monolignoles más comunes encontrados en los bloques de construcción de la lignina: a): alcohol p-cumarílico, b) alcohol coniferílico, c) alcohol sinapílico (Higuchi, 1990).....	3
Figura 2.2. Estructura de lacasa de <i>Trametes versicolor</i>	6
Figura 2.3. Esquema de los sitios de la lacasa T1 (Cu1) y T2/T3 (Cu4 /Cu2-Cu3) de la lacasa CotA de <i>Bacillus subtilis</i> , indicando las distancias entre los átomos más importantes (Enguita <i>et al.</i> , 2003).	7
Figura 2.4. Mecanismo de acción de la lacasa (A) de forma directa, (B) con la intervención de un mediador (Arana <i>et al.</i> , 2002).....	9
Figura 2.5. Oxidación de (A) subunidades fenólicas de lignina por lacasas y (B) compuestos modelo de lignina no fenólicos por un sistema lacasa- mediador (Archibald <i>et al.</i> , 1997).	10
Figura 2.6. Polimerización de la molécula de alginato con iones de calcio.	19
Figura 2.7. Procedimiento general de atrapamiento en alginato (Smidsrod & Skjak-Braek, 1990).....	19
Figura 6.1. Secuencia de pasos para la inmovilización de <i>T. hirsuta</i> Bm2 y su evaluación en la remoción de fenoles.	31
Figura 8.1. Cinética del crecimiento de <i>T. hirsuta</i> Bm2 en medio suplementado con diferentes concentraciones (μM) de efluente sintético compuesto por guayacol, 2,6-dimetoxifenol y ácido vainillico a 35°C.	40
Figura 8.2. Crecimiento de <i>Trametes hirsuta</i> Bm2 en medio sólido con efluente sintético a diferentes concentraciones a 35°C.....	40
Figura 8.3. Producción de lacasas por <i>Trametes hirsuta</i> Bm2 en medio con salvado de trigo, pH 6, 35°C, 150 rpm.	42
Figura 8.4. Remoción de fenoles totales durante el cultivo de <i>T. hirsuta</i> Bm2 en salvado de trigo a pH 6, 35°C, 150 rpm.....	43
Figura 8.5. Proteína presente en los extractos producidos por <i>T. hirsuta</i> Bm2 en medio con salvado de trigo, pH 6, 35°C, 150 rpm.....	44

Figura 8.6. Fenoles totales en cultivo con medio YMPG suplementado con un efluente sintético compuesto por 2,6- dimetoxifenol, guayacol y ácido vainílico, a 35°C, pH 4.5, 150 rpm	46
Figura 8.7. Biomasa final después del tratamiento microbiano (72 h)	47
Figura 8.8. Efecto de las condiciones de inmovilización de micelio de <i>T. hirsuta</i> Bm2 en medio YMPG suplementado con fenoles (C1-C8), pH 4.5, 150 rpm, (A) concentración de fenoles, (B) lacasas.....	49
Figura 8.9. Efecto de la temperatura en la remoción de fenoles (A) y actividad de lacasas (B) utilizando micelio inmovilizado de <i>T. hirsuta</i> Bm2 en medio YMPG suplementado con fenoles a pH 4.5 y 150 rpm.	51
Figura 8.10. Efecto de las temperaturas 30°C, 35°C, 37°C y 40°C en la generación de biomasa liberada y retenida a los diferentes tiempos.....	53
Figura 8.11. Tamaño de las esferas de alginato de calcio con <i>T. hirsuta</i> Bm2 en cultivos a 30°C, 35°C, 37°C y 40°C.....	53
Figura 8.12. Efecto del pH en la remoción de fenoles (A) y actividad de lacasas (B) utilizando micelio inmovilizado de <i>T. hirsuta</i> Bm2 en medio YMPG suplementado con fenoles a 35°C y 150 rpm.	56
Figura 8.13. Biomasa liberada (naranja) y retenida (azul) durante los cultivos de las esferas con <i>T. hirsuta</i> a pH de 4 a 6.	58
Figura 8.14. Comparación del micelio libre e inmovilizado de <i>T. hirsuta</i> Bm2 en la remoción de fenoles (A) y en la producción de lacasas (B) a 35°C, pH 6 y 150 rpm. 61	
Figura 8.15. Fenoles residuales durante los ciclos del reuso del micelio inmovilizado a 35°C, pH 6 y 150 rpm. La concentración inicial de fenoles fue 500µM.	61
Figura 8.16. Esferas de alginato de calcio con micelio inmovilizado de <i>T. hirsuta</i> Bm2 (A) al inicio, (B) al final del cultivo y (C) micrografía del micelio en el interior de la esfera (40X).....	61
Figura 8.17. Fenoles residuales cuantificados mediante HPLC en los ciclos de reuso 1, 3 y 5 después del tratamiento microbiano, control sin tratamiento.....	64
Figura 8.18. Cromatograma de fenoles por HPLC antes y después del tratamiento. A) mezcla estándar de ácido vainílico, guayacol, 2,6-dimetoxifenol (700 µM), B) control (ES sin tratamiento microbiano), C) primer ciclo de reuso. Medido a 280 nm. Picos: (1) ácido vainílico, (2) guayacol, (3) 2,6 dimetoxifenol.....	65

RESUMEN

Los hongos de la podredumbre blanca producen un sistema oxidativo con baja especificidad y son capaces de degradar diferentes compuestos xenobióticos. Los compuestos fenólicos son moléculas orgánicas altamente tóxicas que son vertidos a los ecosistemas acuáticos y terrestres por lo que son considerados contaminantes prioritarios. La inmovilización de micelio en alginato de calcio representa una alternativa para la remoción de fenoles porque es un proceso inocuo que además protege a las células del efecto nocivo de los contaminantes. En este estudio se determinó que el hongo *Trametes hirsuta* tolera hasta 500 μM de un efluente sintético con fenoles durante su crecimiento en placa y que mayores concentraciones tienen un fuerte efecto inhibitorio. En cultivo sumergido el micelio libre disminuyó 50% de la mezcla de fenoles en 72 h y no se produjeron lacasas, lo que indicó que los fenoles fueron removidos por adsorción al micelio. La inmovilización de micelio por atrapamiento en alginato de calcio se realizó mediante un diseño factorial 2^k con tres factores y dos niveles: concentración de micelio y CaCl_2 y el tamaño de esferas. En todos los tratamientos hubo remoción de fenoles y no hubo diferencia significativa entre los tratamientos. A las 48 h disminuyó 40% y la máxima remoción fue de 60% (96 h) en relación al control. Hubo un notable incremento en la actividad de lacasas, sugiriendo que los fenoles también fueron removidos por la acción de las enzimas. Se determinó que la temperatura influyó en el proceso de remoción de fenoles y la producción de enzimas. La mejor temperatura para llevar a cabo el proceso fue de 35°C, a diferencia, a 40°C no hubo crecimiento, remoción de fenoles ni producción de lacasas. Asimismo, se determinó que a pH 6 se logra remover con mayor eficiencia la concentración de fenoles. Las cinéticas comparativas del tratamiento de fenoles con micelio libre e inmovilizado mostraron que las esferas de alginato de calcio incrementaron 10% la remoción de fenoles. Este sistema pudo ser reusado 6 ciclos con alta eficiencia de remoción de fenoles y producción de lacasas. El análisis por HPLC mostró que desde el primer ciclo el 2,6 dimetoxifenol fue removido completamente (100 %) y el guayacol y ácido vainílico 92 % respectivamente, lo que

validó la eficiencia del tratamiento. Estos resultados aunados al bajo desprendimiento de células (9%) en las condiciones establecidas, muestran que el micelio inmovilizado de *Trametes hirsuta* Bm2 tiene un potencial para el tratamiento de fenoles, por lo que será importante evaluar este sistema en un efluente real y el desarrollo de reactores para la biorremediación de efluentes a mayor escala.

ABSTRACT

The white rot fungi produce an oxidative system with low specificity and are capable of degrading different xenobiotic compounds. Phenolic compounds are highly toxic organic molecules that are discharged into aquatic and terrestrial ecosystems, for this reason are considered priority pollutants. The immobilization of mycelium in calcium alginate represents an alternative for the elimination of phenols because it is an innocuous process that also protects the cells from the harmful effect of contaminants. In this study was determined that fungus *Trametes hirsuta* tolerates up to 500 μM of a synthetic effluent with phenols during its growth in plaque and that higher concentrations have a strong inhibitory effect. In submerged culture the free mycelium decreased 50 % of the mixture of phenols in 72 h. There were no laccases, which indicated that the phenols were removed by adsorption to the mycelium. Immobilization of mycelium by calcium alginate entrapment was carried out by means of a 2^k factorial design with three factors and two levels: concentration of mycelium and CaCl_2 and the beads size. In all treatments there was not significant difference in the level of phenol elimination. At 48 h, phenols decreased 40 % and the maximum removal was 60 % (96 h) with respect to the control. There was a marked increase in laccase activity, suggesting that phenols were removed by adsorption and by the action of enzymes. It was determined that the temperature influenced the process of phenol removal and enzyme production. The best temperature to carry out the process was 35 °C, unlike, at 40 °C there was no growth, phenol removal or laccase production. In the other hand at pH 6 phenols were more efficiently removed. The comparative kinetics of the

treatment of phenols with free mycelium and immobilized showed a greater efficiency of the calcium alginate spheres. This system could be reused 6 cycles with high efficiency of phenol removal and laccase production. HPLC analysis showed that 2,6-dimethoxyphenol were completely removed (100%), guaiacol and vanillic acid 92% from the first reuse cycle, which validated the efficiency of the treatment. These results combined with low cell shedding (9 %) under the established conditions show that the immobilized mycelium of *Trametes hirsuta* Bm2 has a potential for the treatment of phenols, so it will be important in the development of reactors for bioremediation of effluents to scale up.

1. INTRODUCCIÓN

Los fenoles son compuestos que se encuentran en los efluentes de industrias como la farmacéutica, perfumería, plásticos, textiles, petróleo, colorantes, pesticidas y plaguicidas entre otros, donde se expulsan alrededor del 26% al aire, 73% al agua y cerca del 0.4% en el suelo y los sedimentos acuáticos (Mohan *et al.*, 2004). Tanto el fenol, como los fenoles sustituidos, se encuentran entre los contaminantes de mayor toxicidad incluso a concentraciones relativamente bajas, algunos también han sido descritos como cancerígenos (Verschueren, 1977). Debido a sus efectos tóxicos, los fenoles están clasificados entre las sustancias más peligrosas de acuerdo a la US EPA (Environmental Protection Agency, Atlow *et al.*, 1984). El fenol no es fácilmente degradable y es capaz de inhibir el crecimiento de microorganismos, aún de especies que son capaces de usarlo como sustrato (Annachhatre & Gheewala, 1996).

Diversos organismos han sido estudiados en la biodegradación de fenoles, entre éstos, los hongos han mostrado ventajas como el crecimiento por hifas que colonizan los sustratos para utilizar los nutrientes, pueden crecer en condiciones de estrés ambiental como la baja actividad de agua y a pHs bajos donde el crecimiento de bacterias es limitado (Basha *et al.*, 2010). Los hongos de la podredumbre blanca (HPB) son basidiomicetos que tienen un potencial enorme para la degradación de materiales recalcitrantes (Gao *et al.*, 2010). Asimismo, en los últimos años ha crecido el interés en el estudio de las enzimas lacasas producidas por diferentes HBPs para ser usadas en diversas aplicaciones biotecnológicas.

La inmovilización de microorganismos o enzimas ha sido estudiada en la biorremediación de diferentes áreas incluyendo el tratamiento de aguas residuales y la remoción de compuestos tóxicos. Estas técnicas generalmente proveen ventajas en relación a las células libres como el uso repetido del sistema inmovilizado, son de fácil separación del medio líquido de reacción, le confiere mayor protección a las células o enzimas de los contaminantes y los cambios en la permeabilidad de las células

permiten mejorar la transferencia de sustratos (Dzionic et al., 2016; Ha et al., 2009; Kim et al., 2002). Se han usado diferentes matrices sólidas para la inmovilización de células y enzimas como la espuma de poliuretano, *kappa* carragenina y especialmente el alginato de sodio por su inocuidad y facilidad de manejo. (Datta et al., 2013).

Varios hongos del género *Trametes* han probado su capacidad degradativa de diferentes xenobióticos, como *T. versicolor* que logró crecer en un medio con fenol como única fuente de carbono y remover fenoles y clorofenoles (Yemendzhiev et al., 2011), naftaleno (Manohar et al., 2001), tintes y fenoles complejos en aguas residuales del procesamiento del aceite de oliva (Duarte et al., 2014). Carabajal et al., (2014) evidenciaron la capacidad de *Trametes* para degradar una amplia variedad de contaminantes, lo cual indica que éste género representa un excelente modelo para estudios de biorremediación de fenoles.

En estudios previos el hongo *Trametes hirsuta* Bm2 logró reducir el contenido fenólico durante el tratamiento de vinazas y efluentes textiles, sin embargo el proceso fue limitado debido a la inhibición por los fenoles presentes en los efluentes. El propósito de este trabajo fue desarrollar un sistema con el hongo inmovilizado en alginato de calcio con el fin fue evaluar la remoción de fenoles de un efluente sintético preparado de manera artificial usando un inmovilizado de *Trametes hirsuta*, estableciendo las condiciones de inmovilización y evaluando los ciclos de reúso.

2. ANTECEDENTES

2.1. Lignina

La lignina, es el segundo mayor componente de la materia vegetal después de la celulosa y la forma más abundante de material aromático en la biosfera. La madera y otros tejidos vasculares contienen alrededor del 20 al 30 por ciento de lignina. (Lin & Dence, 1992). Este compuesto se encuentra en mayor proporción dentro de las paredes celulares, y da rigidez a las plantas al mezclarse con las hemicelulosas actuando a su vez como pegamento entre las fibras de celulosa, protegiendo a estos carbohidratos de la hidrólisis enzimática microbiana (Kirk & Farrell, 1987).

Se sabe que la lignina contiene alrededor de 10-20% de grupos hidroxilos fenólicos (figura 2.1), los anillos aromáticos conforman la mayor parte de su estructura, estos junto a los diferentes enlaces presentes en su estructura dan rigidez a la pared celular vegetal y a su vez la protegen de ataques de organismo patógenos. Por lo general la lignina se deriva de tres unidades fenilpropanomonoméricas (monolignoles) básicas: alcohol *p*-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico (Gellerstedt & Henriksson, 2008).

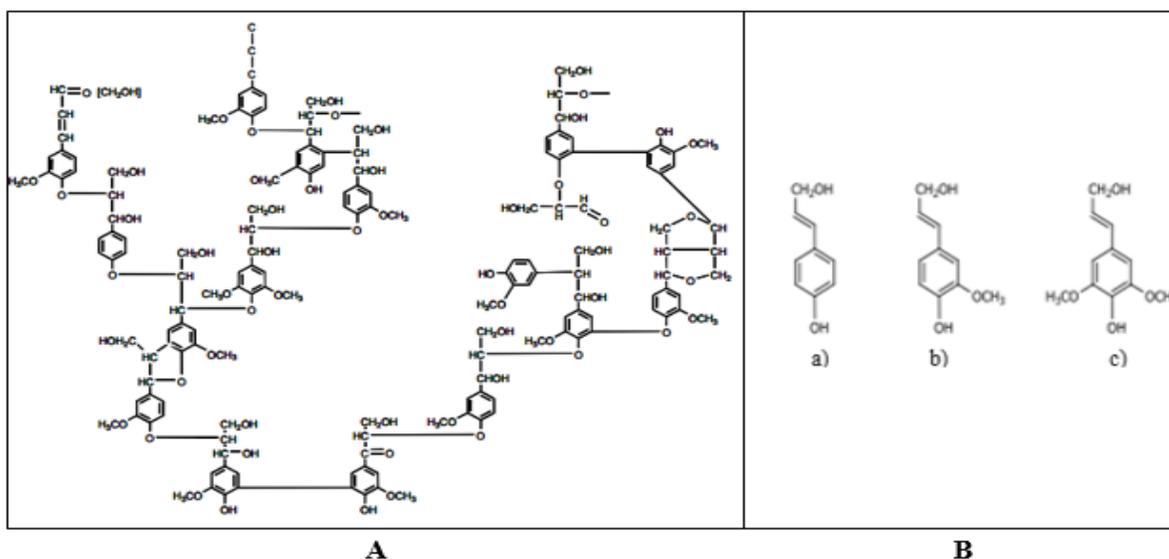


Figura 2.1. A) Estructura parcial de la lignina. B) Tipos de monolignoles más comunes encontrados en los bloques de construcción de la lignina: a): alcohol *p*-cumarílico, b) alcohol coniferílico, c) alcohol sinapílico (Higuchi, 1990).

2.2 Hongos de la podredumbre blanca (HPB)

Los hongos tienen la capacidad de degradar la celulosa y hemicelulosa. Producen enzimas capaces de degradar los componentes de las paredes celulares de las plantas (celulasas, xilanasas, pectinasas y ligninasas) Los hongos denominados de podredumbre blanca de la madera (Kirk & Farrell, 1987), forman el grupo más importante de organismos responsables de la biodegradación del polímero natural más complejo que existe, la lignina. Estos hongos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza; pueden vivir en ambientes húmedos y secos; su temperatura óptima de crecimiento varía entre los 20°C y 30°C y la mayoría pertenecen al grupo *Basidiomycetes* de géneros como *Trametes*, *Pleurotus*, *Lentinula*, *Pycnoporus*, *Phanerochaete* y *Agaricus* (Pointing, 2001).

Muchos hongos son capaces de degradar la lignina, celulosa, hemicelulosa de la madera, pero la velocidad y extensión de la degradación de cada componente de la pared celular varía considerablemente. Los hongos ligninolíticos degradan la lignina para acceder a la celulosa y hemicelulosa que son utilizadas como fuente de carbono o limitación de nutrientes especialmente nitrógeno y carbono (Moreira *et al.*, 2000). La acción de este sistema es estrictamente extracelular y en él intervienen varias enzimas extracelulares esenciales para la transformación inicial de la lignina para posteriormente lograr su mineralización (Pointing, 2001). El metabolismo ligninolítico, es inducido en general por deficiencia o limitación de carbono y nitrógeno (Sathiya, *et al.*, 2007) y puede dar lugar a la producción de tres tipos de enzimas: ligninoperoxidasa (LiP, EC1.11.1.14), manganeso-peroxidasa (MnP, EC 1.11.1.13) y lacasas (Lac, EC 1.10.3.2), cabe mencionar que la producción de estas enzimas varía de un hongo a otro. Las ligninasas son de particular relevancia debido a que su falta de especificidad permite que actúen sobre un amplio número de sustratos, en particular las lacasas son enzimas que han mostrado un gran potencial para su aplicación en la descontaminación de compuestos xenobióticos. Debido a la naturaleza extracelular de las ligninasas, se evita la necesidad de internalizar los sustratos y permite que aquellos

de baja solubilidad sean oxidados, gracias a esto es como los HPB pueden tolerar una mayor concentración de contaminantes tóxicos (Reddy & Mathew, 2001).

2.3 Lacasas

Las lacasas (EC 1.10.3.2) se definen de acuerdo a la nomenclatura de la Comisión de Enzimas, como oxidorreductasas, que oxidan difenoles y sustancias relacionadas y utilizan oxígeno molecular como un aceptor de electrones (Thurston, 1994). Se trata de una de las principales enzimas implicadas en la deslignificación por hongos de podredumbre blanca. (Mayer & Staples, 2002). Es una de las pocas enzimas que han sido objeto de estudio desde finales del siglo pasado y pertenecen al pequeño grupo de enzimas llamadas oxidasas de cobre azul (Thurston, 1994).

El sitio activo de las lacasas está conformado por cuatro iones de cobre ligados a tres sitios redox denominados T1, T2 y T3 (figura 2.2). Los iones de cobre están distribuidos de la siguiente manera:

- Un ión mononuclear de cobre (T1)
- Un grupo de cobre trinuclear (T2/T3) formado por un ión de cobre T2 y dos T3.
- Dos iones de cobre T3.

Las distancias entre los sitios T2 y T3 es de 4 Å, estando el sitio T1 a una distancia aproximada de 12 Å de ellos. Los ligandos del sitio T1 y del grupo T2/T3 son dos histidinas imidazoles y el grupo sulfhidrilo de cisteína, y ocho histidinas imidazoles respectivamente (figura 2.3). (Enguita *et al.*, 2003; Garavaglia *et al.*, 2004).

Las lacasas caracterizadas hasta ahora pertenecen en su mayoría al grupo de los basidiomicetos de pudrición blanca de la madera (Baldrian, 2006). La estabilidad de

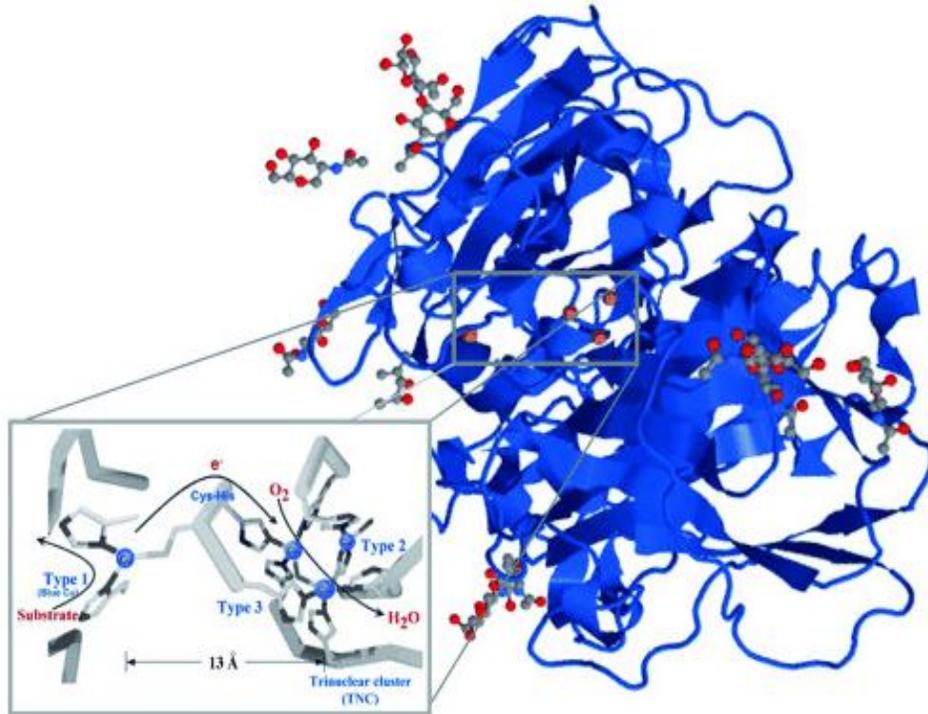


Figura 2.2. Estructura de lacasa de *Trametes versicolor*.

éstas es mayor en valores ácidos de pH, en cuanto a su temperatura óptima y su estabilidad varía considerablemente entre las diversas fuentes de obtención.

Las lacasas de origen fúngico son proteínas en su mayoría monoméricas, de aproximadamente 60-70 kDa, del cual 10-50% puede ser atribuido a la glicosilación. Esta glicosilación es la responsable de la secreción, susceptibilidad proteolítica, actividad, retención de cobre y estabilidad térmica (Madhavi & Lele, 2009). El punto isoeléctrico alrededor de 4 y existe mucha heterogeneidad entre las lacasas aisladas. El pH óptimo de las lacasas se encuentra alrededor de 4, pero el valor óptimo es altamente dependiente del sustrato, en el caso de los fenoles como sustrato, el pH óptimo puede ir de 3 a 7, en cambio cuando se usa ABTS como sustrato, el pH óptimo es más ácido y se encuentra en el rango entre 3 y 5. En general, las curvas de actividad de la lacasa tienen forma de campana con un pH óptimo que varía considerablemente. Esta variación puede ser debido a los cambios en la reacción causados por el sustrato,

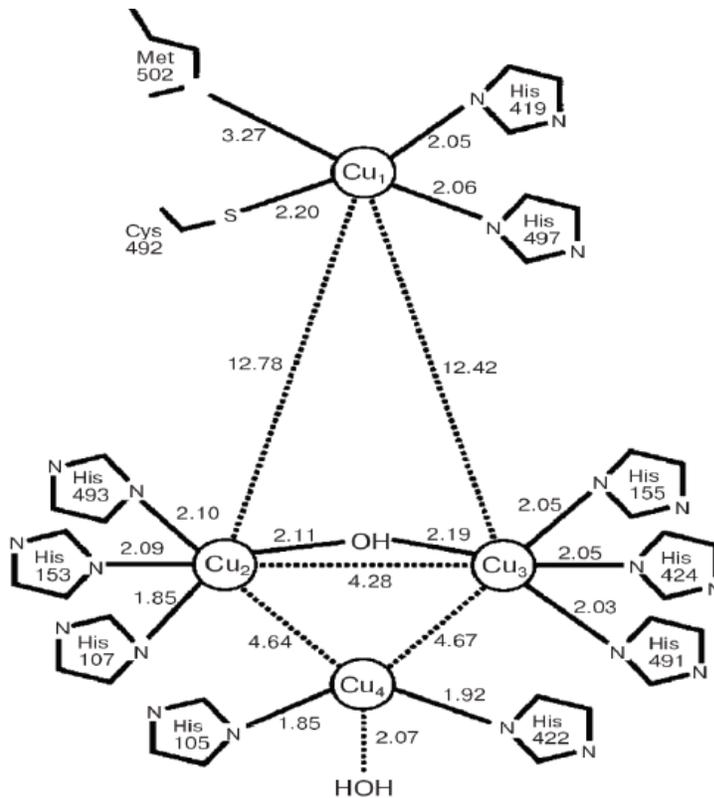


Figura 2.3. Esquema de los sitios de la lacasa T1 (Cu1) y T2/T3 (Cu4 /Cu2-Cu3) de la lacasa CotA de *Bacillus subtilis*, indicando las distancias entre los átomos más importantes (Enguita *et al.*, 2003).

oxígeno o la enzima misma (Madhavi & Lele, 2009). En cuanto a su estabilidad a la temperatura, esta varía considerablemente dependiendo de la fuente de la que provienen, por ejemplo, las lacasas de *Lentinula edodes* tienen una vida media de 2 a 3 horas (D'Annibale, *et al.*, 1996), en cambio en las de *Trametes versicolor* es de 50 a 70 horas de acuerdo a lo aportado por (Smirnov *et al.*, 2001).

Hay mucha literatura que gira en torno a las propiedades bioquímicas, fisicoquímicas y parámetros cinéticos de las lacasas, sin embargo, es difícil comparar debido a que en dichos reportes se han utilizado cepas, sustratos, inductores y condiciones de ensayo diferente.

Entre los sustratos típicos para estas enzimas están los monofenoles, como el ácido sinapínico o guayacol. La naturaleza y la posición de los sustituyentes en el anillo fenólico influye en la eficiencia de la oxidación por unas lacasas en particular. Grupos funcionales electrófilos, específicamente en la posición orto, afectan negativamente a la afinidad del sustrato para la enzima, por el contrario, para los grupos funcionales nucleófilos. Las lacasas también pueden oxidar poliaminas, aminofenol, ligninas, diamina arilo, algunos iones inorgánicos, y también pueden disminuir la toxicidad de algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos (Pozdnyakova, *et al.*, 2004), los pesticidas organofosforados y los colorantes azoicos (Torres *et al.*, 2003).

2.3.1. Mecanismo de acción

No se ha comprendido del todo como ocurre exactamente el mecanismo de transferencia de electrones ni la forma en que ocurre la reducción de oxígeno a agua. Sin embargo, algunos hechos establecidos en cuanto al mecanismo de catálisis de estas enzimas son (figura 2.4):

- 1) Las lacasas reaccionan oxidando al sustrato reduciéndose el ion mononuclear del sitio T1, esto da como consecuencia un radical libre catiónico el cual, al ser inestable, puede ser sometido ya sea a una nueva oxidación catalizada por estas enzimas, para transformar por ejemplo fenol a quinona o por medio de reacciones no enzimáticas, como la hidratación o polimerización.
- 2) Durante la oxidación del sustrato, cada reacción en la que se sustrae un electrón al sustrato, está acoplada a la reducción de cuatro electrones del oxígeno, lo cual no ocurre de manera completamente sencilla. Se cree que las lacasas funcionan de manera semejante a una batería, donde el almacenamiento de electrones de las reacciones de oxidación tiene la finalidad de reducir el oxígeno molecular. Por lo que es necesaria la oxidación de cuatro moléculas de sustrato para la reducción completa del oxígeno molecular a agua.

- 3) Cada electrón extraído de las cuatro oxidaciones monoelectrónicas en el sitio T1 son transferidos al grupo trinuclear T2/T3 en donde se unen al oxígeno molecular. En los sitios T2 y T3 es donde ocurre la reducción del oxígeno molecular y la liberación de agua.

En contraste con otras enzimas ligninolíticas, las lacasas solo pueden oxidar los fragmentos fenólicos de la lignina debido al su bajo potencial redox (que se encuentra entre 450-850 mV) por lo que pueden usar agentes cooxidantes llamados mediadores; que son moléculas de bajo peso molecular que al ser oxidados por las lacasas alcanzan un alto potencial de óxido-reducción que los hace capaces de oxidar la parte no fenólica de la lignina (figura 2.5) (Desai & Nityanand, 2011).

El uso de mediadores sintéticos como el 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfónico) (ABTS) ha permitido extender el rango de sustratos sobre los cuales pueden actuar las lacasas, sin embargo, estos compuestos de origen sintético son caros y tóxicos por lo que recientemente se ha realizado la búsqueda de fenoles derivados de la lignina que actúan como mediadores naturales no tóxicos y han demostrado mejorar la eficiencia en la remoción de compuestos xenobióticos (Kunameni *et al.*, 2008)

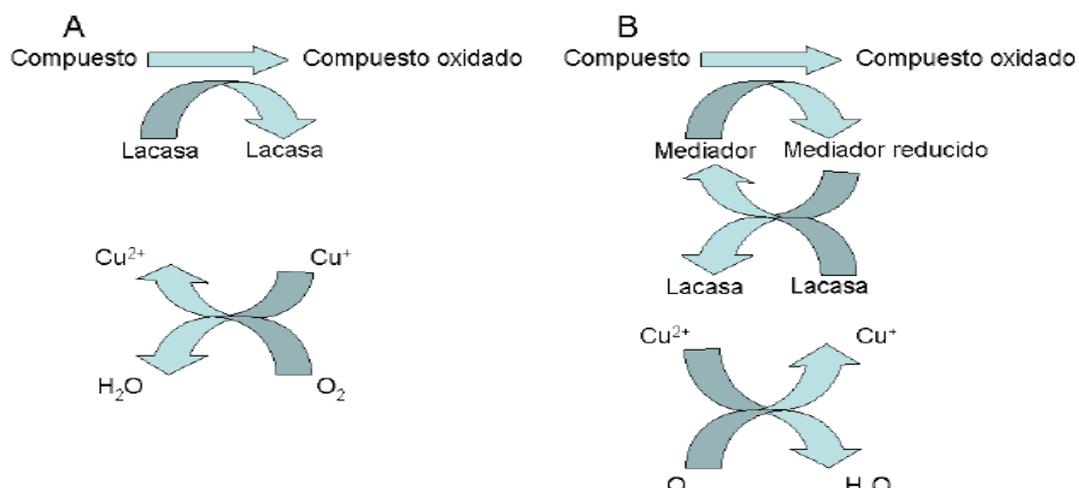


Figura 2.4. Mecanismo de acción de la lacasa (A) de forma directa, (B) con la intervención de un mediador (Arana *et al.*, 2002).

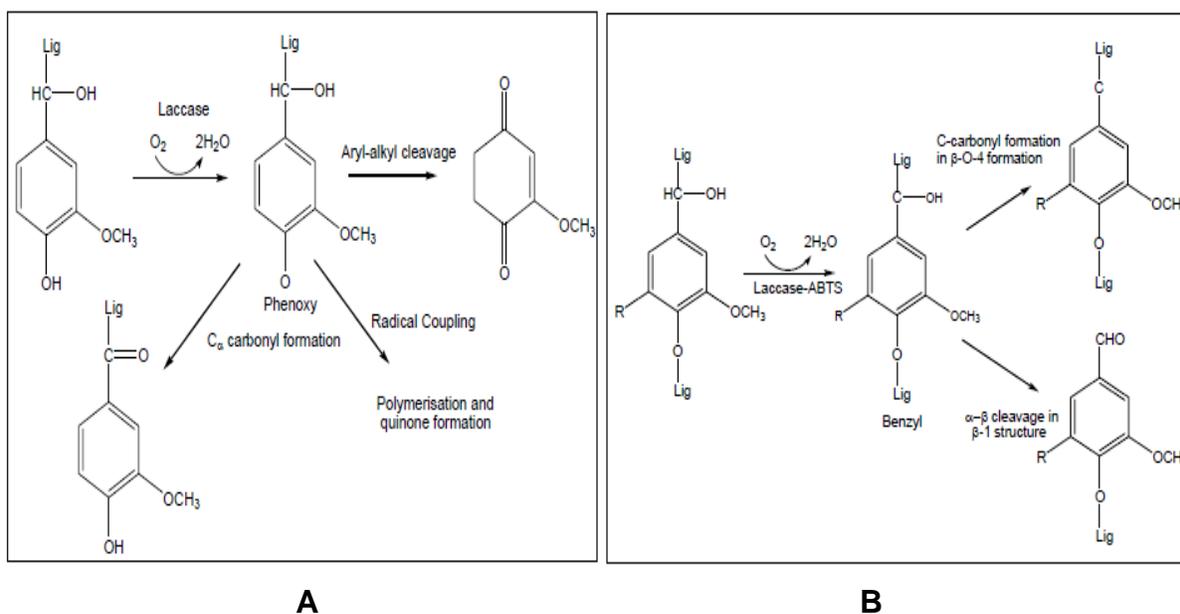


Figura 2.5. Oxidación de (A) subunidades fenólicas de lignina por lacasas y (B) compuestos modelo de lignina no fenólicos por un sistema lacasa- mediador (Archibald *et al.*, 1997).

2.3.2. Tratamiento de contaminantes ambientales

Los tiempos modernos se han caracterizado por la gran producción de materiales sintéticos que son difíciles de degradar y son tóxicos para el ambiente. Con el fin de mejorar su rendimiento, los compuestos han sido diseñados específicamente para tener una larga vida útil y no reaccionar con los productos químicos comunes. Como resultado de las actividades industriales, en los efluentes son vertidos una gran cantidad de contaminantes como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), el benceno, tolueno, etilbenceno, xileno, bifenilos policlorados (PCB) que son conocidos por tener efectos carcinógenos y mutagénicos (Blanquez, 2017).

El fenol es un anillo aromático presente en colorantes y efluentes de la industria textil; este compuesto se encuentra naturalmente en materiales vegetales como raíces,

troncos, vainas y hojas donde es metabolizado a partir de 1-metiletilbenceno (cumeno); en cambio los fenoles sintéticos son originados a partir de la oxidación del tolueno, fusión de sodio y benceno sulfonato con hidróxido de sodio o calentando monoclorobenceno con hidróxido de sodio a baja presión (Robinson *et al.*, 2001). Debido a sus efectos tóxicos están clasificados entre las sustancias más peligrosas de acuerdo a la US EPA (Environmental Protection Agency). Debido a lo anterior, la contaminación ambiental por desechos de monómeros y polímeros fenólicos es reconocida como un problema grave. Debido a su alta toxicidad, los fenoles tienen efectos adversos sobre la biota y los seres humanos, tanto por su acumulación en la cadena alimentaria como por su persistencia en su entorno, por lo que es necesario su tratamiento antes de ser liberados al medio ambiente, a través de la aplicación de diferentes técnicas de tratamiento de efluentes, como la biorremediación que se basa en la capacidad enzimática de diversos tipos de organismos para eliminar compuestos tóxicos.

Existen numerosas técnicas físico-químicas de descontaminación, sin embargo, no todas resultan eficientes para degradar los contaminantes y suelen ser costosas. La inespecificidad química y la intensa actividad oxidante de las lacasas les confieren una considerable capacidad de degradar diferentes compuestos orgánicos con estructura similar a la de las unidades monoméricas que constituyen la lignina. Entre los diferentes xenobióticos se encuentran los compuestos orgánicos clorados (pentaclorofenoles, cloroanilinas, bifenilos policlorados), azocolorantes, etc.

El primer estudio de la degradación de compuestos aromáticos por hongos como *Phanerochaete chrysosporium* fue llevado a cabo por Bumpus *et al.*, 1985. Este hongo ha demostrado ser capaz de degradar, adsorber y detoxificar efluentes que contienen clorofenoles (Mathialagan & Viraraghavan, 2009). Dada su capacidad para degradar clorofenoles algunas potenciales aplicaciones de *P. chrysosporium* han sido exploradas, por ejemplo la detoxificación y decoloración de efluentes de la industria papelería o el tratamiento de suelos contaminados con residuos contaminantes de

madera (Paszcanski & Crawford, 1995). Gusse *et al.*, 2006 fueron los primeros en reportar la biodegradación de resinas fenólicas por el hongo ligninolítico *Phanerochaete chrysosporium*. Sundarapandiyar *et al.*, (2010) reportaron que *Trametes versicolor* fue capaz de degradar un producto comercial llamado Basyntan DI que es un condensado de fenol y naftol en un periodo de ocho días. Carabajal *et al.*, (2014), evaluaron la capacidad de 26 cepas de hongos basidiomicetos para remover fenoles como el resorcinol, *p*-cresol y *o*-nitrofenol, siendo *Trametes versicolor* el hongo que removió la mayor concentración de fenoles adicionados como única fuente de carbono. Su acción fue asociada a procesos de adsorción a la pared del hongo y a la biotransformación de los compuestos por las lacasas producidas.

Las lacasas son consideradas enzimas "ahorradoras de energía", que junto con su biodegradabilidad las convierten en biocatalizadores eficientes, sostenibles y amigables con el medio ambiente. Sin embargo, a pesar de las ventajas que ofrecen estas enzimas, aún se requiere vencer ciertos impedimentos técnicos y económicos para su aplicación, siendo uno de los más importantes su costo de producción, problemas de estabilidad y difícil separación del producto final. Asimismo, las lacasas son enzimas sensibles a inhibición en presencia de altas concentraciones de compuestos fenólicos.

En base a lo antes mencionado es necesario buscar alternativas para poder aplicar los procesos microbianos o enzimáticos en el biotratamiento de fenoles. Una alternativa es la inmovilización del hongo y/o las enzimas sobre un soporte (Silva *et al.*, 2002; Cao, 2005; Blázquez, 2015) para que pueden crecer y actuar respectivamente en sistemas altamente tóxicos.

2.4 Inmovilización de enzimas y células

La inmovilización es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima o célula en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente. (Wingard, 1972). La aplicación de sistemas de inmovilización en bioremediación tiene varias ventajas en relación al uso de células o enzimas libres como son la actividad prolongada, estabilidad del biocatalizador, utilización en procesos continuos o semicontinuos, incremento en la tolerancia a altas concentraciones de los compuestos tóxicos, fácil recuperación, posibilidad de reuso del catalizador, reducción del riesgo de contaminación microbiana y el uso de biorreactores pequeños con un proceso simplificado (Dzionic *et al.*, 2016). Estas ventajas, hacen de la inmovilización una herramienta atractiva como alternativa tecnológica en varios procesos como en la solución de problemas ambientales tales como: remoción de pesticidas, degradación de pigmentos, compuestos fenólicos y en productos alimenticios (Akin, 1987; Norton & Vuilleumard, 1994). Los principales inconvenientes del proceso de inmovilización son: la alteración de la conformación de la enzima respecto a su estado nativo, la pérdida de actividad enzimática o viabilidad de la célula, heterogeneidad del sistema enzima/célula-soporte, además de que el biocatalizador puede ser más caro que la enzima nativa (Spahn & Minteer, 2008; Elnashar, 2010; Tran & Balkus, 2011).

Algunos problemas de la inmovilización de enzimas han despertado el interés de inmovilizar células a manera de biocatalizadores. La principal ventaja que presenta la inmovilización de células respecto a enzimas es que los procesos de extracción y purificación son innecesarios. Al mismo tiempo la inmovilización de células cuenta con desventajas como la complejidad entre el microorganismo y su medio físico y químico ya que existe poco control sobre el microambiente del sistema inmovilizado.

2.4.1 Inmovilización por atrapamiento

Consiste en la retención física de la enzima o célula en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano. El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución del monómero. Seguidamente se inicia la polimerización por un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico. El atrapamiento puede ser en geles o en fibras, que suelen ser más resistentes que los geles. En el primer caso, la enzima queda atrapada en el interior de un gel, mientras que en el segundo caso la enzima se encuentra ocluida dentro de las microcavidades de una fibra sintética. (Arroyo, 1998).

2.4.2 Inmovilización por inclusión en membranas

Microencapsulación: En esta técnica, las células o enzimas están rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no de enzima. Estas membranas semipermeables pueden ser permanentes (originadas por polimerización interfacial) o no permanentes (generadas por surfactantes, también llamadas “micelas reversas”). Las microcápsulas obtenidas son de forma esférica, con tamaños comprendidos entre 1 y 100 μm de diámetro. Mediante este método se pueden encapsular simultáneamente una gran variedad de enzimas, células o biomoléculas, permitiendo que se lleven a cabo determinadas reacciones que suceden en múltiples pasos (Klei, Sundstrom, Shim, 1985).

2.4.3 Inmovilización por adsorción

Las enzimas se pueden unir químicamente a los soportes mediante la adsorción o por unión covalente. En la adsorción, la enzima se une a un soporte inerte mediante

interacciones iónicas, hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals y por puentes de hidrógeno. Los principales factores que influyen en la adsorción, son:

a) pH del medio que controla el número y la naturaleza de las cargas que presenta la superficie de la proteína y del soporte,

b) la fuerza iónica que al aumentar a ciertos límites produce la desorción de la enzima, ya que los iones inorgánicos se unen con más fuerza al soporte que la proteína,

c) el diámetro de poro que debe ser aproximadamente dos veces el tamaño del eje mayor de la enzima y

d) la presencia de iones que actúen como cofactores de la enzima, ya que pueden incrementar la carga enzimática del derivado (Arroyo, 1998).

2.4.4 Inmovilización por unión covalente

La unión covalente de una enzima a un soporte es quizá el método de inmovilización más interesante desde el punto de vista industrial. La metodología de la unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas.

De entre los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de las enzimas, los más empleados para la formación de enlaces con el soporte son principalmente la lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina, y en menor medida la metionina, el triptófano, la arginina, el ácido aspártico y glutámico. El resto de aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica, y no pueden intervenir en la unión covalente. (Arroyo, 1998).

2.4.5 Inmovilización por reticulado

También denominado entrecruzamiento o cross-linking, es una técnica que ha sido ampliamente utilizada en la estabilización de muchas enzimas (Wong, 1992). El método del reticulado consiste en uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de enzima. Como reactivos bifuncionales se pueden emplear dialdehídos, diiminoésteres, diisocianatos, sales de bisdiazonio e, incluso, diaminas si están activadas con carbodiimida. El resultado del reticulado son enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura.

El co-reticulado, permite eliminar las pérdidas de actividad enzimática debidas a efectos difusionales, mediante el entrecruzamiento de las enzimas con una proteína sin actividad enzimática y rica en residuos de lisina (por ejemplo, la albúmina bovina). Un procedimiento mixto de inmovilización muy común consiste en inmovilizar la enzima por adsorción sobre una resina de intercambio iónico o un soporte polimérico (con lo que se consigue una elevada carga enzimática) y posteriormente añadir el reactivo bifuncional. (Arroyo, 1998)

2.5 Ventajas y desventajas de las diferentes técnicas de inmovilización

Dentro de los métodos de inmovilización presentados se pueden resaltar las siguientes ventajas y desventajas en el momento de la tarea de elegir el método adecuado de inmovilización (tabla 2.1)

Tabla 2.1.

Ventajas y desventajas de los tipos de inmovilización.

Técnica	Ventajas	Desventajas
Unión física		
Atrapamiento	La enzima o célula no sufre alteraciones químicas. Proporciona mayor estabilidad.	Desprendimiento del soporte
Encapsulación	Se pueden encapsular sistemas multienzimáticos.	Rotura de las cápsulas.
Unión química		
Unión covalente	La unión es muy fuerte. Mayor estabilidad.	Pérdida de actividad enzimática. Requiere la protección del centro activo de la enzima para evitar su alteración.
Adsorción	Retención de la actividad enzimática. Preparación sencilla.	La unión soporte-enzima es muy débil.
Entrecruzamiento	Gran estabilidad de la enzima debido a la rigidez de la estructura.	Pérdida de la actividad enzimática.

*Tomado de Sánchez-Ramírez *et al.*, 2014

2.6 Alginato

El alginato de calcio es el principal soporte utilizado en la inmovilización por atrapamiento. El alginato es un copolímero lineal extraído de algas y formado por dos ácidos urónicos el D- manurónico y L-gulurónico, distribuidos en secciones de homopolímeros, intercalados con secuencias donde se encuentran ambos monómeros (Akin, 1987; Groboillot *et al.*, 1994). Después de su procesamiento el alginato está disponible como una sal de sodio, el cual es soluble en agua y cuando se pone en contacto con cationes polivalentes como: Ca^{+2} , Ba^{+2} , Al^{+3} , Co^{+2} , Fe^{+3} , Fe^{+2} gelifica por intercambio iónico (figura 2.6) (Groboillot *et al.*, 1994). La capacidad de gelificar en presencia de estos cationes depende principalmente del contenido de ácido gulurónico.

Las ventajas de utilizar este biopolímero es que la inmovilización se lleva a cabo a condiciones suaves y no se requieren agentes enlazantes. Adicionalmente, el alginato no es tóxico, es estable a pH ácido y cuenta con la aprobación de la FDA para uso farmacéutico y en alimentos. Sin embargo, es inestable en presencia de agentes quelantes como fosfato, lactato y citrato debido a su elevada afinidad por el calcio, lo que provoca la desestabilización del gel (Akin, 1987).

Por otra parte, se ha reportado la efectividad del uso de biopolímeros en la reducción de contaminantes en diferentes tipos de aguas residuales (efluentes de la agroindustria, de la industria del petróleo, entre otras). Retes-Pruneda *et al.*, (2014) desarrollaron un método que consistió en un tratamiento fisicoquímico de alginato de sodio seguido de un tratamiento biológico con hongos de la podredumbre blanca para la biorremediación de vinazas del tequila obteniendo resultados alentadores. También se ha demostrado que la aplicación de los biopolímeros alginato y quitosano remueve cantidades considerables de DQO y fenoles debido a su capacidad coagulante-floculante (Vacío-Muro *et al.*, 2015)

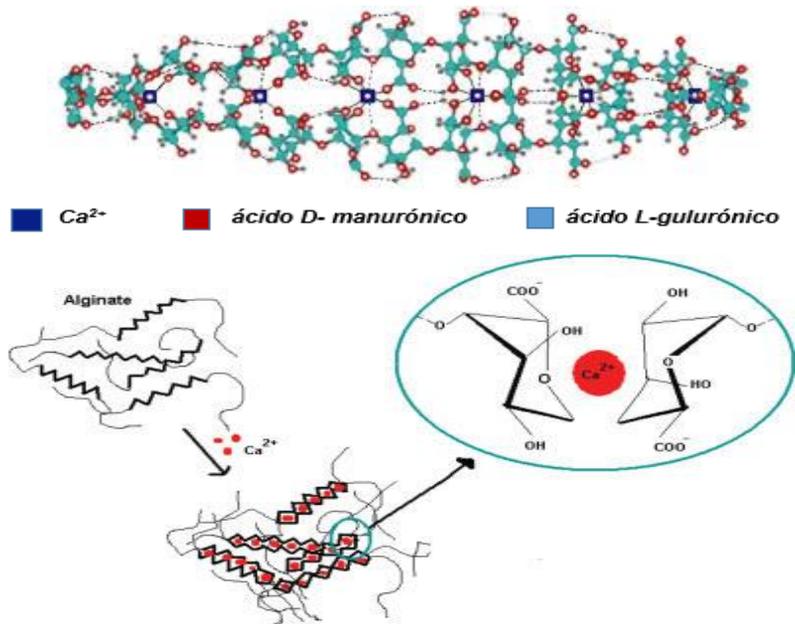


Figura 2.6. Polimerización de la molécula de alginato con iones de calcio.

Las esferas de alginato de calcio se pueden producir por el método de extrusión (figura 2.7), que consiste en mezclar una suspensión de células con una solución de alginato de sodio estéril, y la mezcla es goteada por medio de una jeringa en solución fría de $CaCl_2$ donde instantáneamente se formarán las esferas de gel con las células inmobilizadas (Groboillot *et al.*, 1994).

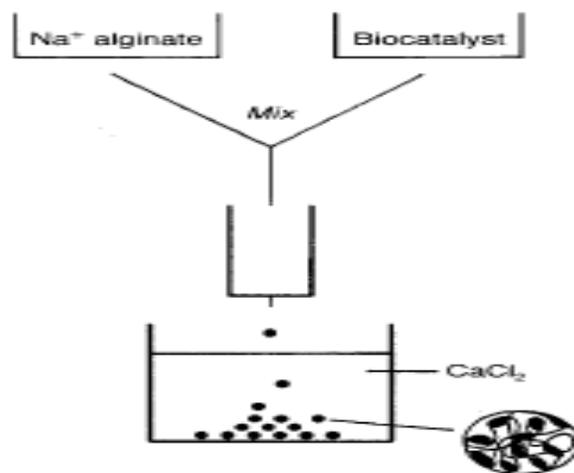


Figura 2.7. Procedimiento general de atrapamiento en alginato (Smidsrod & Skjak-Braek, 1990)

2.7 Factores involucrados durante la inmovilización en esferas de alginato de calcio

Algunos de los factores involucrados en la inmovilización de células por atrapamiento en esferas de alginato de calcio mediante el método de extrusión son los presentados a continuación. Estos parámetros influyen de manera importante en la eficiencia biocatalítica, además se han relacionado con las respuestas fisiológicas de los sistemas inmovilizados respecto a sus contrapartes libres, inducidos por problemas de transferencia de masa y modificaciones en el microambiente celular (Groboillot *et al.*, 1994; Junter *et al.*, 2002).

2.7.1 Concentración de gel

La concentración de gel afecta directamente la dureza e integridad de las esferas formadas, y en el caso de las producidas con alginato de sodio, además de su concentración el contenido de ácido gulurónico y peso molecular son determinantes. En experimentos para inmovilizar *Saccharomyces cerevisiae* en cubos de alginato de sodio se observó que su dureza disminuye a menor cantidad de ácido gulurónico en el alginato, pero también cuando el peso molecular es muy bajo (viscosidad de 5 cp a 1% de alginato de sodio), o a bajas concentraciones. Bajo estas condiciones, se formaron cubos suaves que permitieron una mayor transferencia de sustratos y productos lo que mejoró la fermentación alcohólica (Johansen, 1986). La concentración de alginato utilizada para inmovilizar células de *Aspergillus niger* 26, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas sp.* BA2 fue de 3% (p/v) (Bódalo *et al.*, 1997; Angelova *et al.*, 1998; Quintana y Dalton, 1998). Para las dos primeras esta concentración fue considerada como la óptima, en donde las esferas desarrollaron una dureza adecuada que permitió su reuso. En el caso de *Aspergillus niger* 26, una concentración mayor de alginato de calcio ocasionó un incremento en la viscosidad del gel impidiendo la formación de esferas, mientras que una menor las suavizó y fragmentó. Las esferas producidas con 3% de alginato de calcio retuvieron el micelio de *Aspergillus niger* 26, sin afectar de manera importante la actividad respiratoria del

microorganismo (Pashova *et al.*, 1999b). En otros trabajos se han señalado la concentración de alginato de calcio de 2.78 % como estadísticamente óptima en la inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae* en donde se obtuvo mayor dureza en las esferas con una conversión del 74.56 % de glucosa a alcohol (Jamuna *et al.*, 1992).

2.7.2 Diámetro de esferas

El tamaño de las esferas depende principalmente del proceso de producción. Para las esferas obtenidas por extrusión, el diámetro de la aguja determina en gran medida su tamaño (Poncelet & Neufeld, 1989). La mayoría de los experimentos a nivel laboratorio utilizan la extrusión con aguja o micropipeta cortada en la punta para producir las esferas de alginato de calcio. De esta manera se han obtenido diámetros promedio de 2.5-3, 4 y 5 mm para inmovilizar *Aspergillus niger* (Angelova *et al.*, 1998); *Bacillus* (Jamuna & Ramakrishna, 1992) y *Pseudomonas sp.* BA2 (Bódalo *et al.*, 1997) respectivamente, pero, en estos estudios no se especificó el calibre de la aguja utilizada. Otra investigación señaló que una aguja con un diámetro interno de 0.8 mm produjo esferas de 1.98 mm en la inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae*, sin modificar su viabilidad medida por el consumo de glucosa respecto a la célula libre (Sriamornsak, 1998). Sin embargo, levaduras inmovilizadas en esferas de 2.4 mm de diámetro si presentaron diferencias en la difusión de glucosa y etanol (Hannoun & Stephanopoulos, 1986). En general, se recomienda que los diámetros de las esferas sean menor es a 1 mm, ya que disminuyen los problemas de transferencia de masa de la célula inmovilizada, e incrementa su resistencia mecánica (Poncelet & Neufeld 1989).

2.7.3 Concentración de inóculo

La concentración de células atrapadas en las esferas influye directamente en los rendimientos de los productos obtenidos. Se ha reportado que concentraciones iniciales elevadas de células producen rendimientos máximos de producto. Por

ejemplo, 1×10^9 células de *Bacillus* por esfera de alginato de calcio produjeron 130 U/ml de α -amilasa, mayor a la obtenida con 1×10^8 células por esfera con 50 U/ml (Jamuna & Ramakrishna, 1992). No obstante, en *Bacillus* se ha determinado que concentraciones de inóculo elevadas pueden afectar la transferencia de masa en las esferas, debido a la alta densidad celular producida por el crecimiento del microorganismo (Jamuna & Ramakrishna, 1992); mientras que de manera diferente en hongos filamentosos como *A. niger* 26, el rápido crecimiento del micelio formó una capa densa sobre las esferas, que facilitó la transferencia de oxígeno, alcanzando a las hifas sin atravesar el alginato. En este caso, la cantidad de biomasa producida por el micelio inmovilizado fue la misma, independientemente de la concentración inicial de inóculo utilizada (Angelova *et al.*, 1998).

2.7.4 pH

El pH del medio de cultivo tiene un efecto no sólo en la fisiología de las células sino, también en la síntesis y secreción de proteínas (Trejo-Aguilar *et al.*, 1996) y en el pH celular interno. En células inmovilizadas en alginato de calcio se ha observado un efecto protector a cambios de pH extracelular. Por ejemplo, células inmovilizadas de *Saccharomyces bayanus* fueron capaces de mantener un pH interno mayor que el externo durante la fermentación, mientras en las libres disminuyó rápidamente. Este mantenimiento del pH citoplásmico en las células inmovilizadas tuvo un efecto regulatorio sobre el metabolismo el cual favoreció la producción de etanol (Taipa *et al.*, 1993). Un efecto protector similar también ha sido reportado en *S. cerevisiae* inmovilizada en alginato de calcio. En estos trabajos, las variaciones de pH entre 2.5 a 6.2 del medio de fermentación no tuvieron ninguna influencia en la capacidad fermentativa de la levadura, en contraste con las células libres que mostraron un pH óptimo de 4.0 (Buzás *et al.*, 1989).

2.7.5 Temperatura

En los sistemas de fermentación la temperatura influye directamente en la demanda de oxígeno, crecimiento, morfología y actividad metabólica de las células (Schügerl *et al.*, 1998) los cuales tienen un efecto directo sobre la producción de metabolitos (Znidarsic & Pavko, 2001). El efecto de la temperatura ha sido poco evaluado en los sistemas inmovilizados. En la mayoría de los estudios en donde se emplean métodos de inmovilización de células productoras de enzimas, la temperatura a la que se evalúa el sistema inmovilizado es similar a la utilizada en células libres. No obstante, en algunos microorganismos la temperatura óptima a la que se obtiene los metabolitos, puede ser modificada cuando las células se inmovilizan. Por ejemplo, el incremento de la temperatura de fermentación desde 37 a 40 °C en células de *Lactobacillus amylovorus* inmovilizadas en alginato de calcio mejoró la concentración de ácido láctico en un 14% respecto a las libres crecidas a 37 °C (Yan *et al.*, 2001). En otra investigación, la inmovilización de *Candida krusei* en esferas de alginato de calcio produjo una mayor actividad de fitasas a una temperatura óptima de 55 °C, la cual fue de 15 °C mayor que las células libres (Quan *et al.*, 2003).

2.8 Efectos de la inmovilización por atrapamiento en alginato de calcio

Las respuestas fisiológicas de las células pueden variar en función del método de inmovilización utilizado, y el uso de técnicas de atrapamiento induce limitaciones de transferencia de masa y cambios en las propiedades fisicoquímicas del microambiente que influyen sobre el metabolismo celular. La mayor parte de los estudios de la fisiología de células inmovilizadas por atrapamiento, han sido relacionados con las limitaciones de transferencia de masa y en el microambiente celular. Es importante señalar que es escasa la información en hongos de la podredumbre blanca.

Las limitaciones de transferencia de masa el consumo de oxígeno, nutrientes y remoción de productos en numerosos microorganismos inmovilizados en geles diversos, están bien documentadas, y en procesos aeróbicos la difusión de oxígeno parece ser el factor crítico (Norton & D'Amore, 1994). El efecto del consumo de oxígeno

sobre el crecimiento ha sido estudiado en *S. cerevisiae*, *Pseudomonas putida* y *A. niger* atrapados en alginato de calcio (Grosmann & Jürgen, 1986). La incubación de estos microorganismos retenidos en esferas formó un gradiente de oxígeno y nutrientes a lo largo del diámetro, lo que resultó en diversas velocidades de crecimiento, concentrándose la biomasa principalmente en la periferia y disminuyendo en el centro de la misma. Este comportamiento, modificó el factor de efectividad (η) donde η =velocidad específica de consumo de oxígeno en células inmovilizadas/velocidad específica de consumo de oxígeno en células libres. Si $\eta = 1$ significa que la barrera de difusión no tiene influencia en la actividad respiratoria.

Se han establecido también algunos de los factores microambientales que afectan el comportamiento metabólico de las células atrapadas en esferas de gel, éstos incluyen la disminución de la actividad de agua que está relacionada con un incremento de la presión osmótica, y la disminución de la presión de oxígeno (Mattiasson & Hahn-Hägerdal, 1982), así como la presencia de cargas iónicas (Groboillot *et al.*, 1994). La menor disponibilidad de agua en células de *S. cerevisiae* atrapadas en alginato de calcio, se ha relacionado con el hecho de que el agua queda atrapada durante su polimerización y en consecuencia se eleva la presión osmótica sobre las células (Mattiasson & Hahn-Hägerdal, 1982).

Para compensar este estrés ambiental, se incrementa de forma intracelular la secreción de ciertos metabolitos como glicerol, polietilenglicol, manitol, ectoína etc. Se cree que la presencia de éstos es el disparador de rearrreglos o nuevas rutas metabólicas, lo que ocasiona un incremento de los rendimientos de sustancias del metabolismo de mantenimiento como son las enzimas, conforme se deteriora su crecimiento celular. Asimismo, la baja presión de oxígeno altera las condiciones de oxidoreducción afectando el balance entre NADH y NADPH, lo que lleva a la formación de metabolitos secundarios como ácidos grasos, carotenoides, etc. (Mattiasson & Hahn-Hägerdal, 1982).

La presencia de iones en el microambiente celular también puede afectar la fisiología de las células inmovilizadas. Se ha señalado que los iones de Ca^{+2} afectaron la fisiología de *Mycobacterium* sp. E3 incrementando la producción de 1,2 epoxipropano a partir de propano. A pesar de que no se estableció el mecanismo del efecto de Ca^{+2} sobre el *Mycobacterium* sp. E3, se observó una estimulación de la respiración endógena de las células, que se relacionó con un incremento en la velocidad de utilización del glucógeno (Smith *et al.*, 1993).

2.9 Inmovilización de lacasas y células de hongos de la podredumbre blanca

Las lacasas son excelentes biocatalizadores para aplicaciones biotecnológicas y ambientales debido a su alta actividad, selectividad y especificidad, que les permiten llevar a cabo procesos químicos complejos en condiciones experimentales y naturales (Mateo *et al.*, 2007). Sin embargo, el uso de estas enzimas para aplicaciones prácticas es todavía limitado debido a su baja estabilidad y los altos costos de producción (Hu *et al.*, 2007; Rekuć *et al.*, 2009b.).

La inmovilización de las lacasas es una alternativa para superar algunas de las limitaciones antes mencionadas ya que puede haber una mejora de algunas de las propiedades de la enzima (Kunamneni *et al.*, 2008). Las lacasas inmovilizadas se pueden separar fácilmente de los productos de reacción, permitiendo que las enzimas para ser empleados en las operaciones de biorreactor continuas (Arroyo, 1998; Arica *et al.*, 2009). La aplicación de lacasas inmovilizadas ha sido principalmente estudiada en el área de ambiental en el tratamiento de efluentes.

La inmovilización de células de HPB también ha sido estudiada durante las últimas décadas como la solución y el mejoramiento de sistemas utilizados con fines biotecnológicos. Bajo muchas condiciones las células inmovilizadas tienen ventajas sobre las células libres y las enzimas inmovilizadas. El principal problema del uso de células libres, en los sistemas de tratamiento de efluentes, es que la alta concentración

de los contaminantes generalmente inhibe la acción de las enzimas. Se ha reportado que la inmovilización, puede brindar un efecto protector a las enzimas (Mishra *et al.*, 2001). Cuando se usan células inmovilizadas en procesos de biorremediación se logra un incremento en la tasa de biodegradación, debido a las altas densidades celulares que se alcanzan, además de incrementar la estabilidad y tolerancia de los microorganismos a los compuestos tóxicos (Hanaki *et al.*, 1994; Godjevargova *et al.*, 2003). En la tabla 2.2 se presentan algunos reportes en torno a la inmovilización de lacasas y hongos de la podredumbre blanca.

Tabla 2.2

Aplicación de lacasas y células inmovilizadas en alginato.

Fuente	Técnica de Inmovilización	Soporte	Aplicación	Referencia
Lacasas				
<i>Coriolus versicolor</i>	Adsorción	Carbón activado	Degradación de xenobioticos	Zhang <i>et al.</i> , 2006
<i>Coriolus versicolor</i>	Unión covalente	Quitosano	Degradación de xenobióticos	Zhang <i>et al.</i> , 2009
<i>Trametes versicolor</i>	Adsorción	Perlas magnéticas	Decoloración de tintes	Bayramoglu <i>et al.</i> , 2010b
<i>Novzynes</i>	Adsorción - reticulación	MCF-sílica	Decoloración de Alizarina Roja e Indigo Azul	Zhao <i>et al.</i> , 2011
<i>Novozymes</i>	Atrapamiento	Alginato de Calcio	Decoloración de Direct Blue 2	Sanlier <i>et al.</i> , 2013
<i>Lentinus polychorus Lev.</i>	Atrapamiento	Alginato de bario	Degradación de paracetamol	Ratanapongleka & Supot, 2017
Hongos de la Podredumbre Blanca				
<i>Funalia trogii</i>	Encapsulación	Alginato de sodio	Decoloración Negro ácido 52	Park <i>et al.</i> , 2006

<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Atrapamiento	Alginato de calcio	Remoción de fenol por adsorción	Farkas <i>et al.</i> , 2013
<i>Trametes versicolor</i>	Adsorción	<i>Luffa aegyptica</i>	Degradación de fenol, nitrofenol, licor negro, Azure B	Carabajal <i>et al.</i> , 2015
<i>Trametes versicolor</i>	Atrapamiento	Alginato de calcio	Degradación de Azure B	Carabajal <i>et al.</i> , 2015
<i>Trametes versicolor</i>	Atrapamiento-reticulación	Alginato-quitosano	Deslignificación de la lignina	Asgher <i>et al.</i> , 2017

3. JUSTIFICACIÓN

Los fenoles presentes en efluentes industriales son contaminantes difícilmente biodegradables que representan un riesgo a la salud y el medio ambiente. Usualmente son aplicados tratamientos físico-químicos que generan grandes cantidades de lodos difíciles de disponer. En este sentido, es importante el desarrollo de procesos amigables con el medio ambiente como el empleo de hongos de la podredumbre blanca que son capaces de eliminar diversos compuestos recalcitrantes hasta su mineralización a CO₂ y H₂O. La acción de estos hongos se basa en su capacidad de adsorber los fenoles en la pared celular y/o a la participación de enzimas como las lacasas que actúan oxidando a los fenoles. Es importante señalar que es muy escasa la información relacionada con la remoción de fenoles por hongos aun cuando es prioritario el establecimiento de procesos inocuos de biorremediación ambiental. *Trametes hirsuta* Bm2 es un hongo autóctono de la península de Yucatán que produce altos títulos de lacasas y ha logrado remover fenoles de efluentes reales aunque de manera limitada. La inmovilización de lacasas o del hongo en alginato de calcio representa un sistema que actúa como barrera protectora sobre el efecto inhibitorio de los fenoles, lo que podría mejorar la eficiencia en la remoción de fenoles de un efluente real. Asimismo, el sistema inmovilizado podría ser reutilizado generando un proceso más rentable para la remoción de fenoles en efluentes y para la producción de lacasas que tienen un gran potencial en procesos biotecnológicos.

4. HIPOTESIS

Las lacasas o células de *Trametes hirsuta* Bm2 inmovilizadas en alginato de calcio son capaces de remover fenoles.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Obtener un sistema inmovilizado de enzimas o células de *T. hirsuta* por atrapamiento en alginato de calcio para la remoción de fenoles de un efluente sintético.

5.2 Objetivos específicos

- Producir lacasas en salvado de trigo y células por fermentación sumergida.
- Evaluar la capacidad de la remoción de fenoles por células de *T. hirsuta* y lacasas libres.
- Evaluar algunos factores como el tamaño de la esfera, la concentración de micelio y de CaCl_2 en la inmovilización de células o enzimas en alginato de calcio para establecer las mejores condiciones de remoción de fenoles
- Comparar la remoción de fenoles del sistema libre con respecto al inmovilizado.
- Determinar los ciclos de reuso del sistema inmovilizado.
- Determinar por HPLC el contenido de ácido vainillico, guayacol y 2,6 dimetoxifenol antes y después del tratamiento.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

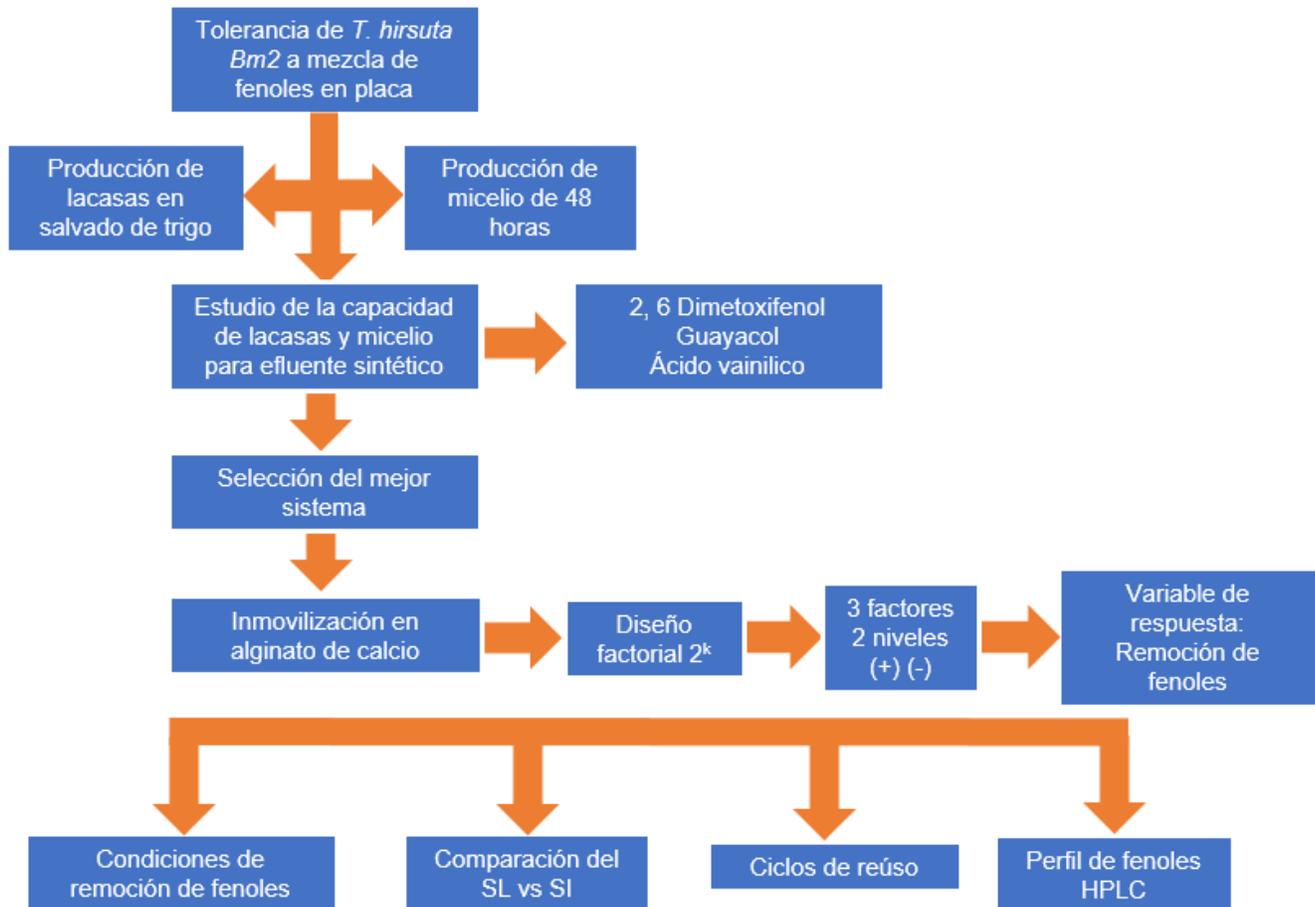


Figura 1.1 Secuencia de pasos para la inmovilización de *T. hirsuta* Bm2 y su evaluación en la remoción de fenoles.

7. METODOLOGÍA

7.1 Microorganismo

Se usó *Trametes hirsuta* Bm2, una cepa aislada de desechos de madera de Yucatán que forma parte de la colección del Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Microbiana del Instituto Tecnológico de Mérida (Tapia-Tussell, 2011). La cepa fue mantenida en placas con 2 % (p/v) de extracto de malta (EM) y 2 % de agar bacteriológico. El medio se esterilizó durante 15 minutos a 121 °C y 15 psi. La inoculación se llevó a cabo adicionando al medio una superficie de 1 cm² de micelio y se incubó a 35 °C por 4 días y se almacenó a 4 °C.

7.2 Estudio de crecimiento del hongo en medio suplementado con fenoles

El estudio de tolerancia del hongo *T. hirsuta* a los fenoles fue evaluado usando la metodología de Carabajal *et al.*, (2014) con modificaciones donde se determinó la velocidad de crecimiento del hongo en placas que contenían medio EM (extracto de malta al 2% y agar bacteriológico al 2%) suplementado con diferentes concentraciones del efluente sintético (ES). El ES consistió en una mezcla de fenoles preparada con 2,6-dimetoxifenol, guayacol y ácido vainílico diluidos en etanol y esterilizados en sweenex con membrana Millipore de 0.22 µm antes de adicionarlos al medio de cultivo. El medio EM estéril fue suplementado con distintas concentraciones de efluente sintético de 50 a 5000 µM. El inóculo de los medios con fenoles consistió en un cuadro de micelio (1 cm²) procedente de un cultivo de 4 días en el mismo medio y también se inocularon placas sin ES que sirvieron como control. Las placas fueron incubadas a 35°C por 5 días. Se evaluó la tasa de crecimiento midiendo el diámetro la extensión radial de las colonias a intervalos de 24 horas para calcular la velocidad de crecimiento (mm.día⁻¹), las determinaciones se realizaron por triplicado sin réplicas.

7.3 Producción de lacasas y micelio por *Trametes hirsuta* Bm2

La producción del inóculo se realizó adicionando el hongo en cajas de Petri con medio de extracto de malta y agar bacteriológico que se incubó por 4 días a 35°C. Posteriormente se cortó 1 cm² del micelio y se adicionó a cada matraz Erlenmeyer de 125 ml con 50 ml de medio YMPG (**Anexo 1**) (Bonnarme & Jeffries, 1990), Los matraces se incubaron a 35°C y 150 rpm durante 4 días para obtener el inóculo del cultivo para la producción de lacasas. El micelio fue homogenizado en un Ultraturrax. Para la producción de lacasas se prepararon matraces Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de buffer de fosfatos 50 mM pH 6 y 3% (p/v) de salvado de trigo. Se inocularon 2 ml del micelio homogenizado por cada matraz. Se incubaron los matraces a 35°C y 150 rpm y se colectaron matraces los días 6 y 7. Las muestras se filtraron a vacío para remover los restos de salvado de trigo y pellets formados durante el cultivo. Posteriormente los extractos de centrifugaron a 3500 rpm por 15 min a 10°C. En el sobrenadante se cuantificó la actividad enzimática y la cantidad de proteína. Los extractos se almacenaron a 4°C.

El micelio con el que se trabajó se obtuvo después de inocular 1 cm² del micelio en 50 ml de medio YMPG durante 48 horas a 35°C y 150 rpm. El micelio fue homogenizado por Ultraturrax y se le determinó biomasa por peso seco.

7.4 Determinación de actividad de lacasas

La actividad de lacasa se determinó por espectrofotometría usando ABTS (2,2'-azino-bis [ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico]) 5 mM como sustrato y buffer de acetatos 1 M pH 4.5. Se midió el incremento en la absorbancia a 420 nm y la actividad se calculó 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. (Coll *et al.*, 1993)

7.5 Determinación de la concentración de proteína

La cantidad de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976). El ensayo se basa en el cambio de absorbancia del colorante Coomassie Blue G-250 al unirse a las proteínas (de 465 a 595 nm). Los datos de absorbancia se extrapolaron a una curva patrón de albumina de suero de bovina (BSA) a una concentración de entre 1-20 $\mu\text{g/ml}$ (**Anexo 2**), se trataron las muestras con la metodología correspondiente y se realizó la medición espectrofotométrica una longitud de onda de 595 nm. Los resultados se expresaron en μg de proteína por ml de muestra.

7.6 Determinación del contenido de fenoles totales

Se determinó por medio de la técnica de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965) La mezcla de reacción consistió en 100 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu (1:9), 60 μL de muestra, 1460 μL de agua y 300 μL de Na_2CO_3 (7.5%). Se incubó a 40°C por 30 min. La absorbancia se leyó a 765 nm y comparó con una curva patrón realizada con ácido gálico (**Anexo 3**).

7.7 Determinación del contenido de fenoles por absorbancia

Se obtuvo la longitud de onda máxima de absorción de los fenoles presentes en la mezcla utilizada en los experimentos por medio de un barrido de longitudes de onda en el rango de 200 a 700 nm. De acuerdo a la longitud de onda máxima determinada se midieron las absorbancias de las muestras problema buscando pérdida en la absorbancia a través del tiempo por lo que la remoción se calculó de manera porcentual considerando al control como el 100%.

7.8 Tratamiento de fenoles por enzimas y células libres

La capacidad de las enzimas lacasas libres para remover fenoles se determinó en tubos de ensayo que contenían 5ml de la mezcla de fenoles diluidas en etanol a concentraciones 50, 250 y 500 μM , y a cada una se añadió 500 μl de extracto crudo de lacasas (9000 U/ml). Los controles fueron las mismas mezclas de reacción sin el extracto enzimático. Las muestras se incubaron durante 72 horas a 45 °C y se midió la concentración de fenoles cada 24 horas.

La remoción de fenoles por micelio libre se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 25 ml de medio YMPG a pH 4.5 suplementado con la mezcla de fenoles a concentración final de 50, 250 y 500 μM y 1 ml de inóculo de micelio homogenizado que fue obtenido a las 48 horas. El control fue el mismo medio sin inóculo. Se evaluó la concentración de fenoles con intervalos de 24 horas durante 72 horas.

7.9 Inmovilización de lacasas y células

Se utilizó un diseño factorial 2^3 (**Anexo 4**) con tres factores (variables independientes): la concentración de micelio, el tamaño de la esfera y la concentración de CaCl_2 y se usaron dos niveles, siendo la variable de respuesta (variable independiente) la remoción de los fenoles en el ES. Los factores fueron seleccionados de acuerdo a estudios previos de literatura.

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Se realizaron cinéticas de cultivo 0 a 96 h de donde se determinó a cada tiempo la remoción de fenoles y la actividad de lacasas. Los valores fueron expresados como promedio \pm desviación estándar; se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para la significancia del factor estudiado y seguido por el test de Duncan para identificar diferencias entre los tratamientos, utilizando el programa STAT GRAPHIS Plus versión 4.1. Se consideraron las diferencias significativas en $p < 0.5$.

Para la inmovilización se siguió la metodología de Thakur *et al.*, (2015). Se mezcló 1 ml de células con 2 ml de alginato de sodio (concentración final 2% de alginato) y se depositó la mezcla en dos jeringas estériles, una de 3 ml y otra de 5 ml. La mezcla se goteó en 100 ml de una solución fría de CaCl₂ de concentración de acuerdo a la matriz de experimentos con agitación suave por 15 min. Las esferas se estabilizaron en refrigeración por 24 horas a 4°C. Después se enjuagaron en 50 ml de CaCl₂ y se recuperaron las esferas para medir su capacidad de remoción de fenoles. Esto se realizó agregando lotes de micelio inmovilizado con las diferentes condiciones a cultivos con medio YMPG adicionados con el efluente sintético a concentración 500 µM. Se obtuvieron alícuotas a 0, 48 y 96 horas. Donde se cuantificaron los fenoles totales y actividad de lacasas con las técnicas anteriormente descritas. También se determinó la biomasa al final del tratamiento.

7.10 Cuantificación de la biomasa liberada y retenida

La biomasa liberada se recuperó del caldo de cultivo y para cuantificar la biomasa retenida se recuperaron las esferas con la ayuda de un cedazo de acero inoxidable estéril, se enjuagaron con CaCl₂ estéril y enseguida se agregaron a un matraz Erlenmeyer que contenía 50 ml de una solución 0.2 M de buffer de citrato pH 5.0. Se incubaron a temperatura ambiente y agitación de 200 rpm para deshacer el gel y liberar la biomasa de la esfera. La biomasa se determinó por diferencia en peso entre el papel filtro seco y el papel filtro con biomasa seco.

$$\text{Biomasa (peso seco)} = (\text{peso muestra} + \text{peso papel filtro}) - \text{peso papel filtro}$$

7.11 Determinación del efecto del pH y temperatura en la remoción de fenoles con micelio inmovilizado.

El efecto de la temperatura se evaluó con esferas del hongo inmovilizado en alginato de calcio. El sistema inmovilizado (SI) utilizado fue el de las siguientes condiciones: esferas de 3 mm de diámetro, concentración de micelio de 0.107 g y concentración de CaCl_2 de 0.1M. Se agregó el lote de esferas a matraces Erlenmeyer que contenía 25 ml de medio YPMG suplementado con el ES (500 μM). Los medios se incubaron a 30, 35, 37 y 40°C durante 96 h a 150 rpm y se realizaron muestreos cada 24 horas.

Se determinó el efecto del pH en un rango de 4-6. Se adicionaron esferas del micelio inmovilizado a matraces Erlenmeyer que contenían 25 ml de medio YPMG a los diferentes pH, suplementados cada uno con 500 μM del ES. Los matraces se incubaron durante 96 horas a 35°C y 150 rpm. En condiciones estériles se tomaron muestras a las 0, 24, 48 y 96 h.

En ambos experimentos se determinó en el caldo de cultivo la concentración de fenoles, la actividad de lacasas y el micelio liberado. En las esferas se cuantificó la biomasa retenida como se describió anteriormente (sección 7.9). Se midió el tamaño de las esferas con un vernier a través del tiempo.

7.12 Determinación de los ciclos de reúso

El número de ciclos de reuso del SI se determinó por medio de fermentaciones en lotes repetidos a 35°C y pH 6 durante ciclos de 48 h de fermentación. Se realizaron los experimentos por triplicado, donde se determinó la remoción de fenoles y la productividad de lacasas. También se estimó la biomasa liberada y retenida, así como la identificación y cuantificación de fenoles por HPLC en los diferentes ciclos de reuso.

7.13 Cinéticas de remoción de fenoles y producción de lacasas en micelio libre e inmovilizado

Se realizaron cinéticas de la remoción de fenoles en el ES por el micelio libre e inmovilizado a las condiciones seleccionadas en la sección 7.11.

7.14 Identificación del perfil de fenoles

La identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos fue realizado por un HPLC-1220 Infinity (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.), equipado con un inyector manual (Loop de 20 ml) y un detector UV-Vis. El instrumento fue controlado por el OpenLAB paquete de software CDS ChemStation Edition (Agilent Technologies). La identificación del perfil de fenoles se realizó antes del tratamiento y después del tratamiento con el sistema inmovilizado (ciclos de reúso 1, 3 y 5). La cromatografía líquida de alto rendimiento HPLC-1220 Agilent se realizó en una columna Nucleosil C18 (250x4.6 mm, 5 μ m), según la metodología de Suzuki & Motosugi (1990) con algunas modificaciones. Se utilizó como fase móvil una mezcla de ácido fórmico al 1% (Fase A) y metanol (Fase B) en una relación 15:85 (v/v) con un flujo de 1.5 ml/min a 25°C. Las muestras eluidas se detectaron a 280 nm. Los estándares fueron ácido vainillico, 2,6 dimetoxifenol y guayacol obtenidos de Sigma-Aldrich.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Tolerancia del hongo a fenoles en medio sólido

Un paso importante para el desarrollo de procesos eficientes de biorremediación fúngica, consiste en seleccionar la cepa de estudio. En estudios previos se evaluó la capacidad de varios hongos de la podredumbre blanca para remover tintes sintéticos (Tapia-Tussell, 2011) y fenoles de una vinaza industrial, (Tapia-Tussell *et al.*, 2015) donde fue seleccionado *Trametes hirsuta Bm2* por su mayor eficiencia en los procesos. En estos estudios se determinó que las lacasas producidas por el hongo fueron inhibidas por altas concentraciones de fenol, lo que limitó la eficiencia del tratamiento (Zapata-Castillo *et al.*, 2012). El efecto tóxico de compuestos fenólicos ha sido cuantificado evaluando su efecto sobre el crecimiento de hongos de la podredumbre blanca (Bollag *et al.*, 1988). En este trabajo se evaluó la tolerancia del hongo durante su crecimiento en placa en medios que contenían diferentes concentraciones (50, 250, 500, 1000, 2500, y 5000 μM) del efluente sintético que contenía guayacol, 2-6 dimetoxifenol y ácido vainílico. Los resultados mostraron que el hongo fue capaz de crecer en un medio con fenoles tolerando hasta una concentración de 500 μM (figura 8.1 y 8.2). Cuando se incrementó la concentración de ES se encontró una disminución significativa del crecimiento de hasta un 95%, lo cual explica la existencia de un efecto inhibitorio. Los hallazgos encontrados son similares a lo reportado por Ryan *et al.*, (2007) quienes determinaron que la adición de fenoles a concentraciones superiores a 2 mM inhiben el crecimiento de *Trametes versicolor*. En otro estudio, Carabajal *et al.*, (2016) evaluaron el crecimiento de cinco hongos ligninolíticos en placas con medios suplementados con 2,6 dimetoxifenol, ácido gálico, 2-4 diclorofenol y guayacol. Ninguna de las cepas fue capaz de crecer en presencia de guayacol, que es considerado uno de los fenoles más recalcitrantes que es tóxicos para el crecimiento de los hongos. La degradación de la lignina por los HPB es conocida como un proceso co-metabólico pues los azúcares de la hemicelulosa y celulosa son fuentes de carbono fácilmente asimilables por el hongo, sin embargo, el crecimiento de los hongos sobre

monómeros aromáticos como los fenoles ha sido escasamente descrito (Yemendzhiev *et al.*, 2008, Krastanov *et al.*, 2013).

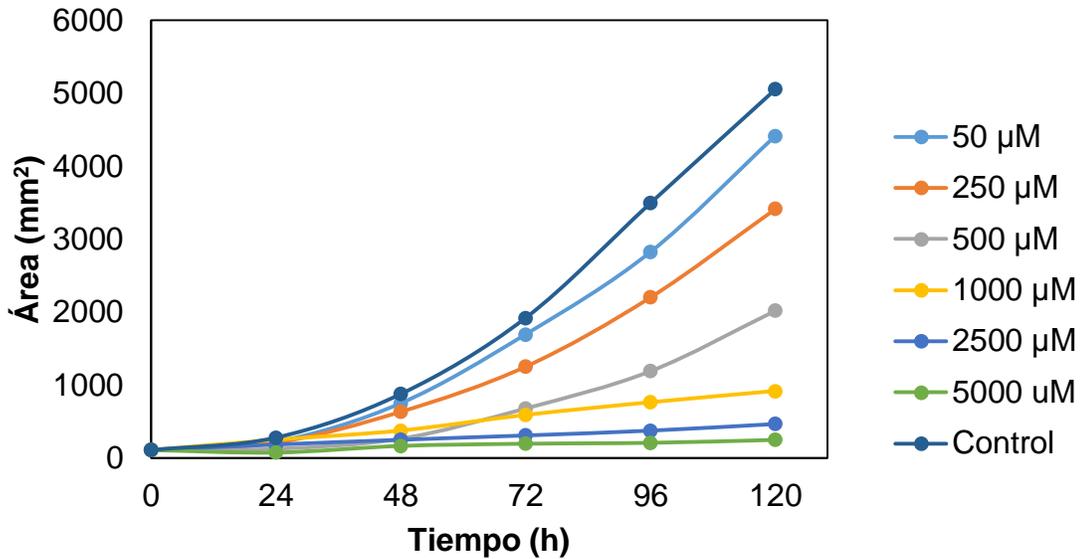


Figura 8.1 Cinética del crecimiento de *T. hirsuta* Bm2 en medio suplementado con diferentes concentraciones (μM) de efluente sintético compuesto por guayacol, 2,6- dimetoxifenol y ácido vainillico a 35 °C.

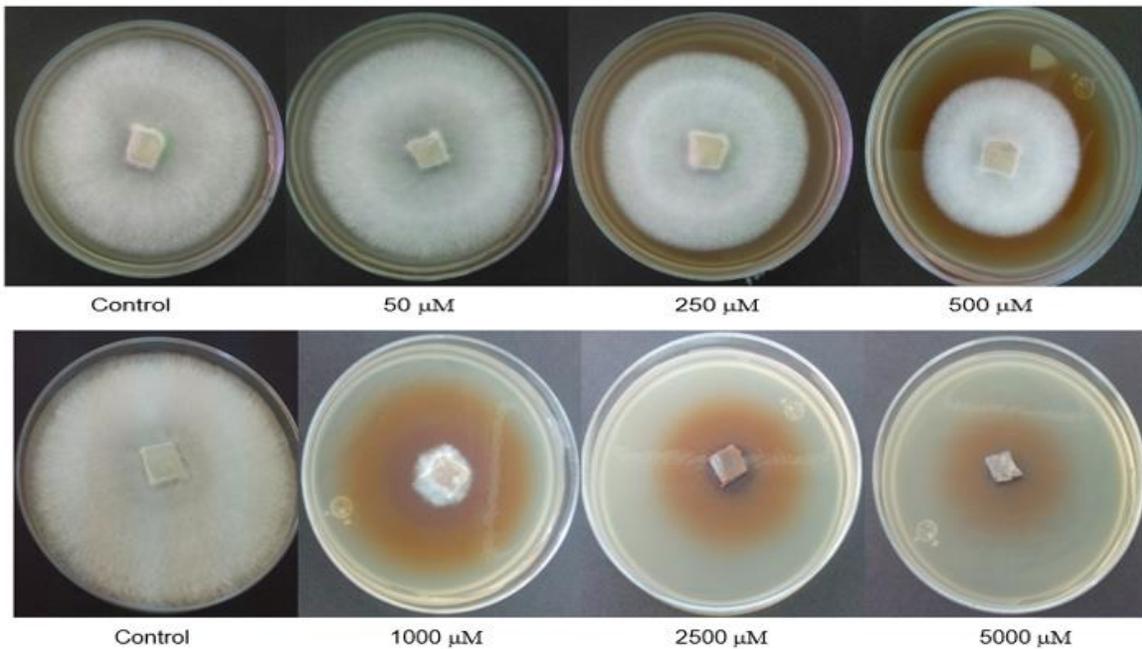


Figura 8.2. Crecimiento de *Trametes hirsuta* Bm2 en medio sólido con efluente sintético a diferentes concentraciones a 35 °C.

La figura 8.2 muestra la disminución del crecimiento del hongo y también la formación de un halo naranja cuyo tamaño e intensidad varió en función de la concentración de fenoles (250 μM – 5000 μM). Este halo ha sido asociado a la oxidación de fenoles por acción de las lacasas (Papinutti & Forchiassin, 2000). Se ha establecido que las lacasas son producidas por los hongos como una respuesta al estrés oxidativo ocasionado por compuestos fenólicos que inhiben el crecimiento de hongos de la podredumbre blanca. A partir de este estudio se seleccionaron las concentraciones de 50, 250 y 500 μM para evaluar la capacidad de remoción de fenoles con la enzima y células libres de *T. hirsuta* Bm2.

8.2 Producción de lacasas en salvado de trigo

Una amplia variedad de materiales lignocelulósicos pueden ser usados en las fermentaciones para la producción de lacasas incluyendo desechos agrícolas y forestales. Además de la lignina estos sustratos contienen celulosa, hemicelulosa y otros nutrientes que favorecen el crecimiento del hongo y la producción de enzimas (Pandey, 2003).

Se determinó la cinética de producción de lacasas en un medio enriquecido con salvado de trigo al 3 %, que ha demostrado ser un buen sustrato para la producción de lacasas de *T. hirsuta* Bm2 (Pool-Yam, 2014). La figura 8.3 muestra que en los primeros cuatro días hubo un incremento progresivo en la producción de lacasas (7711.8 U/ml) y alcanzó un máximo de 8456 U/ml el día 6. Posteriormente disminuyó la actividad de lacasas probablemente debido a la presencia de inhibidores que se hayan generado durante el crecimiento del hongo y/o a la inestabilidad de las enzimas (Islas-Solís, 2016).

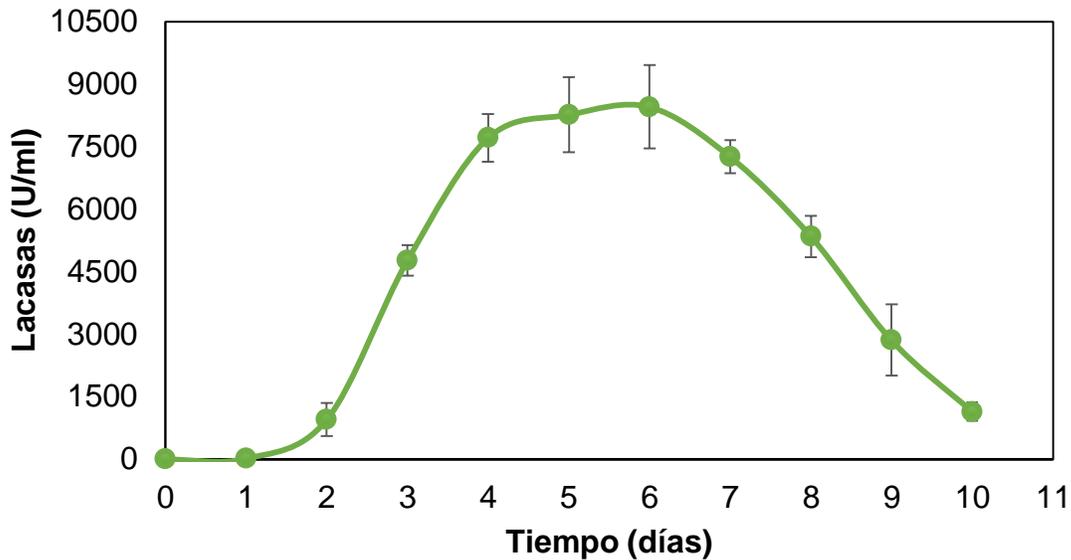


Figura 8.3. Producción de lacasas por *Trametes hirsuta* Bm2 en medio con salvado de trigo, pH 6, 35 °C, 150 rpm.

Estos resultados coinciden con otros estudios que han mostrado que el salvado de trigo es un buen inductor de la actividad de lacasas. Durante el cultivo del hongo se generan monómeros fenólicos que estimulan la síntesis de lacasas. Algunos monómeros fenólicos derivados de la lignina del salvado de trigo como el ácido p-cumárico, sinapílico, guayacol, ácido vainílico han mostrado ser buenos inductores de las lacasas en *Picnoporus cinnabarius* (Herpoël *et al.*, 2000). Recientemente Tapia-Tussell *et al.*, (2015) e Islas-Solís, (2016) demostraron que el salvado de trigo y algunos monómeros fenólicos inducen transcripcionalmente la síntesis de lacasas en *Trametes hirsuta* Bm2. El papel de los fenoles puede variar dependiendo de su estructura y concentración en el medio de cultivo. Bajas concentraciones de fenol pueden tener un efecto inductor en la síntesis de enzimas y también de la actividad de lacasas, mientras que a altas concentraciones pueden ejercer un efecto inhibitorio.

La figura 8.4 muestra una elevada concentración de fenoles en 48 h que coincide con la baja actividad de lacasas (figura 8.3). Asimismo, se observa que cuando disminuyó el 50% del contenido fenólico se obtuvo la máxima actividad de lacasas, lo cual pudo

ser debido a un efecto inductor o debido a que bajas concentraciones los monómeros fenólicos también pueden actuar como mediadores redox mejorando la actividad de lacasas. Camarero *et al.*, (2005), obtuvieron extractos fenólicos durante el cultivo de *T. versicolor* en salvado de trigo, los extractos ultrafiltrados demostraron ser potenciadores de la actividad de lacasas. Estas moléculas actúan como agentes cooxidantes y al ser oxidadas por las lacasas generan radicales libres que también pueden actuar oxidando al sustrato o moléculas sobre las cuales la enzima no puede actuar.

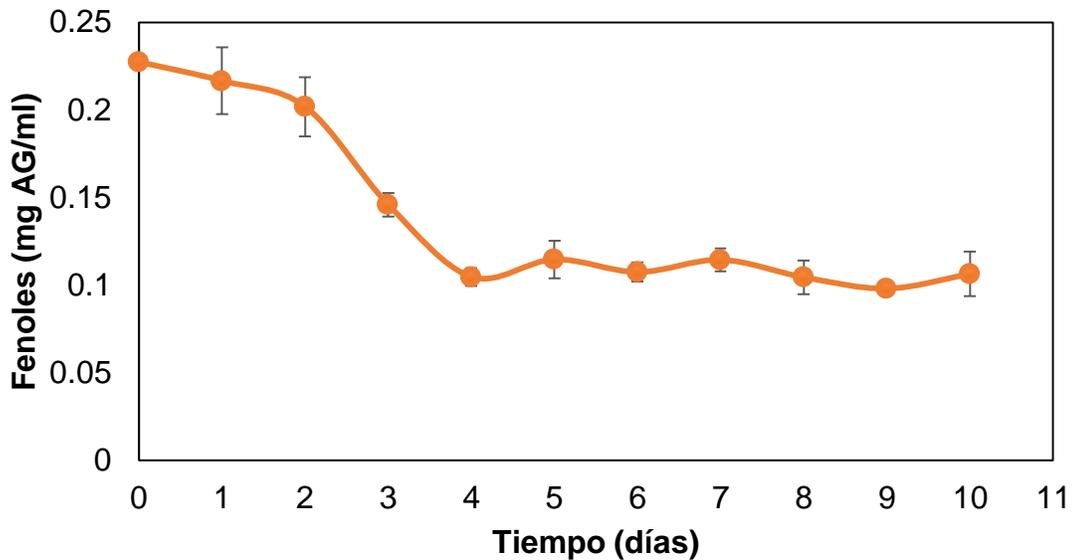


Figura 8.4. Remoción de fenoles totales durante el cultivo de *T. hirsuta* Bm2 en salvado de trigo a pH 6, 35 °C, 150 rpm.

La figura 8.5 muestra que la concentración de proteína presente en los extractos del cultivo se incrementó en función del tiempo de cultivo. Se escogieron los tiempos 6 y 7 para la posterior obtención del extracto enzimático debido a la alta actividad específica en esos tiempos.

A partir de este cultivo se obtuvo un extracto rico en lacasas con una actividad enzimática de 9055.5 U/ml, y 1.46 mg/ml de proteína, que representa una actividad específica de 6202.4 U/mg.

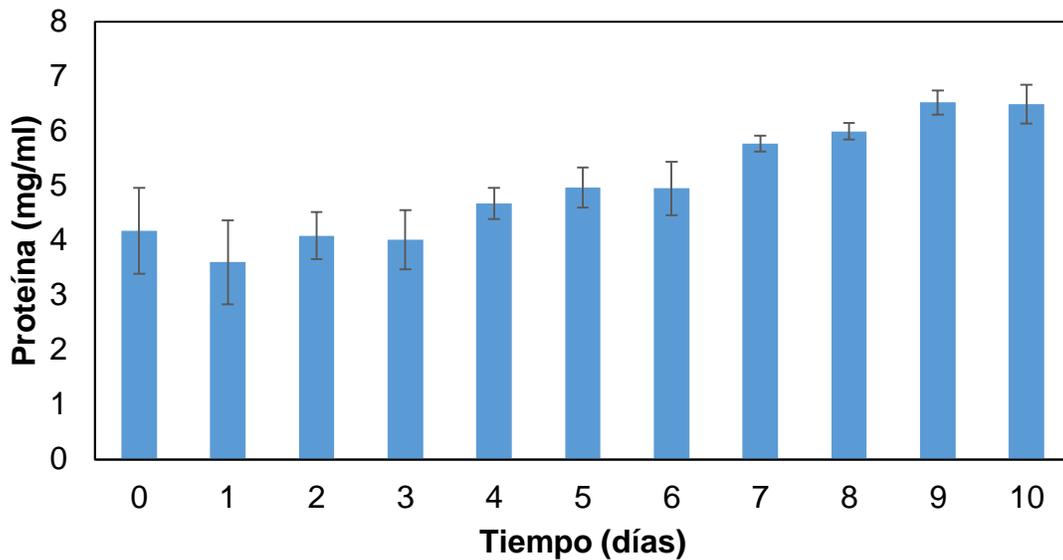


Figura 8.5. Proteína presente en los extractos producidos por *T. hirsuta* Bm2 en medio con salvado de trigo, pH 6, 35 °C, 150 rpm.

8.3 Capacidad de lacasas libres para remover fenoles

Se evaluó la capacidad de las lacasas de *T. hirsuta* Bm2 en la remoción de fenoles del efluente sintético (ES) compuesto por 2,6-dimetoxifenol, ácido vainilico y guayacol a las concentraciones previamente seleccionadas. Sin embargo, es importante señalar que los fenoles fueron disueltos en etanol y que desde el momento de la adición de la enzima al sistema de reacción se generó una turbidez que posteriormente dio lugar a la formación de un precipitado. Asimismo, el control con etanol y el extracto enzimático también precipitó y la pérdida de la actividad de lacasas fue total, lo que indica la desnaturalización de la enzima y no permitió determinar la capacidad de las lacasas para remover el efluente sintético en este sistema. El etanol es utilizado como agente precipitante en la purificación de proteínas, ya sea sólo o mezclado con acetona como ocurrió en la purificación de lacasas de *T. versicolor* (Rogalski *et al.*, 1990). El etanol también es utilizado para la eliminación de proteínas durante aislamiento de ADN por el método fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (Sambrock *et al.*, 1989). En base a lo anterior es probable que durante el tratamiento enzimático se hayan formado

complejos proteína-fenoles que precipitaron y de esta manera fueron removidos del sistema de reacción. Para determinar la efectividad de las lacasas libres en el tratamiento de fenoles será necesario utilizar otros solventes o disminuir la concentración de fenoles.

8.4 Capacidad de células libres para remover fenoles

La remoción de fenoles por vía microbiana es una alternativa sustentable para el desarrollo de procesos amigables con el medio ambiente. Sin embargo, debido al efecto inhibitorio del fenol a altas concentraciones, el tratamiento biológico de efluentes continúa siendo un reto. La capacidad de remoción de fenoles por micelio libre se determinó en un medio YMPG suplementado con fenoles a las concentraciones establecidas que fue inoculado con micelio de 48 h. La figura 8.6 muestra la concentración de fenoles totales en mg/ml equivalentes de ácido gálico (mg AG/ml) detectada durante el tratamiento. Se observó la disminución del 50 % de los fenoles totales a las 24 h. Es importante señalar que en ninguno de los extractos libres de células obtenidos a diferentes tiempos de cultivo se detectó actividad de lacasas. Lo anterior sugiere que la remoción de fenoles fue debida a la adsorción de fenoles al micelio.

También se midió la biomasa al final del tratamiento microbiano (figura 8.7). Cuando se compara el contenido de biomasa entre los tratamientos, se puede sugerir que el uso de 500 μ M de fenoles favoreció un aumento de biomasa respecto a las otras dos concentraciones evaluadas. Probablemente este comportamiento sea explicado debido a que los fenoles podrían ser utilizados por el hongo como fuente de carbono. (Carabajal *et al.*, 2014)

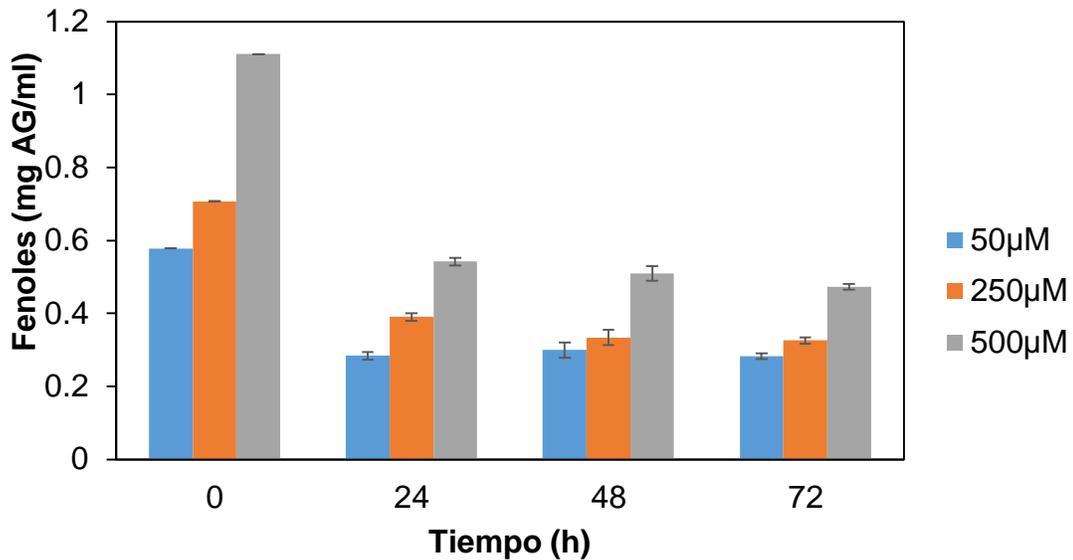


Figura 8.6. Fenoles totales en cultivo con medio YMPG suplementado con un efluente sintético compuesto por 2,6- dimetoxifenol, guayacol y ácido vainillico, a 35 °C, pH 4.5, 150 rpm

Estos resultados difieren a los reportados por Ryan *et al.*, (2007) quienes encontraron que el incremento en la concentración de fenol en el medio de cultivo de *Trametes versicolor* coincidió con la disminución de la biomasa. Por su parte, Carabajal *et al.*, (2014) reportaron que ni el fenol ni el nitrofenol afectaron el crecimiento de *Trametes versicolor* lo que demostró la tolerancia del hongo a las concentraciones de fenol evaluadas durante el cultivo sumergido. Diversos basidiomicetos levaduriformes como *Trichosporum cutaneum* (Gaal & Neujahr, 1979), y ascomycetes como *Penicillium frequentans* (Hofrichter & Fritsche, 1996) o *Aspergillus niger* (Jones *et al.*, 1993) demostraron ser capaces de utilizar varios compuestos aromáticos relacionados con la lignina, como única fuente de carbono y energía.

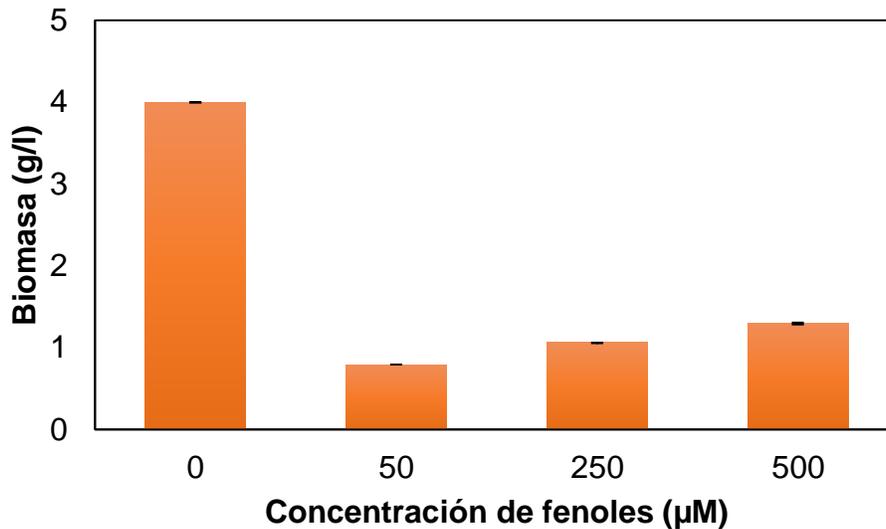


Figura 8.7. Biomasa final después del tratamiento microbiano (72 h)

En base a los resultados se eligió el sistema de micelio libre para inmovilizar y aplicarlo en la remoción de fenoles en el ES con una concentración de 500 µM, y estudiar posteriormente tanto las mejores condiciones de inmovilización como las mejores condiciones de temperatura y pH para la remoción de fenoles.

8.5 Inmovilización de micelio de *T. hirsuta* Bm2

El proceso de inmovilización de células ha demostrado ser adecuado para la remoción de compuestos recalcitrantes en relación a las células libres en suspensión ya que la inmovilización permite el uso repetido de las células, facilita la separación sólido-líquido. Más aún, las células inmovilizadas tienden a ser más resistentes a perturbaciones del medio ambiente como los cambios de pH y temperatura o la exposición de compuestos químicos tóxicos (Rodríguez-Couto, 2009).

La selección de la técnica así como el material de inmovilización es esencial para el diseño de un sistema efectivo dependiendo de cada propósito particular. Se han probado diferentes técnicas de inmovilización en la remoción y/o transformación de

fenoles. La inmovilización en esponja vegetal (*Luffa aegyptiaca*) y en esferas de alginato de calcio ha permitido la remoción eficiente de fenoles, por adsorción y por vía enzimática. Sin embargo es importante puntualizar que las esferas de alginato de calcio, representan un sistema simple e inocuo que permite la separación fácil del medio contaminado y que a su vez también podría actuar como un agente adsorbente.

Son diversos los factores que afectan la inmovilización de células, por lo que se evaluaron los factores que han demostrado ser relevantes, como del tamaño de la esfera, la concentración del inóculo y la concentración de alginato de calcio utilizando un diseño factorial con dos niveles (**Anexo 4**) para establecer las condiciones de inmovilización. Los diferentes tratamientos de inmovilización fueron utilizados para determinar el grado de remoción de fenoles del efluente sintético a concentración 500 μM durante 96 h. La figura 8.8A muestra que en todos los tratamientos con células inmovilizadas desde las 48 h disminuyó la concentración de fenoles alrededor del 40% y la remoción al final fue de alrededor del 60% con respecto al control. En todos los tratamientos con células inmovilizadas hubo actividad de lacasas (figura 8.8B) mientras que en el tratamiento con el micelio libre no se detectó actividad de lacasas, este hecho podría estar relacionado con el efecto protector del alginato a la inhibición de las enzimas. Los niveles de enzima variaron en función del tiempo de cultivo y las condiciones evaluadas, la mayor actividad se produjo a 48 h y coincidió con la mayor remoción de fenoles. Los resultados indican que la remoción de los fenoles por *T. hirsuta* Bm2 puede ocurrir por eventos mixtos que incluyen la adsorción y que las lacasas participan activamente en el proceso. En otros estudios de inmovilización de HPB como el de *T. versicolor* en silica-alginato lograron remover un 48 % de fenoles a concentración 10 mM en 14 días (Carabajal *et al.*, 2012), cuya remoción fue atribuida principalmente a la adsorción.

La aplicación de células inmovilizadas para degradar compuestos fenólicos, ha demostrado que la inmovilización confiere mayor resistencia a los microorganismos, incluso a altas concentraciones del contaminante, que resultan tóxicas cuando el

microorganismo está libre en la fase líquida (Martínez-Trujillo & García-Rivero, 2012). El análisis de los resultados obtenidos, no mostró diferencias significativas en las diferentes condiciones. Se seleccionó el tratamiento 2, (concentración de micelio: 0.107 g, tamaño de la esfera de 3 mm y concentración de CaCl_2 : 0.1 M). Se eligió la menor concentración de micelio a fin de limitar el crecimiento para disminuir o evitar la liberación del micelio de la esfera, la mayor concentración de CaCl_2 que está relacionada con una mayor la resistencia mecánica de las esferas y el menor tamaño de esfera para una mayor superficie de contacto y menor problema de difusión de nutrientes.

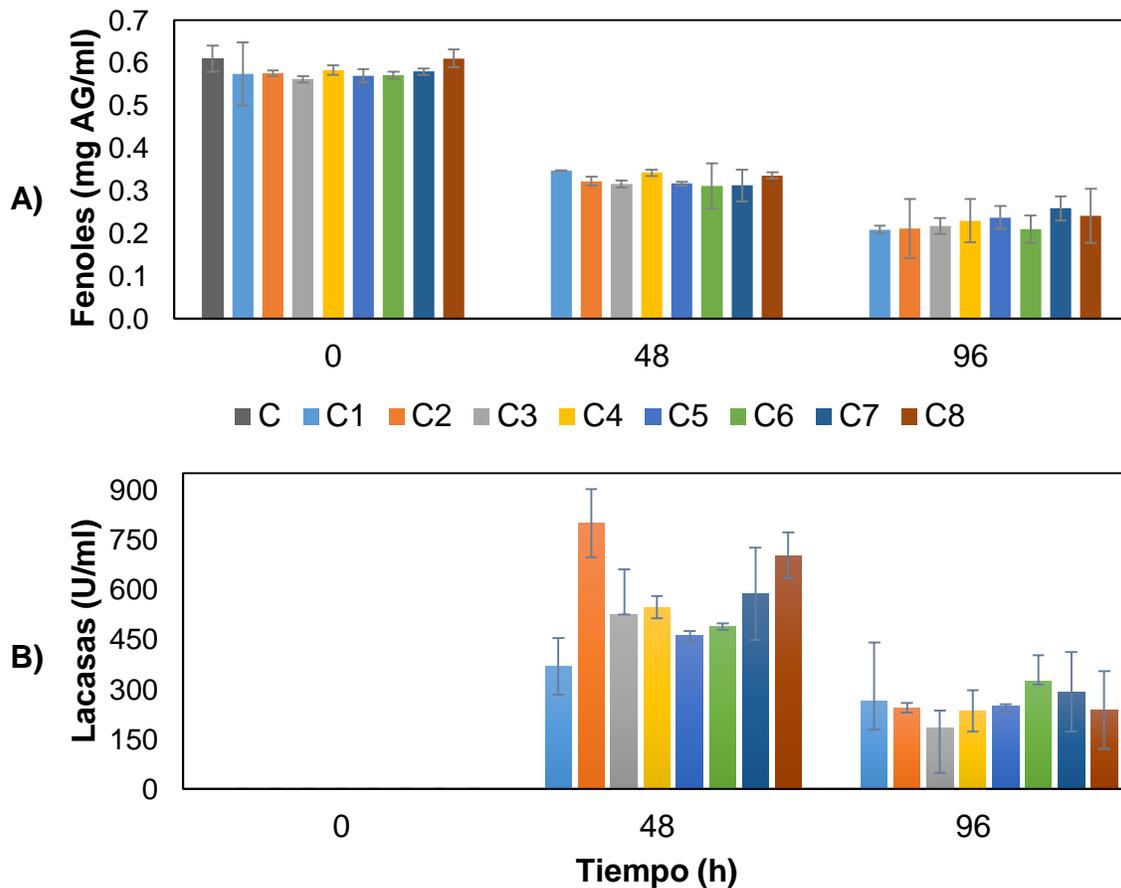


Figura 8.8. Efecto de las condiciones de inmovilización de micelio de *T. hirsuta* Bm2 en medio YMPG suplementado con fenoles (C1-C8), pH 4.5, 150 rpm, (A) concentración de fenoles, (B) lacasas.

Massalha *et al.*, (2007) evaluaron esferas de alginato de calcio con células inmovilizadas con diámetros de 1, 2, 4 y 6 mm. Las esferas de mayor tamaño mostraron la menor velocidad de degradación de fenol, lo cual fue atribuido a limitaciones en la difusión de transferencia de masa, mientras que las esferas de 1 mm lograron la degradación completa del fenol. En Aksu & Bulbul (1999) reportaron que el efecto de la resistencia a la difusión tiene un efecto significativo en la eficiencia de biotransformación, por lo cual es un parámetro que siempre debería ser considerado cuando se usan células inmovilizadas en alginato de calcio.

8.6 Efecto de la temperatura en la remoción de fenoles con el sistema inmovilizado

La temperatura es un parámetro que afecta el crecimiento y la actividad metabólica del hongo (Schügerl *et al.*, 1998) por lo cual tiene un efecto directo sobre la producción de metabolitos (Znidarsic & Pavko, 2001). Se evaluó el efecto de la temperatura a 30, 35, 37 y 40 °C en la remoción de fenoles con el sistema inmovilizado durante 96 h. La figura 8.9A muestra que los fenoles pueden ser removidos tras 48 h hasta alcanzar el 55 % de remoción entre 30 y 37 °C. La máxima remoción se detectó a las 96 h con un valor de 60 % a 35 °C. El incremento de la temperatura a 40 °C afectó negativamente el proceso ya que no hubo remoción de fenoles. Es importante señalar que después de 96 h de cultivo realizado a 30 °C, la concentración de fenoles residuales aumentó, lo que representó una disminución de la remoción a 30 %. Este hecho fue atribuido a que a las 96h a 30 °C hubo un efecto de desorción. La desorción comúnmente se presenta a altas temperaturas, por lo que la desorción a 30 °C podría estar relacionada con los cambios estructurales de la pared celular que se presentan durante el cultivo del hongo. La quitina, quitosano, glucanos y mucopolisacáridos presentes en la pared pueden ser modificadas durante el crecimiento del hongo generando cambios en los grupos funcionales que favorezcan o no la adsorción de compuestos (Ahmaruzzaman, 2008)

La producción de lacasas también fue influenciada por la temperatura (figura 8.9B). A 30 y 35 °C (520-540 U/ml respectivamente) se produjo la mayor actividad a las 48h, sin embargo a las 96 horas disminuyó drásticamente. Esta respuesta indica que pudieran baja estabilidad las enzimas, o disminución de algún fenol en el medio que limitó su función como mediador redox. A 37 °C el comportamiento fue diferente, la actividad de lacasas incrementó gradualmente hasta alcanzar la máxima producción a 96 h.

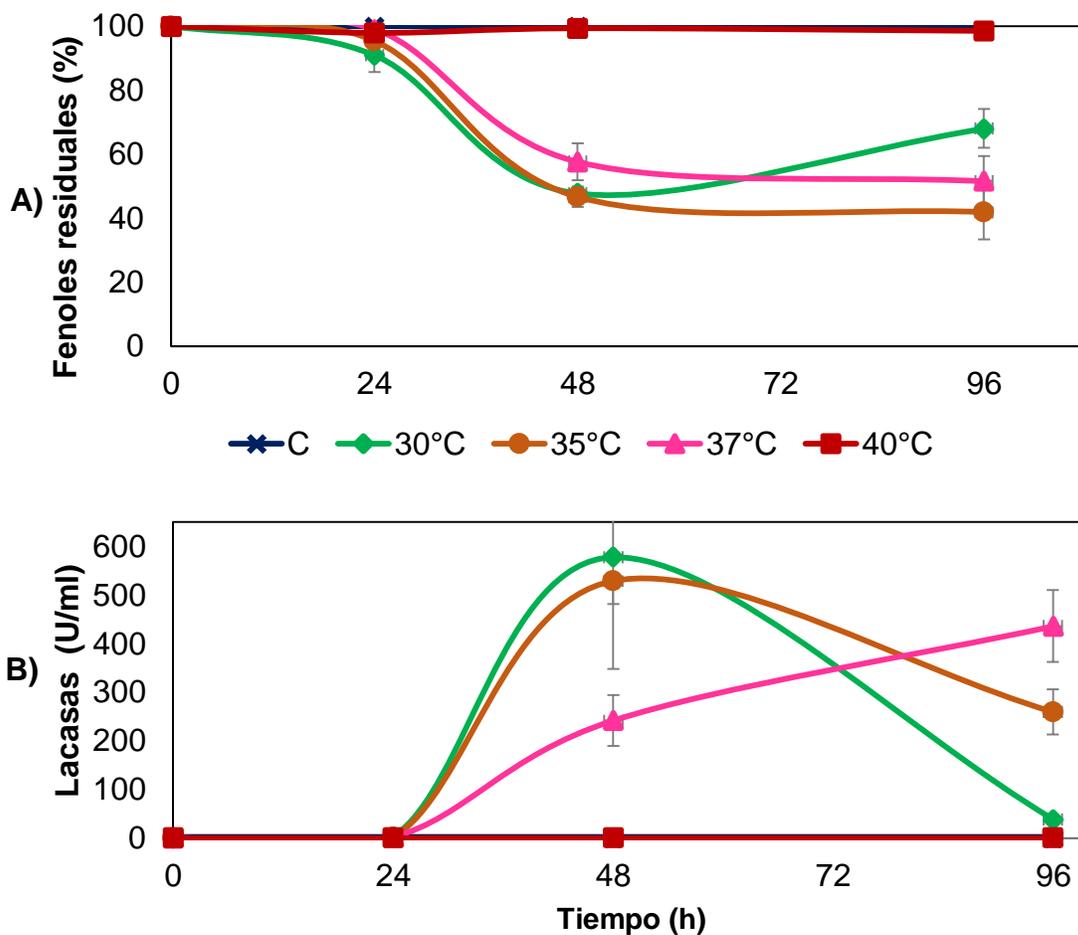


Figura 8.9. Efecto de la temperatura en la remoción de fenoles (A) y actividad de lacasas (B) utilizando micelio inmovilizado de *T. hirsuta* Bm2 en medio YMPG suplementado con fenoles a pH 4.5 y 150 rpm.

Se ha reportado que la temperatura óptima de células libres en la producción de metabolitos, puede ser modificada en las células inmovilizadas. Por ejemplo, las células de *Lactobacillus amylovorus* inmovilizadas en alginato de calcio mostraron una temperatura óptima de 40 °C donde mejoraron la producción de ácido láctico en un 14 % respecto a las libres cuya temperatura óptima fue de 37 °C (Yan *et al.*, 2001). En otra investigación, la inmovilización de *Candida krusei* en esferas de alginato de calcio produjo mayor actividad de fitasas a la temperatura óptima de 55 °C, la cual fue de 15°C mayor que las células libres (Quan *et al.*, 2003). En este estudio la mejor de las temperaturas evaluadas para la remoción de fenoles fue de 35 °C, que también es la mejor temperatura a la que crece y produce lacasas el micelio libre de *T. hirsuta*, lo que indica que la inmovilización no modificó la temperatura de crecimiento y producción de lacasas del hongo.

Un aspecto muy importante a evaluar es la cantidad de biomasa liberada, ya que este es una característica indeseable en la aplicación de células inmovilizadas. La figura 8.10 muestra que la temperatura afectó tanto la cantidad de biomasa retenida y liberada al medio de cultivo. La biomasa retenida aumentó con el tiempo en todas las temperaturas excepto 40 °C, que se mantuvo constante. Este hecho indica que a 40 °C se afectó negativamente el crecimiento del hongo y en consecuencia la actividad de lacasas y remoción de fenoles. Sólo se desprendió del 5 al 7 % de la biomasa, lo cual es un resultado muy satisfactorio comparado con otros estudios como el de Reyes (2006) en donde se liberó entre 25 y 3 % de biomasa con el sistema inmovilizado de *Aspergillus* HL en alginato de calcio.

El tamaño de las esferas aumentó con el tiempo de cultivo, sin embargo no hubo una variación significativa por efecto de la temperatura (figura 8.11). El menor tamaño de esferas se observó a 40 °C y fue asociado al escaso crecimiento del hongo. A partir de los resultados obtenidos se eligió 35 °C para el tratamiento de fenoles con el micelio inmovilizado ya que a esta temperatura se obtuvo la mayor remoción del efluente con fenoles y alta producción de lacasas.

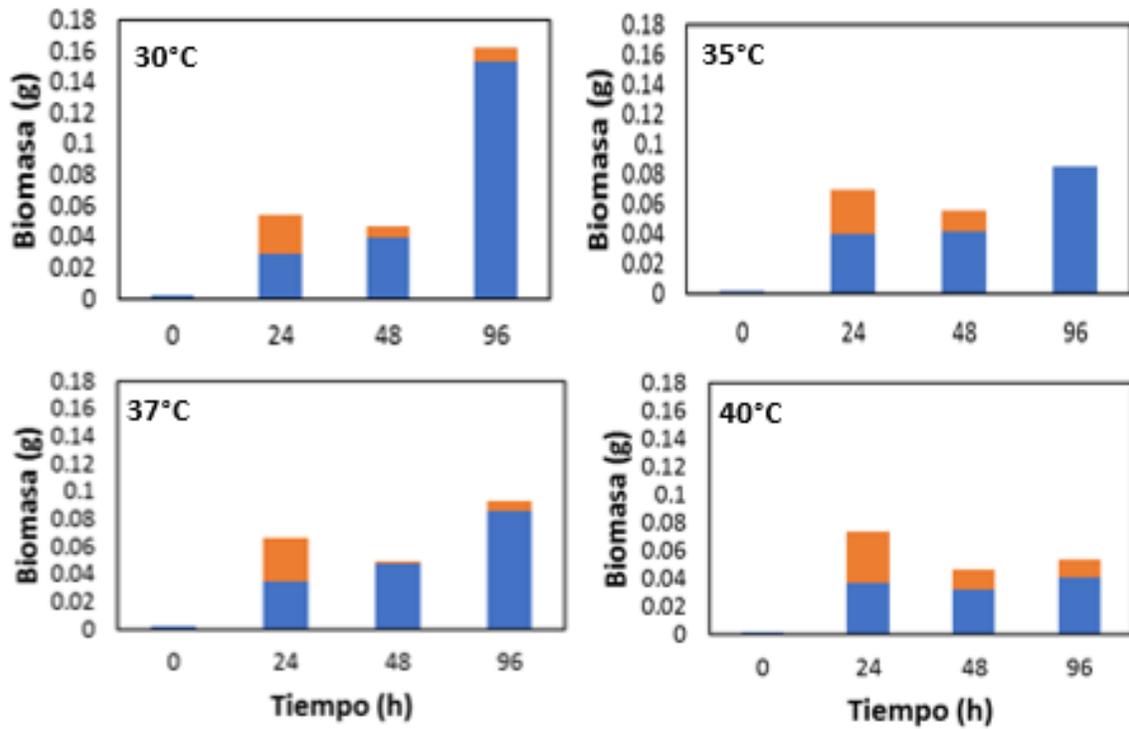


Figura 8.10. Efecto de la temperatura 30 °C, 35 °C, 37 °C y 40 °C en la generación de biomasa liberada y retenida a los diferentes tiempos.

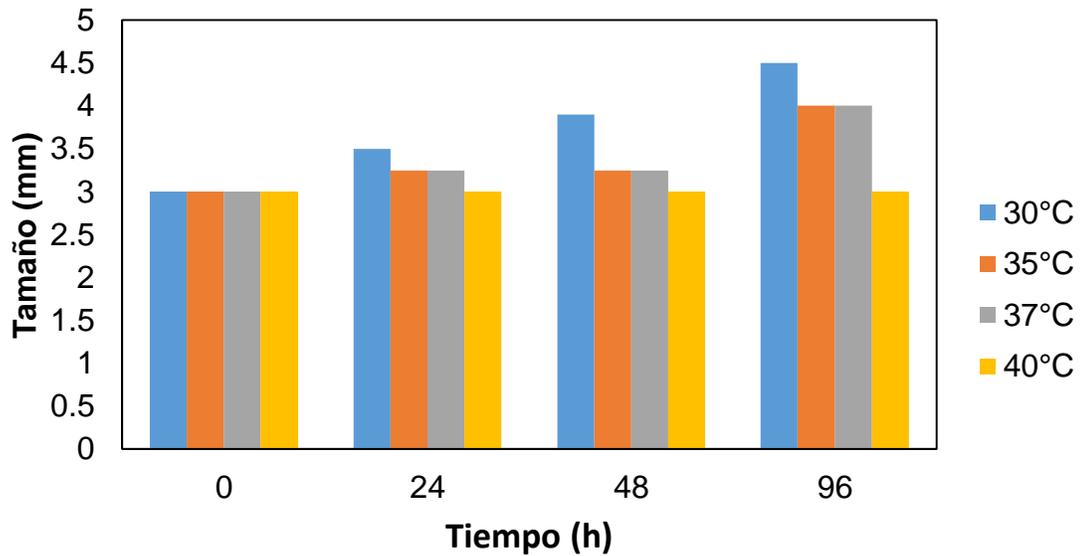


Figura 8.11. Tamaño de las esferas de alginato de calcio con *T. hirsuta* Bm2 en cultivos a 30 °C, 35 °C, 37 °C y 40 °C.

8.7 Efecto del pH en la remoción de fenoles con el sistema inmovilizado

El pH tiene un papel relevante en la capacidad de adsorción del micelio, ya que este parámetro influye en la carga de la superficie del adsorbente, es decir la disociación de grupos funcionales de los sitios activos del soporte (Sari *et al.*, 2009). La adsorción de compuestos fenólicos es bien conocida por ser dependiente del pH ya que influye en la adsorción de estos compuestos. Algunos reportes indican que la adsorción de fenoles aumenta conforme aumenta el pH, sin embargo el comportamiento puede variar en función del organismo y las condiciones de cultivo. Así mismo, el pH afecta la actividad metabólica del hongo y es un parámetro que influye en los niveles de síntesis y actividad de lacasas (Ahmaruzzaman, 2008).

En este trabajo se estudió el efecto del pH en la capacidad de adsorción de la biomasa inmovilizada de *T. hirsuta* a valores de pH 4, 4.5, 5.5 y 6 en la remoción de fenoles durante 96 horas. En la figura 8.12A se observa que no hubo diferencia entre los tratamientos realizados. Al final del tratamiento se logró una remoción de hasta el 70% a pH 4, 4.5, 5 y 6. Annadurai *et al.*, (2000) determinaron que el incremento de pH hasta 7 permitió una mayor degradación del fenoles. Los exopolímeros presentes en pared celular como glucanos, quitina y quitosano varían en su contenido de grupos amino e hidroxilo; el grado de ionización de estas moléculas está asociada con la eficiencia en la remoción de metales fenoles, tintes y otros compuestos tóxicos (Mohanty *et al.*, (2017). En este mismo estudio, reportaron que el incremento de grupos hidroxilo presentó un alto potencial de adsorción de compuestos fenólicos, sin embargo, el aumento a mayores valores de pH tuvo efecto inverso que ocasionó una notable disminución de la remoción de fenol. Karigar *et al.*, (2006) reportaron que pHs alcalinos disminuyó la remoción de fenol en *Arthrobacter citreus*, ésto puede ser debido a que la modificación del grado de ionización por efecto del pH puede afectar las rutas metabólicas del organismo, o causar desnaturalización de proteínas.

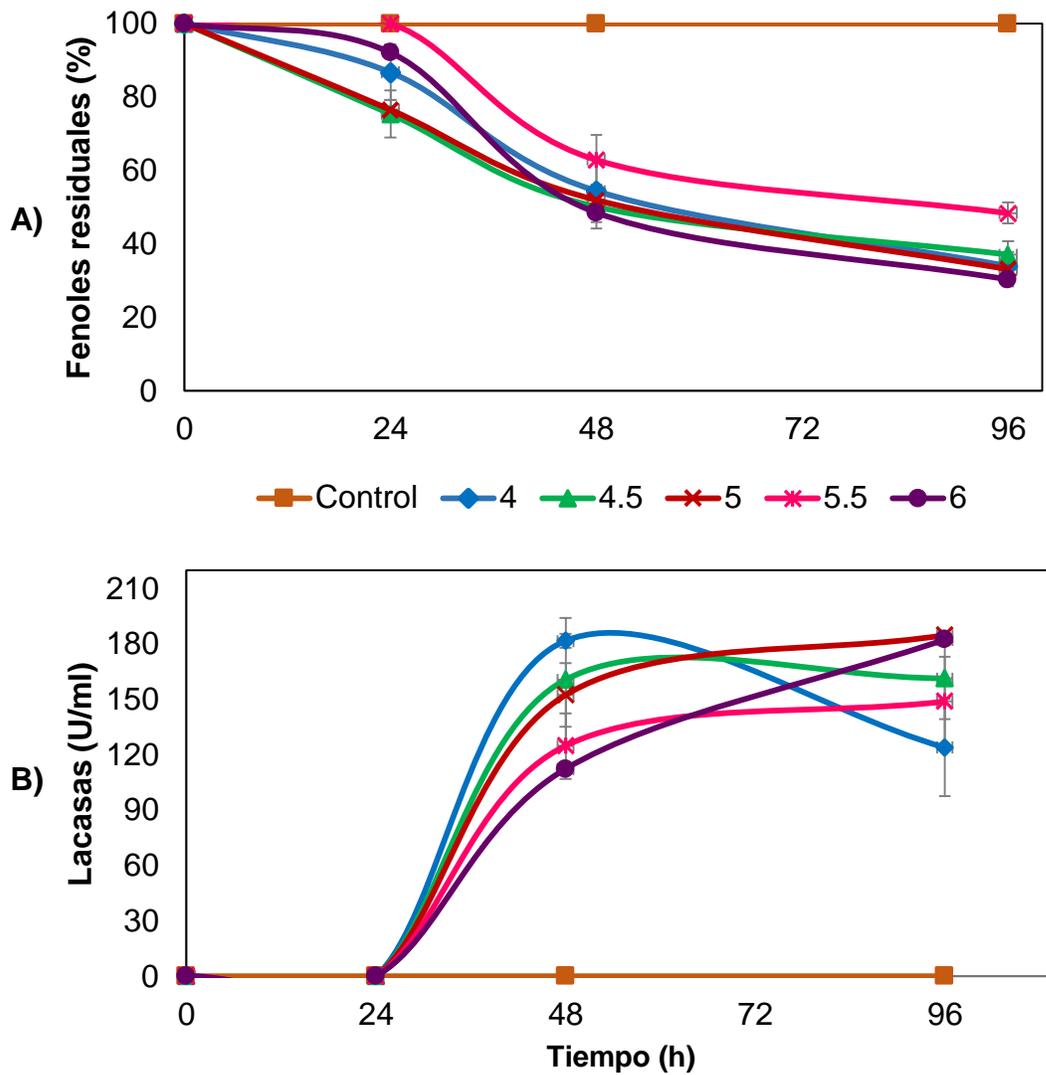


Figura 8.12. Efecto del pH en la remoción de fenoles (A) y actividad de lacasas (B) utilizando micelio inmovilizado de *T. hirsuta* Bm2 en medio YMPG suplementado con fenoles a 35 °C y 150 rpm.

La actividad enzimática presente durante los tratamientos del efluente sintético a diferentes valores de pH, se muestra en la figura 8.12B. El pH influyó en la producción de la enzima, a las 48 h el mejor pH evaluado fue de 4 a 5 y a las 96 h la mayor actividad se detectó a pH entre 5 y 6. Sin embargo las variaciones no arrojaron diferencias significativas, lo que indica que el hongo puede producir las enzimas en un amplio rango de pH. Se ha evidenciado que los hongos de la podredumbre blanca son

capaces de crecer en un amplio rango de pH, sin embargo este parámetro ha demostrado tener un papel predominante en la inducción de enzimas ligninolíticas que se ha evidenciado incluso a nivel transcripcional (Fernández, *et al.*, 2014).

El pH afectó la concentración de biomasa libre y retenida, conforme aumentó el pH hubo una mayor cantidad de biomasa retenida. Nuevamente se observa que la biomasa liberada fue nula o despreciable en los tratamientos (figura 8.13), lo cual corrobora las ventajas del sistema inmobilizado. La biomasa retenida fue relacionada directamente con el tamaño de esfera, es decir conforme aumentó el valor de pH aumentó la biomasa y el tamaño de esfera.

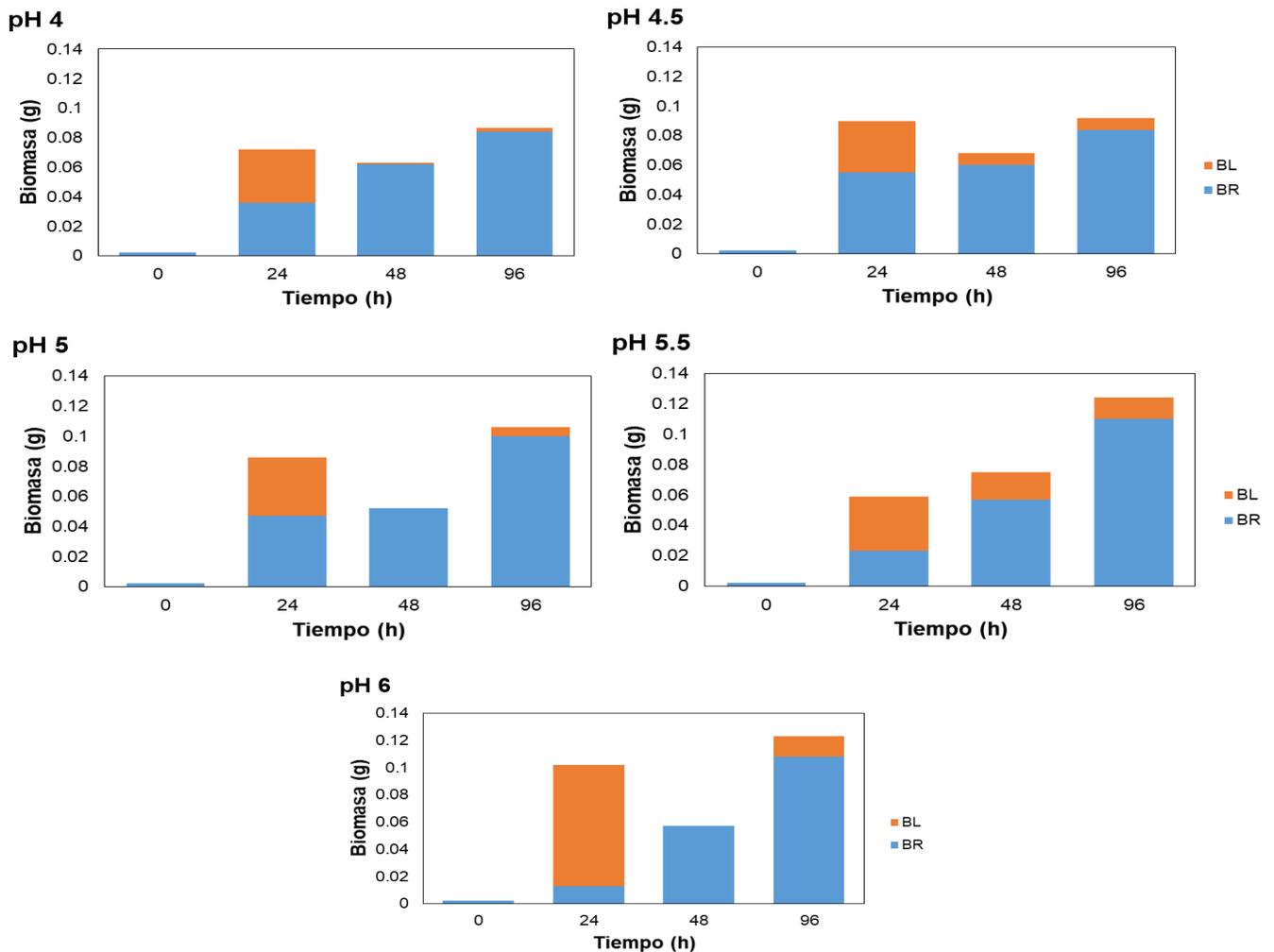


Figura 8.13. Biomasa liberada (naranja) y retenida (azul) durante los cultivos de las esferas con *T. hirsuta* a pH de 4 a 6.

El pH es un parámetro importante en el tratamiento biológico de aguas residuales. Los valores extremos de pH (menores de 3 o mayores de 9), así como las variaciones de pH durante el tratamiento pueden inhibir el crecimiento del microorganismo (Agarry *et al.*, 2008). Se ha propuesto que los sistemas de tratamiento puedan operar en un rango de pH de 6 a 8 considerando que es el pH en el que se encuentran los efluentes (Majumder & Gupta, 2009).

En este estudio se encontró que las esferas de *T. hirsuta* lograron remover fenoles eficientemente a pH 6, por lo que podrían eliminar estos compuestos en un efluente real. Asimismo la remoción de fenoles podría ser atribuida a eventos mixtos de adsorción y acción enzimática.

8.8 Comparación del sistema libre y sistema inmovilizado con micelio de *Trametes hirsuta* Bm2

Se comparó la eficiencia en la remoción de fenoles del micelio inmovilizado en relación al micelio libre a 35 °C y pH 6. En la figura 8.14 se observa que las esferas con el hongo lograron remover el 70% de fenoles a las 96h, mientras que el sistema libre logró remover 60 % de fenoles. Cabe mencionar que la inmovilización puede disminuir la capacidad metabólica del hongo debido a problemas en la transferencia de nutrientes y de oxígeno a la célula. Aun cuando la remoción de fenoles se incrementó 10% en el sistema inmovilizado, este último presenta la posibilidad de ser reutilizado. Estos resultados coinciden con los reportados por Passos *et al.*, (2010) quienes demostraron mayor eficiencia de las células inmovilizadas de *Aspergillus sp.* Las esferas de alginato de calcio mostraron un efecto protector que favoreció el microambiente dentro del soporte sol-gel y redujo el estrés abiótico de las células encapsuladas. A diferencia, Santos *et al.*, (2003) reportaron las mayores tasas de degradación de fenol 12 mM por células libres de *Graphium sp.* FIBY en relación a las inmovilizadas en alginato.

Las células libres de hongos pueden ser aplicadas en el tratamiento de aguas residuales con bajos niveles de fenoles. Algunas de las limitaciones del uso del sistema libre incluyen mantener la concentración óptima de células y la eliminación de la biomasa fúngica. A diferencia, la aplicación de un sistema inmovilizado en matrices como el alginato de calcio en donde no se libere biomasa, permite su fácil recuperación y la reutilización en un sistema semicontinuo o continuo (Massalha, 2007).

La actividad enzimática del micelio libre e inmovilizado se muestra en la figura 8.14. La actividad fue muy baja en el cultivo con el micelio libre (20 U/ml) a las 48 h, aun cuando la remoción de fenoles a ese tiempo fue de 50 %. Este hecho confirma que la remoción de fenoles a las 48 h en el sistema libre está relacionada a la adsorción al micelio. La máxima actividad de 150 U/ml se detectó a las 96 horas.

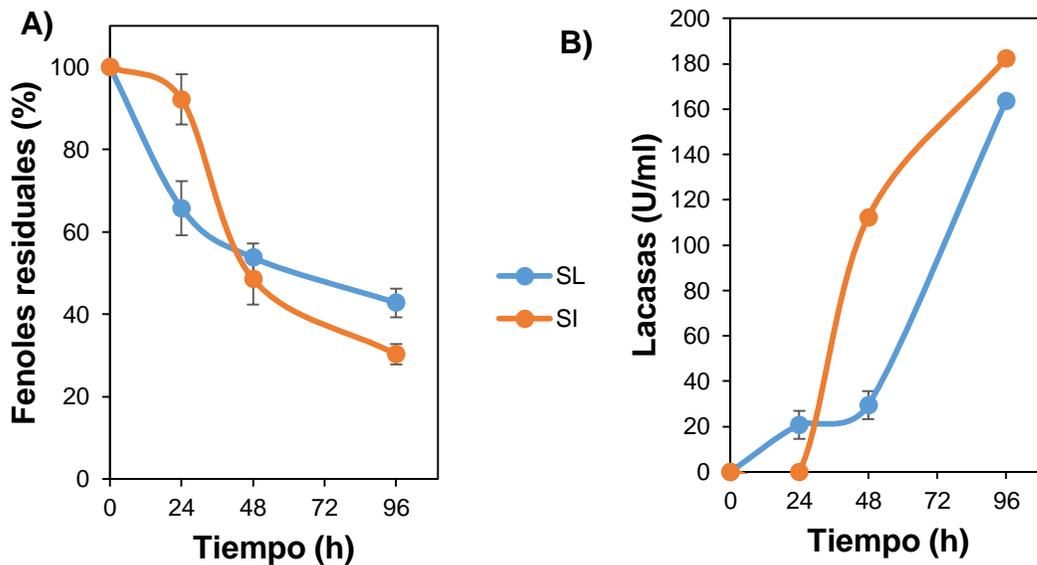


Figura 8.14. Comparación del micelio libre e inmovilizado de *T. hirsuta* Bm2 en la remoción de fenoles (A) y en la producción de lacasas (B) a 35 °C, pH 6 y 150 rpm.

Las esferas con micelio mostraron un retraso de 24 h en la aparición de las enzimas; a las 48 h hubo un incremento sustancial de la actividad con 110 U/ml. Esta actividad

representa un incremento de 5.5 veces más que el sistema libre, por lo que es probable estas enzimas estén involucradas en la alta de remoción de fenoles durante el tratamiento. A las 96 h se alcanzó una actividad de lacasas de 180 U/ml, probablemente debido a la disminución de la concentración de fenoles. Es importante hacer hincapié en que los fenoles son capaces de inhibir la actividad enzimática a altas concentraciones del contaminante, lo que explica la baja actividad al inicio de ambos tratamientos. Existen evidencias de que el soporte tiene un efecto protector contra la toxicidad del fenol y sirve como una barrera de difusión contra el fenol que afecta las enzimas en las células libres (Chen *et al.*, 2002).

El sistema inmovilizado puede actuar como un sistema de liberación lenta, donde el sustrato, en este caso el contaminante (fenol) se libera lentamente a las células sin causar un fuerte impacto al entorno circundante (Massalha, 2007), este efecto “protector” otorgado por el alginato en calidad de soporte de inmovilización, logra evitar el efecto inhibitor del efluente sintético, por lo que al dosificar el contaminante dentro del microambiente celular se puede generar como respuesta, un efecto inductor que participa en el incremento de la enzima, o un efecto mediador que tenga repercusión en el aumento de la actividad enzimática.

Varios estudios han indicado que las células inmovilizadas muestran una mayor estabilidad y mayor actividad de remoción de fenol en comparación de las células libres. Adicionalmente la inmovilización de células completas puede eliminar la necesidad de extraer y purificar las enzimas, permite obtener mayor estabilidad operativa, resistencia a las perturbaciones del entorno y menor costo (Hechachander *et al.*, 2001; Singh & Satyanarayana 2008; Kaur & Satyanaraya 2010). Es en base a lo anterior que la inmovilización de células en alginato de calcio posee un gran potencial de aplicación en el tratamiento de fenol en aguas residuales (Hristov, *et al.*, 2011)

8.9 Ciclos de reúso

La aplicación repetida del micelio inmovilizado fue estudiada para determinar el número de ciclos que puede ser utilizado, ésto con el fin de identificar su potencial para el desarrollo de un sistema de operación continua. En la figura 8.15 se observa que conforme aumentaron los ciclos de reúso de 48 h aumentó la eficiencia de remoción de fenoles. Los niveles de eliminación de fenoles y producción de lacasas se muestran en la tabla 8.1, donde se observa que la remoción de fenol fue de 1510 μM y 1049 U/ml de lacasas durante 6 ciclos de reúso con una duración de 288 h (figura 8.15). Como se mostró anteriormente, el micelio libre logró remover una concentración de fenol de 176 μM con actividad de lacasas de 161 U/ml al final del cultivo. La mayor capacidad de adsorción y de actividad de lacasas del hongo encapsulado en alginato de calcio dieron lugar a una mayor eficiencia de este sistema con respecto al micelio libre. La mayor actividad, así como la resistencia a los fenoles del sistema inmovilizado se podría atribuir a la mayor superficie de perlas de alginato que son más pequeñas en comparación con los pellets que se forman durante el cultivo del micelio libre. En general el crecimiento micelial en la esfera se observó como una película delgada en la superficie de la misma (figura 8.16) y se observó que por cada ciclo de reúso hubo un crecimiento constante de las hifas en la superficie del soporte. La agregación micelial en las esferas fue cualitativamente diferente a los pellets y micelio disperso libre, lo que probablemente facilitó la disponibilidad de sustrato y oxígeno en el sistema inmovilizado.

Con respecto a la actividad de lacasas, diversos estudios han demostrado su implicación en la remoción de fenoles. Estas enzimas pueden actuar en forma directa o indirecta en el proceso de biodegradación, a través de una reacción en cadena que conduce a la degradación de contaminantes mediante la generación de radicales libres, tales como radicales fenoxi, que a su vez pueden actuar sobre moléculas muy recalcitrantes que normalmente no son atacadas por la acción enzimática (Anastasi *et al.*, 2010).

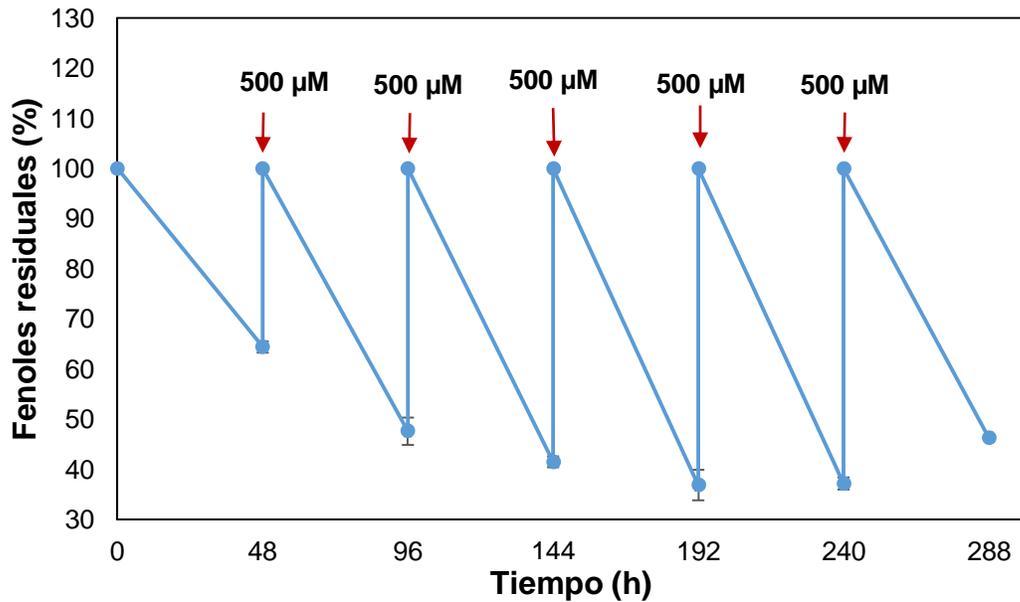


Figura 8.15. Fenoles residuales durante los ciclos del reúso del micelio inmovilizado a 35°C, pH 6 y 150 rpm. La concentración inicial de fenoles fue 500μM.

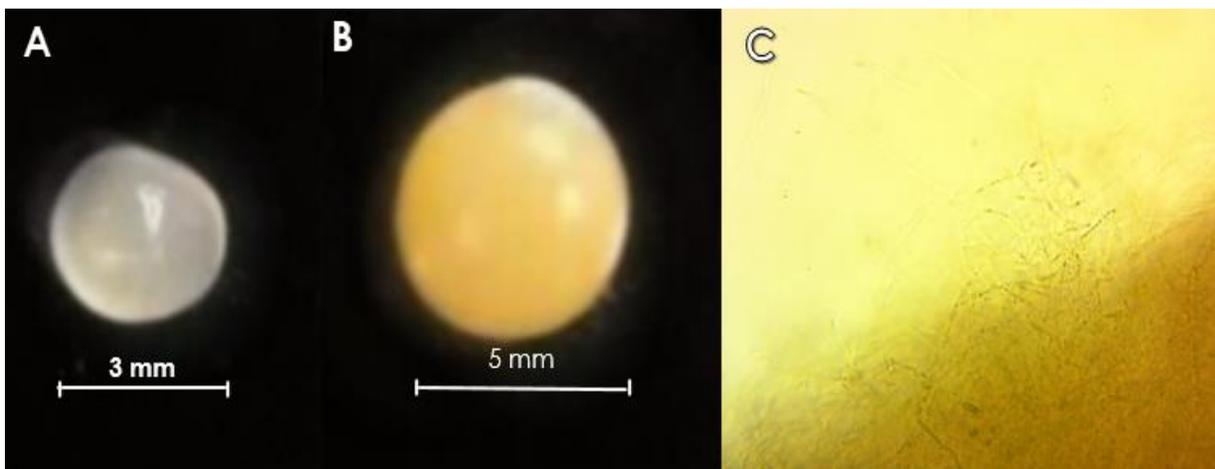


Figura 8.16. Esferas de alginato de calcio con micelio inmovilizado de *T. hirsuta* Bm2 (A) al inicio, (B) al final del cultivo y (C) micrografía del micelio en el interior de la esfera (40X).

Tabla 8.1.

Remoción de fenoles y producción de lacasas durante los ciclos de reúso de micelio libre e inmovilizado.

# Ciclos	Fenoles (µM)	Lacasa (U/ml)
1	175	150
2	200	176
3	275	178
4	335	179
5	335	179
6	190	179
Total	1510	1049

Los mecanismos de biotransformación de fenoles han sido poco estudiados. *Trametes versicolor* ha sido empleado exitosamente en la degradación de compuestos aromáticos como el nitrofenol e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y se ha mencionado que puede ocurrir a través de dos vías diferentes. Una vía tiene lugar extracelularmente mediante las enzimas lacasa, MnP y LiP (Scheiber *et al.*, 1997) que pueden oxidar los compuestos fenólicos hasta CO₂ y H₂O ó mediante la polimerización de los fenoles que da lugar a la formación de precipitados color oscuro (Ryan *et al.*, 2007). La biotransformación el nitrofenol también puede ocurrir de forma intracelular mediante la acción citocromo P450, fenol hidrolasas inespecíficas y/o oxidoreductasas (Ichinose, 2013; Teramoto *et al.*, 2004).

Cabe mencionar que en este estudio se liberó 9% de biomasa durante los ciclos de reúso, lo cual es un resultado satisfactorio para el proceso. La aplicación de células libres comúnmente ocasiona problemas de acumulación de sólidos que son difíciles

de disponer. En este estudio los ciclos de reuso fueron similares a los observados en la inmovilización de *Pseudomona sp.* en alginato (Mohanty *et al.*, 2017) , este sistema permitió degradar el fenol durante 7 ciclos consecutivos sin disminuir su eficacia y también se determinó que las células se mantuvieron activas sin pérdida de actividad durante su reuso.

8.10 Perfil de fenoles por HPLC

Se analizó el perfil de los fenoles antes y después del tratamiento con micelio libre e inmovilizado durante varios ciclos de reuso 1, 3 y 5 (CR1, CR3, CR5). Los resultados se muestran en las figuras 8.17 y 8.18. En el patrón de elución se observó que la resolución de los picos cromatográficos correspondió a los fenoles existentes en la mezcla figura 8.18 A, por lo que puede considerarse que las condiciones empleadas fueron las adecuadas. En los picos identificados antes y después del tratamiento se obtuvieron los mismos tiempos de retención que los estándares (figura 8.18 B y 8.18 C). Se observó que 2,6 dimetoxifenol no presentó pico desde el primer ciclo de reuso y que los picos correspondientes a los fenoles ácido vainílico y guayacol disminuyeron sustancialmente. El cromatograma obtenido después del tratamiento con el micelio inmovilizado también muestra la aparición de pequeños picos que no estaban presentes antes del tratamiento, por lo que es posible que éstos sean productos de la transformación de los fenoles. En resumen, la figura 8.18 se muestra que desde el primer ciclo el 2,6 dimetoxifenol fue removido completamente (100%), mientras que el guayacol y ácido vainílico disminuyeron 92%. En el segundo ciclo ya no se detectó el 2,6 dimetoxifenol y en el tercer ciclo se removió 97% del ácido vainílico.

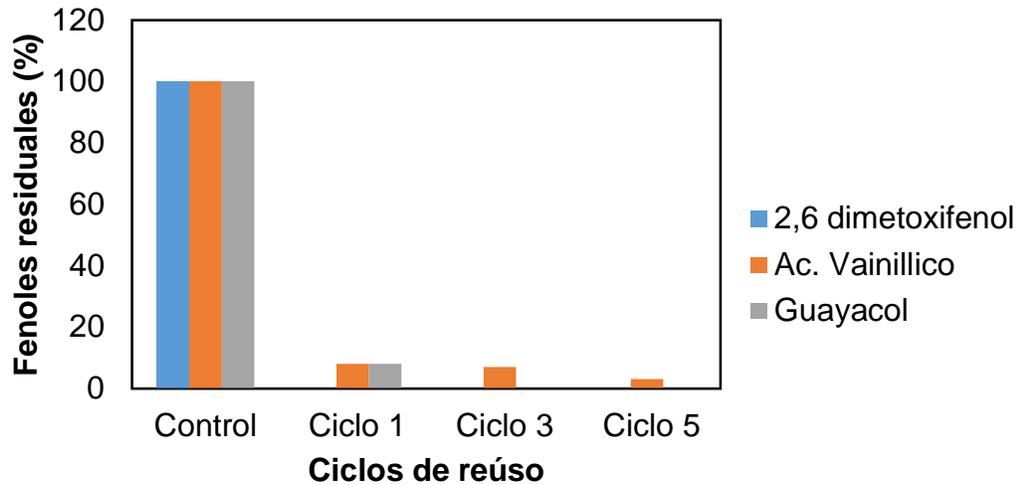


Figura 8.17. Fenoles residuales cuantificados mediante HPLC en los ciclos de reúso 1, 3 y 5 después del tratamiento microbiano, control sin tratamiento.

Los resultados mostraron que el nivel de remoción de fenoles por HPLC fue casi completo (97-100 %), mientras que cuando se determinaron espectrofotométricamente por el método Folin la remoción fue de aproximadamente 60 %. Es importante señalar que método de Folin no permite discriminar entre fenoles y otros compuestos que presentan anillos hidroxilados como los taninos, ligninas, proteínas, etc.. A pesar de que el método es bastante sensible, muchos compuestos reductores como nitritos, aminas, fructuosa entre otros causan interferencias con el método (Clesceri *et al.*, 1989). Esto significa que durante el cultivo el hongo se pueden excretar metabolitos que son cuantificados por el método Folin. A diferencia, la cromatografía por HPLC es un método muy sensible, reproducible y confiable para la identificación y cuantificación de fenoles y otras moléculas. En la figura 24 también se observa la aparición de otros picos pequeños con menores tiempos de retención que podrían ser subproductos de la biotransformación de los fenoles. Para la identificación de estos compuestos sería necesario realizar una cromatografía por HPLC acoplada a masas.

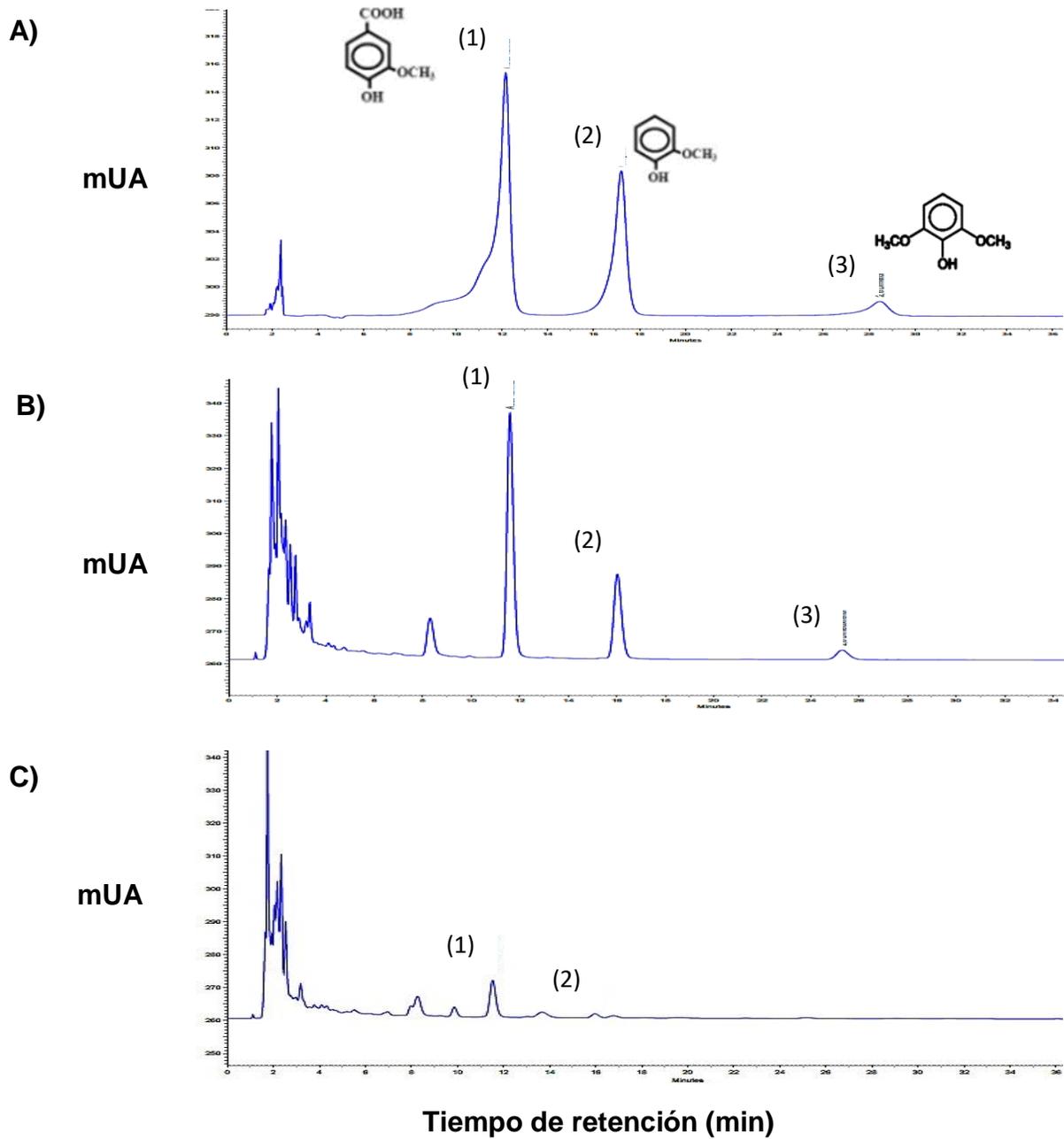


Figura 8.18. Cromatograma de fenoles por HPLC antes y después del tratamiento.

A) mezcla estándar de ácido vainílico, guayacol, 2,6-dimetoxifenol (700 μ M), B) control (ES sin tratamiento microbiano), C) primer ciclo de reúso. Medido a 280 nm.

Picos: (1) ácido vainílico, (2) guayacol, (3) 2,6 dimetoxifenol

9. CONCLUSIONES

El hongo *Trametes hirsuta* Bm2 tolera hasta 500 µm del efluente sintético en placas de cultivo sólido y en cultivo sumergido.

Se establecieron las condiciones de inmovilización del micelio del hongo. El micelio inmovilizado fue capaz de remover fenoles hasta un 60% a las 96 h que coincidió con alta actividad de lacasas, lo que indica que la remoción puede ser debida a la adsorción y acción enzimática.

A pH 6 y 35°C se alcanzó la mayor remoción de fenoles (70%) con nula liberación de biomasa.

El sistema inmovilizado mostró tener ventajas sobre el sistema libre, como mayor remoción de fenoles a las 48 horas y mayor actividad enzimática, la cual contribuye en el proceso de remoción de los fenoles por el micelio. Asimismo, el sistema pudo ser reutilizado durante 6 ciclos con alta actividad de lacasas y baja liberación de biomasa (9%)

La cromatografía por HPLC antes y durante los ciclos de tratamiento mostró que el tratamiento con células inmovilizadas logró remover el 100% de 2,6 dimetoxifenol y guayacol y 97% el ácido vainillico.

Los resultados de este trabajo muestran que el sistema inmovilizado de *T. hirsuta* Bm2 fue muy eficiente en la remoción de fenoles, por lo que es un buen prospecto para el tratamiento de aguas residuales.

10. BIBLIOGRAFÍA

Acosta Baquedano, O.A. (2011). Decoloración de efluentes de la industria textil mediante el sistema lacasa-mediador redox de *Trametes hirsuta* Bm2. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Yucatán.

Agarry, S.E., Durojaiye, A.O. & Solomon, B.O. (2008). Microbial degradation of phenols: A review. *Int J Environ Pollut*, 32: 12-28.

Ahmaruzzaman, M. (2008). Adsorption of phenolic compounds on low-cost adsorbents: A review. *Adv. Colloid. Interface Sci.* 143: 48-67.

Akin, C. (1987). Biocatalysis with immobilized cells. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 5(1): 319-367

Alvarez Briseño, I.A. (2016). Remoción de tintes industriales por tratamientos naturales renovables. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Mérida.

Anastasi, A., Spina, F., Prigione, V., Tigini V., Giansanti, P. & Varese, G.C. (2010). Scale up of a bioprocess for textile wastewater treatment using *Bjerkandera dusta*, *Biores Technol* 101: 3067-3075.

Angelova, M., Sheremetska, P. & Lekov, M. (1998). Enhanced polymethylgalacturonase production from *Aspergillus niger* 26 by calcium alginate immobilisation. *Process Biochem.* 33 (3): 299-305.

Annachhatre, A.P. & Gheewala, S.H. (1996) Biodegradation of chlorinated phenolic compounds. *Biotechnol Adv* 14: 35-43.

Annadurai, G., Babu, S. R., Mahesh, K. P. O., & Murugesan, T. (2000). Adsorption and bio-degradation of phenol by chitosan-immobilized *Pseudomonas putida* (NICM 2174). *Bioprocess Eng.* 22(6): 493-501.

Arana, A. (2002). Aplicaciones de la biología molecular. Identificación del basidiomiceto *Trametes sp* I-62 y expresión heteróloga del gen *cg/cc1* en *Kluyveromyces lactis* y *Yarrowia lipolytica* . Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Madrid.

Archibald, F.S., Bourbonnais, R., Jurasek, L., Paice, M.G., & Reid, I. D. (1997). Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. *J Biotechnol.* 53(2): 215-236.

Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars. Pharmaceutica.* 39(2): 23-39.

Asgher, M., Noreen, S. & Bilal, M. (2017). Enhancement of catalytic, reusability, and long-term stability features of *Trametes versicolor* IBL-04 laccase immobilized on different polymers. *Int J Biol Macromol.* 95: 54-62.

Atlow, S.C., Bonadonna-Aparo, L. & Klibanov, A.M. (1984). Dephenolization of industrial wastewaters catalyzed by polyphenol oxidase. *Biotechnol Bioeng.* 26: 599-603.

Baldrian , P. (2006). Fungal Laccase-occurrence and properties. *FEMS Microb Rev.* 30: 215-242.

Basha, K.M., Rajendran, A., & Thangavelu, V., (2010). Recent Advances in the Biodegradation of Phenol: A review, *Asian J. Exp. Biol. Sci.* 1: 219–234.

Bayramoglu, G. & Arica, M.Y., (2009). Immobilization of laccase onto poly(glycidylmethacrylate) brush grafted poly(hydroxyethylmethacrylate) films: enzymatic oxidation of phenolic compounds. *Mater Sci Eng C.* 29: 1990–1997.

Bayramoğlu, G., Yilmaz, M. & Arica, M.Y. (2010). Reversible immobilization of laccase to poly (4-vinylpyridine) grafted and Cu (II) chelated magnetic beads: biodegradation of reactive dyes. *Biores Technol.* 101(17): 6615-6621.

Blánquez, A., Ball, A.S., González-Pérez, J. A., Jiménez-Morillo, N.T., González-Vila, F., Arias, M.E., & Hernández, M. (2017). Laccase SilA from *Streptomyces ipomoeae* CECT 3341, a key enzyme for the degradation of lignin from agricultural residues. *PloS one*, 12(11): e0187649.

Bonnarme, P., & Jeffries, T. W. (1990). Mn (II) regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi. *Appl. Environ Microb.* 56(1): 210-217.

Bódalo, A., Bastida, J., Gómez, J.L., Gómez, E., Alcaraz, I. & Asanza, M.L. (1997). Stabilization studies of L-aminoacylase-producing *Pseudomonas sp.*BA2 immobilized in calcium alginate gel. *Enzyme Microb Technol.* 21: 64-69.

Böhmer, S., Messner, K. & Srebotnik, E. (1988). Oxidation of phenanthrene by a fungal laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole and unsaturated lipids. *Biochem. Biophys Res Commun.* 244: 233–8.

Bollag, J.M., Shuttleworth, K.L. & Anderson D.H. (1988). Laccase-Mediated detoxification of phenolic compounds. *Appl Environ Microbiol.* 54(12): 3086-3091.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.

Bressler, D.C., Fedorak, P.M. & Pickard, M.A. (2000) Oxidation of carbazole, N-ethylcarbazole, fluorene, and dibenzothiophene by the laccase of *Coriolopsis gallica*. *Biotechnol Lett.* 22: 1119–1125

Buzás, Z., Dallmann, K. & Szajáni, B. (1989). Influence of pH on the growth and ethanol production of free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnol. Bioeng.* 34: 882-884.

Cao, L. (2006). Carrier-bound immobilized enzymes: principles, application and design. John Wiley & Sons.

Carabajal, M.L. (2014) Degradación de compuestos fenólicos por el hongo causante de pudrición blanca *Trametes versicolor*. Tesis de doctorado. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, M.J., & Martínez, Á.T. (2005). Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Appl Environ Microb.* 71(4): 1775-1784.

Chen K. C., Lin Y.H., Chen W.H. & Lin Y. C. (2002). Degradation of phenol by PAA-immobilized *Candida tropicalis*. *Enzyme Microb. Technol.* 31: 490 – 497.

Coll, P.M., Fernandez-Abalos, J.M., Villanueva, J.R., Santamaría, R. & Perez, P. (1993). Purification and characterization of a phenoloxidase (Laccase) from the lignin-degrading basidiomycete PM1 (CECR 2971). *Appl Environ Microbiol.* 59(8): 2607-2613.

Clesceri, L.S., Greenberg, A.R & Trussell, R.R. (1989). Standard methods for the examination of water and wastewater-APHA publication, Washington, DC. ISBN 0-87553-161-X.

Datta, S.L., Christena, L.R., Sriramulu Rajaram & Y.R. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *Biotechnol J.* 3: 1-9.

Desai, S.S., & Nityanand, C. (2011). Microbial laccases and their applications: a review. *Asian J Biotechnol.* 3(2): 98-124.

Dos Santos A.B., Cervantes F.J. & Van Lier J.B. (2007). Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. *Biores Technol.* 98: 2369-2374.

Dos Passos, C. T., Michelon, M., Burkert, J. F. D. M., Kalil, S. J., & Burkert, C. A. V. (2010). Biodegradation of phenol by free and encapsulated cells of a new *Aspergillus* sp. isolated from a contaminated site in southern Brazil. *Afr J Biotechnol.* 9(40): 6716-6720.

Duarte, K., Justino C.I., Panteleitchouk, T.S., Zrineh, A., Freitas, A.C., Duarte, A.C. & Rocha-Santos, P. (2014). Removal of phenolic compounds in olive mill wastewater by silica-alginate -fungi biocomposites. *Int J Environ Sci Technol.* 11: 589-596.

Dzionic, A., Wojcieszynska, D. & Guzik, U. (2016). Natural carriers in bioremediation: A review. *Electron J Biotechnol.* 23: 28-36.

Duran, N., & Esposito, E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Appl Catal B Environ.* 28: 83–99.

D'Annibale, A., Celletti, D., Felici, M., Dimattia, E. & Giovannozzi-Sermanni, G. (1996). Substrate specificity of laccase from *Lentinus edodes*. *Acta Biotechnol.* 16: 257-270.

Dzionic, A., Wojcieszynska, D. & Guzik, U. (2016). Natural carriers in bioremediation: a review. *Electronic Biotechnol J.* 23: 28-36

Enguita, F.J., Martins, L.O., Henriquest, A.O., & Carrondo, M.A. (2003). Crystal structure of a bacterial endospore coat component. A laccase with enhanced thermostability properties. *J Biol Chem.* 278: 19416–19425.

Elnashar, M.M. (2010). Immobilized molecules using biomaterials and nanobiotechnology. *J. Biomater. Nanobiotechnol.* 1(1).

Farkas, V., Felinger, A., Hegedúsova, A., Dékány, I., & Pernyeszi, T. (2013). Comparative study of the kinetics and equilibrium of phenol biosorption on immobilized white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* from aqueous solution. *Colloids Surf B Bioint.* 103: 381-390.

Fernández-Fueyo, E., Castanera, R., Ruiz-Dueñas, F.J., López-Lucendo, M.F., Ramírez, L., Pisabarro, A.G., & Martínez, A.T. (2014). Ligninolytic peroxidase gene expression by *Pleurotus ostreatus*: differential regulation in lignocellulose medium and effect of temperature and pH. *Fungal Genet Biol.* 72: 150-161.

Fritsche, W. & Hofrichter, M. (2008). *Aerobic degradation by microorganisms. Biotechnology Ser. Second Edition.* 144-167.

Gaal, A. & Neujahr, H.Y. 1979. Metabolism of phenol and resorcinol in *Trichosporon cutaneum*. *J. Bacteriol.* 137: 13-21.

Gao, D., Du, J., Yang, W.M. & Liang H. (2010). A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control. *Crit Rev Biotechnol.* 30: 70-77.

Garavaglia, S., Cambria, M.T., Miglio, M., Ragusa, S., Lacobazzi, V. & Palmieri, F.. (2004). The structure of *Rigidoporus lignosus* laccase containing a full component of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair. *J Mol Biol.* 342: 1519–1531.

Gellerstedt, G., & Henriksson, G. (2008). *Lignins: major sources, structure and properties.* Amsterdam, the Netherlands: Elsevier. 201-224.

Godjevargova, T., Ivanova, D., Alexieva, Z. & Dimov, N. (2003). Biodegradation of toxic organic components from industrial phenol production waste waters by free and immobilized *Trichosporon cutaneum* R57. *Process Biochem.* 38: 915-920.

Groboillot, A., Boadi, D.K. & Neufeld, R.J. (1994) Immobilization of cells for application in the food industry. *Crit. Rev. Biotechnol.* 14(2):75-107.

Gusse, A.C., Miller, P.D., & Volk, T.J. (2006). White-rot fungi demonstrate first biodegradation of phenolic resin. *Environ. Sci. Technol.* 40(13): 4196-4199.

Ha, J., Engler, C.R. & Wild, J.R. (2009). Biodegradation of coumaphos, chlorferon and diethylthiophosphate using bacteria immobilized in Ca-alginate gel beads. *Biosour Technol.* 100:1138-1142.

Hanaki, K., Hirunmasuwana, S. & Matsuo, T. (1994). Protection of methanogenic bacteria from low pH and toxic materials by immobilization using polyvinyl alcohol. *Water Res.* 28: 877-885.

Hannoun, B.J. & Stephanopoulos, G. (1986). Diffusion coefficients of glucose and ethanol in cell-free and cell-occupied calcium alginate membranes. *Biotechnol Bioeng.* 28(6): 829-835.

Hammel, K.E., Tien, M., Kalyanaraman, B., & Kirk, T.K. (1985). Mechanism of oxidative Ca-Cb cleavage of a lignin model dimer by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. *J Biol Chem.* 260: 8348-8353.

Hemachander, C., Boss, N. & Puvanakrishnan, R. (2001). Whole cell immobilization of *Ralstonia pickettii* for lipase production. *Process Biochem.* 36(7): 629–633.

Herpoël, I., Moukha, S., Lesage-Meessen, L., Sigoillot, J. C., Asther, M. (2000). Selection of *Pycnoporus cinnabarinus* strains for laccase production. *FEMS Microbiol Lett.* 183(2): 301-306.

Hofrichter, M. & Fritsche, W. (1996). Depolymerization of low-rank coal by extracellular fungal enzyme systems. I. Screening for low-rank-coal-depolymerizing activities. *Appl Microbiol Biotechnol.* 46: 220-225.

Hou, H., Zhou, J., Wang, J., Du, C. & Yan, B. (2004). Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochem.* 39: 1415-1419.

Hristov, A., Gouliamova, D., Nacheva, L., & Tsekova, K. (2012). Biodegradation of phenol in the presence of heavy metals by free and immobilized cells of yeast association. *Compt Rend Acad Bulg Sci*: 65(3): 335-340.

Hu, X., Zhao, X. & Hwang, H. (2007). Comparative study of immobilized *Trametes versicolor* laccase on nanoparticles and kaolinite. *Chemosphere*. 66: 1618–26.

Ichinose, H. (2013). Citocrome P450 of wood-rotting basidiomycetes biotechnological applications. *Biotechnol Appl Biochem*. 60: 71-81.

Islas-Solis, T.R., (2016). Expresión del gen lacasa en *Trametes hirsuta* Bm2 durante su cultivo en residuos lignocelulósicos. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Mérida.

Jamuna, R. & Ramakrishna, S.V. (1992). Continuous synthesis of thermostable α -amylase by *Bacillus* cells immobilized in calcium alginate. *Enzyme Microb Technol*. 14: 36-41.

Jamuna, R., Sai, P.S.T., Vora, S. & Ramakrishna, S.V. (1992). Optimization of critical parameters for immobilization of yeast cells to alginate gel matrix. *J Ferment Bioeng*. 73(4): 319-322.

Johannes, C., Majcherczyk, A. & Huttermann, A. (1996). Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediator compounds. *Appl Microbiol Biotechnol*. 46: 313-317.

Jones, K.H., Trudgill, P.W. & Hopper, D.J. (1993). Metabolism of *p*-cresol by the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol*. 59: 1125-1130.

Junter, G.A., Coquet, L., Vilain, S. & Jouenne, T. (2002). Immobilized-cell physiology: current data and the potentialities of proteomics. *Enzyme Microb Technol*. 31: 201-212.

Karigar, C., Mahesh, A., Nagenahalli, M. & Yun, D. J. (2006). Phenol degradation by immobilized cells of *Arthrobacter citreus*. *Biodegradation*. 17: 47-55.

Kaur, P. & Satyanarayana, T. (2010). Improvement in cell-bound phytase activity of *Pichia anomala* by permeabilization and applicability of permeabilized cells in soymilk dephytinization. *J Appl Microbiol.* 108(6): 2041–2049.

Kim, J.W., Rainina, E.I., Mulbry, W.W., Engler, C.R. & Wild J. (2002). Enhanced rate biodegradation of organophosphate neurotoxins by immobilized non-growing bacteria. *Biotechnol Progr.* 18: 429-436.

Kirk, T.K., & Farrell, R L. (1987). Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annu Rev Microbiol.* 41: 465-505.

Klei, H.E., Sundstrom, D.W. & Shim, D. (1985). Immobilization of enzymes by microencapsulation in Immobilized cell and enzymes: a practical approach. J. Woodward, Ed. IRL Press. 49-54.

Krastanov, A., Alexieva, Z. & Yemendzhiev, H. (2013). Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives. *Eng Life Sci.*13(1): 76-87.

Kunamneni, A., Plou, F.J., Ballesteros, A. & Alcalde, M. (2008). Laccases and their applications: A patent review. *Recent Pat Biotechnol.* 2: 10-24.

Lee, C.M., Lu C.J. & Chuang M.S. (1994). Effects of immobilized cells on the biodegradation of chlorinated phenols. *Water Sci Technol.* 30: 87-90.

Lin, S. Y. & Dence, C. W. (1992). *Methods in lignin chemistry.* Springer-Verlag, Berlin.

Lloret, L., Eibes, G., Feijoo, G., Moreira, M.T., Lema, J.M. & Hollmann, F. (2011). Immobilization of laccase by encapsulation in a sol–gel matrix and its characterization and use for the removal of estrogens. *Biotechnol Prog.* 27: 1570-1579.

Madhavi V. & Lele, S.S. (2009). Laccase: properties and applications. *Bioresource.* 4(4): 1694-1717.

Majumder, P.S. & Gupta S.K. (2007). Removal of chlorophenols in sequential anaerobic-aerobic of bacteria involved in degradation of pentachlorophenol in soil. *Environ Microbiol.* 7: 1349-1360.

Manohar, S., Kim, C.K. & Karegoudar T.B, (2001). Enhanced degradation of nephtahalene by immobilization of *Pseudomonas sp.* strain NGK1 in polyuretane foam. *Appl Microbiol Biotechnol.* 55: 311-316.

Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Vicent, T & Caminal, G. (2009): Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere.* 74: 765–772.

Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Blánquez, P., Vicent, T. & Caminal, G. 2010a. Biodegradation of the analgesic naproxen by *Trametes versicolor* and identification of intermediates using HPLC-DAD-MS and NMR. *Bioresour Technol.* 101: 2159-2166.

Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Cruz- Morato, C., Caminal, G. & Vicent, T. 2010. White-rot fungus-mediated degradation of the analgesic ketoprofen and identification of intermediates by HPLC-DAD-MS and NMR. *Chemosphere* 78: 474-481.

Martínez-Trujillo, M.A. & García-Rivero, M. (2012). Revisión: aplicaciones ambientales de microorganismos inmovilizados. *Rev Mex Ing Quím.* 11: 55-73.

Massalha, N., Basheer, S. & Sabbah, I. (2007). Effect of adsoption and bead size of immobilized biomass on the rate of biodegradation of phenol at high concentration levels. *Ind Eng Chem.* 46: 6820-6824.

Mateo, C.; Palomo, J.M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J.M. & Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol.* 40: 1451–1463.

Mathialagan, T., & Viraraghavan, T. (2009). Biosorption of pentachlorophenol from aqueous solutions by a fungal biomass. *Bioresour. Technol.* 100(2): 549-558.

Mattiasson, B. & Hahn-Hägerdal, B. (1982). Microenvironmental effects on metabolic behaviour of immobilized cells. A Hypothesis. *Eur J Appl Microbiol.* 16: 52-55.

Mayer, A.M., & Staples, R.C. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry.* 60: 551-651.

Mishra, S., Jyot, J., Kuhad, R. & Lal, B. (2001). Evaluation of inoculum addition to stimulate it *in situ* bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. *Appl Environ Microbiol.* 67: 1675-1681.

Mohan, J., Prakash, R. & Behari, J.R. (2004). Electrochemical detection and catalytic oxidation of phenolic compounds over nickel complex modified graphite electrode. *Appl Eco. Environ Res.* 2(2): 25-33.

Mohanty, S.S., & Jena, H.M. (2017). Biodegradation of phenol by free and immobilized cells of a novel *Pseudomonas sp.* NBM11. *Braz. J Chem Eng.* 34(1): 75-84.

Mohorcic, M., Teodorovic, S., Golob, V. & Friedrich, J. (2006). Fungal and enzymatic decolourisation of artificial textile dye baths. *Chemosphere.* 63: 1709-1717.

Moreira, M.T., Mielgo, I., Feijoo, G. & Lema J.M. (2000). Evaluation of different fungal strains in the decolourisation of synthetic dyes. *Biotechnol Lett.* 22: 1499-1503.

Norton, S. & D'Amore, T. (1994). Physiological effects of yeast cell immobilization: Applications for brewing. *Enzyme Microb Technol.* 16: 365-375.

Norton, S. & Vuilleumard, J.C. (1994). Food bioconversions and metabolite production using immobilized cell technology. *Crit Rev Biotechnol.* 14(2): 193-224.

Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P. & Soccol, V.T. (2000). Biotechnological potential of agroindustrial residues: sugarcane bagasse. *Biores Technol.* 74: 69-80.

Papinutti, L. (2011). Black liquor decolorization by selected white-rot fungi. *Appl Biochem Biotechnol.* 165: 406-415.

Park, C., Lee, B., Han, E. J., Lee, J., & Kim, S. (2006). Decolorization of acid black 52 by fungal immobilization. *Enzyme Microb Technol.* 39(3), 371-374.

Paszczynski, A., & Crawford, R. L. (1995). Potential for bioremediation of xenobiotic compounds by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol. Prog* 11(4): 368-379.

Pashova, S., Slokoska, L., Sheremetska, P., Krumova, E., Vasileva, L. & Angelova, M. (1999b). Physiological aspects of immobilised *Aspergillus niger* cells producing polymethylgalacturonase. *Process Biochem.* 35: 15-19.

Pointing, S.B. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl Microbiol Biotechnol.* 57: 20-33.

Poncelet, D. & Neufeld, R.J. (1989). Shear breakage of nylon membrane microcapsules in a turbine reactor. *Biotechnol Bioeng.* 33: 95-103.

Pool-Yam, L.F. (2014). Obtención de extractos fenólicos potenciadores de lacasas en cultivos de *Trametes hirsuta* en salvado de trigo. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico de Mérida.

Pozdnyakova, N.N., Rodakiewicz-Nowak, J. & Turkovskaya, O.V. (2004). Catalytic properties of yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1. *J. Mol Catal B: Enzym.* 30: 19-24.

Prasad, K.K., Mohan, S.V., Pati, B R., & Sarma, P.N. (2006). Immobilization of *Pleurotus ostreatus* 1804 on PUF cubes: Influence of mycelial growth pattern on laccase yield. *IJBT* (5)1: 84-88.

Quan, C.S., Fan, S.D. & Ohta, Y. (2003). Immobilization of *Candida krusei* cells producing phytase in alginate gel beads: an application of the preparation of myo-inositol phosphates. *Appl Microbiol Biotechnol.* 62 41-47.

Quintana, M.G. & Dalton, H. (1998). Production of toluene cis-diol by immobilized *Pseudomona putida* UV4 cells in barium alginate beads. *Enzyme Microb Technol.* 22: 713-720.

Ratanapongleka, K., & Punbut, S. (2017). Removal of acetaminophen in water by laccase immobilized in barium alginate. *Environ Technol.* 1-10.

Rekuc, A., Bryjak, J., Szymanska, K., & Jarzebski, A.B., (2009). Laccase immobilization on mesostructured cellular foams affords preparations with ultra high activity. *Process Biochem.* 44: 191–198.

Reddy, C.A. & Mathew, Z. (2001). Bioremediation potential of white rot fungi. In: Gadd GM (Ed) *Fungi in bioremediation*. Cambridge University Press, London. 52-78.

Reyes, N., Rivas-Ruiz, I., Dominguez-Espinosa, R., & Solis, S. (2006). Influence of immobilization parameters on endopolygalacturonase productivity by hybrid *Aspergillus sp.* HL entrapped in calcium alginate. *Biochem Eng J.* 32(1): 43-48.

Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., & Nigam, P. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresour Technol.* 77(3): 247-255.

Rodriguez - Couto, S. (2009). Dye removal by immobilised fungi. *Biotechnol Adv.* 27(3): 227-235.

Rogalski, J., Dawidowicz, A.L., & Leonowicz, A. (1990). Purification and immobilization of the inducible form of extracellular laccase of the fungus *Trametes versicolor*. *Eng Life Sci.* 10(3): 261-269.

Ryan, D., Leukes, W. & Burton, S. (2007). Improving the bioremediation of phenolic wastewaters by *Trametes versicolor*. *Biores Technol.* 98: 579-587.

Sarı, A., & Tuzen, M. (2009). Kinetic and equilibrium studies of biosorption of Pb (II) and Cd (II) from aqueous solution by macrofungus (*Amanita rubescens*) biomass. *J. Hazard Mater.* 164(2), 1004-1011.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.

Sánchez-Ramírez, J., Martínez-Hernández, J.L., Segura-Ceniceros, E P., Contreras-Esquivel, J.C., Medina-Morales, M.A., Aguilar, C.N., & Iliná, A. (2014). Inmovilización de enzimas lignocelulolíticas en nanopartículas magnéticas. *Quim Nova.* 37(3): 504-512.

Santos, V. & Linardi, R. (2004). Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents, identification and degradation potential. *Process Biochem.* 39: 1001-1006.

Santos, V.L., Heilbuth, N.M., Braga, D.T., Monteiro, A.S., & Linardi, V.R. (2003). Phenol degradation by a *Graphium sp.* FIB4 isolated from industrial effluents. *J Basic Microbiol.* 43(3): 238-248.

Sanlier, S.H., Gider, S. & Köprülü, A. (2013). Immobilization of laccase for biotechnology applications. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 41(4): 259-263.

Sathiya- Moorthi, P., Periyar, S., Sasikalaveni, A., Murugesan, K. & Kalaichelvan, P.T. (2007). Decolorization of textile dyes and their effluents using white rot fungi. *Afr J Biotechnol.* 6: 424-429.

Schügerl, K., Gerlach, S.R. & Siedenberg, D. (1998). Influence of process parameters on the morphology and enzyme production of *Aspergillus*. *Adv. Biochem. Eng Biotechnol.* 60: 195-266.

Selvam, K., Swaminathan, K. & Chae, K.S. (2003). Decolourization of azo dyes and dye industry effluent by a white rot fungus *Telephora sp.* *Biores Technol.* 88: 115-119

Silva, S.R., González, A.E., & Villar, J.C. (2002). Congreso Iberoamericano de Investigación de Celulosa y Papel. Chile: Universidad de Chile.

Singh, B. & Satyanarayana, T. (2006) A marked enhancement in phytase production by a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* using statistical designs in a cost-effective cane molasses medium. J Appl Microbiol. 101: 344–352

Singleton, V.L. & Rossi, J.A.Jr. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. Am J Enol Vitic. 16: 144-158.

Smidsrod, O. & Skak-Braek, L. (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. TIBTECH. 8: 71-78.

Smirnov, S.A., Koroleva, O.V., Gavrilova, V.P., Belova, A.B. & Klyachko, N.L. (2001). Laccases from basidiomycetes: physico-chemical characteristics and substrate specificity towards methoxyphenolic compounds. Biochemie. 66: 774-779.

Smith, M.R., de Haan, A. & de Bont J.A.M. (1993). The effect of calcium alginate entrapment on the physiology of *Mycobacterium* sp. strain E3. Appl Microbiol Biotechnol. 38: 642-648.

Spahn, C. & Minteer, S.D. (2008). Enzyme immobilization in biotechnology. Recent Pat Eng. 2(3): 195-200.

Sriamornsak, P. (1998). Preliminary investigation of some polysaccharides as a carrier for cell entrapment. Eur J Pharm Biopharm. 46: 233-236.

Sundarapandiyam, S., Ramanaiah, B., Chandrasekar, R., & Saravanan, P. (2010). Degradation of phenolic resin by *Trametes versicolor*. J Polym Environ. 18(4): 674-678.

Suzuki, T., & Motosugi, M. (1990). Determination of 2, 6-Dimethoxyphenol, guaiacol and 4-Methylguaiacol in Dried Skipjack (*Katsuoobushi*) by high performance liquid chromatography. NSKGA. 37(7): 536-539.

Taipa, M., Cabral, J.M.S. & Santos, H. (1993). Comparison of glucose fermentation by suspended and gel-entrapped yeast cells: An in vivo nuclear magnetic resonance study. *Biotechnol Bioeng.* 41: 647-653.

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

Tapia- Tussell, R., Perez – Brito, D., Torres-Calzada, C., Cortes-Velazquez, Alzate-Gaviria, L., Chablé-Villacis, R. & Solís- Pereira, S. (2015) Laccase Gene Expression and Vinasse Biodegradation by *Trametes hirsuta* Strain Bm-2. *Molecules.* 20: 15147-15157.

Teramoto, H., Tanaka H. & Wariishi, H. (2004). Degradation of 4-nitrophenol by the lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 66:312-317

Thakur, V., Pradeep, K., Verma, A. & Chand D. (2015). Decolorization of dye by alginate immobilized laccase from *Cercospora* SPF-6: Using compact 5 stage plug flow reactor. *Int J Curr Microbiol. App Sci.* 4: 183-200.

Thurston, C.F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology.* 140: 19-26.

Torres, E., Bustos-Jaimes, I. & Le Borgne, S. (2003). Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Appl Catal B Environ.* 38: 1-15.

Tran, D. N., & Balkus Jr.K.J. (2011). Perspective of recent progress in immobilization of enzymes. *Acs Catalysis.* 1(8): 956-968.

Trejo-Aguilar, B.A., Visser, J. & Aguilar-Osorio, G. (1996). Pectinase secretion by *Aspergillus* FP-180 and *Aspergillus niger* N-402 growing under stress induced by the

pH of culture medium. In: Visser J, Voragen AGJ, eds. Pectins and Pectinases. Biotechnol Progress. 14: 915-920.

Vacio-Muro, K.J., Jáuregui-Rincon, J., Lozano-Alvarez, J.A., Sánchez-González M.N., (2015). Reducción de la contaminación del nejayote usando el hongo *Bjerkandera adusta* y los biopolímeros alginato y quitosano. XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.

Verschueren, K. (1977). Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals. Van Nostrand Reinhold Co., New York.

Wingard, L.B. (1972). Enzyme Engineering, Interscience Publishers, New York.

Wong, S.S. & Wong, L.J.C. (1992). Chemical cross-linking for the stabilization of proteins and enzymes. Enzyme Microb Technol. 14: 866-874.

Yan, J., Bajpai, R., Iannotti, E., Popovic, M. & Mueller, R. (2001). Lactic acid fermentation from enzyme-thinned starch with immobilized *Lactobacillus amylovorus*. Chem Biochem Eng Quart. 15 (2): 59-63.

Yemendzhiev, H., Gerginova, M., Krastanov, A., Stoilova, I. & Alexieva, Z. (2008). Growth of *Trametes versicolor* on phenol. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 35: 1309-1312.

Yemendzhiev, H., Terziska, A., Manasiev J. & Alexieva Z. (2011). Degradation of mixed aromatic pollutants by *Trametes versicolor* Strain 1. Biotechnol Equip. 25: 39-40.

Younes, S.B., Mechichi, T. & Sayadi, S. (2007). Purification and characterization of the laccase secreted by the white rot fungus *Perenniporia tephropora* and its role in the decolourization of synthetic dyes. J Appl Microbiol. 102: 1033-1042

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

Zhang, J., Xu, Z., Chen, H. & Zong, Y. (2009). Removal of 2, 4-dichlorophenol by chitosan-immobilized laccase from *Coriolus versicolor*. *Biochem Eng J.* 45(1): 54-59.

Zhang, S., Gao, E., & Xia, L. (2006). Dechlorination of dichlorophenol in waste water by immobilized laccase. *J Chem Ind Eng.* 57(2): 359.

Zhao, M., Wang, Y., Liu, Z., Cui, D. & Bian, X. (2011). Properties of immobilized laccase on mesostructured cellular foam silica and its use in dye decolorization. *J Macromol Sci A.* 48(6): 447-453.

Znidarsic, P. & Pavko, A. (2001). The morphology of filamentous fungi in submerged cultivations as a bioprocess parameter. *Food Technol Biotech.* 39(3): 237-252.

ANEXOS

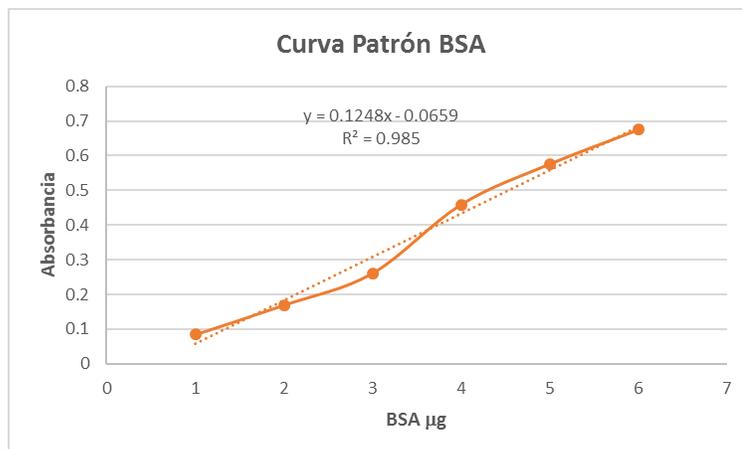
Anexo 1. Composición del medio de cultivo YMPG (1 L) (Bonnarme & Jeffries, 1990)

Componente	Cantidad
Glucosa	10 g
Extracto de malta	10 g
Peptona	2 g
Extracto de levadura	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	1 g
Tiamina HCl	1 mg

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

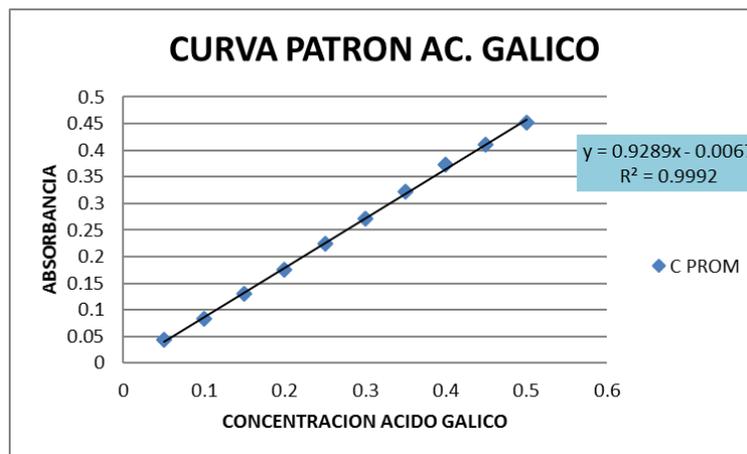
Anexo 2. Curva estándar BSA para cuantificación de proteínas por ensayo de Bradford.

[Proteína]	Absorbancia
1 µg	0.084666667
2.5 µg	0.169333333
5 µg	0.261333333
10 µg	0.459333333
15 µg	0.576
20 µg	0.674666667



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

Ac. Galico mg/ml	Absorbancia
0.05	0.04366667
0.1	0.083
0.15	0.131
0.2	0.17533333
0.25	0.225
0.3	0.272
0.35	0.323
0.4	0.37233333
0.45	0.41
0.5	0.45233333



Anexo 4. Factores y niveles del diseño factorial 2^k

Condición	Micelio (g)	Tamaño (mm)	CaCl ₂ (M)	Variable de respuesta
C1	(↓) 0.107	(↓) 3	(↓) 0.05	Remoción de fenoles
C2	(↓) 0.107	(↓) 3	(↑) 0.1	
C3	(↓) 0.107	(↑) 5	(↓) 0.05	
C4	(↓) 0.107	(↑) 5	(↑) 0.1	
C5	(↑) 0.23	(↓) 3	(↓) 0.05	
C6	(↑) 0.23	(↓) 3	(↑) 0.1	
C7	(↑) 0.23	(↑) 5	(↓) 0.05	
C8	(↑) 0.23	(↑) 5	(↑) 0.1	