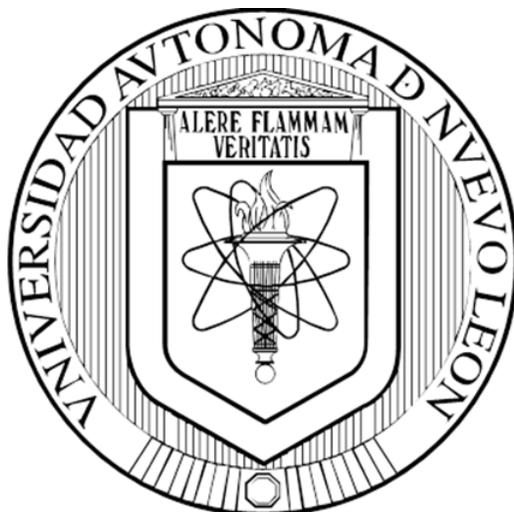


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS

**INMOVILIZACIÓN DE LACASAS EN ESFERAS DE SiO₂ PARA
LA DEGRADACIÓN DE ROJO CONGO**

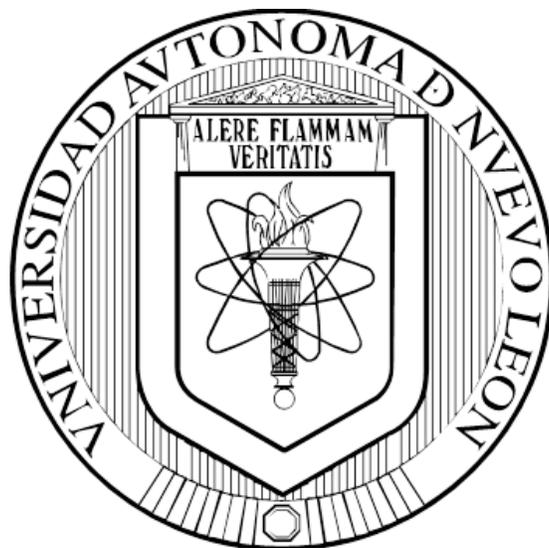
Por

LYNETTE ALVARADO RAMÍREZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
**MAestrÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN PROCESOS
SUSTENTABLES**

FEBRERO, 2015

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



TESIS

**INMOVILIZACIÓN DE LACASAS EN ESFERAS DE SiO_2 PARA LA
DEGRADACIÓN DE ROJO CONGO**

POR

LYNETTE ALVARADO RAMÍREZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN PROCESOS
SUSTENTABLES**

FEBRERO, 2015

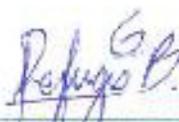
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN PROCESOS SUSTENTABLES

"INMOVILIZACIÓN DE LACASAS EN ESFERAS DE SiO₂ PARA LA
DEGRADACIÓN DE ROJO CONGO"

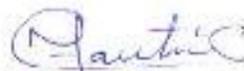
Aprobación de la Tesis:



DRA. ALCIONE GARCÍA GONZÁLEZ
PRESIDENTE



DR. REFUGIO BERNARDO GARCÍA REYES
SECRETARIO



DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS
VOCAL



DRA. MA. ARACELI HERNÁNDEZ RAMÍREZ
SUB-DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN PROCESOS SUSTENTABLES

**"INMOVILIZACIÓN DE LACASAS EN ESFERAS DE SiO_2 PARA LA
DEGRADACIÓN DE ROJO CONGO"**

Revisión de la Tesis:



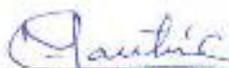
DRA. ALCIONE GARCÍA GONZALEZ
ASESORA



DRA. MARÍA TERESA GARZA GONZÁLEZ
CO-ASESORA



DR. REFUGIO BERNARDO GARCÍA REYES
REVISOR



DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS
REVISOR



DR. JUAN FRANCISCO VILLARREAL-CHIU
REVISOR



DRA. SARA ELENA SOLÍS PEREIRA
REVISOR

Lynette Alvarado Ramírez

Fecha de Graduación: Diciembre,

2014

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del estudio: INMOVILIZACIÓN DE LACASAS EN ESFERAS DE SiO₂ PARA LA DEGRADACIÓN DE ROJO CONGO

**Número de páginas: 103
para el grado de Maestría**

Candidato

Orientación en

en Ciencias con

Procesos Sustentables

Área de estudio: procesos sustentables

Propósito y Método de Estudio: Las lacasas son enzimas extracelulares que tienen la capacidad de oxidar una amplia variedad de sustratos utilizando al oxígeno como aceptor de electrones. Debido a esto, se ha utilizado esta enzima para diversas aplicaciones biotecnológicas dentro de las cuales destaca la degradación de colorantes textiles. En este trabajo se inmovilizaron tres tipos de lacasas, dos a partir de hongos de pudrición blanca (lacasa-HPB y lacasa HTT) y una comercial del género *Trametes versicolor* (lacasa-EC), en esferas mesoporosas de dióxido de silicio modificado para la degradación del colorante tipo azo rojo congo y azul índigo. Las lacasas HPB y HTT fueron purificadas a partir de la fermentación líquida optimizada de los hongos de pudrición blanca. Posteriormente se inmovilizaron mediante enlace covalente con el soporte (SiO₂) y se realizaron las cinéticas de actividad enzimática y de degradación de los colorantes rojo congo y azul índigo.

Contribuciones y Conclusiones: Se encontraron las condiciones de máxima producción de lacasa para los hongos seleccionado (HPB) y el hongo de referencia (HTT), observando que la producción de las lacasas se ve favorecida cuando el medio de cultivo contiene materiales lignocelulósicos. Además se purificaron lacasas a partir de los extractos de los hongos HPB y

HTT obteniendo pesos moleculares de aproximadamente 67 kDa lo que concuerda con lo reportado para las lacasas monoméricas. Se inmovilizaron las lacasas-EC, lacasas-HPB y lacasas-HTT en esferas mesoporosas de dióxido de silicio reteniendo un 56.94%, 55.68% y 46.08% de su actividad inicial respectivamente. En la degradación del colorante rojo congo con las enzimas inmovilizadas se obtuvieron porcentajes de decoloración de un 92.2%, 61.9% y 42.2% para la lacasa-EC, lacasa-HPB y lacasa-HTT en un tiempo de 60 minutos. Para el colorante azul índigo los porcentajes de degradación fueron de 89.2%, 62.1% y 50.3% para la lacasa-EC, lacasa-HPB y lacasa-HTT en 90 minutos. Por los resultados anteriores se muestra que la inmovilización enzimática de lacasas en SiO₂ mesoporoso modificado con aminos, es una opción recomendable en el tratamiento de efluentes textiles, ya que los porcentajes de degradación se favorecen por el aporte que presenta el soporte en la degradación debido a la adsorción del colorante, disminuyendo por lo tanto los tiempos de proceso de tratamiento de efluentes acuosos con colorantes.

FIRMA DEL ASESOR:

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer primeramente a la Universidad Autónoma de Nuevo León y a la Facultad de Ciencias Químicas por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico para la realización de mis estudios

A mi asesora la Dra. Alcione García por todo el apoyo brindado en los dos años de estudios, gracias por tenerme paciencia, por enseñarme y aconsejarme, es una gran persona y tuve la fortuna de conocerla y ser su alumna.

A la Dra. María Elena Cantú por las facilidades brindadas al permitirme trabajar en el laboratorio de Biotecnología y por la facilitación de la cepa del hongo que se utilizó como referencia en el desarrollo de la tesis.

A mi co-asesora la Dra. Tere Garza por los consejos y sugerencias brindados.

Al Dr. Bernardo García por su gran apoyo, comentarios y su interés mostrado al trabajo realizado.

Al Dr. Francisco Villarreal por sus sugerencias a lo largo de la duración de la investigación.

A la Dra. Sara Solis y a mis compañeros de laboratorio de Mérida por el cálido recibimiento que me dieron y por sus sugerencias en la investigación.

DEDICATORIAS

Quiero dedicar esta tesis en especial a mi mamá ya que ella siempre confió en mí y me apoyó de todas las formas que pueden existir y para mí es un gran ejemplo de la perseverancia, a mi papá que de igual forma he visto su apoyo en todas las etapas de mi vida. A mis hermanos Dulce, Josué y Jehú que a pesar de nuestras diferencias los quiero mucho y sé que puedo contar con ellos siempre. A mis abuelitos Alfonso y Esperanza que me enseñaron con su ejemplo que todo se puede lograr esforzándote y dando lo mejor de ti en todo lo que emprendas. Mis compañeros de maestría Gerardo, Eric, Daniel, Jessica que hicieron amenos cada uno de los días de laboratorio y clases que compartimos, a Esther y Tania ya que en ellas dos encontré a dos amigas en las que sé que puedo confiar y que quiero mucho. A Héctor porque a lo largo de este tiempo me brindó apoyo moral y ánimo. A todos mis amigos y todas las personas que de alguna u otra forma fueron un aliento cuando más los necesitaba.

ÍNDICE

| Capítulo | Número de página |
|--|------------------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Efluentes textiles | 1 |
| 1.2 Colorantes tipo azo | 2 |
| 1.3 Tratamientos fisicoquímicos de aguas residuales | 3 |
| 1.4 Tratamientos biológicos de aguas residuales | 5 |
| 1.4.1 Tratamiento con enzimas producidas por hongos | 6 |
| 1.5 Inmovilización | 8 |
| 1.5.1 Tipos de inmovilización | 9 |
| 1.6 Hipótesis | 17 |
| 1.7 Objetivo General | 17 |
| 1.8 Objetivos específicos | 17 |
| 2. METODOLOGÍA | 19 |
| 2.1 Aislamiento y selección de las cepas de hongos con actividad enzimática para la degradación de colorantes | 19 |
| 2.1.2 Selección de la cepa del hongo | 20 |
| 2.1.3 Inóculo para el medio de producción de lacasas | 20 |
| 2.1.4 Producción del extracto crudo de lacasas | 21 |
| 2.2 Condiciones de cultivo óptimas para la producción de lacasas (medio de cultivo y temperatura) | 21 |
| 2.2.1 Medición de la actividad enzimática | 23 |
| 2.2.2 Medición de proteína por el método de Bradford | 25 |
| 2.2.3 Determinación del peso seco | 25 |
| 2.2.4 Degradación del colorante | 25 |
| 2.3 Separación de fracciones de enzimas para la degradación | 26 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3.1 Ultrafiltración..... | 27 |
| 2.3.2 Precipitación con sulfato de amonio..... | 27 |
| 2.3.3 Diálisis..... | 28 |
| 2.3.4 Cromatografía por exclusión de tamaño molecular..... | 28 |
| 2.3.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS..... | 29 |
| 2.3.6 Zimogramas..... | 32 |
| 2.4 Obtención de los soportes para la inmovilización enzimática..... | 32 |
| 2.4.1 Preparación de esferas de dióxido de silicio mesoporosas ... | 32 |
| 2.4.2 Modificación del soporte con grupos amino..... | 33 |
| 2.4.3 Caracterización del soporte..... | 33 |
| 2.5 Inmovilización de la enzima en el soporte..... | 35 |
| 2.5.1 Determinación de las condiciones óptimas para la inmovilización..... | 35 |
| 2.5.2 Inmovilización de la lacasa-HPB y lacasa-HTT..... | 37 |
| 2.5.3 Determinación de las condiciones de máxima actividad enzimática a diferentes valores de pH y temperatura..... | 38 |
| 2.6 Degradación del colorante rojo congo y azul índigo con las enzimas inmovilizadas y sin inmovilizar..... | 38 |
| 2.7 Disposición de los residuos generados..... | 39 |
| 3. RESULTADOS..... | 40 |
| 3.1 Aislamiento y selección de las cepas de los hongos..... | 40 |
| 3.1.1 Medición de la actividad enzimática..... | 42 |
| 3.2 Obtención de las condiciones óptimas de producción de la enzima con los hongos de pudrición blanca..... | 43 |
| 3.2.1 Actividad enzimática..... | 44 |
| 3.2.2 Proteína extracelular..... | 49 |

| | | |
|-----------------|---|------------|
| 3.2.3 | Peso seco..... | 55 |
| 3.2.4 | Decoloración del colorante rojo congo | 59 |
| 3.3 | Separación de las fracciones ricas en lacasas | 61 |
| 3.4 | Síntesis del soporte | 69 |
| 3.4.1 | Caracterización del soporte..... | 69 |
| 3.5 | Inmovilización de la lacasa comercial | 76 |
| 3.5.1 | Inmovilización de la lacasa-HPB y lacasa-HTT | 80 |
| 3.5.2 | Máxima actividad de las lacasas inmovilizadas frente a valores de pH y temperatura diferentes | 81 |
| 3.6 | Degradación del colorante rojo congo y azul índigo con las enzimas libres e inmovilizadas..... | 86 |
| 4. | CONCLUSIONES..... | 91 |
| 5. | BIBLIOGRAFÍA..... | 94 |
| ANEXO I | | 99 |
| ANEXO II | | 100 |
| ANEXO IV | | 103 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | Número de página |
|---|-------------------------|
| Figura 1. Inmovilización por atrapamiento (a) y encapsulamiento (b) | 10 |
| Figura 2. Inmovilización por entrecruzamiento..... | 10 |
| Figura 3. Inmovilización por adsorción (a), enlace covalente (b) | 12 |
| Figura 4. Proceso de modificación del SiO ₂ con grupos aminos para la inmovilización enzimática | 12 |
| Figura 5. Estructura del rojo congo | 26 |
| Figura 6. Estructura del colorante azul índigo..... | 39 |
| Figura 7. Hongos de pudrición blanca recolectados | 40 |
| Figura 8. Hongos aislados hongo 1(a), hongo 2(b), y hongo 3(c) | 41 |
| Figura 9. Placa con colorante rojo congo (a), hongo 2 (b), hongo 3 (c) | 41 |
| Figura 10. Hongo de referencia (<i>Trametes troggi</i> , HTT) en placa sólida. | 42 |
| Figura 11. Cinética de la actividad enzimática de lacasa comercial (Lacasa-EC), y los extractos crudos de los hongos de referencia (HTT) y aislado (HPB) | 43 |
| Figura 12 Gráfico de superficie de respuesta del hongo seleccionado (HPB) para la actividad enzimática frente a los factores de medio de cultivo y temperatura | 46 |
| Figura 13. Gráfico de superficie de respuesta del hongo de referencia (HTT) para la actividad enzimática frente a los factores de temperatura y medio de cultivo | 48 |
| Figura 14. Gráfico de superficie de respuesta del hongo seleccionado (HPB) para la proteína extracelular frente a los factores de temperatura y medio de cultivo | 52 |

| | |
|---|----|
| Figura 15. Gráfico de superficie de respuesta del hongo de referencia (HTT) para la proteína extracelular con los factores medio de cultivo y temperatura..... | 54 |
| Figura 16 Gráfico de superficie de respuesta para el peso seco del hongo seleccionado (HPB) con los factores de temperatura y medio de cultivo | 57 |
| Figura 17 Gráfico de superficie de respuesta del hongo de referencia (HTT) respecto al peso seco | 59 |
| Figura 18. Decoloración del colorante rojo congo por los extractos crudos del hongo seleccionado (HPB) | 60 |
| Figura 19. Decoloración del colorante rojo congo por los extractos crudos del hongo de referencia (HTT)..... | 61 |
| Figura 20. Perfil de separación de proteína y actividad enzimática de la lacasa producida por el hongo HPB en el medio de cultivo MM-ST2 a 28 °C..... | 64 |
| Figura 21. Perfil de separación de proteína y actividad enzimática de la lacasa producida por el hongo HTT en el medio de cultivo MM-ST a 33 °C | 65 |
| Figura 22. Gel de poliacrilamida para el marcador de peso molecular (a), lacasa comercial (b), lacasa-HPB (c), y lacasa-HTT (d)..... | 66 |
| Figura 23. Zimograma frente al sustrato ABTS de Lacasa comercial (1), Lacasa HPB (2) y, Lacasa HTT (3) | 68 |
| Figura 24. Espectro de ATR-FTIR del soporte sintetizado de SiO ₂ (EDSM) y del soporte modificado con aminas de SiO ₂ (EDSM-A)..... | 70 |
| Figura 25. Análisis Termogravimétrico (TGA) de EDSM, EDSM-A y EDSM-AGI | 71 |
| Figura 26. Análisis Térmico Diferencial (DTA) de EDSM, EDSM-A y EDSM-AGI | 72 |

| | |
|--|-----|
| Figura 27. Análisis de Difracción de Rayos X (DRX) de EDSM | 73 |
| Figura 28. Micrografías de EDSM | 74 |
| Figura 29. Isotermas de adsorción y desorción de nitrógeno de EDSM y EDSM-A | 75 |
| Figura 30. Superficie de respuesta para la inmovilización de la lacasa-EC | 80 |
| Figura 31. Cinéticas de degradación (a) (b) del colorante rojo congo con las enzimas libres | 86 |
| Figura 32. Cinética de decoloración del rojo congo con las enzimas inmovilizadas (lacasa-EC, lacasa-HPB y lacasa-HTT) y el soporte (EDSM) | 88 |
| Figura 0.1 Gel de poliacrilamida co7 Gel de poliacrilamida con las etapas de purificación. 1) y 8) marcadores de peso molecular, 2) Filtrado, 3) Ultrafiltrado 10 kDa, 5) Precipitado sulfato de amonio, 6)Cromatografía de exclusión, 7) Enzima comercial | 101 |

ÍNDICE DE TABLAS

| Tabla | Número de página |
|--|-------------------------|
| Tabla 1. Ventajas y desventajas de algunos de los procesos de decoloración fisicoquímicos aplicados a los efluentes textiles | 4 |
| Tabla 2. Inmovilización de lacasas en diferentes soportes..... | 15 |
| Tabla 3. Diseño experimental para la optimización de la actividad enzimática de lacasas con los factores de medio de cultivo y temperatura..... | 23 |
| Tabla 4. Soluciones requeridas para el gel separador | 31 |
| Tabla 5. Soluciones requeridas para el gel de apilamiento | 31 |
| Tabla 6. Diseño de experimentos para la inmovilización de lacasas-EC en EDSM | 36 |
| Tabla 7. Diseño experimental para la máxima actividad enzimática para la lacasa-EC, lacasa-HPB y lacasa HTT | 38 |
| Tabla 8. Diseño factorial centrado en las caras para las dos variables (medio de cultivo y temperatura) para el hongo seleccionado (HPB) con la actividad enzimática como respuesta | 44 |
| Tabla 9. ANOVA para la actividad enzimática del hongo de seleccionado (HPB) | 45 |
| Tabla 10. Diseño factorial centrado en las caras para las dos variables (medio de cultivo y temperatura) para el hongo de referencia (HTT) con la actividad enzimática como respuesta | 47 |
| Tabla 11. ANOVA de la actividad enzimática del hongo de referencia (HTT) .. | 48 |

| | |
|--|----|
| Tabla 12. Diseño factorial centrado en las caras para las dos variables del hongo seleccionado (HPB) con la proteína extracelular como respuesta..... | 50 |
| Tabla 13. ANOVA del hongo seleccionado (HPB) para la proteína extracelular | 51 |
| Tabla 14. Diseño factorial centrado en las caras para las dos variables del hongo de referencia (HTT) con la proteína extracelular como respuesta | 53 |
| Tabla 15. ANOVA del hongo de referencia (HTT) para la proteína extracelular | 53 |
| Tabla 16. Diseño factorial centrado en las caras para las dos variables del hongo seleccionado (HPB) para el peso seco como respuesta del diseño | 56 |
| Tabla 17. ANOVA para el peso seco del hongo seleccionado (HPB)..... | 56 |
| Tabla 18. Diseño factorial centrado en las caras para las dos variables del hongo de referencia (HTT) para el peso seco como respuesta | 58 |
| Tabla 19. ANOVA para el peso seco del hongo de referencia (HTT) | 58 |
| Tabla 20. Etapas de purificación de la lacasa producida por HPB en el medio de cultivo MM-ST a 28 °C | 63 |
| Tabla 21. Etapas de purificación de la lacasa producida por HTT | 67 |
| Tabla 22. Diseño factorial centrado en las caras para las tres variables en la inmovilización de la lacasa-EC | 78 |
| Tabla 23. ANOVA para la inmovilización de la enzima lacasa comercial en EDSM-A | 79 |
| Tabla 24. Sistemas de inmovilización para la lacasa-EC, lacasa-HPB y lacasa-HTT con actividades enzimáticas antes y después del proceso de anclaje..... | 81 |

| | |
|--|----|
| Tabla 25. Diseño factorial general para la actividad enzimática máxima para la lacasa-EC | 82 |
| Tabla 26. ANOVA de la determinación de las mejores condiciones de actividad enzimática para la lacasa-EC | 83 |
| Tabla 27. Diseño factorial general para la actividad enzimática máxima para la lacasa-HPB..... | 83 |
| Tabla 28. ANOVA de la determinación de las mejores condiciones de actividad enzimática para la lacasa-HPB..... | 84 |
| Tabla 29. Diseño factorial general para la actividad enzimática máxima para la lacasa-HTT | 84 |
| Tabla 30. ANOVA de la determinación de las mejores condiciones de actividad enzimática para la lacasa-HTT | 85 |
| Tabla 31. Condiciones experimentales para obtener la máxima actividad enzimática de las lacasas con el sustrato ABTS..... | 85 |
| Tabla 32. Porcentajes de decoloración del colorante rojo congo entre las lacasas seleccionadas bajo diferentes condiciones* | 89 |
| Tabla 33. Decoloración en condiciones óptimas para el rojo congo, azul índigo en una mezcla 2 mM* | 90 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Efluentes textiles

Los efluentes textiles contienen una gran variedad de compuestos orgánicos que son tóxicos al medio ambiente [1, 2], las características de dichos efluentes son una alta alcalinidad, elevados valores de demanda química de oxígeno (DQO), contienen abundantes sólidos en suspensión y son altamente coloreados [3]. Entre los compuestos orgánicos tóxicos presentes en efluentes textiles se encuentran los colorantes en mayor proporción y relevancia ya que son de difícil remoción. Además, los colorantes son los primeros contaminantes en ser reconocidos, pues una pequeña cantidad en el agua (10-50 mg/L) es altamente visible y afecta la transparencia y estética de la misma [4, 5]. Un colorante sintético es definido como una sustancia que cuando es aplicada sobre fibras, le confiere un color permanente capaz de resistir la exposición a la luz, calor, agentes oxidantes y el ataque microbiano [6]. Además, los colorantes presentan grados de fijación variable, por lo que se esperan pérdidas de los mismos en los efluentes en un intervalo de 5-20% en el caso de los colorantes tipo ácido y hasta un 50% para los colorantes de tipo reactivo [7]. Los colorantes ácidos (ácidos sulfónicos orgánicos) presentan una alta solubilidad y son mayormente usados en fibras como polipropileno, lana y seda [8]; mientras que los colorantes del tipo

reactivo presentan una estructura molecular compleja aromática y son usados en industrias de plástico, textil, imprenta, cosmética, papel y alimenticia [9]. Se calcula que a nivel mundial 280,000 toneladas de colorantes son descargados en los efluentes industriales cada año [6], de los cuales casi el 70% son colorantes tipo azo [10], siendo el mayor grupo de colorantes sintéticos descargados al medio ambiente, y los que tienen un mayor impacto sobre el mismo [11, 12].

1.2 Colorantes tipo azo

Los colorantes azo se consideran un grupo importante de colorantes sintéticos, ya que son compuestos químicos xenobióticos caracterizados por la presencia de uno o más grupos azo ($-N=N-$) [9]. Se han reportado al menos 30,000 variedades diferentes de colorantes tipo azo las cuales son utilizadas en las industrias textiles, de papel, alimentación, cosmética y farmacéutica [13].

Debido a su gran estabilidad frente a la luz y al ataque microbiano, los colorantes son muy recalcitrantes originando una severa contaminación de ríos y aguas subterráneas en las áreas en donde se encuentran estas industrias, especialmente las textiles [12, 14].

La descarga de efluentes coloreados en los ecosistemas no sólo causa contaminación estética, eutrofización [15] y biotoxicidad, sino además, tienen efectos cancerígenos y mutagénicos. Su degradación por métodos convencionales se dificulta debido a su estructura compleja y su naturaleza sintética; no son biodegradables por métodos biológicos aerobios, y los sistemas

basados en métodos físicos y químicos no son eficientes pues requieren de tratamientos adicionales para la posterior eliminación del contaminante [16].

El rojo congo es un colorante soluble [3,3'-((1,1'-bifenil)-4,4'-diyl) bis (4-aminonaftalen-1-ácido sulfónico)] (fórmula: $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$; peso molecular: 696.66 g/mol) [17], se considera que fue uno de los primeros colorantes sintéticos en ser producidos, y puede teñir directamente el algodón. El rojo congo se encuentra presente en efluentes textiles, de impresión y teñido, papel, plásticos industrias de caucho, entre otras [18, 19]. Debido a su compleja estructura aromática, este colorante es altamente resistente a tratamientos de agua convencionales. Diversos tratamientos fisicoquímicos se han utilizado para la remoción de este colorante incluyendo la coagulación/floculación, separación por membranas, intercambio iónico, oxidación química, técnicas electroquímicas y adsorción en carbón activado [20].

1.3 Tratamientos fisicoquímicos de aguas residuales

Para eliminar estos colorantes de efluentes acuosos se han estudiado diferentes tipos de tratamientos fisicoquímicos los cuales presentan limitaciones tanto técnicas como económicas que incluyen los altos costos, así como baja eficiencia y efectividad [13]. En la Tabla 1 se muestran algunas de las restricciones que presentan estos procesos.

Tabla 1. Ventajas y desventajas de algunos de los procesos de decoloración fisicoquímicos aplicados a los efluentes textiles [14]

| Métodos físico-químicos | Descripción del método | Ventajas | Desventajas |
|--|---|--|---|
| <i>Reactivos de Fenton</i> | Reacción de oxidación usando principalmente H_2O_2 -Fe (II). | Decoloración efectiva de colorantes solubles e insolubles. | Generación de lodos y sustancias tóxicas reactivas. |
| <i>Ozonación</i> | Reacción de oxidación usando gas ozono. | Aplicación en estado gaseoso: no se altera el volumen. No se producen lodos. | Vida media corta (20 min), alto costo de equipos y gastos en generación de ozono. |
| <i>Oxidación fotoquímica</i> | Reacción usando principalmente H_2O_2 -UV. | No se producen lodos. | Formación de sub-productos tóxicos. |
| <i>Oxidación con NaOCl</i> | Reacción usando un oxidante para atacar al grupo amino. | Iniciación y aceleración de los compuestos azo. | Generación de aminas aromáticas y compuestos clorados. |
| <i>Carbón activado</i> | Remoción de colorantes por adsorción. | Remoción de una gran variedad de colorantes. | Costo elevado y requiere una etapa de regeneración. |
| <i>Filtración por membranas</i> | Separación física. | Remoción de todos los colorantes. | Producción de efluentes muy concentrados, alto costo de equipo y reactivos. |
| <i>Intercambio iónico</i> | Resina de intercambio iónico. | Regeneración: no hay pérdidas de adsorbentes. | No es efectivo para todos los colorantes y costo elevado. |
| <i>Destrucción electroquímica</i> | Reacción de oxidación usando electrodos y aplicando un potencial eléctrico. | Degradación de los componentes en componentes no peligrosos. | Alto costo de energía eléctrica, formación de subproductos tóxicos. |

1.4 Tratamientos biológicos de aguas residuales

Los tratamientos biológicos parten de los principios que ocurren de manera natural en los ríos, lagos o suelos; donde los microorganismos nativos consumen la materia orgánica y la emplean para generar nuevo material celular o para la generación de biogás [21]. Se ha demostrado la habilidad de algunos microorganismos para degradar colorantes azo, entre ellos bacterias, algas y hongos [13]. Barragán y colaboradores (2007) reportaron el uso de bacterias (*Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Morganella sp.*) para la degradación del colorante naranja ácido 7 obteniendo porcentajes de decoloración del 92% en un tiempo de 27 días [22]. El-Sheekh y colaboradores (2009) utilizaron algas y cianobacterias (*Chlorella vulgaris*, *Lyngbya lagerlerimi*, *Nostoc lincki*, *Oscillatoria rubescens*, *Elkatothrix viridis* y *Volvox aureus*) para degradar rojo de metilo, naranja II y g-rojo alcanzando porcentajes de decoloración de 4 hasta 95% [23]; mientras que Ayed y colaboradores (2010) utilizaron *Staphylococcus epidermidis* aislado de aguas textiles para degradar cristal violeta y fuscina básica alcanzando porcentajes de decoloración máximos del 70 y 80 % [24]. Sin embargo, en el caso de los tratamientos biológicos empleando bacterias, se suelen generar aminas incoloras aromáticas, las cuales son generalmente más tóxicas que los componentes originales. Además, estos productos de degradación tienen una baja adaptabilidad y una aplicación limitada al volumen del agua residual [14].

1.4.1 Tratamiento con enzimas producidas por hongos

El mecanismo principal de degradación de colorantes empleado por los hongos de pudrición blanca es el sistema enzimático de oxidorreductasas, compuesto por las enzimas manganeso peroxidasas dependientes de Mn^{+2} (MnP), ligninoperoxidasas (LiP) y lacasas (Lac) [25, 26]. A las reacciones mediadas por enzimas se les conoce como reacciones enzimáticas, y dichas enzimas actúan sobre moléculas denominadas sustratos las cuales se convierten en productos por medio de dichas reacciones. Las enzimas producidas por hongos de pudrición blanca poseen la propiedad de la degradación de materiales ligninocelulósicos, la cual está basada en la capacidad de producir enzimas ligninolíticas extracelulares que poseen una baja especificidad y producen ataques oxidativos a una amplia gama de contaminantes ambientales con potenciales de ionización menores de 8.0 eV .

Las enzimas son una clase de proteína que poseen propiedades únicas de actividad catalítica, selectividad y especificidad, son amigables con el medio ambiente y producen menos subproductos que sus contrapartes químicas. Debido a esto, las enzimas juegan un papel muy valioso en varios procesos industriales [25]. Por ejemplo, en el tratamiento de aguas, el mecanismo enzimático implica la transferencia de equivalentes reductores generados a partir de la oxidación del sustrato.

1.4.1.1 Lacasas

La lacasa (benzenediol: oxígeno oxidorreductasa) pertenece al grupo de las oxidasas multicobre azul, la cual contiene átomos de cobre en su centro catalítico

que tienen la función de ser aceptores de electrones. Es una enzima extracelular que se encuentra en plantas, insectos, bacterias y hongos fuera de los tejidos vegetales [27]. Rojas-Verde y colaboradores (2010) reportaron que esta enzima es producida por más de 60 tipos de hongos de pudrición blanca en Nuevo León y realizaron estudios de degradación del colorante azul brillante de remazol con enzimas del hongo *Trametes sp* obteniendo porcentajes de decoloración hasta del 90% en dos días [26]. Esta enzima mediante reacciones de oxidación desestabiliza a los sustratos utilizando al oxígeno como aceptor de electrones reduciéndolo a una molécula de agua. Esta capacidad la hace rentable para diversas aplicaciones, dentro de las cuales se encuentra la degradación de distintos tipos de contaminantes recalcitrantes [28], transformación de efluentes textiles, biosensores [29], degradación de insecticidas y blanqueamiento de pulpa de papel [7].

Dentro de las aplicaciones de la lacasa en la eliminación de colorantes sintéticos Wang y colaboradores (2003) utilizaron una lacasa comercial para degradar el colorante negro 5 removiendo hasta un 92% del colorante en sólo 30 minutos [7]. Hsu y colaboradores (2012) utilizaron lacasas del hongo *Lentinus sp.* para degradar antraquinona y colorantes tipo azo como rojo ácido y azul brillante alcanzando remociones entre el 66 y el 99% de remoción [30]. Campos y colaboradores (2001) degradaron colorante azul índigo con lacasas del hongo *Trametes hirsuta* alcanzando porcentajes de decoloración del 30% en 24 h [28].

1.5 Inmovilización

A través de los años se han buscado formas de mantener la actividad enzimática, así como aumentar la estabilidad de la misma a cambios de pH y temperatura [31]. La inmovilización ha probado ser una tecnología efectiva para incrementar la estabilidad y posibilita la aplicación de enzimas en sistemas continuos [27, 32-34].

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio para dar lugar a formas insolubles, las cuales retienen su actividad catalítica y pueden ser reutilizadas repetidamente, lo que abre las puertas a que las enzimas tengan aplicaciones industriales [35].

Los procesos de inmovilización presentan ventajas tales como:

1. El aumento de la estabilidad de la enzima,
2. La posible reutilización de la enzima inmovilizada (por lo que disminuyen los costos del proceso) [36], y
3. La posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control, adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada [31].

Sin embargo, algunas de las desventajas que presenta este método son:

1. La alteración de la conformación de la enzima respecto de su estado nativo [35],
2. La gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte, y
3. Pérdida de actividad enzimática durante la inmovilización [35].

Considerando tanto las ventajas como las desventajas anteriores, el hecho de que a la enzima se le abra la posibilidad de ampliar su uso sobre todo a escala industrial, y que disminuya el costo del procedimiento, la inmovilización emerge como un proceso rentable si se desea trabajar con enzimas. El tipo de inmovilización a usar es un paso trascendental, por lo que es necesario elegir adecuadamente el método que cumpla con las condiciones que son requeridas según sea el caso [36].

1.5.1 Tipos de inmovilización

Existen cuatro métodos básicos de inmovilización: unión a un soporte, atrapamiento, encapsulación y entrecruzamiento [33, 37, 38]. Fernández-Fernández y colaboradores (2013) definieron a la inmovilización por atrapamiento (Figura 1 a) como la retención física de las enzimas en una matriz sólida porosa como poliacrilamida, colágeno, alginato o gelatina [39]. Es un método de fácil trabajo y no se altera la estructura de la enzima. Makas y colaboradores (2010) inmovilizaron lacasas de *Trametes versicolor* en redes de polímero de κ -carragenina por atrapamiento [40]. Por otro lado, la encapsulación del mismo modo que el atrapamiento protege a la enzima del medio ambiente (Figura 1b). Qiu y colaboradores (2010) trabajaron con el encapsulamiento de lacasas de un hongo de pudrición blanca en una matriz de sílice [41].

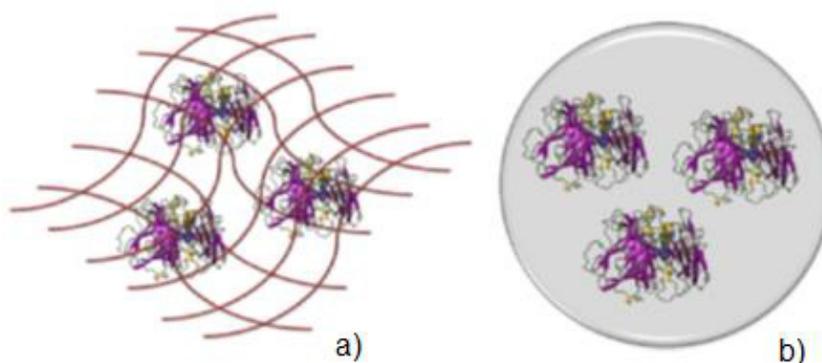


Figura 1. Inmovilización por atrapamiento (a) y encapsulamiento (b) [39]

El entrecruzamiento (Figura 2) emplea agentes bifuncionales, por ejemplo el glutaraldehído con grupos amino reactivos ($R-NH_2$), en donde el entrecruzamiento es producido por mezclar en una solución acuosa la enzima con el glutaraldehído [42].

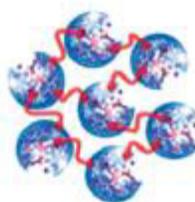


Figura 2. Inmovilización por entrecruzamiento [31]

Ba y colaboradores (2014) inmovilizaron lacasas de *Trametes versicolor* por entrecruzamiento en quitosano manteniendo una buena actividad a pH entre 3-5 y temperaturas de 5 a 30 °C [43]. Sadighi y colaboradores (2013) inmovilizaron lacasas por entrecruzamiento en perlas de vidrio funcionalizadas con 3-

aminopropiltriétoxissilano (APTES) para degradar rojo congo teniendo una actividad enzimática después de inmovilizar del 75% [44]. Daâssi y colaboradores (2014) inmovilizaron lacasa de un hongo *Corioloopsis gallica* en perlas de Ca-alginato mediante entrecruzamiento para remoción de colorantes [45].

Dentro de los métodos de unión a un soporte se encuentra la adsorción y la unión por enlace covalente. La adsorción de enzimas en soportes (Figura 3a) involucra la interacción física entre el soporte y la enzima, combinando efectos hidrofóbicos, fuerzas electrostáticas y puentes de hidrógeno; sin embargo, estas interacciones no son tan fuertes para mantener a la enzima inmovilizada [46]. Chen y colaboradores (2012) inmovilizaron lipasas de *Candida sp* por adsorción en seda [47], mientras que Salis y colaboradores (2008) inmovilizaron lacasas en sílice mesoporosa mediante adsorción reteniendo el 70% de la actividad inicial [48]. Cristóvão y colaboradores (2011) inmovilizaron lacasa de *Aspergillus* en fibras de coco por adsorción alcanzando un porcentaje de actividad retenida del 47.5 % con respecto a la actividad de la lacasa libre [49].

La inmovilización por enlace covalente (Figura 3b) implica la unión de aminoácidos residuales (-NH₂, -SH, -CO₂) de la enzima con el soporte, este método es popular por las grandes áreas de superficie del soporte, con grandes diámetros de poro (3-10 nm) lo que permite que el sustrato y el producto se puedan difundir sin que la enzima se lixivie [46].

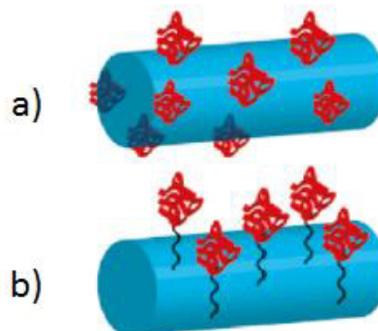


Figura 3. Inmovilización por adsorción (a), enlace covalente (b) [46]

El enlace covalente (Figura 4) comienza con la funcionalización de los soportes. Diversos autores han reportado el uso de agentes de entrecruzamiento después de la funcionalización para promover los enlaces peptídicos entre el soporte y la enzima. Zhu y colaboradores (2007) inmovilizaron lacasas de *Trametes versicolor* en soportes de SiO₂ funcionalizados con glutaraldehído (agente de entrecruzamiento) [50]

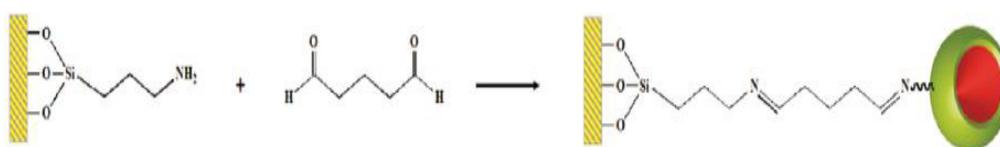


Figura 4. Proceso de modificación del SiO₂ con grupos aminos para la inmovilización enzimática [46]

Shi y colaboradores (2014) utilizaron nanopartículas de magnetita (Fe₃O₄) para inmovilizar lacasas producidas por un hongo de pudrición blanca (*E. taxodii*) mediante enlace covalente para la remoción de antibióticos sulfonamidas con un 60.1% de actividad retenida después de la inmovilización [51]. Por otro lado,

Sathishkumar y colaboradores (2014) utilizaron fibras de celulosa para inmovilizar lacasa obtenida de un hongo de pudrición blanca (*Pleurotus florida*) por enlace covalente alcanzando un 88% de actividad retenida después de inmovilizar con respecto a la lacasa libre [52].

1.5.2 Tipo de soporte

Los materiales de sílice mesoporosos son atractivos soportes enzimáticos debido a que se puede controlar su tamaño de poro, incluso mayor a 20 nm lo que es similar o mayor a una gran cantidad de moléculas enzimáticas [35]. Además la sílice posee una estructura porosa, alta área superficial y buena resistencia térmica [53, 54].

La Amberlita se ha usado también como soporte de enzimas debido a su resistencia a la degradación biológica. La inmovilización covalente de Amberlita se logró después de un pre-tratamiento del soporte con glutaraldehído para unir covalentemente la enzima con el soporte [55]. Las esferas de sílice por otro lado, han sido reportadas como buenos soportes debido a sus propiedades tales como fácil recubrimiento, alta áreas superficial, tamaño y volumen de poro; así mismo sus propiedades superficiales pueden ser modificadas [56]. Los soportes cerámicos también han sido utilizados, específicamente los soportes “honeycomb” debido a su forma geométrica, ya que en estos soportes se tiene un patrón de flujo que puede ser usado para la mejora de la transferencia de masa en las reacciones [57]. Además se ha usado quitosano modificado el cual es rico en grupos funcionales amino e hidroxilo, lo que hace que posea una

excelente afinidad a las proteínas; sin embargo, es difícil formar fibras de este material [33]. Otro tipo de soporte son los materiales magnéticos recubiertos, ya que se le confiere al material una mayor estabilidad y actividad ante las biomoléculas, y esto se incrementa con la funcionalización o recubrimiento. Xiaobing y colaboradores (2012) inmovilizaron la lacasa de *Trametes versicolor* en partículas de sílice magnéticas recubiertas manteniendo el 70.1% de la actividad comparada con la actividad original [58], así como Wang y colaboradores (2010) inmovilizaron lacasas de *Trametes versicolor* usando nanopartículas de sílice magnéticas con un 81.5% de actividad retenida [53]. Se ha utilizado Epergit C también como material para inmovilizar, por la practicidad que representa el lavado, mezcla de los componentes e incubación del material, además de que los grupos oxiranos del Epergit C son componentes activos para el enlace covalente de los ligandos que contienen grupos aminos o hidroxilos [59]. En la Tabla 2 se muestran estudios de inmovilización de enzimas en diferentes soportes y se presenta también la actividad de las enzimas después de su inmovilización.

Tabla 2. Inmovilización de lacasas en diferentes soportes [58]

| Tipo de inmovilización | Tipo de soporte | Actividad de la enzima (U/mg) | Actividad después de inmovilización | Referencia |
|---|---------------------------------|--------------------------------------|--|-----------------------------------|
| <i>Enlace covalente</i> | Quitosano | 0.161 | 60% | Domínguez, G. <i>et al</i> (2001) |
| <i>Enlace covalente</i> | TiO ₂ | 0.135 | 79% | Jingwei Hou <i>et al</i> (2013) |
| <i>Enlace covalente</i> | CS/PVA | 0.111 | 69% | Ran Xu, <i>et al</i> (2013) |
| <i>Enlace covalente</i> | Partículas de sílice magnéticas | 0.224 | 70.4% | Zheng, X. <i>et al</i> (2012) |
| <i>Enlace covalente y adsorción física</i> | Esferas de sílice mesoporosas | 0.271 | 70 % | Zhu, Y. <i>et al</i> (2007) |

En este trabajo de investigación se inmovilizaron tres tipos de lacasas (una comercial y dos obtenidas de hongos de pudrición blanca) en esferas mesoporosas de dióxido de silicio por medio de enlace covalente para degradar los colorantes rojo congo y azul índigo. Se evaluaron las capacidades de degradación para cada uno de los sistemas soporte-enzima, así como el efecto del soporte en el sistema de degradación. Este tratamiento enzimático proporciona una alternativa sustentable de degradación de estos colorantes presentes en efluentes acuosos industriales, ya que se obtuvieron las bases para reusar los sistemas enzima-soporte en procesos de tratamiento de agua en

sistemas continuos, los cuales son más baratos y fáciles de manejar a escala industrial.

1.6 Hipótesis

Las lacasas inmovilizadas en esferas de SiO_2 mantienen el 50% de su actividad enzimática y son capaces de degradar rojo congo presente en efluentes acuosos.

1.7 Objetivo General

Inmovilizar lacasas en esferas de dióxido de silicio modificadas y evaluar la degradación de rojo congo (colorante azo) presente en efluentes acuosos.

1.8 Objetivos específicos

1. Aislar y seleccionar cepas de hongos con actividad para la degradación del colorante azo rojo congo.
2. Obtener las condiciones óptimas de crecimiento y de producción de lacasas (medio de cultivo y temperatura) para los hongos seleccionados.
3. Separar las fracciones de enzimas, con alto contenido de lacasas, de los hongos seleccionados para su inmovilización.
4. Sintetizar y modificar esferas de SiO_2 (soporte) para la inmovilización de las enzimas seleccionadas.
5. Caracterizar el soporte antes y después de la modificación química.
6. Inmovilizar las enzimas en el soporte sintetizado.

7. Determinar las condiciones de máxima actividad enzimática para las enzimas inmovilizadas.
8. Cuantificar la actividad enzimática libre e inmovilizada.
9. Degradar el colorante rojo congo y el colorante azul índigo con lacasas inmovilizadas.

2 METODOLOGÍA

2.1 Aislamiento y selección de las cepas de hongos con actividad enzimática para la degradación de colorantes

2.1.1 Aislamiento del hongo de pudrición blanca

Se localizaron hongos de pudrición de madera en el parque San Nicolás, en el municipio de San Nicolás de los Garza, Nuevo León y en la división de estudios de posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León ubicada en la calle Guerrero esquina con Progreso en Monterrey, Nuevo León. Para la colecta de los hongos se utilizaron bolsas de autocierre, guantes y bisturís estériles.

Posteriormente, las muestras colectadas e identificadas se llevaron al laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas en la Cd. Universitaria de la UANL, y se procedió a la siembra de las mismas. El medio de cultivo que se utilizó para el aislamiento fue Agar Papa Dextrosa (PDA) el cual contiene por litro 4.0 g de almidón de papa, 20 g de dextrosa y 15.0 g de agar además de 500 µl de antibiótico (bencilpenicilina) para evitar el crecimiento de bacterias. Se esterilizó el medio en una autoclave a una temperatura de 121 °C y una presión de 15 psi durante 15 min, para luego ser vertido en placas Petri de

100 x 15 mm. Posterior a su solidificación, se inoculó el medio con un fragmento del micelio de cada uno de los hongos, se incubó a dos temperaturas de 28 °C y 37 °C por cinco días. Las placas se revisaron cada 24 h para verificar crecimiento, repitiéndose el procedimiento hasta que los hongos quedaron aislados [26].

2.1.2 Selección de la cepa del hongo

Posterior al aislamiento del hongo, se realizó la selección de la cepa utilizando un medio de cultivo PDA que contenía 200 mg/L del colorante seleccionado (rojo congo), previamente esterilizado por filtración utilizando un filtro Whatman de 0.45 µm. Después se inoculó el medio de cultivo enriquecido con el colorante con un fragmento del hongo y se colocaron las placas a 28 °C por cinco días, revisándolas cada 24 h para evaluar la decoloración.

El cultivo del hongo en placa que presentó una mayor degradación del colorante fue seleccionado para esta investigación. Además se utilizó una cepa de referencia (*Trametes troggi* UAMH 8156) proporcionada por el laboratorio de Biotecnología de la facultad, la cual se tenía la certeza de que producía enzimas tipo lacasas, por lo que se trabajó con los dos hongos para realizar las pruebas [26].

2.1.3 Inóculo para el medio de producción de lacasas

El hongo seleccionado (HPB) y el hongo de referencia (HTT) se propagaron en placas con el medio sólido PDA a 28 °C durante 5 días. Enseguida se levantó

un micelio de 1 x 1 cm con una espátula estéril y este micelio fue “licuado” para homogeneizarlo. Posteriormente, con la suspensión del micelio se inocularon matraces Erlenmeyer de 250 mL, que contenían 150 mL de medio líquido Glucosa Mineral (GM) el cual contenía por litro: 1.0 g de extracto de levadura, 10 g de glucosa, 2.0 g de KH_2PO_4 , 0.5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g de KCl, 1.0 mL de solución mineral (100 mg de $\text{B}_4\text{O}_7\text{Na}_2 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 10 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 10 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 10 mg de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Este medio fue esterilizado previamente durante 15 minutos a 121 °C y 15 psi. Finalmente se incubaron los matraces inoculados a una temperatura de 28 °C y una velocidad de 150 rpm por 12 días [26].

2.1.4 Producción del extracto crudo de lacasas

Después de la preparación del inóculo, se homogenizó el micelio obtenido durante los 12 días de incubación, se tomó 1 mL del inóculo homogeneizado y se colocó en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 150 mL de medio de cultivo previamente esterilizado variando el medio de cultivo y la temperatura de incubación de acuerdo al diseño experimental descrito más adelante.

2.2 Condiciones de cultivo óptimas para el crecimiento y producción de lacasas (medio de cultivo y temperatura)

Para maximizar la actividad enzimática de lacasas producidas por el hongo aislado y de referencia se utilizó un diseño factorial central compuesto 2^2 con cinco puntos centrales (CCD). Los factores seleccionados fueron el medio de

cultivo y la temperatura, con dos niveles cada uno (*ver* Tabla 3). Los niveles del medio de cultivo fueron medio líquido GM, medio líquido mineral adicionado con 1 g de salvado de trigo y 5 % de glucosa (5GM-ST1) y medio líquido mineral adicionado con 2 g de salvado de trigo (MM-ST2). Las variables respuesta del diseño experimental fueron la actividad enzimática, la cantidad de proteína extracelular y el peso seco. Además, se usaron los extractos crudos de los hongos (HPB y HTT) resultantes del diseño experimental para hacer cinéticas de decoloración del colorante azo rojo congo.

Se inoculó cada medio de cultivo después de ser esterilizado, dejando un experimento control para cada tipo de medio de cultivo y a cada temperatura, esto para descartar contaminaciones. Enseguida los matraces fueron llevados a la temperatura de incubación correspondiente, todos a una velocidad de agitación de 150 rpm por 12 días. Transcurrido el tiempo de incubación se separó la biomasa por filtración al vacío utilizando filtros de papel Whatman 1, el filtrado se centrifugó a 3500 rpm y 4 °C, durante 20 minutos recuperándose el sobrenadante y volviendo a centrifugar a 4500 rpm a 4°C durante 20 minutos [60]. Posteriormente los sobrenadantes (extractos crudos) se usaron para la medición de proteína, actividad enzimática y para evaluar la decoloración del rojo congo.

Tabla 3. Diseño experimental para la optimización de la actividad enzimática de lacasas con los factores de medio de cultivo y temperatura

| Factores | | Rango y niveles (codificados) | | |
|------------------|---|-------------------------------|---------|--------|
| | | -1 | 0 | +1 |
| Medio de cultivo | A | GM | 5GM-ST1 | MM-ST2 |
| Temperatura (°C) | B | 28 | 33 | 37 |

GM: Medio glucosa mineral.

G5M-ST1 Medio glucosa al 5% con 2 g de salvado de trigo.

MM-ST2 Medio mineral con 2 g de salvado de trigo

El análisis de los datos obtenidos en los diseños experimentales fue realizado mediante el programa estadístico Design-Expert 7.0. Los datos experimentales fueron analizados por la metodología de superficie de respuesta (MSR) y ajustados a un modelo de segundo orden (Ecuación (1)), además de los análisis de varianza (ANOVA) para determinar los factores que fueron significativos en los experimentos.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (1)$$

2.2.1 Medición de la actividad enzimática

Se realizaron experimentos cinéticos previos con los extractos crudos de los hongos HPB, HTT y una lacasa comercial (*Trametes versicolor*) con la finalidad de establecer el tiempo al cual se llevaría a cabo la lectura de la actividad enzimática. Se preparó un sistema de reacción y se monitoreó el cambio de absorbancia en función del tiempo [61].

La medición de la actividad fue mediante un sistema de reacción (1 mL) el cual consistía de agua desionizada (700 μL), extracto crudo con la enzima (100 μL), buffer de acetatos 1 M a pH 5 (100 μL) y como sustrato ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS) 5 mM (100 μL).

Una vez añadido el sustrato (ABTS) al sistema de reacción, se midieron los incrementos de la absorbancia en un espectrofotómetro UV-vis (marca Spectronic y modelo Genesys 20) a una longitud de onda de 420 nm, llevando la muestra a 40 °C por un minuto para después realizar la lectura y durante los siguientes 60 minutos a temperatura ambiente.

Una unidad de actividad (U) se definió como la cantidad de enzima que oxida 1 μmol de sustrato por minuto bajo las condiciones de reacción. La actividad enzimática se calculó con la Ecuación (2) [62, 63].

$$Lcc = \frac{\Delta Abs * Vr}{\xi * Vm * t * d} \quad (2)$$

Donde:

Lcc= Actividad de la lacasa (U)

ξ =Coeficiente de extinción molar (0.036 $\mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) [64]

ΔAbs =Lectura de Absorbancia inicial-lectura de absorbancia final

Vr=Volumen total de la reacción (μl)

Vm=Volumen de la muestra (μl)

d= Paso de luz de la celda (cm)

t=Tiempo de la reacción (min)

2.2.2 Medición de proteína por el método de Bradford

Para la medición de proteína extracelular total se mezclaron 800 μL de extracto del cultivo con la enzima y 200 μL del reactivo de Bradford (Bio-Rad), se dejó reaccionar por 5 minutos para luego medir la absorbancia en un espectrofotómetro UV-vis a una longitud de onda de 595 nm. Previamente, se construyó una curva de calibración para determinar la concentración de la proteína con 2, 4, 6, 8 y 10 $\mu\text{g/mL}$ de albúmina sérica bovina como estándar (Anexo I) realizando las mediciones por duplicado [27].

2.2.3 Determinación del peso seco

Para cuantificar el incremento de la biomasa en el cultivo de los hongos (HTT y HPB) después de 12 días, se realizaron pruebas gravimétricas de la siguiente manera. Se llevaron a peso constante a 80 °C todos los filtros Whatman 1 que serían utilizados y se registró su peso seco. Dichos filtros fueron usados para separar la biomasa de los hongos por medio de filtración al vacío. Posteriormente los filtros fueron secados a 80 °C y se registró el peso seco final. Por último, se obtuvo por diferencia el incremento de biomasa de los hongos (HPB y HTT).

2.2.4 Degradación del colorante

La degradación del colorante rojo congo (Figura 5) se realizó con los extractos crudos de los hongos del diseño experimental (HPB y HTT) que contenían la

enzima mediante un sistema de reacción que consistió en buffer de acetatos pH 5 (100 μ l), agua (700 μ l) y extracto crudo con enzimas (100 μ l).

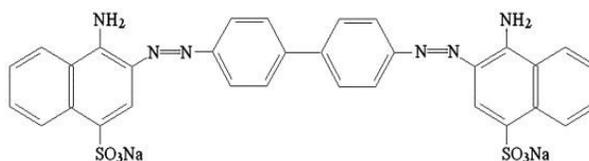


Figura 5. Estructura del rojo congo [17]

Este sistema de reacción se incubó a 40 °C durante un minuto y posteriormente se le agregaron 100 μ l de la solución del colorante rojo congo (40 mg/mL); se monitoreó la absorbancia en un espectrofotómetro UV-vis a una longitud de onda de 500 nm. El porcentaje de decoloración se determinó por medio de la Ecuación (3) [60].

$$\%Decoloración = \frac{A_o - A_t}{A_o} \times 100 \quad (3)$$

Donde:

A_o = Absorbancia inicial

A_t = Absorbancia total

2.3 Separación de fracciones de enzimas para la degradación

Para la separación de las fracciones enzimáticas ricas en lacasas, 1 L del extracto crudo obtenido bajo cada una de las condiciones encontradas en la optimización de la actividad enzimática para cada hongo, fue ultrafiltrado con

unidades de ultrafiltración AMICON. Posteriormente, se precipitaron las enzimas presentes en el extracto crudo con sulfato de amonio al 80%, se separó por diálisis y ultrafiltración nuevamente, y se realizó una cromatografía por exclusión de tamaño molecular. Finalmente se llevaron a cabo pruebas en geles de electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE) para determinar el grado de purificación. En cada etapa se determinó la actividad enzimática total, la actividad específica (actividad enzimática por mg de proteína), así como la proteína total, mediante el método de Bradford [65], a continuación se detalla cada una de las etapas llevadas a cabo.

2.3.1 Ultrafiltración

Los extractos crudos enzimáticos fueron separados por ultrafiltración con unidades de centrifugación AMICON (10 kDa y 100 kDa) para concentrar el extracto crudo. La centrifugación se llevó a cabo a una velocidad de 4,500 rpm, a 4 °C y un tiempo de 30 min [62].

2.3.2 Precipitación con sulfato de amonio

En el extracto crudo enzimático se precipitaron proteínas de alto peso molecular con una solución de sulfato de amonio, la cual fue agregada lentamente al extracto crudo enzimático hasta llegar a una saturación del 80% y dejando en agitación lenta durante una hora a 4 °C. Enseguida se dejó reposar el extracto crudo enzimático durante 12 h. Transcurrido el tiempo de reposo, se centrifugó el extracto crudo a 4,500 rpm a 4 °C por 30 minutos, los sobrenadantes

fueron decantados y los pellets fueron resuspendidos en 2 mL de buffer de acetatos 0.1M a pH 5 [66, 67].

2.3.3 Diálisis

Los pellets resuspendidos en el buffer de acetatos 0.1 M y pH 5 fueron separados contra el mismo buffer en membranas de diálisis de 1,000-14,000 Da por un tiempo de 12 h, cambiando el buffer de acetatos cada 6 h, manteniéndolo a una temperatura de 4 °C [68].

2.3.4 Cromatografía por exclusión de tamaño molecular

En el equipo de cromatografía por exclusión se utilizó una columna Glass econo column de Bio-Rad. La fase estacionaria fue Bio-Gel P-100 (finas perlas de poliacrilamida de 45 a 90 μm con rangos de fracción de 5,000 a 100,000 Da) y la fase móvil utilizada fue un buffer de acetatos 0.1M a pH 5 y temperatura ambiente. La cromatografía comenzó con la inyección de 1 mL del extracto crudo enzimático para cada hongo (HPB y HTT) por la columna de exclusión de tamaño. Se probaron diferentes velocidades de flujo hasta encontrar la condición más adecuada para la separación por cromatografía. Se determinaron la cantidad de proteína y la actividad enzimática de las fracciones recolectadas durante la separación por cromatografía para seleccionar las mejores condiciones de dicha separación. Las fracciones que presentaron una mayor actividad enzimática para la lacasa fueron ultrafiltradas para concentrarlas con unidades AMICON de 30

kDa y se realizó SDS-PAGE para verificar la separación de las fracciones enzimáticas.

2.3.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

Los geles de electroforesis fueron realizados de acuerdo al método de Laemmli (1970) [69], en todos los casos se utilizó una concentración del 12% de acrilamida, la cantidad de muestra usada para cada pozo fue de 20 μ L y los geles se corrieron en una cámara mini-protean Bio-Rad. Se revelaron las bandas de proteínas con una solución de azul de Coomassie. Las soluciones empleadas se describen a continuación.

2.3.5.1 Soluciones para preparar los geles

Para realizar la electroforesis se prepararon una serie de soluciones, en la solución del dodecilsulfato sódico (SDS) al 10 % (p/v) se mezclaron 10 g de SDS en 90 mL de agua en agitación suave y luego se aforó a 100 mL. Para la solución de Tris-HCl 1.5 M, se mezclaron 18.5 g de Tris con 80 mL de agua destilada ajustando el pH a 8.8 con HCl y aforando a 100 mL; mientras que la solución de Tris-HCl 0.5 M se mezclaron 6 g de Tris con 60 mL de agua destilada y se ajustó el pH a 6.8 con HCl, llevando a un volumen final de 100 mL pH 6.8. En el caso de la solución de persulfato de amonio (APS) al 10% (p/v) se mezclaron 0.10 g de persulfato de amonio en 90 μ L de agua destilada.

El buffer de corrida estuvo compuesto por 3 g de tris, 14.4 g glicina, 10 mL de SDS (10% p/v) aforando a un litro con agua destilada. El buffer de muestra

contenía 0.9 mL de agua destilada, 1.25 mL de Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 2.5 mL de glicerol, 2 mL de SDS (10% p/v), 0.2 mL de azul de bromofenol (0.5 % p/v). Luego se agregaron 50 μ L de β -mercaptoetanol a 950 μ L del buffer de muestra.

La solución para teñir se preparó combinando 450 mL de metanol, 50 mL de ácido acético glacial, 500 mL de agua destilada, 2.5 g de azul de comassie guardando la solución en un frasco ámbar. La solución de desteñido contenía 150 mL de metanol, 150 mL de ácido acético y 650 mL de agua destilada.

2.3.5.2 Condiciones de corrida

Primero se ensambló el equipo de electroforesis y se preparó después el gel de separación (Tabla 4). Después de la gelificación, se preparó el gel de apilamiento (Tabla 5) hasta llenar el molde y luego se colocó el peine.

Para la preparación de las muestras en tubos eppendorf se mezclaron 20 μ L de la muestra con 5 μ L del buffer de la muestra. Se colocaron en un baño a 100 °C por 10 minutos para su completa desnaturalización y se cargaron los pozos con 15 μ L de la mezcla. Se utilizó un marcador de peso molecular (Bio-Rad Precision Plus Protein Standards).

Los geles se corrieron a un voltaje constante de 180 volts en el buffer de corrida por un tiempo de una hora.

Tabla 4. Soluciones requeridas para el gel separador

| Solución de trabajo | 12 % |
|---------------------------------|-------------|
| Acrilamida (30%) | 2 mL |
| H₂O destilada | 1.1 mL |
| Tris 1.5 M pH 8.8 | 1.8 mL |
| SDS (10% p/v) | 50 µL |
| APS (10 % p/v) | 50 µL |
| TEMED | 9 µL |

Tabla 5. Soluciones requeridas para el gel de apilamiento

| Solución de trabajo | 4 % |
|---------------------------------|------------|
| Acrilamida (30%) | 0.120 mL |
| H₂O destilada | 0.180 mL |
| Tris 0.5 M pH 6.8 | 0.680 mL |
| SDS (10% p/v) | 20 µL |
| APS (10 % p/v) | 20 µL |
| TEMED | 9 µL |

2.3.5.3 Revelado de las proteínas

Posterior al corrimiento de los geles, se desmontó el equipo y cuidadosamente se retiró el gel, se lavó con agua destilada y se colocó en un recipiente con la

solución de tñido por una hora en agitaci3n suave. Enseguida, se retir3 la soluci3n para el tñido de las bandas y se lav3 nuevamente el gel con agua destilada para luego colocar la soluci3n de desteñido, enjuagando dos veces en agitaci3n constante. Finalmente, se lav3 el gel con agua destilada y se dej3 secar en celof3n a temperatura ambiente.

2.3.6 Zimogramas

Los geles fueron revelados con actividad enzim3tica para lo cual se utilizaron las mismas condiciones para preparar los geles descritos en las secciones 2.3.5.1 y 2.3.5.2; solamente que la muestra de la enzima no fue desnaturalizada y el buffer de carga no contenía SDS ni β -mercaptoetanol. Las condiciones de corrida fueron las mismas que en la electroforesis desnaturalizante. Despu3s de transcurrido el tiempo el gel se lav3 con agua destilada y luego se le agreg3 una soluci3n de buffer de acetatos 1 M con 15 mL de ABTS 5 mM, se dej3 a temperatura ambiente con agitaci3n suave un tiempo de 10 a 15 minutos en donde se visualizaron las bandas de color verde correspondientes a la actividad de lacasas [30].

2.4 Obtenci3n de los soportes para la inmovilizaci3n enzim3tica

2.4.1 Preparaci3n de esferas de di3xido de silicio mesoporosas

La sntesis del SiO_2 se realiz3 mediante el m3todo modificado de Sol-Gel reportado por Zhu y colaboradores [50] utilizando el tetraetil ortosilicato (TEOS)

como precursor. En la síntesis se mezclaron 4 g de P123 ($\text{EO}_{20}\text{PO}_{70}\text{EO}_{20}$) con 5 g de KCl en 120 ml de H_2O y 23 ml de HCl (37% v/v) a temperatura ambiente; luego se agregaron 3 g de mesitileno. Después de una agitación lenta durante dos horas a temperatura ambiente, se agregaron 8.5 g de TEOS a la solución anterior y se agitó durante 10 minutos más. Después la mezcla se mantuvo a 35 °C durante 24 h y posteriormente se incrementó a 100 °C durante otras 24 h. Por último, los precipitados resultantes fueron filtrados, lavados con agua destilada y secados a 100 °C durante 2 h, para después ser calcinados a una temperatura de 510 °C por 8 h y obtener esferas de dióxido de silicio mesoporosas (EDSM).

2.4.2 Modificación del soporte con grupos amino

Para la modificación química del SiO_2 sintetizado, se mezclaron 50 mL de tolueno con 1 mL de $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ y 0.5 g del soporte (EDSM). Después, se agitó la suspensión a 60 °C durante 20 h, la muestra se lavó con acetona y se obtuvo el soporte modificado con los grupos aminos (EDSM-A) [50].

2.4.3 Caracterización del soporte

La caracterización del soporte sintetizado (EDSM) y el aminado (EDSM-A) se realizó por medio de diferentes técnicas instrumentales para corroborar que el soporte sintetizado fuera dióxido de silicio mesoporoso y que existiera la aminación del soporte. Las técnicas usadas se describen a continuación.

2.4.3.1 Caracterización por Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier con Reflexión Total Atenuada (ATR-FTIR)

Se usó espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier con Reflexión Total Atenuada para observar los enlaces entre el Si-O correspondientes al SiO₂, así como la funcionalización del soporte con el grupo amino por medio de la adición de enlaces N-H. Se utilizó un equipo marca Perkin Elmer modelo Spectrum One, en el cual básicamente se realizaron 8 escaneos a temperatura ambiente, y el parámetro de número de onda fue de 650 a 4000 cm⁻¹.

2.4.3.2. Difracción de Rayos X (DRX)

La Difracción de Rayos X se utilizó para determinar si el soporte sintetizado (SiO₂) correspondía con el patrón de difracción del SiO₂ puro. El equipo usado fue un Difractómetro de Rayos X marca Siemens y modelo D-5000, la corrida de la muestra se realizó a temperatura ambiente y presión constante, con un voltaje de 35 kV y 25 mA en un tiempo de 30 min y a un ángulo de 5 a 90°.

2.4.3.3 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM):

La morfología del soporte (SiO₂) y del soporte aminado se determinó por SEM. Esta caracterización se realizó en un Microscopio Electrónico de Barrido marca JEOL (modelo JSM-6701F), la muestra se sometió a condiciones de ultravacío (10⁻⁵ Pa) en la cámara de observación, el voltaje usado fue de 3.0 kV y la

magnificación fue desde 1000x hasta 30000x aumentos. Las muestras fueron colocadas sobre una cinta adhesiva de carbono. Además, en el mismo equipo se realizó un Sistema de Microanálisis de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS o EDX) para determinar los elementos que contiene el soporte.

2.4.3.4 Análisis Termogravimétricos (TGA/DTA):

Se realizaron análisis termogravimétricos para determinar la estabilidad térmica de los soportes seleccionados. El análisis se realizó en un equipo marca LINSEIS modelo STAPT1600. Las muestras de los soportes (EDSM, EDSM-A) fueron calentadas desde temperatura ambiente hasta 1000 °C a una razón de 10 °C/min en atmósfera oxidante.

2.4.3.5 Fisisorción de nitrógeno:

Para determinar el área superficial, volumen y distribución de poros de los soportes obtenidos (EDSM y EDSM-A) se realizaron pruebas de fisisorción de nitrógeno en un equipo marca Quantachrome modelo Autosorb-1.

2.5 Inmovilización de la enzima en el soporte

2.5.1 Determinación de las condiciones óptimas para la inmovilización

En la inmovilización para determinar las óptimas condiciones así como la influencia de los factores se utilizó un diseño experimental central compuesto 2^3

(CCD) con ocho puntos centrales. En la Tabla 6 se muestran los rangos de los factores usados.

Para la inmovilización de la enzima se colocaron 100 mg de soporte aminado (EDSM-A), se agitó a temperatura ambiente con solución de glutaraldehído¹ en 10 mL de buffer de fosfato (pH 7.0, 0.1 M) a velocidad lenta, para después lavarlo utilizando agua destilada y usando un filtro de papel Whatman 1 para evitar pérdidas del soporte. Los soportes resultantes fueron esferas de dióxido de silicio mesoporosas modificadas y activadas con glutaraldehído (EDSM-AG). Este soporte fue usado para la inmovilización de la enzima, para lo cual 100 mg de EDSM-AG fueron suspendidos en 15 mL de buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7.0) el cual contenía 7 mg de lacasa comercial. El soporte (EDSM-AG) y la enzima se agitaron lentamente a temperatura ambiente durante el tiempo establecido².

Tabla 6. Diseño de experimentos para la inmovilización de lacasas-EC en EDSM

| Factores | Rangos y niveles (codificados) | | | |
|--|--------------------------------|----|----|----|
| | | -1 | 0 | +1 |
| Concentración de glutaraldehído (%v/v) | A | 4 | 12 | 25 |
| Tiempo con glutaraldehído (h) | B | 1 | 5 | 9 |
| Tiempo de inmovilización (h) | C | 6 | 8 | 12 |

¹ La concentración de glutaraldehído y el tiempo de activación dependió del punto en el que se estuviera trabajando en el CCD

² El tiempo de inmovilización utilizado dependió del punto en el que se estuviera trabajando en el CCD

Posteriormente, las esferas de dióxido de silicio modificado con las lacasas inmovilizadas (EDSM-AGI) fueron separadas y luego lavadas con buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7) utilizando un filtro Whatman 1 para no perder el soporte. El procedimiento de lavado se repitió 8 veces. Finalmente, las esferas inmovilizadas fueron usadas para medir la actividad enzimática de lacasas mediante un sistema de reacción similar al usado para el extracto del medio de cultivo descrito en la sección 2.2.1 [50, 58, 60].

2.5.2 Inmovilización de la lacasa-HPB y lacasa-HTT

La inmovilización de las lacasas-HPB y lacasa-HTT se realizó bajo las condiciones en las que se obtuvo una mayor actividad enzimática en el diseño experimental de la inmovilización. Se determinó la actividad enzimática antes y después de la inmovilización, así como el porcentaje de retención de actividad con la Ecuación (4) para cada una de las lacasas inmovilizadas [55].

$$\%Actividad\ retenida = \frac{AI}{ADI} \quad (4)$$

Donde:

AI= Actividad enzimática antes de la inmovilización.

ADI= Actividad enzimática después de la inmovilización.

2.5.3 Determinación de las condiciones de máxima actividad enzimática a diferentes valores de pH y temperatura

Después de inmovilizar las enzimas (lacasa-EC, lacasa-HPB y lacasa-HTT) se buscaron las condiciones de máxima actividad enzimática (pH y temperatura) para cada lacasa usando un diseño experimental factorial general, dos factores (pH y temperatura) y cuatro niveles para cada factor (Tabla 7). El diseño fue analizado como un factorial general con una observación por celda [70]. Se realizaron sistemas de reacción con el sustrato ABTS midiendo la actividad para la lacasa descrito en la sección 2.2.1 bajo cada una de las condiciones establecidas.

Tabla 7. Diseño experimental para la máxima actividad enzimática para la lacasa-EC, lacasa-HPB y lacasa HTT

| Factores | Rangos y niveles (codificados) | | | | |
|-------------------------|--------------------------------|----|-----|----|-----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Temperatura (°C) | A | 35 | 40 | 45 | 50 |
| pH (buffer de acetatos) | B | 4 | 4.5 | 5 | 5.5 |

2.6 Degradación del colorante rojo congo y azul índigo con las enzimas inmovilizadas y sin inmovilizar

La degradación del colorante rojo congo se llevó a cabo mediante sistemas de reacción similares a los usados en la sección 2.2.4. Se realizaron cinéticas de

hasta cinco días para evaluar la degradación de las tres enzimas libres y las tres enzimas inmovilizadas (lacasa-HPB, lacasa-HTT y lacasa-EC). Además, para evaluar la contribución del soporte (EDSM-AG) se realizó de la misma forma una cinética de decoloración, usando solo el soporte. El porcentaje de degradación fue obtenido con la Ecuación (2) descrita en la sección 2.2.4.

Adicionalmente, para determinar si las enzimas inmovilizadas (lacasa-HPB, lacasa-HTT y lacasa-EC) tenían la capacidad de degradar otros colorantes, se eligió el colorante azul índigo (Figura 6), bajo las mismas condiciones usadas que para el colorante rojo congo.

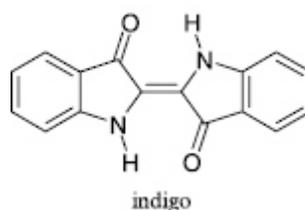


Figura 6. Estructura del colorante azul índigo [28]

2.7 Disposición de los residuos generados

La disposición de los residuos generados durante la investigación fue llevada a cabo según lo estipulado en el reglamento de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL.

3. RESULTADOS

3.1 Aislamiento y selección de las cepas de los hongos

Se recolectaron cuerpos fructíferos de hongos crecidos sobre troncos de árboles en distintos puntos del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León (Figura 7).

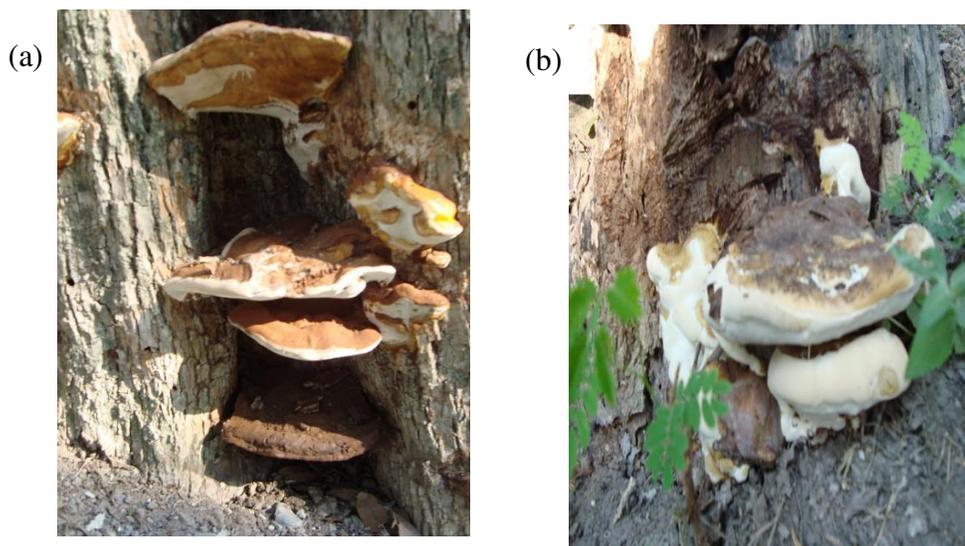


Figura 7. Hongos de pudrición blanca recolectados

Se aislaron 3 hongos (Figura 8) a partir de las muestras extraídas de los troncos de árboles, las cuales se crecieron en las condiciones descritas en la metodología.

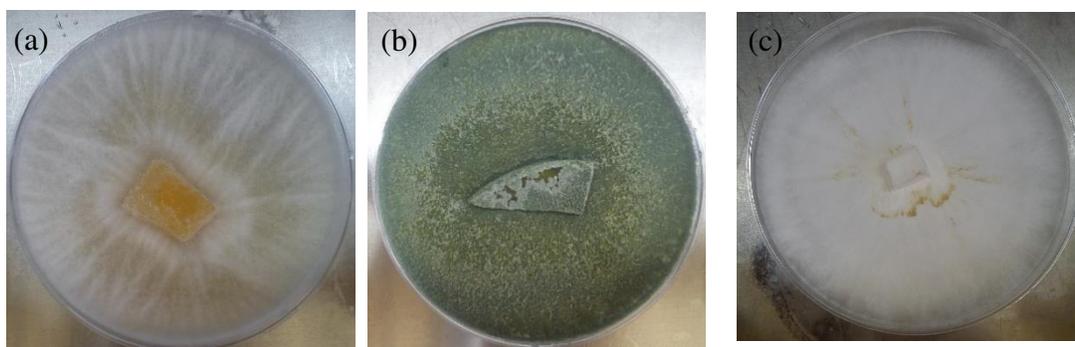


Figura 8. Hongos aislados hongo 1(a), hongo 2(b), y hongo 3(c)

Para evaluar la capacidad de los hongos aislados para degradar el colorante se realizó una prueba de degradación en medio sólido adicionando colorante rojo congo a cada una de las placas e incubándolas a una temperatura de 28 °C. El hongo que logró una mayor decoloración del colorante rojo congo fue el hongo 3 (Figura 9c) el cual fue nombrado con las siglas HPB (hongo de pudrición blanca).

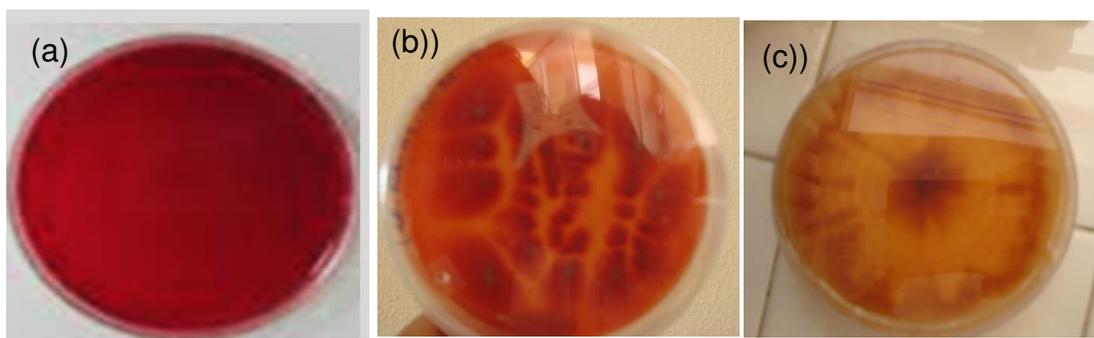


Figura 9. Placa con colorante rojo congo (a), hongo 2 (b), hongo 3 (c)

El hongo usado como referencia se muestra en la Figura 10 y se nombró con las siglas HTT (Hongo *Trametes troggi*). En todos los experimentos se realizaron comparaciones entre el hongo de referencia (HTT) y el hongo aislado (HPB) para

evaluar sus capacidades de producción de enzima, proteína y degradación de colorantes.



Figura 10. Hongo de referencia (*Trametes troggi*, HTT) en placa sólida.

3.1.1 Medición de la actividad enzimática

Se realizaron experimentos cinéticos con los extractos crudos de los hongos aislado (HPB) y de referencia (HTT), así como de la enzima comercial (lacasa-EC) para establecer las condiciones de medición de la actividad enzimática (Figura 11). La lacasa-EC alcanzó el máximo de actividad para el minuto tres, mientras que extractos crudos de los hongos HPB y HTT hasta el minuto 15 debido a que aún no se sometía a ningún proceso de purificación enzimática. Para los experimentos posteriores. la medición de la actividad se realizó en el tiempo de máxima actividad.

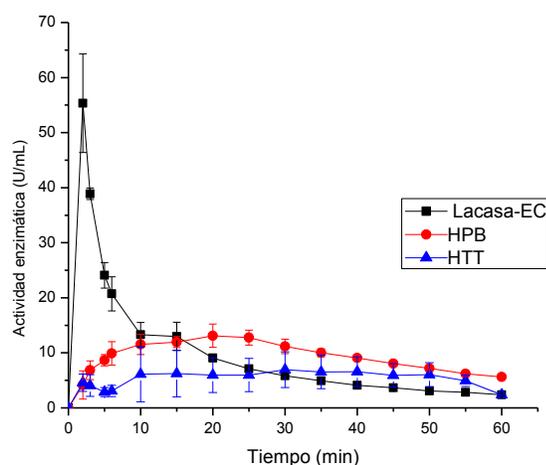


Figura 11. Cinética de la actividad enzimática de lacasa comercial (Lacasa-EC), y los extractos crudos de los hongos de referencia (HTT) y aislado (HPB)

3.2 Obtención de las condiciones óptimas de producción de la enzima con los hongos de pudrición blanca

El diseño experimental CCD se empleó para determinar los efectos simples y combinados de los factores (variables de operación) en la producción de las lacasas. El procedimiento se realizó en tres pasos: realizar los experimentos designados, estimar los coeficientes en el modelo propuesto, predecir la respuesta del proceso y checar la validez del modelo. Los datos experimentales fueron analizados por el metodología de superficie de respuesta (MSR) y ajustados a un modelo de segundo orden usando el programa estadístico Design-Expert 7.0, además de los análisis de varianza (ANOVA) para determinar los factores que fueron significativos en los experimentos.

Las variables respuesta del diseño experimental (actividad enzimática, proteína total, peso seco) así como la decoloración del colorante rojo congo, se muestran a continuación haciendo un comparativo entre los hongos HPB y HTT.

3.2.1 Actividad enzimática

Los resultados de cada punto experimental del diseño en donde la actividad enzimática fue la respuesta, se muestran en la Tabla 8. La aplicación de la metodología de superficie de respuesta fue expresada por el modelo cuadrático de la Ecuación (5).

Tabla 8. Diseño factorial central compuesto para las dos variables (medio de cultivo y temperatura) para el hongo seleccionado (HPB) con la actividad enzimática como respuesta

| Corrida | Valores codificados de las variables | | Actividad enzimática (U/mL) (R) |
|---------|--------------------------------------|--------------------|---------------------------------------|
| | Medio de cultivo (A) | Temperatura (B) | |
| 1 | -1 | -1 | 8.8271 |
| 2 | +1 | -1 | 5.8 |
| 3 | -1 | +1 | 17.91 |
| 4 | +1 | +1 | 7.8 |
| 5 | -1 | 0 | 12.2 |
| 6 | +1 | 0 | 5.08 |
| 7 | 0 | -1 | 1.975 |
| 8 | 0 | +1 | 13.54 |
| 9 | 0 | 0 | 12.5 |
| 10 | 0 | 0 | 11.43 |
| 11 | 0 | 0 | 11.2 |
| 12 | 0 | 0 | 12 |
| 13 | 0 | 0 | 10.23 |

En la Tabla 9 se muestra el ANOVA de la actividad enzimática del hongo aislado (HPB) y se encuentra que el factor significativo es el medio de cultivo. El

valor asociado *p*-valor para el modelo es menor de 0.05 lo que indica que el modelo es considerado estadísticamente significativo.

$$\text{Actividad enzimática} = 10.76 - 3.36A + 5.68B - 1.77AB - 0.34A^2 - 1.22B^2 - 3.01A^2B + 0.28AB^2 \quad (5)$$

donde *A* y *B* son las dos variables independientes.

Tabla 9. ANOVA para la actividad enzimática del hongo de seleccionado (HPB)

| Análisis de Varianza | | | | | |
|----------------------------------|-------------------|----------|------------------|---------------|-----------------|
| Fuente | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | Valor F | p-valor Prob >F |
| Modelo | 184.864 | 7 | 26.409 | 6.197 | 0.031 |
| A-Temperatura | 25.347 | 1 | 25.347 | 5.948 | 0.059 |
| <u>B-Medio de cultivo</u> | <u>66.875</u> | <u>1</u> | <u>66.875</u> | <u>15.693</u> | <u>0.011</u> |
| AB | 12.542 | 1 | 12.542 | 2.943 | 0.147 |
| A² | 0.322 | 1 | 0.322 | 0.076 | 0.794 |
| B² | 4.138 | 1 | 4.138 | 0.971 | 0.370 |
| A²B | 12.094 | 1 | 12.094 | 2.838 | 0.153 |
| AB² | 0.101 | 1 | 0.101 | 0.024 | 0.884 |
| Residuales | 21.308 | 5 | 4.262 | | |
| Falta de ajuste | 18.354 | 1 | 18.354 | 24.854 | 0.008 |
| Error | 2.954 | 4 | 0.738 | | |
| Total | 206.172 | 12 | | | |

$R^2=0.8967$; C.V.=20.57%; $\alpha=0.05$; gl= grados de libertad

En el gráfico de superficie de respuesta (Figura 12) se muestra que para el hongo aislado (HPB), el punto máximo de la actividad enzimática para la lacasa con los factores analizados (medio de cultivo y temperatura) fueron alcanzados a

28 °C y medio de cultivo MM-ST2. En el gráfico se puede observar de igual forma el efecto tan significativo que tuvo el medio de cultivo.

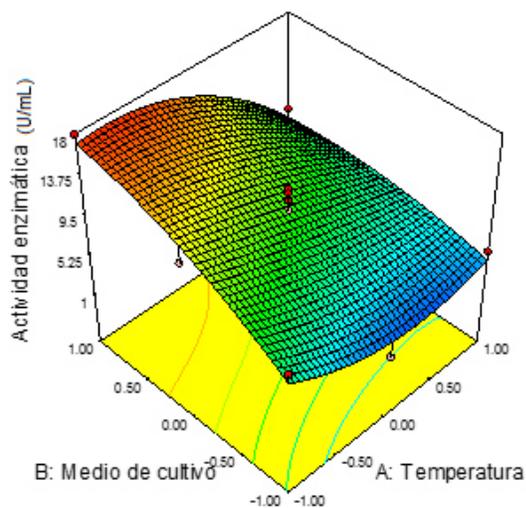


Figura 12 Gráfico de superficie de respuesta del hongo seleccionado (HPB) para la actividad enzimática frente a los factores de medio de cultivo y temperatura

Los resultados de cada punto experimental del diseño para el HTT con la respuesta de actividad enzimática se muestran en la Tabla 10. La aplicación de la metodología de superficie de respuesta fue expresada por el siguiente modelo cuadrático (Ecuación (6))

$$\begin{aligned} \text{Actividad enzimática} = & 13.22 - 4.51A + 6.71B + 0.58AB - 7.40A^2 - 4.30B^2 - \\ & 6.97A^2B + 4.54AB^2 \end{aligned} \quad (6)$$

donde A y B son las dos variables independientes.

Tabla 10. Diseño factorial central compuesto para las dos variables (medio de cultivo y temperatura) para el hongo de referencia (HTT) con la actividad enzimática como respuesta

| Corrida | Valores codificados de las variables | | Actividad enzimática (U/mL) (R) |
|---------|--------------------------------------|---------------|---------------------------------|
| | Medio de cultivo A | Temperatura B | |
| -1 | -1 | -1 | 2.043 |
| +1 | -1 | +1 | 0.858 |
| -1 | +1 | -1 | 11.099 |
| +1 | +1 | +1 | 0.265 |
| -1 | 0 | -1 | 15.006 |
| +1 | 0 | +1 | 2.938 |
| 0 | -1 | 0 | 16.364 |
| 0 | +1 | 0 | 11.327 |
| 0 | 0 | 0 | 11.056 |
| 0 | 0 | 0 | 1.506 |
| 0 | 0 | 0 | 15.025 |
| 0 | 0 | 0 | 1.951 |
| -1 | -1 | -1 | 12.154 |

En la Tabla 9 se muestra el ANOVA del hongo de referencia (HTT) y se encuentra que tanto el medio de cultivo así como la temperatura fueron significativos y, por consiguiente, afectan la producción de la enzima.

En el caso del hongo de referencia (HTT), el punto máximo de actividad enzimática se obtuvo a 33 °C en el medio de cultivo MM-ST2. En la Figura 13 se aprecia claramente la influencia de dichos factores en la actividad enzimática.

Tabla 11. ANOVA de la actividad enzimática del hongo de referencia (HTT)

| Análisis de Varianza | | | | | |
|----------------------------------|-------------------|----------|------------------|---------------|-----------------|
| Fuente | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | Valor F | p-valor Prob >F |
| Modelo | 447.554 | 7 | 63.936 | 17.411 | 0.003 |
| <u>A-Temperatura</u> | <u>40.611</u> | <u>1</u> | <u>40.611</u> | <u>11.059</u> | <u>0.020</u> |
| <u>B-Medio de cultivo</u> | <u>90.128</u> | <u>1</u> | <u>90.128</u> | <u>24.544</u> | <u>0.004</u> |
| AB | 1.361 | 1 | 1.361 | 0.371 | 0.569 |
| A² | 151.353 | 1 | 151.353 | 41.216 | 0.001 |
| B² | 51.088 | 1 | 51.088 | 13.912 | 0.013 |
| A²B | 64.816 | 1 | 64.816 | 17.651 | 0.008 |
| AB² | 27.521 | 1 | 27.521 | 7.494 | 0.040 |
| Residuales | 18.361 | 5 | 3.672 | | |
| Falta de ajuste | 3.139 | 1 | 3.139 | 0.825 | 0.415 |
| Error | 15.222 | 4 | 3.806 | | |
| Total | 465.914 | 12 | | | |

$R^2=0.9606$; C.V.=24.52%; $\alpha=0.05$; gl=grados de libertad

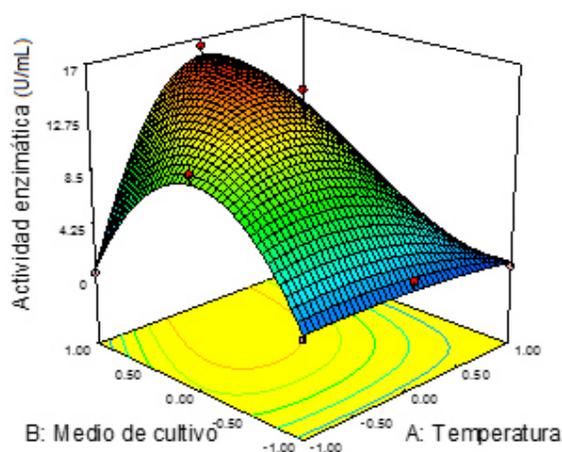


Figura 13. Gráfico de superficie de respuesta del hongo de referencia (HTT) para la actividad enzimática frente a los factores de temperatura y medio de cultivo

Los resultados anteriores resaltan la importancia de la selección adecuada del medio de cultivo y la temperatura, ya que estos parámetros afectan de manera directa la producción de lacasa por los hongos, pues al modificar estos factores se observó un cambio considerable en la variable de respuesta analizada (actividad enzimática). En esta investigación, el medio de cultivo fue un factor significativo para ambos hongos (HPB y HTT), ya que indudablemente existe una relación estrecha entre la producción enzimática y el medio de cultivo seleccionado. Debido a que se trabajó con un medio mineral adicionado con salvado de trigo, este proporciona una fuente importante de materiales ligninocelulósicos favoreciendo la producción enzimática. Además, el medio de cultivo MM-ST2 no contenía glucosa obligando al hongo a producir enzimas tipo lacasas para degradar la lignina presente en el salvado de trigo. En ambos casos, la producción de lacasas por los hongos estudiados fue mejor en el MM-ST2, esto puede estar asociado a la relación Carbono/Nitrógeno (C/N) del medio de cultivo, ya que al parecer la adición de glucosa afecta la producción de las lacasas porque eleva la relación C/N.

3.2.2 Proteína extracelular

En el diseño experimental donde la respuesta fue la proteína extracelular total, los resultados de cada punto experimental del diseño para el HPB se muestran en la Tabla 12. La aplicación de la metodología de superficie de respuesta fue expresada por el siguiente modelo cuadrático (Ecuación (7)).

$$\begin{aligned}
 \text{Proteína extracelular} = & 104.24 - 14.0A + 32.16B - 2.59AB + 11.94A^2 - \\
 & 26.56B^2 - 27.66A^2B + 15.39AB^2
 \end{aligned}
 \tag{7}$$

donde A y B son las dos variables independientes.

Tabla 12. Diseño factorial central compuesto para las dos variables del hongo seleccionado (HPB) con la proteína extracelular como respuesta

| Corrida | Valores codificados de las variables | | Proteína extracelular ($\mu\text{g/ml}$) |
|---------|--------------------------------------|------------------|---|
| | Medio de cultivo A | Temperatura B | (R) |
| -1 | -1 | -1 | 85.2 |
| +1 | -1 | +1 | 93.18 |
| -1 | +1 | -1 | 99.38 |
| +1 | +1 | +1 | 96.99 |
| -1 | 0 | -1 | 122.05 |
| +1 | 0 | +1 | 94.06 |
| 0 | -1 | 0 | 37.39 |
| 0 | +1 | 0 | 101.71 |
| 0 | 0 | 0 | 96.02 |
| 0 | 0 | 0 | 96.14 |
| 0 | 0 | 0 | 103.101 |
| 0 | 0 | 0 | 96.2 |
| -1 | -1 | -1 | 146.02 |

El ANOVA para la proteína extracelular del hongo seleccionado (HPB) muestra que ningún factor (medio de cultivo y temperatura) fue significativo para la producción de proteína extracelular total (Tabla 13).

Tabla 13. ANOVA del hongo seleccionado (HPB) para la proteína extracelular

| Análisis de Varianza | | | | | |
|-----------------------------|--------------------------|-----------|-------------------------|----------------|---------------------------|
| Fuente | Suma de cuadrados | Gl | Media cuadrática | Valor F | p-valor Prob >F |
| Modelo | 4535.422 | 7 | 647.917 | 1.424 | 0.3603 |
| A-Temperatura | 391.720 | 1 | 391.720 | 0.861 | 0.3961 |
| B-Medio de cultivo | 2068.531 | 1 | 2068.531 | 4.546 | 0.0862 |
| AB | 26.884 | 1 | 26.884 | 0.059 | 0.8176 |
| A² | 393.854 | 1 | 393.854 | 0.866 | 0.3949 |
| B² | 1948.836 | 1 | 1948.836 | 4.283 | 0.0933 |
| A²B | 1020.285 | 1 | 1020.285 | 2.242 | 0.1945 |
| AB² | 315.905 | 1 | 315.905 | 0.694 | 0.4427 |
| Residuales | 2275.089 | 5 | 455.018 | | |
| Falta de ajuste | 383.417 | 1 | 383.417 | 0.811 | 0.4188 |
| Error | 1891.672 | 4 | 472.918 | | |
| Total | 6810.511 | 12 | | | |

$R^2=0.6659$; C.V.= 21.88%; $\alpha=0.05$; gl=grados de libertad

En el gráfico de superficie de respuesta para la proteína del HPB (Figura 14) se observa un máximo de proteína extracelular en el medio de cultivo MM-ST2 a una temperatura de 33 °C. Al coincidir únicamente las condiciones del medio de cultivo con lo obtenido para la actividad enzimática (lacasa) y no la temperatura, es probablemente que el hongo produce en mayor cantidad otras enzimas o proteínas que se ven favorecidas bajo esas condiciones y aunque tal vez existan lacasas, este tipo de enzimas no son las que predominan en cantidad en el medio de cultivo.

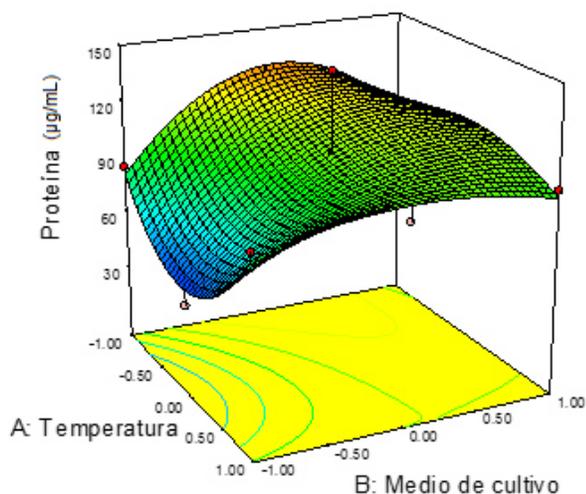


Figura 14. Gráfico de superficie de respuesta del hongo seleccionado (HPB) para la proteína extracelular frente a los factores de temperatura y medio de cultivo

Para el hongo de referencia (HTT), los resultados de cada punto experimental del diseño se muestran en la Tabla 14. La aplicación de la metodología de superficie de respuesta fue expresada por el siguiente modelo cuadrático (Ecuación (8))

$$\begin{aligned} \text{Proteína extracelular} = & 69.98609 - 11.22159A - 38.21023B + 0.19886AB - \\ & 27.80074A^2 - 7.85756B^2 + 59.23295A^2B + 9.03409AB^2 \end{aligned} \quad (8)$$

donde A y B son las dos variables independientes.

En la Tabla 15 se muestra el ANOVA del hongo de referencia (HTT) en donde se observa que los dos factores estudiados (medio de cultivo y temperatura) fueron significativos al igual que para la actividad enzimática.

Tabla 14. Diseño factorial central compuesto para las dos variables del hongo de referencia (HTT) con la proteína extracelular como respuesta

| Corrida | Valores codificados de las variables | | Proteína extracelular ($\mu\text{g/ml}$) (R) |
|---------|--------------------------------------|---------------|--|
| | Medio de cultivo A | Temperatura B | |
| -1 | -1 | -1 | 33.699 |
| +1 | -1 | +1 | 9.551 |
| -1 | +1 | -1 | 72.619 |
| +1 | +1 | +1 | 55.972 |
| -1 | 0 | -1 | 68.926 |
| +1 | 0 | +1 | 103.074 |
| 0 | -1 | 0 | 26.653 |
| 0 | +1 | 0 | 68.074 |
| 0 | 0 | 0 | 56.142 |
| 0 | 0 | 0 | 51.994 |
| 0 | 0 | 0 | 73.074 |
| 0 | 0 | 0 | 14.324 |
| -1 | -1 | -1 | 61.767 |

Tabla 15. ANOVA del hongo de referencia (HTT) para la proteína extracelular

| Análisis de Varianza | | | | | |
|----------------------------------|-------------------|----------|------------------|----------------|-----------------|
| Fuente | Suma de cuadrados | Gl | Media cuadrática | Valor F | p-valor Prob >F |
| Modelo | 8193.197 | 7 | 1170.457 | 46.371 | 0.0003 |
| <u>A-Temperatura</u> | <u>251.848</u> | <u>1</u> | <u>251.848</u> | <u>9.978</u> | <u>0.0251</u> |
| <u>B-Medio de cultivo</u> | <u>2920.043</u> | <u>1</u> | <u>2920.043</u> | <u>115.686</u> | <u>0.0001</u> |
| AB | 0.158 | 1 | 0.158 | 0.006 | 0.9400 |
| A² | 2134.625 | 1 | 2134.625 | 84.570 | 0.0003 |
| B² | 170.524 | 1 | 170.524 | 6.756 | 0.0483 |
| A²B | 4678.057 | 1 | 4678.057 | 185.335 | < 0.0001 |
| AB² | 108.820 | 1 | 108.820 | 4.311 | 0.0925 |
| Residuales | 126.205 | 5 | 25.241 | | |
| Falta de ajuste | 43.389 | 1 | 43.389 | 2.096 | 0.2213 |
| Error | 82.816 | 4 | 20.704 | | |
| Total | 8319.402 | 12 | | | |

$R^2=0.9848$; C.V.=9.39%; $\alpha=0.05$; gl=grados de libertad

El gráfico de superficie de respuesta para el HTT (Figura 15) muestra que el máximo obtenido de proteína extracelular fue en el medio de cultivo GM a 33 °C. Estas condiciones óptimas son diferentes a las obtenidas para la actividad enzimática indicando que el HTT tiene la capacidad de producir una mayor cantidad de otro tipo de enzimas diferentes a lacasas (resultados similares se reportaron para el HPB). No obstante, es importante mencionar que si coinciden el medio de cultivo para maximizar la actividad enzimática y la proteína extracelular del HPB, lo cual sugiere que el hongo HPB tiene la capacidad de producir en su mayoría enzimas extracelulares que degradan lignina, sin necesidad de estresar su metabolismo. En contraste, no coincide el medio de cultivo para maximizar la actividad enzimática y la proteína extracelular del hongo HTT indicando que el metabolismo natural del hongo no produce lacasas u otras enzimas que degradan residuos lingocelulósicos, aunque la adición del salvado de trigo promueve dicha producción basado en la actividad enzimática para ambos hongos estudiados.

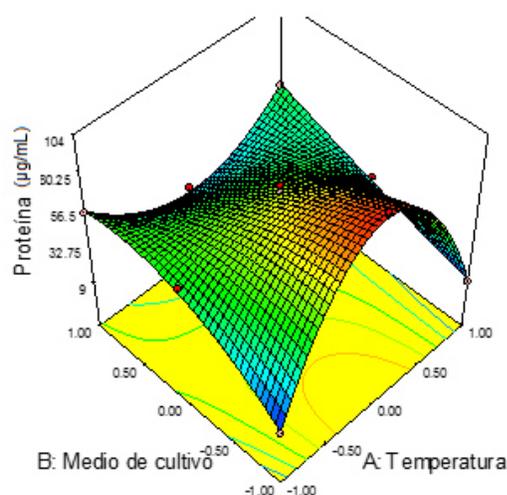


Figura 15. Gráfico de superficie de respuesta del hongo de referencia (HTT) para la proteína extracelular con los factores medio de cultivo y temperatura

Al hacer el comparativo de la proteína extracelular entre los dos hongos estudiados (HTT y HPB) se observa un comportamiento similar, ya que en ambos casos el máximo de proteína producida por los hongos no coincidió con el máximo de actividad enzimática para la lacasa; en otras palabras, las condiciones en las que se produce más enzima de tipo lacasa son diferentes a las condiciones de producción de otras enzimas o proteínas que producen los hongos en mayor cantidad.

3.2.3 Peso seco

La respuesta del diseño experimental relacionada con el crecimiento del hongo, después de su incubación por 12 días, fue el peso seco de la biomasa. Los resultados de cada punto experimental del diseño para el HPB se muestran en la Tabla 16. La aplicación de la metodología de superficie de respuesta fue expresada por el siguiente modelo cuadrático (Ecuación (9))

$$\begin{aligned} \text{Peso seco} = & 1.44 - 0.47A + 0.79B - 0.23AB - 0.055A^2 - 0.15B^2 - 0.43A^2B + \\ & 0.030AB^2 \end{aligned} \quad (9)$$

donde A y B son las dos variables independientes.

El ANOVA del HPB indica que el factor significativo para el crecimiento del hongo fue el medio de cultivo, mientras que la temperatura no tuvo una gran influencia para el desarrollo del hongo (Tabla 17).

Tabla 16. Diseño factorial central compuesto para las dos variables del hongo seleccionado (HPB) para el peso seco como respuesta del diseño

| Corrida | Valores codificados de las variables | | Peso seco (g) (R) |
|---------|--------------------------------------|------------------|----------------------|
| | Medio de cultivo A | Temperatura B | |
| -1 | -1 | -1 | 1.176 |
| +1 | -1 | +1 | 0.773 |
| -1 | +1 | -1 | 2.3788 |
| +1 | +1 | +1 | 1.04 |
| -1 | 0 | -1 | 1.62 |
| +1 | 0 | +1 | 0.69 |
| 0 | -1 | 0 | 0.263 |
| 0 | +1 | 0 | 1.85 |
| 0 | 0 | 0 | 1.66 |
| 0 | 0 | 0 | 1.52 |
| 0 | 0 | 0 | 1.498 |
| 0 | 0 | 0 | 1.6 |
| -1 | -1 | -1 | 1.36 |

Tabla 17. ANOVA para el peso seco del hongo seleccionado (HPB)

| Análisis de Varianza | | | | | |
|----------------------------------|-------------------|----------|------------------|---------------|-----------------|
| Fuente | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | Valor F | p-valor Prob >F |
| Modelo | 3.316 | 7 | 0.474 | 6.758 | 0.0257 |
| A-Temperatura | 0.432 | 1 | 0.432 | 6.170 | 0.0556 |
| <u>B-Medio de cultivo</u> | <u>1.259</u> | <u>1</u> | <u>1.259</u> | <u>17.967</u> | <u>0.0082</u> |
| AB | 0.219 | 1 | 0.219 | 3.124 | 0.1374 |
| A² | 0.008 | 1 | 0.008 | 0.119 | 0.7443 |
| B² | 0.065 | 1 | 0.065 | 0.928 | 0.3797 |
| A²B | 0.242 | 1 | 0.242 | 3.453 | 0.1222 |
| AB² | 0.001 | 1 | 0.001 | 0.017 | 0.9025 |
| Residuales | 0.350 | 5 | 0.070 | | |
| Falta de ajuste | 0.299 | 1 | 0.299 | 23.063 | 0.0086 |
| Error | 0.052 | 4 | 0.013 | | |
| Total | 3.666 | 12 | | | |

$R^2=0.9044$; C.V.=19.75%; $\alpha=0.05$; gl=grados de libertad

Basados en el gráfico de superficie de respuesta del HPB (Figura 16) para el peso seco, se encuentra que el medio de cultivo MM-ST2 y una temperatura de incubación de 28 °C favorecen el mayor crecimiento del hongo. Estas condiciones son las mismas que las obtenidas para el máximo de actividad enzimática e indica que el crecimiento del hongo está relacionado directamente con la producción de la enzima lacasa.

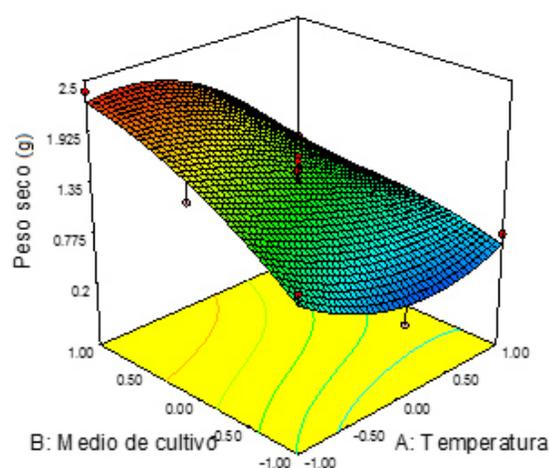


Figura 16 Gráfico de superficie de respuesta para el peso seco del hongo seleccionado (HPB) con los factores de temperatura y medio de cultivo

En el caso del hongo de referencia (HTT) en la Tabla 18 se muestran los resultados de cada punto experimental del diseño. La aplicación de la metodología de superficie de respuesta fue expresada por el siguiente modelo cuadrático (Ecuación (10))

$$\text{Peso seco} = 0.92 - 0.19A + 0.64B - 0.022AB - 0.74A^2 + 0.72B^2 \quad (10)$$

donde A y B son las dos variables independientes.

Tabla 18. Diseño factorial central compuesto para las dos variables del hongo de referencia (HTT) para el peso seco como respuesta

| Corrida | Valores codificados de las variables | | Peso seco (g) (R) |
|---------|--------------------------------------|------------------|----------------------|
| | Medio de cultivo A | Temperatura B | |
| -1 | -1 | -1 | 0.170 |
| +1 | -1 | +1 | 0.033 |
| -1 | +1 | -1 | 0.790 |
| +1 | +1 | +1 | 1.430 |
| -1 | 0 | -1 | 0.821 |
| +1 | 0 | +1 | 1.320 |
| 0 | -1 | 0 | 2.737 |
| 0 | +1 | 0 | 0.723 |
| 0 | 0 | 0 | 0.974 |
| 0 | 0 | 0 | 1.210 |
| 0 | 0 | 0 | 0.834 |
| 0 | 0 | 0 | 0.164 |
| -1 | -1 | -1 | 0.680 |

Tabla 19. ANOVA para el peso seco del hongo de referencia (HTT)

| Análisis de Varianza | | | | | |
|----------------------------------|-------------------|----|------------------|---------|-----------------|
| Fuente | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | Valor F | p-valor Prob >F |
| Modelo | 4.829 | 5 | 0.966 | 6.566 | 0.0142 |
| A-Temperatura | 0.222 | 1 | 0.222 | 1.510 | 0.2588 |
| <u>B-Medio de cultivo</u> | 2.483 | 1 | 2.483 | 16.881 | 0.0045 |
| AB | 0.002 | 1 | 0.002 | 0.014 | 0.9107 |
| A² | 1.508 | 1 | 1.508 | 10.253 | 0.0150 |
| B² | 1.421 | 1 | 1.421 | 9.661 | 0.0171 |
| Residuales | 1.030 | 7 | 0.147 | | |
| Falta de ajuste | 1.012 | 3 | 0.337 | 77.550 | 0.0005 |
| Error | 0.017 | 4 | 0.004 | | |
| Total | 5.859 | 12 | | | |

$R^2=0.8246$; C.V. 41.95%; $\alpha=0.05$; gl=grados de libertad

La Tabla 19 muestra el ANOVA del HTT y se deduce de este análisis que el medio de cultivo afectó de manera significativa el crecimiento del hongo. En la Figura 17 se presenta el gráfico de superficie de respuesta del HTT y se muestra un mayor crecimiento del hongo a 33 °C con el medio de cultivo MM-ST2.

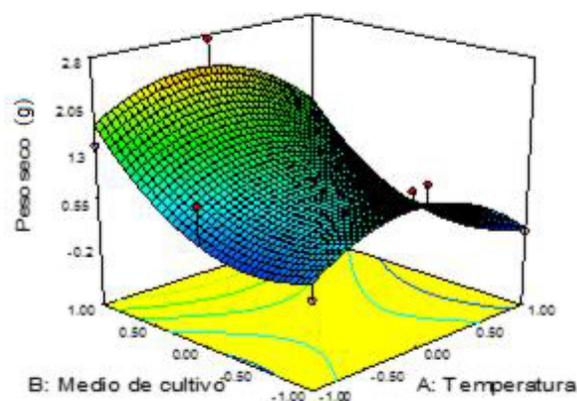


Figura 17 Gráfico de superficie de respuesta del hongo de referencia (HTT) respecto al peso seco

Comparando el peso seco obtenido para ambos hongos bajo estudio, se observa una relación directa entre el crecimiento del hongo (asociado al peso seco de la biomasa) y la actividad enzimática de la lacasa, ya que los valores óptimos encontrados son bajo las mismas condiciones de temperatura y medio de cultivo; es decir, si se produce un mayor crecimiento del hongo, en el medio de cultivo se encontrará también una mayor producción de la enzima lacasa.

3.2.4 Decoloración del colorante rojo congo

La decoloración del efluente acuoso con rojo congo se realizó con los extractos crudos que contenían lacasa. En la Figura 18 se observa un máximo

de decoloración para el hongo aislado (HPB) en el medio de cultivo GM a 37 °C, el porcentaje de decoloración alcanzada por este hongo fue de 60.89% en 24 h. Los demás extractos enzimáticos del HPB mostraron porcentajes de decoloración para el rojo congo entre 5% y 35%. Debido a que no se observó una relación entre los máximos obtenidos para la actividad enzimática de la lacasa y el máximo de la decoloración alcanzada por el hongo HPB, se sugiere que la decoloración es causada por el conjunto de enzimas de tipo ligninolíticas presentes en el extracto crudo y no exclusivamente debido a la actividad de enzimas tipo lacasa.

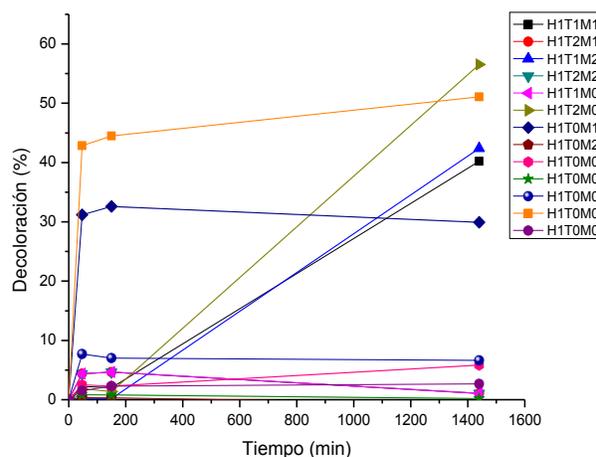


Figura 18. Decoloración del colorante rojo congo por los extractos crudos del hongo seleccionado (HPB)³

El extracto crudo del hongo de referencia (HTT) alcanzó un máximo de decoloración para el colorante rojo congo del 58.34% bajo las condiciones de

³ *Ver Tabla de acrónimos en Anexo II

medio de cultivo MM-ST2 y una temperatura de 33 °C. Los otros extractos enzimáticos del HHT mostraron rangos de decoloración del rojo congo entre el 20% y 30% (Figura 19).

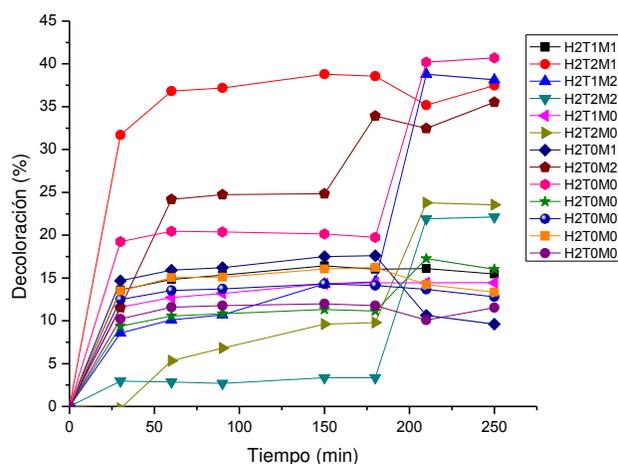


Figura 19. Decoloración del colorante rojo congo por los extractos crudos del hongo de referencia (HTT)⁴

Tomando en cuenta que las condiciones óptimas de la producción enzimática fueron las mismas que para la decoloración para el hongo de referencia (HTT), se puede asociar la producción enzimática de las lacasas con la decoloración del rojo congo. En este caso, las enzimas lacasas parecen ser las principales responsables de la decoloración del rojo congo presente en agua.

3.3 Separación de las fracciones ricas en lacasas

Para el fraccionamiento de los extractos crudos de los hongos HPB y HTT se siguieron los pasos mencionados en la metodología midiendo en cada etapa la

⁴ Ver Tabla de acrónimos en Anexo II

actividad enzimática y la proteína total. En la Tabla 20 se muestran las etapas del proceso de purificación para la enzima lacasa del HPB, en donde se muestra que el rendimiento fue afectado en cada uno de los pasos seguidos en la purificación. Sin embargo, en los pasos de ultracentrifugación se observó un aumento de la actividad enzimática, esto se debe posiblemente a que mediante este paso se enriquece la muestra con enzimas tipo lacasa, y a que se están eliminando proteínas de pesos moleculares distintos a la lacasa.

Tabla 20. Etapas de purificación de la lacasa producida por HPB en el medio de cultivo MM-ST a 28 °C

| Etapas | Actividad total (U) | Proteína total (mg) | Actividad (U/mL) | Actividad específica (U/mg) | Rendimiento (%) | Factor de purificación |
|--|----------------------------|----------------------------|-------------------------|------------------------------------|------------------------|-------------------------------|
| 1. Filtración | 13432 | 18 | 17.91 | 460.41 | 100 | |
| 2.Ultracentrifugación (10 kDa) | 6332 | 8.15 | 31.66 | 776.74 | 47.13 | 1.68 |
| 3. Precipitación con sulfato de amonio | 638.5 | 1.75 | 12.77 | 364.12 | 4.75 | 0.71 |
| 4. Diálisis ultracentrifugado (100 kDa) | 1639.2 | 1.96 | 40.98 | 1043.27 | 12.23 | 2.66 |
| 5.Ultracentrifugación (10 kDa) | 821 | 0.54 | 41.05 | 1519.24 | 6.11 | 3.3 |
| 6. Cromatografía por exclusión molecular | 13.72 | 1.487 | 13.72 | 922 | 1.12 | 2.03 |
| 7. Ultracentrifugación de fracciones (30 kDa) | 143.22 | | 71.61 | | 0.56 | |

La separación de las fracciones enzimáticas del extracto crudo producido por el hongo HPB, mediante cromatografía de exclusión de tamaño molecular se realizó a un flujo de 0.99 mL/min y cada fracción fue recolectada con 35 gotas del filtrado a través de la columna de separación. En el Anexo III se incluyen geles de poliacrilamida con los pasos de purificación para el hongo HPB. La Figura 20 muestra el perfil de separación del extracto crudo del HPB en el cual se obtuvo un pico en la fracción número 13 con 13.8 U de actividad y 14.8 µg/ml de proteína total. En general, se observó una buena separación de lacasa por cromatografía de exclusión corroborado además con los geles de electroforesis. Por último, es importante resaltar que la mayor actividad observada en las fracciones separadas correspondió a la mayor cantidad de proteína.

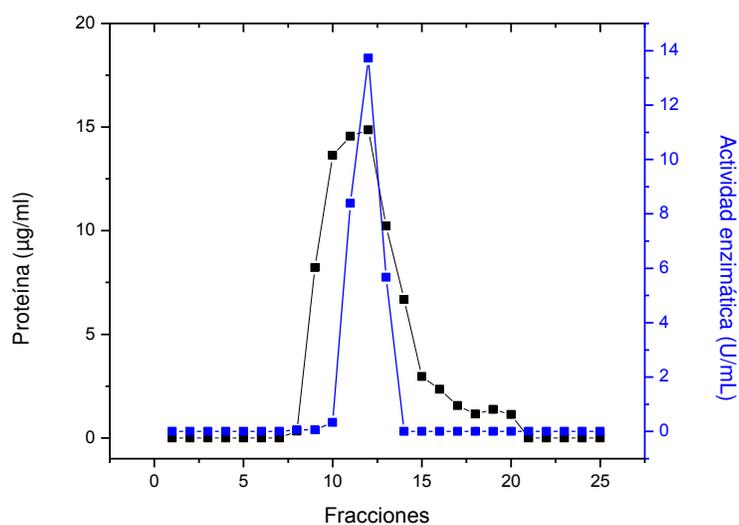


Figura 20. Perfil de separación de proteína y actividad enzimática de la lacasa producida por el hongo HPB en el medio de cultivo MM-ST2 a 28 °C.

Para el extracto crudo del hongo de referencia (HTT) se realizaron los mismos pasos de purificación que para el hongo aislado (HPB). En la Tabla 21 se muestran los resultados obtenidos en cada etapa de separación y se observa un comportamiento similar que el HPB en las etapas de purificación

El cromatograma correspondiente al extracto crudo del HTT se corrió bajo las mismas condiciones que el extracto anterior (HPB) las cuales son un flujo de 0.99 mL/min y 35 gotas por fracción, obteniéndose un pico en la fracción 12 con una actividad enzimática de 14.1 U/mL y 18.17 µg/ml de proteína (Figura 21). En el Anexo III se incluyen geles de poliacrilamida con los pasos de purificación para el HTT.

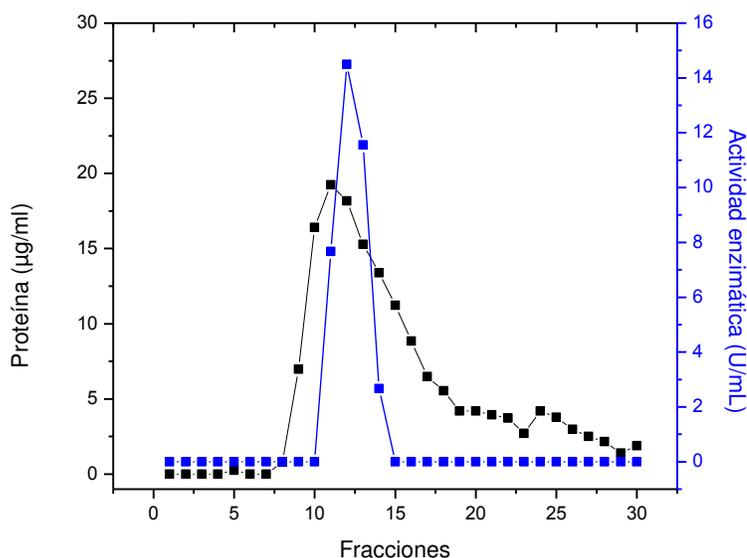


Figura 21. Perfil de separación de proteína y actividad enzimática de la lacasa producida por el hongo HTT en el medio de cultivo MM-ST a 33 °C

Ambos cromatogramas (Figura 18 y 19) muestran una relación directa entre el máximo de proteína de las fracciones con la máxima actividad enzimática de

la lacasa. Esto posiblemente debido a que los pasos previos de purificación eliminaron proteínas sin actividad específica, dejando proteínas de pesos moleculares cercanos al peso molecular de lacasa enriquecidas por último por medio de la cromatografía por exclusión molecular.

Para verificar la existencia de lacasas en los extractos purificados, se corrió un gel de poliacrilamida con las fracciones purificadas de los hongos HPB, HTT (las cuales se denominan como lacasa-HPB y lacasa-HTT en todo el texto) y con una enzima tipo lacasa comercial (lacasa-EC), a la cual ya no se le hizo ninguna modificación. La Figura 22 muestra el corrimiento de las bandas en el gel de poliacrilamida y se observa claramente que las fracciones purificadas de lacasa de los hongos estudiados (lacasa-HPB y lacasa-HTT) presentan una única banda a los ~65 kDa, la cual coincide con la banda de la lacasa comercial y los pesos moleculares de lacasas reportados por diferentes autores [61-63, 71] indicando que se trata de una lacasa monomérica [30, 72].

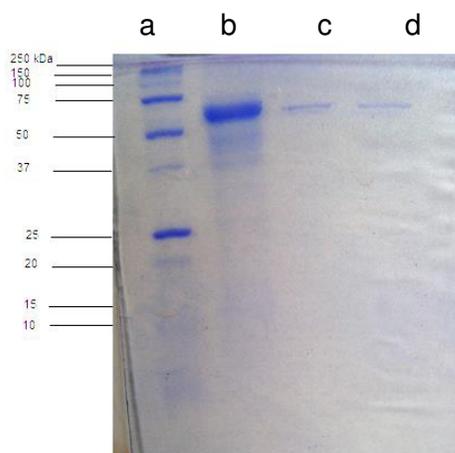


Figura 22. Gel de poliacrilamida para el marcador de peso molecular (a), lacasa comercial (b), lacasa-HPB (c), y lacasa-HTT (d)

Tabla 21. Etapas de purificación de la lacasa producida por HTT

| Etapas | Actividad total (U) | Proteína total (mg) | Actividad (U/mL) | Actividad específica (U/mg) | Rendimiento (%) | Factor de purificación |
|--|----------------------------|----------------------------|-------------------------|------------------------------------|------------------------|-------------------------------|
| 1. Filtración | 7912.5 | 31.155 | 10.55 | 253.972 | 100 | |
| 2. Ultracentrifugación (10 kDa) | 3644 | 8.394 | 18.22 | 434.119 | 46.054 | 1.709 |
| 3. Precipitación con sulfato de amonio | 611 | 2.084 | 12.22 | 293.186 | 7.723 | 1.1544 |
| 4. Diálisis ultracentrifugado (100 kDa) | 605.5 | 1.5275 | 12.11 | 396.399 | 7.653 | 1.561 |
| 5. Ultracentrifugación (10 kDa) | 1396.6 | 0.9216 | 69.83 | 1515.408 | 17.651 | 5.967 |
| 6. Cromatografía por exclusión molecular | 14.5 | 1.817 | 14.5 | 798.019 | 0.183 | 3.142 |
| 7. Ultracentrifugación de fracciones (30 kDa) | 6.52 | | 65.2 | | 0.082 | |

En el zimograma realizado con la lacasa-EC, lacasa-HPB y lacasa-HTT (Figura 23) se observaron bandas con una tonalidad verde al añadir el ABTS (sustrato específico de la lacasa) en la misma posición que la enzima lacasa comercial. Esto corrobora que las enzimas parcialmente purificadas de los extractos de los hongos seleccionados son lacasas y presentan actividad enzimática específica al ABTS. En el caso de la enzima comercial, al observarse el barrido sobre el primer carril, puede indicar que no sólo están presentes un solo tipo de lacasas sino una mezcla de lacasas con diferentes pesos moleculares.

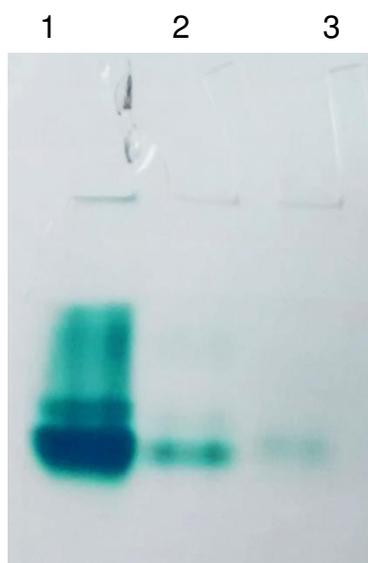


Figura 23. Zimograma frente al sustrato ABTS de Lacasa comercial (1), Lacasa HPB (2) y, Lacasa HTT (3)

3.4 Síntesis del soporte

3.4.1 Caracterización del soporte

3.4.1.1 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier con Reflexión Atenuada Total

En la Figura 24 se muestra el espectro de infrarrojo del soporte obtenido (EDSM) y el soporte aminado (EDSM-A). En el espectro se muestra una banda ancha e intensa en ambos soportes a 1066 cm^{-1} la cual corresponde a los enlaces Si-O. Además, se observan bandas débiles a 3453 cm^{-1} y 1735 cm^{-1} que corresponden a vibraciones de estiramiento y flexión de enlaces Si-O, respectivamente. La banda situada a los 1647 cm^{-1} puede ser asignada al enlace N-H (característico de los grupos amino), lo que confirma la presencia del grupo amino, así como las bandas alrededor de los 3000 cm^{-1} asociadas a bandas características de aminas primarias. [58]. En síntesis, el soporte sintetizado presenta señales características del SiO_2 y su estructura cambia después de la modificación química con aminas indicando el anclaje de estos grupos funcionales en el soporte.

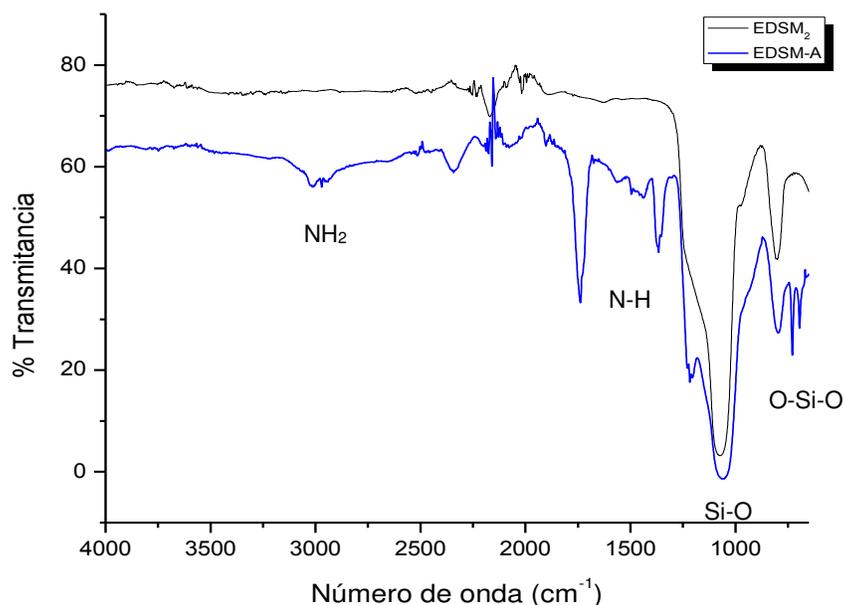


Figura 24. Espectro de ATR-FTIR del soporte sintetizado de SiO_2 (EDSM) y del soporte modificado con aminas de SiO_2 (EDSM-A)

3.4.1.2 Análisis Termogravimétricos (TGA/DTA)

El análisis termogravimétrico (TGA) de la muestra indica la variación del peso de la muestra conforme se incrementa la temperatura. En la Figura 25 se muestra el TGA del EDSM, EDSM-A y EDSM-AGI. En los tres casos se observa una primera pérdida de peso alrededor de $100\text{ }^\circ\text{C}$ que se asocia a la evaporación del agua adsorbida físicamente en la superficie del material. La mayor pérdida de peso de los materiales estudiados se encuentra de 150 a $600\text{ }^\circ\text{C}$, y estos cambios están asociados a la pérdida de agua unida químicamente al soporte de SiO_2 , así como la pérdida de los restos de los precursores usados en la síntesis, en la aminación o en la inmovilización, según corresponda.

A 1000°C el material EDSM, EDSM-A y EDSM-AGI alcanzó una pérdida de peso del 8.53%, 20.32% y 27.83%, respectivamente; la diferencia de peso entre las muestras se debe a la incorporación del grupo amino o la enzima al soporte (en el caso del EDSM-A y el EDSM-AGI, respectivamente).

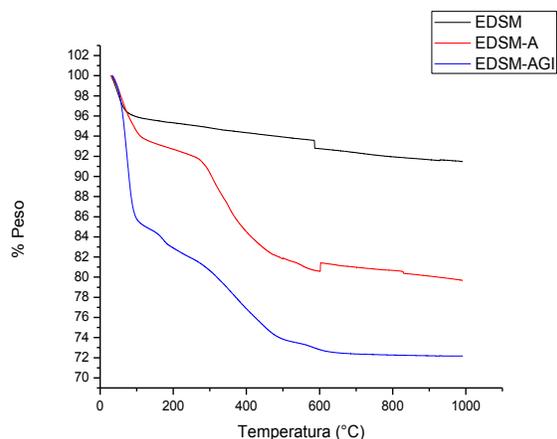


Figura 25. Análisis Termogravimétrico (TGA) de EDSM, EDSM-A y EDSM-AGI

El análisis térmico diferencial (DTA) indica la diferencia de temperatura que se da entre la muestra y un material de referencia. En estos análisis se determinan las reacciones endotérmicas y exotérmicas de la muestra. En la Figura 26 se observa el DTA de las muestras de SiO₂ sintetizado (EDSM), aminado (EDSM-A) y aminado con enzima (EDSM-AGI). Se observa que aunque son de diferente magnitud, las tres muestras presentan picos exotérmicos y endotérmicos casi en las mismas regiones de temperatura. El primer pico endotérmico se observa alrededor de 150 °C, el cual es más pronunciado y corto para EDSM-AGI, mientras que para las EDSM-A el pico es más ancho y corto; para las EDSM se observa un comportamiento parecido al material aminado.

Además, se presentan tres picos exotérmicos en las EDSM y las EDSM-AGI a 300, 350 y 600 °C; mientras que para las EDSM se observó solo un pico exotérmico a 200 °C pero poco pronunciado

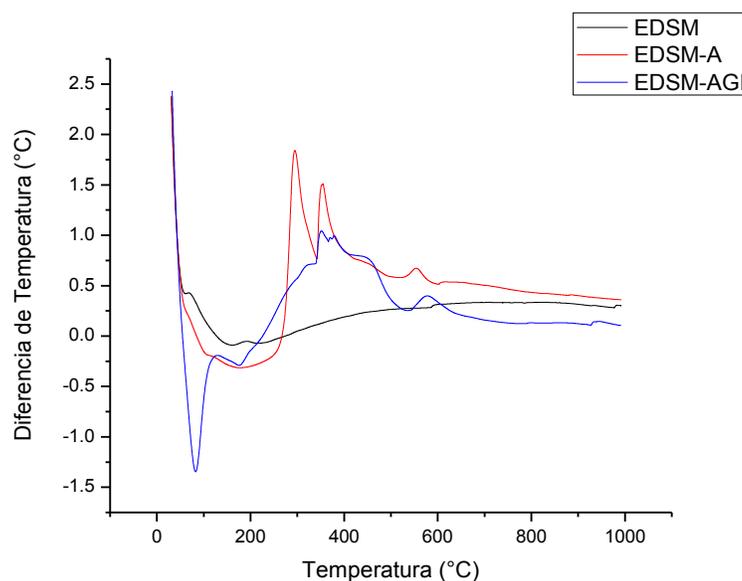


Figura 26. Análisis Térmico Diferencial (DTA) de EDSM, EDSM-A y EDSM-AGI

3.4.1.3 Difracción de Rayos X

El difractograma de rayos X (Figura 27) mostró una coincidencia en sus señales con los picos característicos del patrón de difracción para el SiO₂ (Amscd 0010753). Además, se corroboró que el soporte sintetizado (EDSM) es un material amorfo por el ruido observado en el difractograma., esto debido a que no se llegó a la temperatura de cristalización del material durante la síntesis y, por esta razón, se esperaba este comportamiento característico de materiales amorfos.

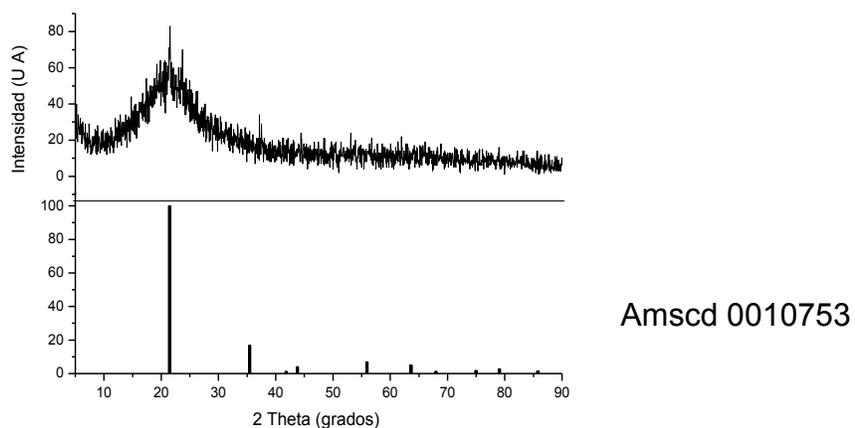


Figura 27. Análisis de Difracción de Rayos X (DRX) de EDSM

3.4.1.4 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La Figura 28 muestra micrografías correspondientes de EDSM en donde se puede observar la morfología del material, la cual son principalmente esferas de con tamaños de entre 2 y 5 μm . Además, se realizó un Microanálisis de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS o EDX) (Anexo III) para identificar los elementos que contienen la muestra, los cuales en este caso son silicio, oxígeno y carbono (esta última señal se debe a la cinta de carbono para fijar las muestras).

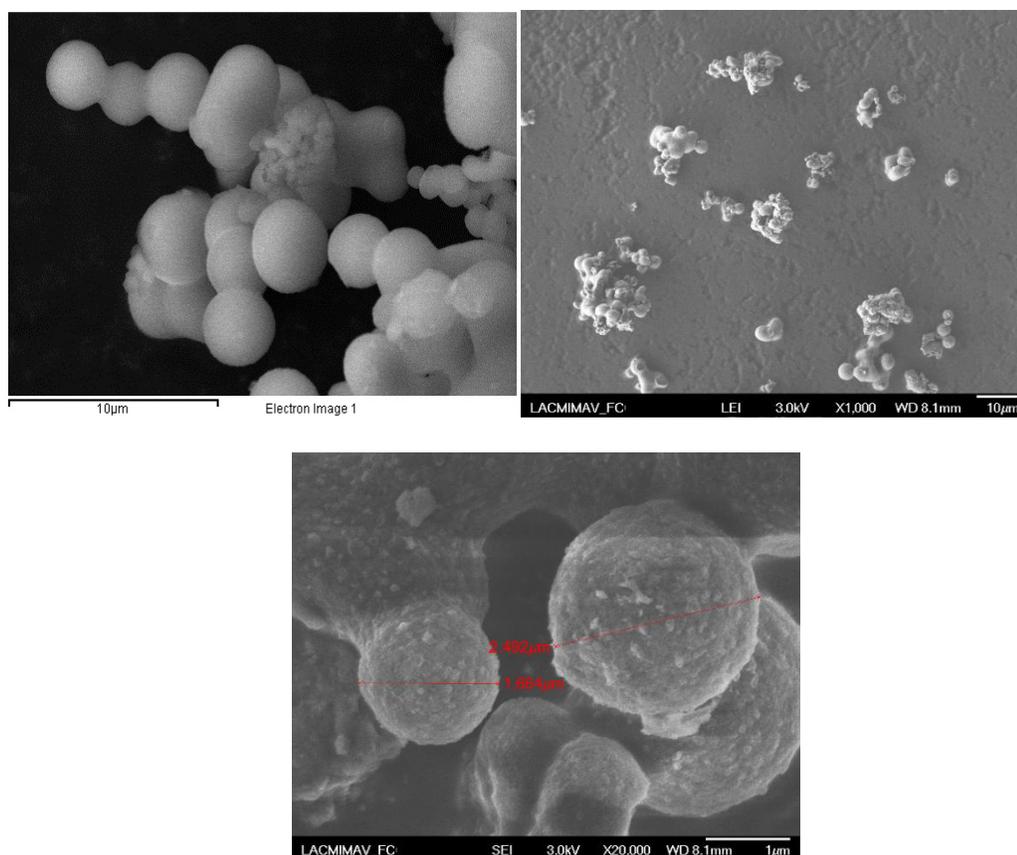


Figura 28. Micrografías de EDSM

Cabe mencionar que no fue posible detectar el nitrógeno con mediante EDS (Anexo IV) en los soportes aminados; sin embargo, es posible que no se haya explorado una zona con nitrógeno durante el análisis por EDS pero se confirmó la modificación del soporte con aminas mediante ATR-FTIR (Figura 24).

3.4.1.5 Fisisorción de nitrógeno

Para determinar si el soporte sintetizado presenta una estructura mesoporosa se realizaron análisis de fisisorción de nitrógeno. En la Figura 29 se muestran los isotermas de adsorción de nitrógeno de las EDSM y las EDSM-A. Ambos casos

muestran un isoterma tipo IV, con una histéresis tipo H1 según la IUPAC, típico de materiales mesoporosos, y es consistente con lo reportado por Zhu y colaboradores en 2007 [50] y por Zhao en 2011 [60]. La adsorción del nitrógeno decrece notablemente en el soporte después de la incorporación de grupos amino que posibilitan la inmovilización de la enzima posteriormente.

La distribución del tamaño de poro para las EDSM y las EDSM-A se realizó por el método propuesto por Barret, Joyner y Halenda (BJH) en 1951, y se obtuvo una distribución de tamaño de poros de 57 nm para las EDSM y de 43.04 nm para las EDSM-A. Del análisis BET para el área superficial, resultó en 254.4 m²/g para las EDSM y de 43.27 m²/g para las EDSM-A; con un volumen de poro de 1.03 cm³/g. para las EDSM y 0.24 cm³/g para las EDSM-A. Por lo tanto, estos resultado son comparables con lo reportado por otros autores [50, 60] para el dióxido de silicio.

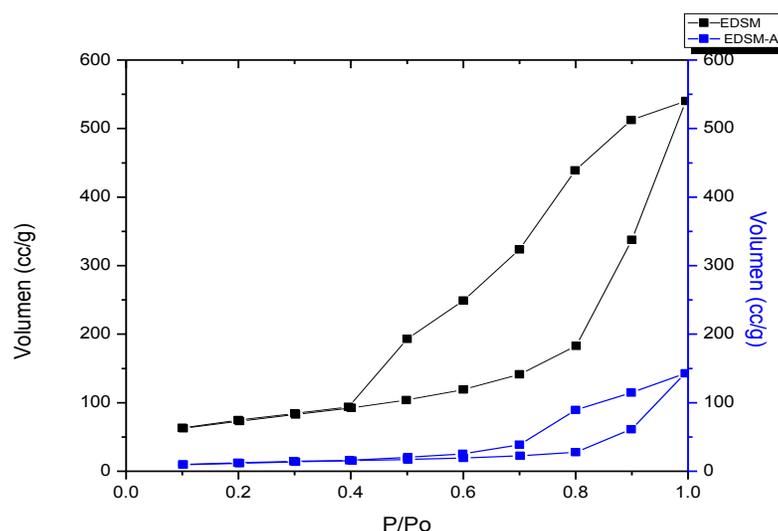


Figura 29. Isotermas de adsorción y desorción de nitrógeno de EDSM y EDSM-A

Como se pudo observar según los resultados de la caracterización se comprobó que el material sintetizado para ser utilizado como soporte (EDSM) era dióxido de silicio y que el material fue modificado con grupos aminos. El mecanismo que Zhu y colaboradores (2007) proponen para tanto la aminación del soporte como de la inmovilización, es que cuando el dióxido de silicio se funcionaliza con glutaraldehído (agente de entrecruzamiento) [50], este forma enlaces covalentes con los grupos aminos del soporte, para después formar enlaces peptídicos con los aminoácidos residuales de las enzimas, generalmente con lisinas [46]., uniendo por lo tanto de forma covalente a la enzima con el soporte.

3.5 Inmovilización de la lacasa comercial

Para la inmovilización enzimática se desarrollo un diseño experimental CCD, donde la variable respuesta fue la actividad de lacasas. De la misma forma que los diseños experimentales anteriores (*sección 2.2.2*) los datos experimentales fueron analizados por el metodología de superficie de respuesta (MSR) y ajustados a un modelo de segundo orden usando el programa estadístico Design-Expert 7.0, además de los análisis de varianza (ANOVA) para determinar los factores que fueron significativos en los experimentos.

La aplicación de la metodología de superficie de respuesta fue expresada por el siguiente modelo cuadrático (Ecuación (11))

$$\begin{aligned} \text{Actividad enzimática} = & 51.03 - 0.74A + 4.10B - 1.33C + 2.46AB + 5.27AC - \\ & 5.77BC - 28.00A^2 - 11.30B^2 + 4.27C^2 \end{aligned} \quad (11)$$

donde A , B y C son las variables independientes.

La Tabla 22 muestra todos los experimentos realizados así como los valores de actividad enzimática obtenidos en cada uno. El ANOVA (Tabla 23) de los resultados del diseño experimental de la inmovilización con la enzima comercial en las EDSM-A, y muestra que ningún factor fue significativo en la inmovilización. Y que es modelo es considerado como estadísticamente significativo.

La figura 30 muestra los gráficos de superficie de respuesta obtenidos del análisis, donde se puede observar el comportamiento de la superficie frente a los factores analizados. En los gráficos se pudo observar que la actividad enzimática máxima retenida después de la inmovilización obtenida se obtuvo a las condiciones de los puntos centrales del diseño experimental; es decir, a una concentración de glutaraldehído de 12%, un tiempo de activación de 6 h y un tiempo de inmovilización de 8 h. Por esta razón, las inmovilizaciones posteriores se realizaron a esas condiciones, tanto para la enzima comercial como para las lacasas obtenidas de la purificación de los extractos de los hongos HPB y HTT.

Tabla 22. Diseño factorial central compuesto para las tres variables en la inmovilización de la lacasa-EC

| Corrida | Valores codificados de las variables | | | Actividad enzimática (R) |
|---------|--|-------------------------------|------------------------------|--------------------------|
| | Concentración de glutaraldehído (%v/v) | Tiempo con glutaraldehído (h) | Tiempo de inmovilización () | |
| | A | B | C | |
| 1 | -1 | -1 | -1 | 20.140 |
| 2 | +1 | -1 | -1 | 3.833 |
| 3 | -1 | +1 | -1 | 30.220 |
| 4 | +1 | +1 | -1 | 27.778 |
| 5 | -1 | -1 | +1 | 16.722 |
| 6 | +1 | -1 | +1 | 25.556 |
| 7 | -1 | +1 | +1 | 7.778 |
| 8 | +1 | +1 | +1 | 22.389 |
| 9 | -1 | 0 | 0 | 15.889 |
| 10 | +1 | 0 | 0 | 3.778 |
| 11 | 0 | -1 | 0 | 17.000 |
| 12 | 0 | +1 | 0 | 36.056 |
| 13 | 0 | 0 | -1 | 44.000 |
| 14 | 0 | 0 | +1 | 40.200 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 60.200 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 58.990 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 61.200 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 59.220 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | 58.980 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 60.389 |

Tabla 23. ANOVA para la inmovilización de la enzima lacasa comercial en EDSM-A

| Análisis de Varianza | | | | | |
|--|--------------------------|-----------|-------------------------|----------------|---------------------------|
| Fuente | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | Valor F | p-valor Prob >F |
| Modelo | 6268.297 | 9 | 696.477 | 3.969 | 0.0213 |
| A- Concentración de glutaraldehído (%v/v) | 5.499 | 1 | 5.499 | 0.031 | 0.8630 |
| B-Tiempo con glutaraldehído (h) | 167.845 | 1 | 167.845 | 0.957 | 0.3511 |
| C-Tiempo inmovilización (h) | 17.760 | 1 | 17.760 | 0.101 | 0.7569 |
| AB | 48.227 | 1 | 48.227 | 0.275 | 0.6115 |
| AC | 222.535 | 1 | 222.535 | 1.268 | 0.2864 |
| BC | 266.061 | 1 | 266.061 | 1.516 | 0.2464 |
| A² | 2155.432 | 1 | 2155.432 | 12.284 | 0.0057 |
| B² | 351.264 | 1 | 351.264 | 2.002 | 0.1875 |
| C² | 50.149 | 1 | 50.149 | 0.286 | 0.6046 |
| Residuales | 1754.663 | 10 | 175.466 | | |
| Falta de ajuste | 1750.536 | 5 | 350.107 | 424.233 | < 0.0001 |
| Error | 4.126 | 5 | 0.825 | | |
| Total | 8022.959 | 19 | | | |

$R^2=0.7813$; C.V.=39.52; $\alpha=0.05$; gl= grados de libertad

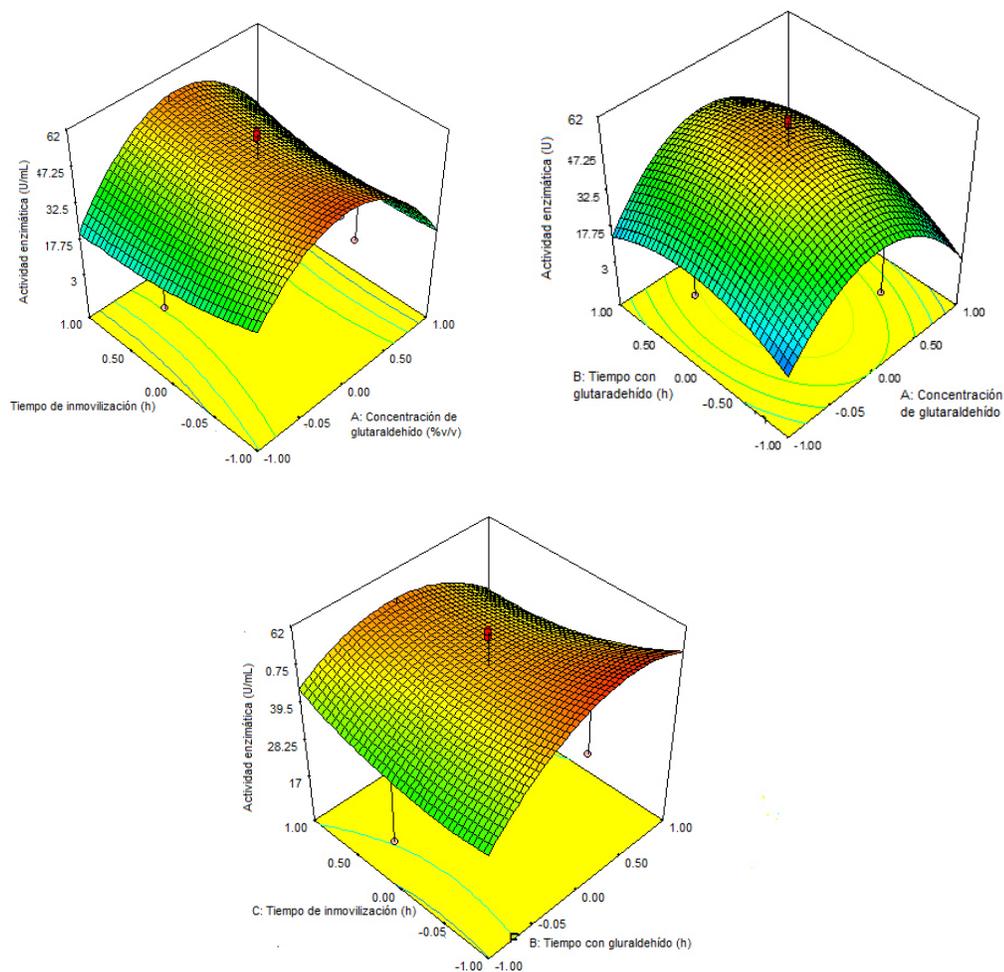


Figura 30. Superficie de respuesta para la inmovilización de la lacasa-EC

3.5.1 Inmovilización de la lacasa-HPB y lacasa-HTT

En la Tabla 17 se muestran las actividades obtenidas antes y después de la inmovilización de lacasa-HPB, lacasa-HTT y lacasa-EC. Los porcentajes de retención de las enzimas variaron entre 46% y 56%; la lacasa-EC presentó un mayor porcentaje de retención en el soporte aminado (EDSM-A) en comparación con la lacasa-HTT.

Dado que el porcentaje de retención de lacasa en el soporte fue menor que el 56% en el mejor de los casos, es probable que no hay suficientes grupos amino

disponibles en la superficie del soporte para formar un enlace covalente con la enzima durante la inmovilización. Por este motivo, es necesario seguir explorando otras alternativas para lograr una mayor eficiencia de anclaje de los grupos amino en la superficie del soporte, ya que esto puede favorecer la inmovilización enzimática por enlace covalente. También cabe resaltar que existen pérdidas de enzima y soporte durante la etapa de lavado (antes y después de la inmovilización) y, por lo tanto, emerge la necesidad de inmovilizar en sistemas donde el lavado y filtrado no afecten la pérdida del soporte ni la enzima inmovilizada.

Tabla 24. Sistemas de inmovilización para la lacasa-EC, lacasa-HPB y lacasa-HTT con actividades enzimáticas antes y después del proceso de anclaje

| Enzima | Actividad enzima libre (U) | Actividad enzima inmovilizada (U) | % Retención |
|-------------------|-----------------------------------|--|--------------------|
| Lacasa-HPB | 46.38 | 25.83 | 55.68 |
| Lacasa-HTT | 44.22 | 20.27 | 46.08 |
| Lacasa-EC | 92.77 | 52.86 | 56.94 |

3.5.2 Máxima actividad de las lacasas inmovilizadas frente a valores de pH y temperatura diferentes

Para obtener una mayor actividad enzimática de las lacasas inmovilizadas, y observar los efectos que las variables temperatura y pH mostraban en la actividad enzimática, se realizó un diseño experimental factorial general con dos factores

(pH y temperatura) y cuatro niveles para cada factor. El diseño fue analizado como un factorial general con una observación por celda, y las respuestas de cada punto del experimento para la lacasa-EC se muestran en la Tabla 25.

Tabla 25. Diseño factorial general para la actividad enzimática máxima para la lacasa-EC

| Corrida | Valores codificados de las variables | | Actividad enzimática (U/mL) |
|---------|--------------------------------------|-----------|-----------------------------|
| | Temperatura (°C) A | pH B | (R) |
| 1 | Nivel 1 A | Nivel 1 B | 12.94 |
| 2 | Nivel 2 A | Nivel 1 B | 12.72 |
| 3 | Nivel 3 A | Nivel 1 B | 15.94 |
| 4 | Nivel 4 A | Nivel 1 B | 15.94 |
| 5 | Nivel 1 A | Nivel 2 B | 2.22 |
| 6 | Nivel 2 A | Nivel 2 B | 11.72 |
| 7 | Nivel 3 A | Nivel 2 B | 13.72 |
| 8 | Nivel 4 A | Nivel 2 B | 11.67 |
| 9 | Nivel 1 A | Nivel 3 B | 7.89 |
| 10 | Nivel 2 A | Nivel 3 B | 7.83 |
| 11 | Nivel 3 A | Nivel 3 B | 2.72 |
| 12 | Nivel 4 A | Nivel 3 B | 1.17 |
| 13 | Nivel 1 A | Nivel 4 B | 3.89 |
| 14 | Nivel 2 A | Nivel 4 B | 7.33 |
| 15 | Nivel 3 A | Nivel 4 B | 7.11 |
| 16 | Nivel 4 A | Nivel 4 B | 0.61 |

En la Tabla 26 se muestra el ANOVA para la lacasa-EC en donde se puede notar que el pH fue el factor significativo, mientras que la temperatura así como la interacción entre los dos factores no fueron significativos.

Tabla 26. ANOVA de la determinación de las mejores condiciones de actividad enzimática para la lacasa-EC

| Análisis de Varianza | | | | | |
|----------------------|-------------------|--------------------|----------------|----------------|------------------|
| Fuente de variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Cuadrado medio | F _o | F _{tab} |
| A-Temperatura | 33.241 | 3 | 11.081 | 0.726 | 4.07 |
| B-pH | 254.272 | 3 | 84.757 | 5.558 | 4.07 |
| AB | 0.752 | 1 | 0.752 | 0.049 | 5.32 |
| Error | 121.993 | 8 | 15.249 | | |
| Total | 410.26 | 15 | | | |

$\alpha=0.05$

En la Tabla 27 y Tabla 29 se observan los valores obtenidos para el diseño experimental factorial en cada una de las corridas realizadas para la lacasa-HPB y HTT respectivamente.

Tabla 27. Diseño factorial general para la actividad enzimática máxima para la lacasa-HPB

| Corrida | Valores codificados de las variables | | Actividad enzimática (U/mL) (R) |
|---------|--------------------------------------|-----------|---------------------------------|
| | Temperatura (°C) A | pH B | |
| 1 | Nivel 1 A | Nivel 1 B | 3.83 |
| 2 | Nivel 2 A | Nivel 1 B | 11.72 |
| 3 | Nivel 3 A | Nivel 1 B | 12.94 |
| 4 | Nivel 4 A | Nivel 1 B | 12.78 |
| 5 | Nivel 1 A | Nivel 2 B | 3.89 |
| 6 | Nivel 2 A | Nivel 2 B | 7.78 |
| 7 | Nivel 3 A | Nivel 2 B | 12.17 |
| 8 | Nivel 4 A | Nivel 2 B | 12.44 |
| 9 | Nivel 1 A | Nivel 3 B | 2.89 |
| 10 | Nivel 2 A | Nivel 3 B | 7.11 |
| 11 | Nivel 3 A | Nivel 3 B | 2.28 |
| 12 | Nivel 4 A | Nivel 3 B | 2.22 |
| 13 | Nivel 1 A | Nivel 4 B | 1.44 |
| 14 | Nivel 2 A | Nivel 4 B | 5.28 |
| 15 | Nivel 3 A | Nivel 4 B | 6.17 |
| 16 | Nivel 4 A | Nivel 4 B | 2.94 |

El ANOVA (Tabla 28) de las lacasas-HPB y el ANOVA (Tabla 30) de las lacasas-HTT para la máxima actividad enzimática, muestra que ningún factor así como las interacciones entre los factores no fueron significativos.

Tabla 28. ANOVA de la determinación de las mejores condiciones de actividad enzimática para la lacasa-HPB

| Análisis de Varianza | | | | | |
|----------------------|-------------------|--------------------|----------------|-------|---------|
| Fuente de variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Cuadrado medio | Fo | F tabla |
| A-Temperatura | 75.423 | 3 | 25.141 | 0.342 | 4.07 |
| B- pH | 142.718 | 3 | 47.572 | 0.648 | 4.07 |
| AB | 23.540 | 1 | 23.540 | 0.321 | 5.32 |
| Error | 586.561 | 8 | 73.320 | | |
| Total | 828.244 | 15 | | | |

$\alpha=0.05$

Tabla 29. Diseño factorial general para la actividad enzimática máxima para la lacasa-HTT

| Corrida | Valores codificados de las variables | | Actividad enzimática (U/mL) |
|---------|--------------------------------------|-----------|-----------------------------|
| | Temperatura (°C) A | pH B | (R) |
| 1 | Nivel 1 A | Nivel 1 B | 10.22 |
| 2 | Nivel 2 A | Nivel 1 B | 14.00 |
| 3 | Nivel 3 A | Nivel 1 B | 5.44 |
| 4 | Nivel 4 A | Nivel 1 B | 1.72 |
| 5 | Nivel 1 A | Nivel 2 B | 5.61 |
| 6 | Nivel 2 A | Nivel 2 B | 11.50 |
| 7 | Nivel 3 A | Nivel 2 B | 2.61 |
| 8 | Nivel 4 A | Nivel 2 B | 1.11 |
| 9 | Nivel 1 A | Nivel 3 B | 8.00 |
| 10 | Nivel 2 A | Nivel 3 B | 15.94 |
| 11 | Nivel 3 A | Nivel 3 B | 7.44 |
| 12 | Nivel 4 A | Nivel 3 B | 2.94 |
| 13 | Nivel 1 A | Nivel 4 B | 5.28 |
| 14 | Nivel 2 A | Nivel 4 B | 9.72 |
| 15 | Nivel 3 A | Nivel 4 B | 3.11 |
| 16 | Nivel 4 A | Nivel 4 B | 2.28 |

Tabla 30. ANOVA de la determinación de las mejores condiciones de actividad enzimática para la lacasa-HTT

| Análisis de Varianza | | | | | |
|----------------------|-------------------|--------------------|----------------|-------|---------|
| Fuente de variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Cuadrado medio | Fo | F tabla |
| A- Temperatura | 254.463 | 3 | 84.821 | 1.241 | 4.07 |
| B-pH | 38.622 | 3 | 12.874 | 0.189 | 4.07 |
| AB | 5.496 | 1 | 5.496 | 0.081 | 5.32 |
| Error | 542.936 | 8 | 67.867 | | |
| Total | 841.519 | 15 | | | |

$\alpha=0.05$

En la Tabla 31 se hace un resumen de las condiciones para los tres tipos de lacasas (lacasa-EC, lacasa-HPB y lacasa-HTT) bajo las cuales la actividad enzimática se vió mayormente favorecida.

Tabla 31. Condiciones experimentales para obtener la máxima actividad enzimática de las lacasas con el sustrato ABTS

| . Enzima | Temperatura (°C) | pH |
|------------|------------------|----|
| Lacasa-EC | 45 | 4 |
| Lacasa-HPB | 45 | 4 |
| Lacasa-HTT | 40 | 5 |

Al hacer un comparativo con los datos obtenidos por lacasas-EC, lacasas-HPB y lacasas-HTT se puede notar que en ninguno de los casos el factor de la temperatura fue significativo, lo que sugiere que las tres lacasas seleccionadas presentan cierta resistencia a los cambios de temperatura y aunque la actividad enzimática pueda verse modificada estadísticamente, no es un factor significativo.

3.6 Degradación del colorante rojo congo y azul índigo con las enzimas libres e inmovilizadas

La cinética de decoloración del colorante rojo congo usando enzimas libres (Figura 31) muestran comportamientos diferentes. Por ejemplo, los porcentajes de decoloración del rojo congo a los 60 minutos fueron 20%, 15% y 11% para la lacasa-HBP, lacasa-EC y lacasa-HTT, respectivamente (Figura 31a). En la Figura 31b se observa también que la lacasa-HPB tuvo una mayor afinidad por el colorante rojo congo al inicio de la reacción, ya que fue la enzima que mostró una mayor degradación. Sin embargo, al prolongarse la cinética (Figura 28b) se observa que la lacasa-EC alcanza el porcentaje de decoloración mayor.

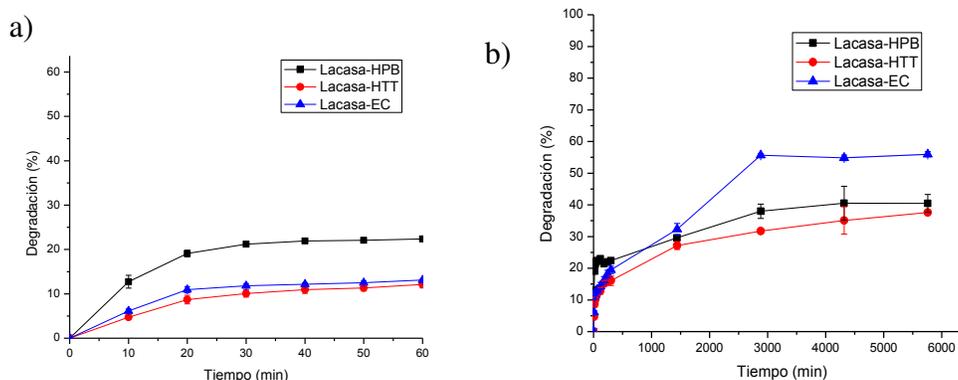


Figura 31. Cinéticas de degradación (a) (b) del colorante rojo congo con las enzimas libres

Los porcentajes de decoloración obtenidos en este estudio son similares a los reportados por Wang y colaboradores (2011), quienes degradaron colorante negro reactivo usando un sistema de lacasas y obteniendo porcentajes de

degradación de 3 a 20 % en 6 h [7]. Hsu y colaboradores (2012) alcanzaron porcentajes de degradación del 97%, 29%, 48% y 22% para los colorantes azul ácido, rojo ácido, azul directo-71 y negro directo-19, respectivamente [30]. Es importante resaltar que dependiendo del colorante es el porcentaje de la degradación obtenida, existen diversos factores que influyen en la decoloración, dentro de los cuales se encuentran la afinidad y carga del colorante con el sustrato, el potencial de óxido-reducción que la enzima posee; todo esto hace que la decoloración se vea más favorecida en unos casos que en otros. La actividad enzimática, obtenida con las lacasas seleccionadas en esta investigación, es ligeramente menor que lo reportado por otros autores; sin embargo, la decoloración de rojo congo es comparable con lo reportado por otros autores, sobre todo en el caso de la enzima comercial utilizada. En el caso de las enzimas del HPB y HTT se observa que presentaron comportamientos de decoloración muy parecidos, lo que se supone que son enzimas del mismo tipo y, por lo tanto, esto se ve reflejado en la actividad enzimática y el porcentaje de decoloración obtenidos.

Para el caso de los sistemas inmovilizados, en la Figura 32 se muestran las cinéticas de decoloración de rojo congo, donde se aprecia que a un tiempo de 60 minutos la degradación alcanzada por la lacasa-EC inmovilizada es de hasta un 90%, mientras que para la lacasa-HBP es de un 60% y un 40% para la lacasa-HTT. Esto muestra que para el caso de las lacasas purificadas, la lacasa-HBP es mejor para la degradación de rojo congo.

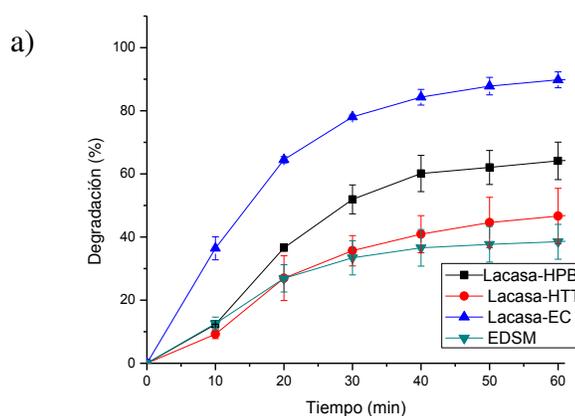


Figura 32. Cinética de decoloración del rojo congo con las enzimas inmovilizadas (lacasa-EC, lacasa-HPB y lacasa-HTT) y el soporte (EDSM)

De la misma forma, la figura 32 claramente muestra la influencia del soporte en el proceso de decoloración, ya que el soporte adsorbe parte del rojo congo. Este proceso de adsorción se favorece porque probablemente el soporte y el colorante rojo congo presentan cierta atracción debida a su carga. Sin embargo, se debe de tomar en cuenta que el soporte llegará a la saturación con el tiempo y, posteriormente, solo se tendrán el efecto de la degradación del colorante por parte de la enzima.

Cabe mencionar que todos los experimentos anteriores se realizaron bajo las mismas condiciones que la medición de actividad enzimática, es decir, se incubaron un minuto a 40 °C y con buffer de acetatos a pH 5 para todas las enzimas. Se realizaron otros experimentos de degradación, pero ahora bajo las condiciones óptimas de temperatura y pH. Los valores resultantes de la decoloración en condiciones óptimas de pH y temperatura se muestran en la Tabla 32, donde se observa el incremento (38-47%) de los porcentajes de

decoloración del colorante rojo congo al hacer la reacción en las mejores condiciones en las que actúa la enzima, sobre todo para las lacasas-HPB y lacasas-HTT.

Tabla 32. Porcentajes de decoloración del colorante rojo congo entre las lacasas seleccionadas bajo diferentes condiciones*

| | Lacasas libres (%) | Lacasas inmovilizadas (%) | Lacasas inmovilizadas condiciones ideales(%) |
|------------|---------------------------|----------------------------------|---|
| Lacasa- EC | 22.3 | 92.2 | 98.2 |
| Lacasa-HPB | 13.2 | 65.9 | 90.3 |
| Lacasa-HTT | 11.5 | 59.2 | 87.2 |

*El aporte del soporte para la decoloración no fue descartado de los porcentajes de decoloración de los sistemas estudiados.

Además, para evaluar si las enzimas inmovilizadas con las que se trabajó eran capaces de degradar otro colorante textil, además del rojo congo, se usó el azul índigo y se evaluó adicionalmente la decoloración de una mezcla de colorantes (rojo congo y azul índigo) a una concentración 2.5 mM. La tabla 33 muestra los resultados de la decoloración del colorante azul índigo que resultaron menores que para el rojo congo. Esto puede deberse a que tanto las enzimas como el soporte en el cual fueron inmovilizadas presentan una mayor afinidad por el colorante rojo congo. Además, al evaluar la mezcla de los colorantes se puede notar un decremento en la decoloración total, esto es probablemente a que las enzimas y el soporte siguen teniendo una mayor preferencia por uno de los colorantes, en este caso por el rojo congo.

Tabla 33. Decoloración en condiciones óptimas para el rojo congo, azul índigo en una mezcla 2.5 mM*

| | Decoloración (%) | | |
|------------|------------------|-------------|----------------------------|
| | Rojo congo | Azul índigo | Rojo congo/ azul índigo |
| Lacasa- EC | 98.2 | 75.2 | 89.2 |
| Lacasa-HPB | 90.3 | 68.2 | 62.1 |
| Lacasa-HTT | 87.2 | 63.4 | 50.3 |

*El aporte del soporte para la decoloración no fue descartado de los porcentajes de decoloración de los sistemas estudiados.

Zhao y colaboradores (2011) reportaron valores de porcentajes de degradación de rojo alizarín de 10% en 7 h con lacasa inmovilizada [60]. Makas y colaboradores (2010) degradaron naranja de metilo con lacasas inmovilizadas y alcanzaron una decoloración del 48% en 6 h [40].

Al comparar los resultados obtenidos en este trabajo con los reportados en la literatura actual se puede comprobar que el grado de degradación obtenido por los tres sistemas estudiados (lacasas HBP, HTT o EC) es superior a lo reportado por los autores mencionados y, además, se alcanza un alto porcentaje de degradación en un tiempo más corto que lo reportado en la literatura. La lacasa comercial inmovilizada alcanzó 95% de degradación en un tiempo de 50 minutos. Por último es importante resaltar que la inmovilización de la enzima aumenta el porcentaje de la degradación del rojo congo (ya que un porcentaje está asociado a la adsorción del colorante en el soporte), alcanza un buen porcentaje de decoloración de azul índigo y de la mezcla de dos colorantes ampliamente utilizados en la industria textil.

4. CONCLUSIONES

En esta investigación se aisló un hongo de pudrición blanca, en el área metropolitana de Monterrey, capaz de producir lacasas que degradan el colorante tipo azo rojo congo y el colorante azul índigo presentes en efluentes acuosos. Además, se obtuvieron las condiciones óptimas de producción de lacasas para el hongo aislado (HPB) y el hongo de referencia (HTT). El crecimiento óptimo del HPB se favorece en medio mineral de salvado de trigo (MM-ST) a 28 °C mientras que para el hongo HTT, el crecimiento se favorece en el mismo medio de cultivo pero a 33 °C. Esto indica que el medio de cultivo MM-ST juega un papel determinante en la estimulación del metabolismo de las cepas de hongos para la producción de enzimas tipo lacasa.

Por otro lado, las condiciones óptimas de degradación del colorante rojo congo usando los extractos crudos del hongo HPB son el medio de cultivo glucosa mineral (GM) a 37 °C, pero para el hongo HTT son en medio de cultivo MM-ST a 33 °C. Estos resultados sugieren que la degradación del rojo congo utilizando el extracto crudo del hongo HPB no está directamente asociado a lacasas, sino que este hongo produce otras enzimas ligninolíticas que participan en la degradación del rojo congo. Por el contrario, la degradación del colorante para con los extractos del hongo HTT si se puede asociar directamente a la

actividad de lacasas; sin embargo, el extracto producido por el HPB presenta actividad enzimática y degradación de rojo congo superiores que los extractos del HTT. Las lacasas separadas de los extractos crudos producidos por las dos cepas seleccionadas (HPB y HTT) tienen un peso molecular de aproximadamente 65 kDa que corresponde a lacasas monoméricas reportadas en la literatura.

Para favorecer la inmovilización de la enzima lacasa comercial (lacasa-EC), en esferas de dióxido de silicio mesoporoso modificado químicamente con grupos aminos (EDSM-A), se requiere entrecruzar el soporte modificado con glutaraldehído al 12%, un tiempo de contacto de 5 h con este agente y un tiempo de inmovilización de 8 h con la lacasa-EC. A estas condiciones se inmovilizaron las lacasas purificadas de los extractos de los hongos HPB y HTT. Las lacasas inmovilizadas en el soporte (lacasa-EC, lacasa-HPB y lacasa-HTT) muestran porcentajes de retención de actividad enzimática entre 46 y 60% después de la inmovilización, aunque estos valores se incrementan del 38 al 47% a las condiciones de máxima actividad (45°C y pH 4 para lacasa-EC y lacasa-HPB; pH 5 y 40°C para lacasa-HTT).

Los porcentajes de la degradación del colorante rojo congo en los sistemas inmovilizados y a las condiciones óptimas de actividad enzimática alcanzan valores del 98.2, 90.3, y 87.2%, mientras que para el azul índigo alcanzan porcentajes de degradación de 75.2, 68.2 y 63.4%, para la lacasa-EC, lacasa-HPB y lacasa-HTT, respectivamente.

En resumen, la inmovilización de lacasas en SiO₂ modificado posibilita la retención de un alto porcentaje de actividad enzimática, lo cual está relacionado

directamente con la decoloración de rojo congo presente en efluentes acuosos, y permitirá su aplicación en sistemas continuos de tratamiento de efluentes contaminados con colorantes tipo azo.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Aleboye, A., N. Daneshvar, and M.B. Kasiri, *Optimization of C.I. Acid Red 14 azo dye removal by electrocoagulation batch process with response surface methodology*. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 2008. **47**(5): p. 827-832.
2. Seredych, M. and T.J. Bandosz, *Removal of Cationic and Ionic Dyes and Industrial Municipal Sludge Based Composite Adsorbents*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2007. **46**(1786-1793).
3. Rajeev, J., M. Bhargava, and N. Sharma, *Electrochemical Studies on a Pharmaceutical Azo Dye: Tartrazine*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2003. **42**: p. 243-247.
4. Gupta, V.K., et al., *Removal and Recovery of the Hazardous Azo Dye Acid Orange 7 through Adsorption over Waste Materials: Bottom Ash and De-Oiled Soya*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2006. **45**: p. 1446-1453.
5. Wong, Y. and J. Yu, *Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes*. Water Research 1999. **33**(16).
6. Saratale, R.G., et al., *Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2011. **42**: p. 138-157.
7. Tian-Nv, W., *Decolorization of the azo dye reactive black 5 using laccase mediator system*. African Journal of Biotechnology, 2011. **10**(75).
8. Hameed, B.H., A.A. Ahmad, and N. Aziz, *Isotherms, kinetics and thermodynamics of acid dye adsorption on activated palm ash*. Chemical Engineering Journal, 2007. **133**(1-3): p. 195-203.
9. Pahalagedara, M.N., et al., *Removal of Azo Dyes: Intercalation into Sonochemically Synthesized NiAl Layered Double Hydroxide*. The Journal of Physical Chemistry C, 2014. **118**(31): p. 17801-17809.
10. Caneiro, P.A., et al., *Evaluation of color removal and degradation of a reactive textile azo dye on nanoporous TiO₂ thin-film electrodes*. Electrochimica Acta, 2004. **49**: p. 3807-3820.
11. Zhang, H., et al., *Energy-Efficient Photodegradation of Azo Dyes with TiO₂ Nanoparticles Based on Photoisomerization and Alternate UV-Visible Light*. Environmental Science & Technology 2010. **44**: p. 1107-1111.
12. Venkata, S., et al., *Treatment of simulated Reactive Yellow 22 (Azo) dye effluents using Spirogyra species*. Waste Management, 2002. **22**: p. 575-582.

13. Chen, K., et al., *Decolorization of azo dye using PVA-immobilized microorganisms*. Journal of Biotechnology, 2003. **101**: p. 241-252.
14. Rodriguez Couto, S., *Dye removal by immobilised fungi*. Biotechnol Adv, 2009. **27**(3): p. 227-35.
15. Lachheb, H., et al., *Photocatalytic degradation of various types of dyes (Alizarin S, Crocein Orange G, Methyl Red, Congo Red, Methylene Blue) in water by UV-irradiated titania*. Applied Catalysis B: Environmental, 2002. **39**: p. 75-90.
16. Garcia-Montano, J., et al., *The testing of several biological and chemical coupled treatments for Cibacron Red FN-R azo dye removal*. J Hazard Mater, 2008. **154**(1-3): p. 484-90.
17. Zhang, R., et al., *Adsorption of Congo red from aqueous solutions using cationic surfactant modified wheat straw in batch mode: Kinetic and equilibrium study*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2014.
18. Wang, C., Y. Le, and B. Cheng, *Fabrication of porous ZrO₂ hollow sphere and its adsorption performance to Congo red in water*. Ceramics International, 2014. **40**: p. 10847-10856.
19. Debnath, S., A. Maity, and K. Pillay, *Impact of process parameters on removal of Congo red by graphene oxide from aqueous solution*. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2014. **2**: p. 260-272.
20. Bhaumik, M., R. McCrindle, and A. Maity, *Efficient removal of Congo red from aqueous solutions by adsorption onto interconnected polypyrrole–polyaniline nanofibres*. Chemical Engineering Journal, 2013. **228**: p. 506-515.
21. Sahu, G., et al., *Optimum Design of Waste Water Treatment Network*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2013. **52**: p. 5161-5171.
22. Barragán, E.B., C. Costa, and M.C. Márquez, *Biodegradation of azo dyes by bacteria inoculated on solid media*. Dyes and Pigments, 2007. **75**: p. 73-81.
23. El-Sheekh, M.M., M.M. Gharieb, and G.W. Abou-El-Souod, *Biodegradation of dyes by some green algae and cyanobacteria*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2009. **63**: p. 699-704.
24. Ayed, L., et al., *Biodegradation and decolorization of triphenylmethane dyes*. Desalination, 2010. **260**: p. 137-146.
25. Campbell, A.S., et al., *Enzyme Catalytic Efficiency: A Function of Bio–Nano Interface Reactions*. Applied Materials & Interfaces, 2014. **6**: p. 5393–5403.
26. Rojas Verde, G., et al., *Decoloración del Azul Brillante de Remazol R (RBBR) en presencia de sulfato de cobre por dos nuevas cepas de Trametes sp.*. Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal, 2010. **1**(2): p. 143-154.
27. Gascón, V., C. Márquez-Álvarez, and R.M. Blanco, *Efficient retention of laccase by non-covalent immobilization on amino-functionalized ordered mesoporous silica*. Applied Catalysis A: General, 2014. **482**: p. 116-126.
28. Campos, R., et al., *Indigo degradation with purified laccases from Trametes hirsuta and Sclerotium rolfsii*. Journal of Biotechnology, 2001. **89**: p. 131-130.
29. Mogharabi, M., et al., *Immobilization of laccase in alginate-gelatin mixed gel and decolorization of synthetic dyes*. Bioinorg Chem Appl, 2012. **2012**: p. 823830.
30. Hsu, C.A., et al., *Biological degradation of anthroquinone and azo dyes by a novel laccase from Lentinus sp.* Environ Sci Technol, 2012. **46**(9): p. 5109-17.
31. Sheldon, R.A., *Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance*. Advanced Synthesis & Catalysis, 2007. **349**(8-9): p. 1289-1307.

32. Liu, Y., et al., *Immobilization of laccase on magnetic bimodal mesoporous carbon and the application in the removal of phenolic compounds*. Bioresour Technol, 2012. **115**: p. 21-6.
33. Xu, R., et al., *Laccase immobilization on chitosan/poly(vinyl alcohol) composite nanofibrous membranes for 2,4-dichlorophenol removal*. Chemical Engineering Journal, 2013. **222**: p. 321-329.
34. Jiang, D.-S., et al., *Immobilization of Pycnoporus sanguineus laccase on magnetic chitosan microspheres*. Biochemical Engineering Journal, 2005. **25**(1): p. 15-23.
35. Spinelli, D., et al., *Immobilization of fungal (Trametes versicolor) laccase onto Amberlite IR-120 H beads: Optimization and characterization*. Process Biochemistry, 2013. **48**(2): p. 218-223.
36. Pang, R., M. Li, and C. Zhang, *Degradation of phenolic compounds by laccase immobilized on carbon nanomaterials: Diffusional limitation investigation*. Talanta, 2015. **131**: p. 38-45.
37. Brandi, P., et al., *In search for practical advantages from the immobilisation of an enzyme: the case of laccase*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2006. **41**(1-2): p. 61-69.
38. Sheldon, R.A. and S. van Pelt, *Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how*. Chem Soc Rev, 2013. **42**(15): p. 6223-35.
39. Fernandez-Fernandez, M., M.A. Sanroman, and D. Moldes, *Recent developments and applications of immobilized laccase*. Biotechnol Adv, 2013. **31**(8): p. 1808-25.
40. Makas, Y.G., et al., *Immobilization of laccase in kappa-carrageenan based semi-interpenetrating polymer networks*. J Biotechnol, 2010. **148**(4): p. 216-20.
41. Qiu, L. and Z. Huang, *The treatment of chlorophenols with laccase immobilized on sol-gel-derived silica*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009. **26**(5): p. 775-781.
42. Sheldon, R.A., *Cross-Linked Enzyme Aggregates as Industrial Biocatalysts*. Organic Process Research & Development, 2011. **15**: p. 213-223.
43. Ba, S., et al., *Synthesis and characterization of combined cross-linked laccase and tyrosinase aggregates transforming acetaminophen as a model phenolic compound in wastewaters*. Sci Total Environ, 2014. **487**: p. 748-55.
44. Sadighi, A. and M.A. Faramarzi, *Congo red decolorization by immobilized laccase through chitosan nanoparticles on the glass beads*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2013. **44**(2): p. 156-162.
45. Daâssi, D., et al., *Biodegradation of textile dyes by immobilized laccase from Coriolopsis gallica into Ca-alginate beads*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2014. **90**: p. 71-78.
46. Tran, D.N. and K.J. Balkus, *Perspective of Recent Progress in Immobilization of Enzymes*. ACS Catalysis, 2011. **1**(8): p. 956-968.
47. Chen, B., et al., *Using silk woven fabric as support for lipase immobilization: The effect of surface hydrophilicity/hydrophobicity on enzymatic activity and stability*. Biomass and Bioenergy, 2012. **39**: p. 59-66.
48. Salis, A., et al., *Laccase from Pleurotus sajor-caju on functionalised SBA-15 mesoporous silica: Immobilisation and use for the oxidation of phenolic compounds*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2009. **58**(1-4): p. 175-180.

49. Cristóvão, R.O., et al., *Immobilization of commercial laccase onto green coconut fiber by adsorption and its application for reactive textile dyes degradation*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2011. **72**(1-2): p. 6-12.
50. Zhu, Y., et al., *Immobilization of Trametes Versicolor Laccase on Magnetically Separable Mesoporous Silica Spheres*. Chemical Materials, 2007. **19**: p. 6408-6413.
51. Shi, L., et al., *Removal of sulfonamide antibiotics by oriented immobilized laccase on FeO nanoparticles with natural mediators*. J Hazard Mater, 2014. **279C**: p. 203-211.
52. Sathishkumar, P., et al., *Laccase immobilization on cellulose nanofiber: The catalytic efficiency and recyclic application for simulated dye effluent treatment*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2014. **100**: p. 111-120.
53. Wang, F., et al., *Magnetic mesoporous silica nanoparticles: fabrication and their laccase immobilization performance*. Bioresour Technol, 2010. **101**(23): p. 8931-5.
54. Fernando Bautista, L., G. Morales, and R. Sanz, *Immobilization strategies for laccase from Trametes versicolor on mesostructured silica materials and the application to the degradation of naphthalene*. Bioresour Technol, 2010. **101**(22): p. 8541-8.
55. Tripathi, P., et al., *Immobilization of α -amylase from mung beans (*Vigna radiata*) on Amberlite MB 150 and chitosan beads: A comparative study*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2007. **49**(1-4): p. 69-74.
56. Wang, Y., et al., *Immobilization of laccase by Cu²⁺ chelate affinity interaction on surface modified magnetic silica particles and its use for the removal of pentachlorophenol*. Chinese Chemical Letters, 2012. **23**(2): p. 197-200.
57. Plagemann, R., L. Jonas, and U. Kragl, *Ceramic honeycomb as support for covalent immobilization of laccase from Trametes versicolor and transformation of nuclear fast red*. Appl Microbiol Biotechnol, 2011. **90**(1): p. 313-20.
58. Zheng, X., et al., *Biomimetic Synthesis of Magnetic Composite Particles for Laccase Immobilization*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2012. **51**(30): p. 10140-10146.
59. Hublik, G. and F. Schinner, *Characterization and immobilization of the laccase from Pleurotus ostreatus and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants*. Enzyme and Microbial Technology, 2000. **27**: p. 330-336.
60. Zhao, M., et al., *Properties of Immobilized Laccase on Mesostructured Cellular Foam Silica and its Use in Dye Decolorization*. Journal of Macromolecular Science, Part A, 2011. **48**(6): p. 447-453.
61. Minussi, R.C., et al., *Purification, characterization and application of laccase from Trametes versicolor for colour and phenolic removal of olive mill wastewater in presence of 1-hydroxybenzotriazole*. African Journal of Biotechnology, 2007. **6**(10): p. 1248-1254.
62. Prinz, A., et al., *Separation and purification of laccases from two different fungi using aqueous two-phase extraction*. Process Biochemistry, 2014. **49**(2): p. 335-346.
63. Linke, D., et al., *Laccases of Pleurotus sapidus: Characterization and Cloning*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**: p. 9498-9505.

64. Jung, H., F. Xu, and K. Li, *Purification and characterization of laccase from wood-degrading fungus Trichophyton rubrum LKY-7*. Enzyme and Microbial Technology, 2002. **30**: p. 161-168.
65. Shi, L., et al., *Biochemical and molecular characterization of a novel laccase from selective lignin-degrading white-rot fungus Echinodontium taxodii 2538*. Process Biochemistry 2014. **49**: p. 1097-1106.
66. Wang, B., et al., *Purification and characterization of a laccase from Coprinopsis cinerea in Pichia pastoris*. World J Microbiol Biotechnol, 2014. **30**(4): p. 1199-206.
67. Bryjak, J. and A. Rekc, *Effective purification of Cerrena unicolor laccase using microfiltration, ultrafiltration and acetone precipitation*. Appl Biochem Biotechnol, 2010. **160**(8): p. 2219-35.
68. Irshad, M., et al., *Purification and characterization of laccase produced by Schizophyllum commune ibl-06 in solid state culture of banana stalks*. Bioresources, 2011. **6**(3): p. 2861-2873.
69. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**: p. 680-685.
70. Montgomery, D.C., *Una observación por celda*, in *Diseño y Análisis de Experimentos*, L. Wiley, Editor 2004: Arizona. p. 191-194.
71. Zhuo, R., et al., *Decolorization of different dyes by a newly isolated white-rot fungi strain Ganoderma sp.En3 and cloning and functional analysis of its laccase gene*. Journal of Hazardous Materials, 2011. **192**: p. 855-873.
72. Que, Y., et al., *High-level coproduction, purification and characterisation of laccase and exopolysaccharides by Coriolus versicolor*. Food Chem, 2014. **159**: p. 208-13.

ANEXO I

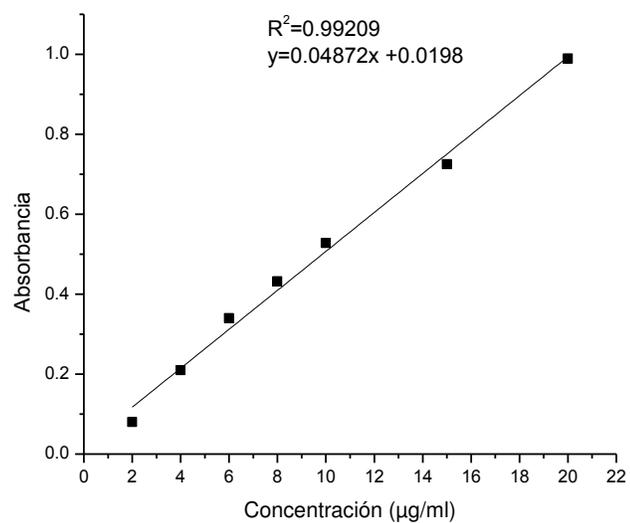


Figura A1. Curva de calibración para determinación de proteína por el método de Bradford usando como estándar albúmina sérica bovina.

ANEXO II

Acrónimos del diseño factorial central compuesto

Tabla A1. Acrónimos del diseño factorial central compuesto para el hongo seleccionado (HPB)

| | Temperatura (°C) | Medio de cultivo |
|--------|------------------|------------------|
| H1T1M1 | 28 | GM |
| H1T2M1 | 37 | GM |
| H1T1M2 | 28 | MM-ST2 |
| H1T2M2 | 37 | MM-ST2 |
| H1T1M0 | 28 | 5GM-ST1 |
| H1T2M0 | 37 | 5GM-ST1 |
| H1T0M1 | 33 | GM |
| H1T0M2 | 33 | MM-ST2 |
| H1T0M0 | 33 | 5GM-ST1 |

Tabla A2. Acrónimos del diseño factorial central compuesto para el hongo de referencia (HTT)

| | Temperatura (°C) | Medio de cultivo |
|--------|------------------|------------------|
| H2T1M1 | 28 | GM |
| H2T2M1 | 37 | GM |
| H2T1M2 | 28 | MM-ST2 |
| H2T2M2 | 37 | MM-ST2 |
| H2T1M0 | 28 | 5GM-ST1 |
| H2T2M0 | 37 | 5GM-ST1 |
| H2T0M1 | 33 | GM |
| H2T0M2 | 33 | MM-ST2 |
| H2T0M0 | 33 | 5GM-ST1 |

ANEXO III

Geles de poliacrilamida con los pasos de la purificación

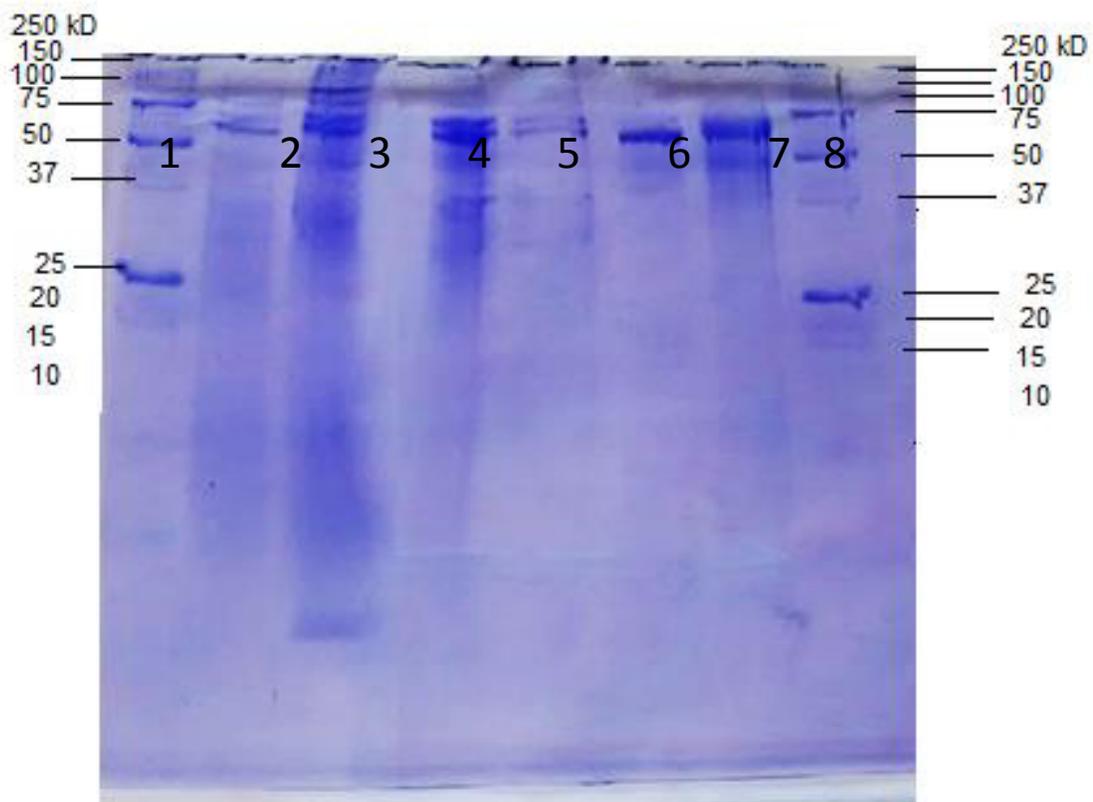


Figura A2. Gel de poliacrilamida con las etapas de purificación para el hongo seleccionado (HPB) 1) y 8) marcadores de peso molecular, 2) Filtrado, 3) Ultrafiltrado 10 kDa, 5) Precipitado con sulfato de amonio, 6) Cromatografía de exclusión, y 7) Enzima comercial.

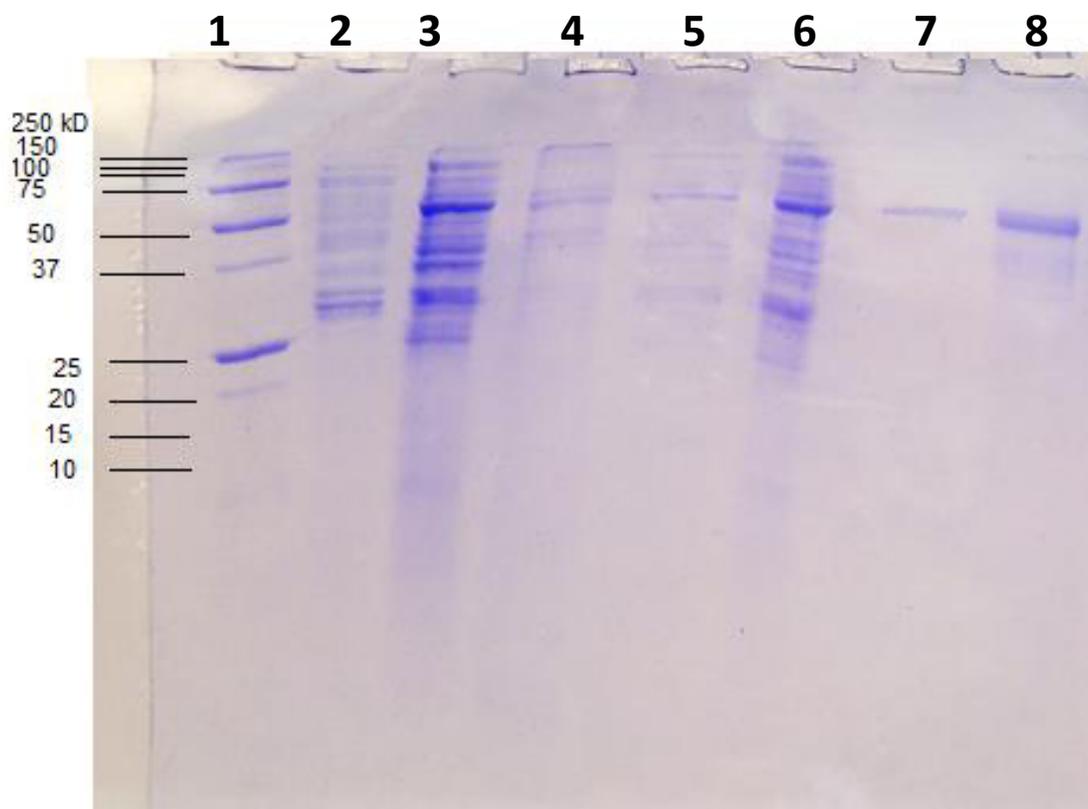


Figura A3. Gel de poliacrilamida con las etapas de purificación para el hongo de referencia (HTT) 1) y 7) marcadores de peso molecular, 2) Filtrado, 3) Ultrafiltrado 10 kDa, 5) Precipitado con sulfato de amonio, 6) Ultrafiltrado, 7) Cromatografía de exclusión, y 8) Enzima comercial

ANEXO IV

Sistema de Microanálisis de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS o EDX)

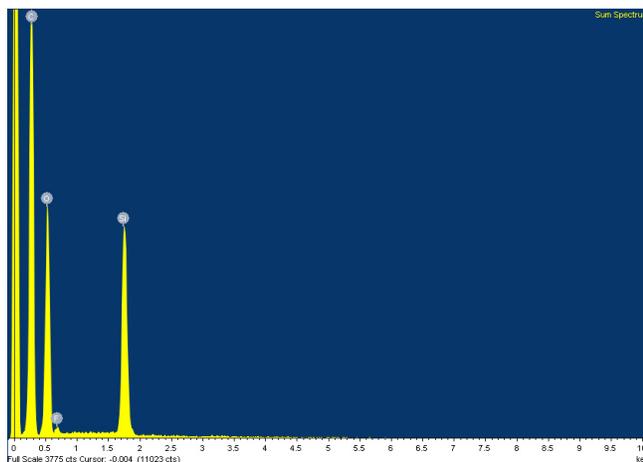


Figura A4. EDS para el SiO₂