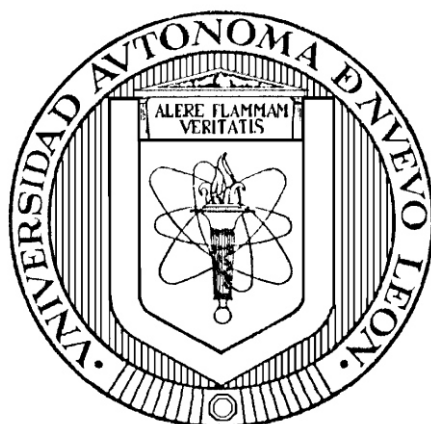


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**TESIS**

**PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS EN UN REACTOR AIRLIFT Y  
EVALUACIÓN DE SU USO EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS AZULES**

**POR**

**MARINA MONTSERRAT ATILANO CAMINO**

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

**DICIEMBRE, 2017**

**PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS EN UN REACTOR AIRLIFT Y  
EVALUACIÓN DE SU USO EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS AZULES**

**AUTORIZACIÓN DE TESIS**

---

DR. REFUGIO BERNARDO GARCÍA REYES  
**PRESIDENTE**

---

DR. CARLOS ESCAMILLA ALVARADO  
**SECRETARIO**

---

DR. LUIS HUMBERTO ÁLVAREZ VALENCIA  
**VOCAL**

---

DRA. MA. ARACELY HERNÁNDEZ RAMÍREZ  
**SUB-DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS EN UN REACTOR AIRLIFT Y  
EVALUACIÓN DE SU USO EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS AZULES**

---

**DR. REFUGIO BERNARDO GARCÍA REYES  
ASESOR**

---

**DRA. ALCIONE GARCÍA GONZÁLEZ  
CO-ASESOR**

---

**DR. FELIPE DE JESÚS CERINO CÓRDOVA  
REVISOR**

---

**DR. LUIS HUMBERTO ÁLVAREZ VALENCIA  
REVISOR**

---

**DR. CARLOS ESCAMILLA ALVARADO  
REVISOR**

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Dios por estar conmigo en esta y en todas las etapas de mi vida.

A la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León por todas las facilidades brindadas para concluir satisfactoriamente este proyecto.

A CONACYT por la beca otorgada para la realización de este estudio.

A OMA (Organización Mexicana de Aeropuertos) Grupo Aeroportuario Centro Norte por la disponibilidad prestada en obtener las aguas azules que fueron parte clave en el proyecto.

A The University of Texas at Austin por las facilidades otorgadas durante la realización de la estancia de investigación, en especial a la Dra. Kerry A. Kinney por la hospitalidad y el apoyo durante mi estancia.

A mis asesores, el Dr. Bernardo García Reyes y la Dra. Alcione García Reyes, por todo el tiempo prestado en transmitir sus conocimientos y confiar en mí en el transcurso de todo el proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, Ale, Jair, Rosario, Axel, Manuel, John, Daniel, Mariana, Paulina, Nelly, Lizbeth y Jonathan, que día con día, en diferentes etapas del proceso fueron un apoyo enorme para terminar satisfactoriamente este proyecto.

## DEDICATORIA

A Dios porque ser la luz y la guía de mi camino en todo momento.

A mi esposo, José, que siempre ha creído en mí y me ha dado el soporte y apoyo para cumplir mis sueños y metas, te amo con el alma.

A mi bebé que está por llegar a nuestras vidas, y que pronto formará parte de todos los sueños que nos falta por cumplir.

A mis padres, Marina y Jorge, por apoyarme en todos los sentidos y maneras posibles, por enseñarme que la perseverancia se trabaja a diario.

A la memoria de mis abuelos, Marina y Alberto, que siempre serán la más grande bendición en mi vida, los extraño.

A mis hermanos, Luis David y Paola, por su apoyo y cariño siempre. Los quiero mucho.

A mis asesores, Dr. Bernardo García y Dra. Alcione García, por guiarme y enseñarme tanto en todo el proyecto.

A mis amigos, Mara, Lupita, Karina, Dari, Manuel, Viri, Jessi e Ilse que estuvieron conmigo para alentarme y aconsejarme siempre.

# RESUMEN

Marina Montserrat Atilano Camino  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Ciencias Químicas

Diciembre, 2017

Título del estudio:

**PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS EN UN REACTOR AIRLIFT Y EVALUACIÓN DE SU USO EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS AZULES**

Número de páginas: 100

Candidato para el grado de Maestría en  
Ciencias con Orientación en Procesos  
Sustentables

Área de estudio: Procesos sustentables

**Propósito y Método de Estudio:** Las aguas residuales generadas en los aviones, trenes o barcos son conocidas como aguas azules y están conformadas por compuestos químicos que inhiben el crecimiento y la actividad de microorganismos patógenos. Estas características hacen de las aguas azules un efluente de difícil tratamiento en un proceso convencional por lodos activados. Actualmente, no existen suficientes alternativas de tratamiento para este tipo de efluentes acuosos. Sin embargo, para la remoción de compuestos recalcitrantes presentes en aguas azules pueden utilizarse lacasas, enzimas involucradas en la degradación de la lignina. Los objetivos de esta investigación fueron encontrar las mejores condiciones para la producción de lacasas por *Trametes versicolor*, mediante un diseño central compuesto (CCD), en sistemas en lote con agitación orbital, replicar dichas condiciones en un reactor *airlift*, y evaluar las propiedades oxidativas del extracto enzimático en la degradación de un efluente real de aguas azules.

**Contribuciones y Conclusiones:** En este estudio se encontraron las mejores condiciones de temperatura (30 °C), concentración (5 g/L) y tipo de cosustrato (ST) en la producción de lacasas de la cepa *Trametes versicolor*. El salvado de trigo fue la mejor opción de cosustrato para incrementar la producción de enzimas tipo lacasa, con 200 U/mL en 11 días aproximadamente. Se utilizaron las mejores condiciones para un cultivo sumergido en un reactor tipo *airlift* y se alcanzó una actividad enzimática máxima de 1200 U/mL en nueve días. Con dicho extracto, se realizaron pruebas de degradación de un efluente real de aguas azules en sistemas en lote, y se obtuvo un porcentaje máximo de 43 % de remoción en la DQO empleando 300 U/mL a una dilución de 1:2 del efluente. Mientras que la degradación en el reactor *airlift* a condiciones similares alcanzó un aumento del índice de biodegradabilidad (IB) de 0.64 a 1.36. En resumen, el pretratamiento enzimático es una estrategia viable para mejorar el IB de efluentes acuosos de naturaleza recalcitrante.

Firma del asesor: \_\_\_\_\_

Dr. Refugio Bernardo García Reyes

# CONTENIDO

AUTORIZACIÓN DE TESIS .....	II
AGRADECIMIENTOS.....	IV
DEDICATORIA.....	V
ÍNDICE DE TABLAS .....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XII
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>6</b>
2.1. La lignina.....	6
2.2. Biodegradación de la lignina por hongos.....	10
2.3. Enzimas ligninolíticas.....	12
2.3.1. Peroxidasas.....	14
2.3.2. Lacasas.....	18
2.3.2.1. Los sustratos de las lacasas .....	20
2.3.2.2. Mecanismo de oxidación.....	21
2.3.2.3. Efecto de los mediadores redox.....	22
2.3.2.4. Fuentes de lacasas.....	24
2.3.3. Optimización de la producción de lacasas .....	26
2.3.3.1. Fuente de carbono .....	27

2.3.3.2.	Fuente de nitrógeno.....	28
2.3.3.3.	Papel del cobre en la fermentación .....	28
2.3.3.4.	Uso de inductores en la fermentación .....	29
2.3.3.5.	Parámetros ambientales .....	29
2.4.	Tipo de fermentación .....	30
2.4.1.	Fermentación sumergida .....	30
2.4.2.	Fermentación en estado sólido .....	31
2.4.3.	Fermentación en estado semi-sólido .....	32
2.4.4.	Uso de residuos lignocelulósicos en la fermentación .....	32
2.5.	Uso de enzimas en el tratamiento de aguas .....	33
2.6.	Aguas azules .....	35
2.7.	Motivación de este proyecto .....	37
2.8.	Hipótesis.....	38
2.9.	Objetivos .....	38
2.9.1.	Objetivo general.....	38
2.9.2.	Objetivos específicos.....	38
<b>3.</b>	<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>41</b>
3.1.	Activación de cepa fúngica.....	41
3.2.	Ensayo de actividad ligninolítica mediante reacción Bavendam .....	41
3.3.	Ensayo de actividad ligninolítica mediante la oxidación ABTS.....	42

3.4. Determinación de las condiciones óptimas para la producción de lacasas en fermentación sumergida.....	42
3.5. Condiciones de cultivo iniciales de la fermentación sumergida .....	44
3.5.1.    Ensayo enzimático para lacasas .....	45
3.5.2.    Determinación de proteína .....	46
3.5.3.    Determinación de azúcares reductores .....	47
3.5.4.    Determinación de peso seco .....	48
3.6. Producción de lacasas en reactor <i>airlift</i> .....	49
3.7. Caracterización fisicoquímica del agua azul.....	50
3.8. Tratamiento enzimático de aguas azules en reactor <i>airlift</i> .....	51
3.9. Disposición de los residuos generados .....	51
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
4.1. Actividad ligninolítica de <i>Trametes versicolor</i> .....	53
4.2. Condiciones de cultivo iniciales de la fermentación sumergida .....	56
4.2.1.    Cinéticas de actividad de lacasas .....	56
4.2.2.    Efecto en la producción de biomasa .....	63
4.3. Análisis estadístico .....	64
4.3.1.    Desarrollo de los modelos.....	64
4.3.2.    Efecto de la temperatura y la concentración de residuo .....	68
4.4. Producción de lacasas por <i>Trametes versicolor</i> en reactor <i>airlift</i> .....	75
4.4.1.    Formación de compuestos fenólicos en la producción de lacasas .....	81

4.5. Caracterización del efluente de las aguas azules .....	82
4.6. Pruebas preliminares de la degradación de un efluente real de aguas azules .....	83
4.6.1. Análisis estadístico .....	84
4.7. Degradación de las aguas azules en reactor tipo airlift .....	89
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>92</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>95</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Contenido de celulosa, lignina y hemicelulosa en algunas especies de madera, residuos agrícolas y desechos (actualizada de [14]).	7
<b>Tabla 2.</b> Principales filos de hongos degradadores de madera y sus propiedades [20]	11
<b>Tabla 3.</b> Algunas propiedades de las enzimas ligninolíticas [14,30].	13
<b>Tabla 4.</b> Producción de lacasas por diferentes hongos en biorreactores a escala de laboratorio. .	25
<b>Tabla 5.</b> Factores y niveles a evaluar en el CCD 2 <sup>2</sup> .	43
<b>Tabla 6.</b> Composición del medio basal de Kirk modificado.	45
<b>Tabla 7.</b> Diseño de experimentos de CCD 2 <sup>2</sup> y resultados correspondientes (actividad enzimática).	65
<b>Tabla 8.</b> ANOVA de la actividad enzimática empleando salvado de trigo como cosustrato.	66
<b>Tabla 9.</b> ANOVA de la actividad enzimática empleando fibra de cáscara de coco como cosustrato.	66
<b>Tabla 10.</b> ANOVA de la actividad enzimática empleando bagazo de agave como cosustrato.	67
<b>Tabla 11.</b> Condiciones óptimas y valores de deseabilidad.	73
<b>Tabla 12.</b> Resultados de caracterización fisicoquímica del efluente de aguas azules.	83
<b>Tabla 13.</b> Diseño de Experimentos 2 <sup>2</sup> y resultados de la remoción de DQO de las aguas azules.	85
<b>Tabla 14.</b> ANOVA de la remoción de DQO de las aguas azules.	86

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> (a) Monómeros constituyentes de la lignina: p- alcohol cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico; (b) estructura ilustrativa de los principales enlaces en la lignina, un biopolímero de 3 dimensiones altamente entrecruzado [16].....	9
<b>Figura 2.</b> Ciclo catalítico de la lignina peroxidasa (AV: alcohol veratrílico) [40] .....	17
<b>Figura 3.</b> Ciclo catalítico de la manganeso peroxidasa [41] .....	18
<b>Figura 4.</b> Ciclo catalítico de la lacasa [40] .....	22
<b>Figura 5.</b> Configuración del reactor airlift utilizado .....	50
<b>Figura 6.</b> Crecimiento en placa de <i>Trametes versicolor</i> en medio extracto de malta (a) y extracto de malta adicionado con ácido tánico 0.01% (b) .....	54
<b>Figura 7.</b> Crecimiento en placa de <i>Trametes versicolor</i> en PDA adicionado con ABTS.....	55
<b>Figura 8.</b> Producción enzimática de la cepa <i>Trametes versicolor</i> bajo diferentes concentraciones (3, 4 y 5 g/L) de salvado de trigo a 25 °C (a), 30 °C (b) y 35 °C (c) .....	59
<b>Figura 9.</b> Producción enzimática de la cepa <i>Trametes versicolor</i> bajo diferentes concentraciones (3, 4 y 5 g/L) de fibra de cáscara de coco a 25 °C (a), 30 °C (b) y 35 °C (c) .....	61
<b>Figura 10.</b> Producción enzimática de la cepa <i>Trametes versicolor</i> bajo diferentes concentraciones (3, 4 y 5 g/L) de bagazo de agave a 25 °C (a), 30 °C (b) y 35 °C (c) .....	62
<b>Figura 11.</b> Peso seco obtenido de la cepa <i>Trametes versicolor</i> utilizando los diferentes residuos lignocelulósicos a 25, 30 y 35°C .....	64
<b>Figura 12.</b> Gráfico de superficie de respuesta y contorno de la interacción entre la temperatura y la concentración de salvado de trigo en la actividad enzimática.....	69
<b>Figura 13.</b> Gráfico de superficie de respuesta y contorno de la interacción entre la temperatura y la concentración de fibras de cáscara de coco en la actividad enzimática.....	70

<b>Figura 14.</b> Gráfico de superficie de respuesta y contorno de la interacción entre la temperatura y la concentración de bagazo de agave en la actividad enzimática .....	71
<b>Figura 15.</b> Gráfico de superficie de respuesta de la función de deseabilidad usando como cosustrato el salvado de trigo .....	74
<b>Figura 16.</b> Gráfico de superficie de respuesta de la función de deseabilidad usando como cosustrato las fibras de cáscara de coco .....	74
<b>Figura 17.</b> Gráfico de superficie de respuesta de la función de deseabilidad usando como cosustrato el bagazo de agave .....	75
<b>Figura 18.</b> Perfil de diferentes parámetros en la producción de lacasas por <i>Trametes versicolor</i> en el reactor airlift a 30°C .....	79
<b>Figura 19.</b> Perfil de diferentes parámetros en la producción de lacasas por <i>Trametes versicolor</i> en el reactor airlift a 35°C .....	80
<b>Figura 20.</b> Perfil de la actividad enzimática y la concentración de compuestos fenólicos en la producción de lacasas por <i>Trametes versicolor</i> en el reactor airlift a 30°C.....	82
<b>Figura 21.</b> Porcentaje de remoción de DQO en efluente real de aguas azules. ....	84
<b>Figura 22.</b> Gráfico de superficie de respuesta y contorno de la interacción entre la actividad enzimática y el factor de dilución. ....	87
<b>Figura 23.</b> Gráfico de superficie de respuesta de la función de deseabilidad con relación a la actividad enzimática y el factor de dilución.....	88
<b>Figura 24.</b> Cinética de degradación de DQO y DBO de un efluente de aguas azules en el reactor airlift y perfil de índice de biodegradabilidad. ....	90



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

# CAPÍTULO 1

## **LAS AGUAS AZULES COMO RETO EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES**

## 1. INTRODUCCIÓN

Las aguas residuales generadas en transportes públicos como aviones, camiones, trenes y vehículos marinos, son conocidas como aguas azules debido a la presencia de productos químicos como colorantes azules, aldehídos, glioxales, glutaraldehídos, fenoles y glicoles, entre otros. La finalidad de agregar estos químicos es sanitizar, aromatizar y descomponer los residuos sólidos en tanques de retención [1]. Las aguas azules se caracterizan por tener una demanda química de oxígeno elevada, asociada a los compuestos químicos presentes en el producto, materia orgánica biodegradable y papel de baño (residuo celulósico). Los compuestos químicos pueden inhibir el crecimiento y la actividad de los microorganismos, usados comúnmente en un tratamiento biológico, dificultando el tratamiento de las aguas azules. La descarga de estos efluentes sin ningún tratamiento en el ambiente, o bien sin cumplir los estándares para su descarga, no solo contamina el ambiente y deteriora la calidad del agua, sino también es una causa de propagación de enfermedades infecciosas [2]. En 1960, la Organización Mundial de la Salud (OMS) a través de la Guía de Salud en la Aviación (*Aviation Health Guide*), publicó algunas recomendaciones para que las aerolíneas traten previamente sus aguas residuales, usando agentes sépticos y evalúen regularmente la eficiencia de éstos a través de exámenes bacteriológicos [3]. Del mismo modo, en el Artículo 14 de las Regulaciones Internacionales Sanitarias, se establece que cada aeropuerto debe tener un sistema efectivo para remover y asegurar

la disposición de los desechos líquidos de los aviones, y que deben ser descargados solo después de someterse a procesos de tratamiento efectivos [4]. Actualmente, no existen suficientes alternativas de tratamiento para este tipo de efluentes acuosos.

La normatividad cada vez más estricta con respecto a la contaminación y protección ambiental ha forzado a los investigadores a buscar una nueva generación de tratamientos más limpios, para maximizar la productividad y simultáneamente minimizar la contaminación. Una alternativa es el uso de enzimas específicas, diferente al uso convencional de la industria, que pueden reducir significativamente la contaminación de una manera sustentable. Existe un creciente reconocimiento sobre el uso de las enzimas para muchos procesos de remediación, enfocados para el tratamiento de compuestos recalcitrantes, debido a sus numerosas ventajas, tales como: la elevada eficiencia catalítica, alta especificidad al sustrato, tiempo corto de reacción, bajo costo energético, condiciones amigables de reacción y ausencia de toxicidad [5]. Muchas enzimas poseen un gran potencial para degradar contaminantes de sus fuentes originales, es decir, que pueden ser aplicadas directamente a efluentes reales y degradarlos satisfactoriamente. Por lo anterior, las enzimas son usadas como agentes catalíticos “verdes” con aplicaciones industriales variadas [6]. Por este motivo, los avances biotecnológicos recientes han permitido la producción más rápida y barata de enzimas, a través de procesos de aislamiento y purificación, así como la producción en biorreactores a una mayor escala [7].

Los reactores *airlift* han sido empleados para la producción a gran escala de enzimas ya que presentan ventajas sobre otros reactores con agitación mecánica. . Los reactores

*airlift* mejoran la transferencia de masa, reducen el esfuerzo cortante sobre los microorganismos, minimizan la contaminación microbiana y bajan el consumo de energía [8]. Este tipo de reactores han sido usados ampliamente en procesos industriales para la producción de antibióticos, aminoácidos, enzimas, vitaminas y ácidos orgánicos.

En este trabajo se evaluó la producción de enzimas ligninolíticas con un hongo de pudrición blanca en reactores en lote en medio sumergido y con agitación orbital y, posteriormente, en un reactor *airlift* a las mejores condiciones obtenidas para determinar la factibilidad técnica del uso de estas enzimas en el tratamiento de aguas residuales azules generadas en los aeropuertos. La finalidad del presente estudio fue aportar una estrategia más verde y sustentable de tratamiento para este tipo de efluentes, aumentando la biodegradabilidad, para su posterior tratamiento mediante un proceso biológico convencional de lodos activados.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

# CAPÍTULO 2

## ANTECEDENTES

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. La lignina

Los residuos lignocelulósicos provenientes de la madera y la agricultura son prácticamente inagotables, debido a que su producción se basa en los procesos fotosintéticos. Este tipo de residuos se encuentran en gran abundancia en la biósfera, ya que representan el 50% del total de la biomasa presente en el planeta ( $10\text{-}50 \times 10^9$  toneladas) [9].

La lignina es el biopolímero más complejo y uno de los más abundantes en el planeta, ya que está presente en las paredes celulares de las plantas. La lignina forma una matriz estrecha que rodea los carbohidratos, y está estrechamente asociada con la celulosa, la hemicelulosa y la pectina, conformando una estructura intrincada. La lignina provee diversas ventajas a las paredes celulares de las plantas, como la resistencia mecánica que ayuda a soportar las grandes estructuras de plantas, protección contra las infecciones microbianas, ya que es difícil de degradar, impermeabilidad y estabilidad contra ataques mecánicos y químicos [10]. La cantidad de lignina, celulosa y hemicelulosa varía según la especie (Tabla 1).

Gracias a los estudios de Ludwig [11] y Nimz [12] se representó la estructura de la lignina, donde se observó la conformación de una red polimérica tridimensional, altamente reticulada, y que es resultado de la copolimerización de tres diferentes monómeros derivados del fenol: alcohol cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol

sinapílico (Figura 1). La reacción de estos tres monómeros, conduce a la creación de una amplia variedad de enlaces, de los más comunes se encuentran:  $\beta$ -O-4, 5-5, 4-O-5,  $\beta$ -1 y  $\beta$ - $\beta$ . Este número de enlaces presentes, y la alta densidad de reticulación, hacen de la lignina un compuesto extremadamente recalcitrante a la degradación [13].

**Tabla 1.** Contenido de celulosa, lignina y hemicelulosa en algunas especies de madera, residuos agrícolas y desechos (actualizada de [14]).

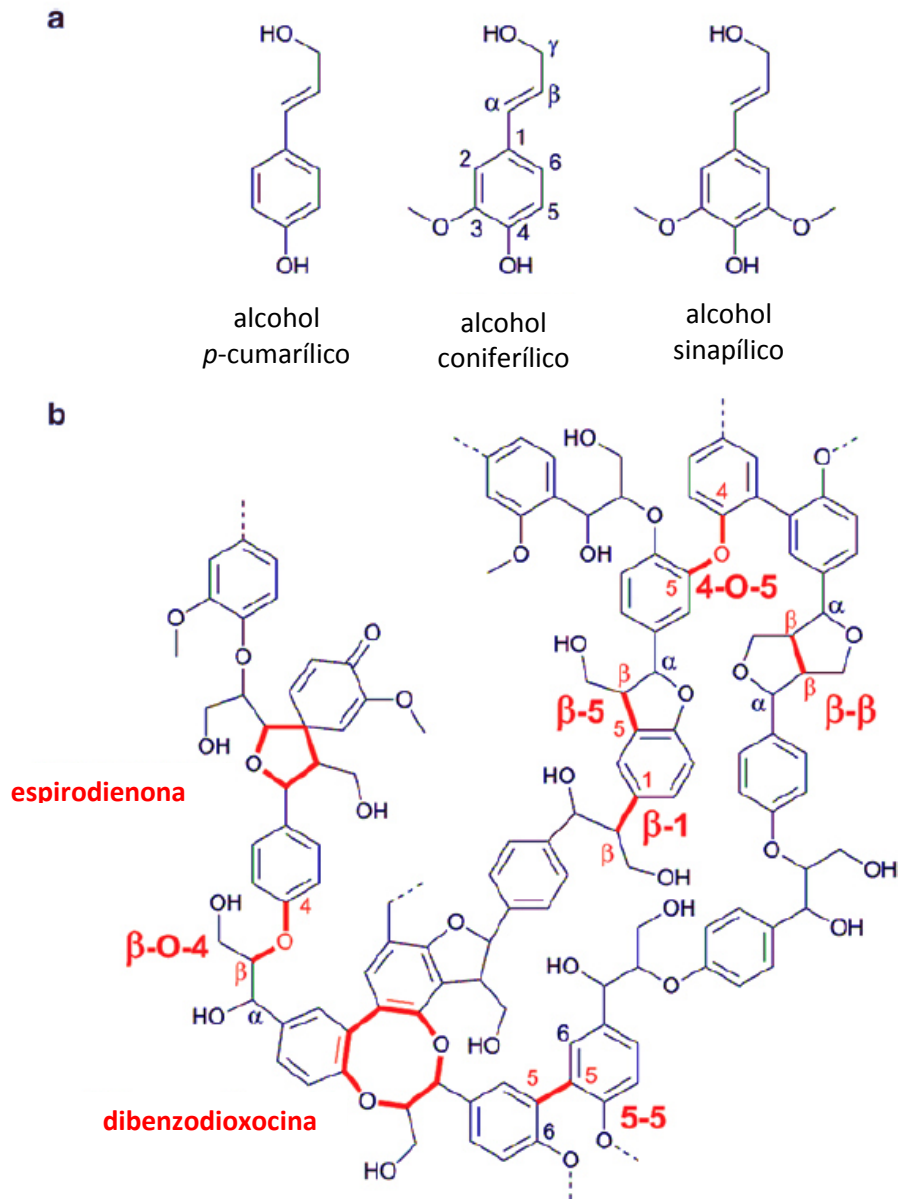
Material lignocelulósico	Peso seco (%)		
	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
<b><i>Tallos de madera dura</i></b>			
Álamo temblón	50	28	15
Haya	47	20	23
Abedul	41	26	25
Roble	48	18	28
Álamo	45	19	20
Arce rojo	39	33	23
<b><i>Tallos de madera blanda</i></b>			
Abeto douglas	57	8	24
Pino Jack	41	10	27
Pino blanco	44	11	28
Abeto rojo	43	12	27
Abeto blanco	44	10	27
<b><i>Residuos agrícolas</i></b>			
Bagazo de caña	33	30	29
Bagazo de agave	74	ND	17-21
Paja de cebada	40	20	15

*Continuación tabla...*

Material lignocelulósico	Peso seco (%)		
	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
Salvado de trigo	10.5	ND	4.4-11.4
Tallos de algodón	42	12	15
Mazorca de maíz	42	39	14
Cáscaras de maní	38	36	16
Paja de avena	41	16	11
Paja de arroz	32	24	13
Paja de trigo	37	30	19
Fibras de cáscara de coco	44	0.25	46
Fibras de semilla de algodón	30-95	5-20	0
<b>Otros</b>			
Hierbas	25-40	35-50	10-30
Papel	85-99	0	0-15
Basura ordenada	60	20	20
Hojas	15-20	80-85	0
Periódico	40-55	25-40	18-30
Papeles de desecho de pastas químicas	60-70	10-20	5-10
Sólidos residuales primarios	8-15	ND	24-29
Desperdicios porcinos	6	28	ND
Estiércol sólido de ganado	1.6-4.7	1.4-3.3	2.7-5.7
Hierba de costera bermudas	25	35.7	6.4

ND: no determinada

En la naturaleza, diversos organismos degradan de manera natural la lignina por diferentes rutas metabólicas, involucrando enzimas en el proceso. Los hongos son los organismos más estudiados en la degradación de la lignina [15].



**Figura 1.** (a) Monómeros constituyentes de la lignina: *p*- alcohol cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico; (b) estructura ilustrativa de los principales enlaces en la lignina, un biopolímero de 3 dimensiones altamente entrecruzado [16]

## **2.2. Biodegradación de la lignina por hongos**

Los hongos son los principales organismos que llevan a cabo la degradación de la madera. Estos microorganismos degradadores de la lignina se dividen en tres categorías (en función del color de la madera degradada): hongos de la pudrición blanca, hongos de la pudrición café y hongos de la pudrición suave [17]. Los filos a los que pertenecen estos grupos de hongos son Ascomycota y Basidiomycota, ambos del subreino Dikarya (Tabla 2) [15].

Los hongos de la pudrición blanca han sido los más estudiados debido a que degradan selectivamente la lignina, es decir, que dejan la fracción de la celulosa y la hemicelulosa intacta durante el proceso. Esta característica selectiva es importante en particular para aplicaciones de la celulosa como el pulpeo y la producción de bioetanol [16]. Los hongos de la pudrición blanca representan un amplio grupo de especies, cada una desarrolla un mecanismo de ataque diferente hacia la lignina, mediante la segregación de un coctel de enzimas [18–20]. El hongo produce varias enzimas, algunas degradan lignocelulosa y otras están implicadas en diferentes roles esenciales, que le ayudan al hongo a desarrollarse en un sustrato tan complejo.

En los últimos 50 años, la degradación de la lignina ha sido estudiada desde una perspectiva microbiológica, enfocándose en el mecanismo de degradación y en la identificación de las enzimas involucradas en el proceso. Las principales aplicaciones que se han desarrollado con el uso de los hongos de la pudrición blanca son: para la conversión de la biomasa lignocelulósica a alimento animal y comida, como

pretratamiento a la deslignificación en la industria papelera, y en la degradación de contaminantes fenólicos en efluentes y deshechos [8, 21–23].

**Tabla 2.** Principales filos de hongos degradadores de madera y sus propiedades [20]

Tipo de degradación	Filo y orden	Efecto en la degradación	Madera en descomposición	Cepa fúngica
Pudrición blanca	Basidiomycota	Causa la erosión de la pared celular en la lumina celular al ocupar grandes espacios con su micelio	Apariencia húmeda, esponjosa, blanca o amarilla	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Ceriporiopsis subvermispora</i>
	Agaricales	Degradar eficazmente la lignina		
	Afilofores			
Pudrición café	Basidiomycota	Penetra a través de los poros de la pared celular, realizando la capa S2 de la pared celular en el lumen	Seco, encogido, agrietado, en fragmentos de color marrón	<i>Gleophyllum trabeum</i> , <i>Postia placenta</i>
	Agaricales	Degradar eficazmente celulosa y hemicelulosa		
	Afilofores			
Pudrición suave	Ascomycota	Los hongos tipo I forman cavidades cilíndricas y bicónicas en las paredes celulares secundarias	La madera descompuesta es de color marrón con apariencia suave que además se agrieta y se seca	<i>Fusarium solani</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Daldinia concéntrica</i>
	Deuteromycota	Los hongos tipo II son degradadores erosivos de la madera		

### **2.3. Enzimas ligninolíticas**

Las enzimas son macropoteínas que pueden ser definidas como catalizadores biológicos de alta selectividad. Cada enzima acepta una gama muy definida de sustratos. Por lo tanto, para degradar los diferentes enlaces de la lignina, los organismos requieren múltiples tipos de enzimas que se clasifican en dos familias: peroxidasas y lacasas (Tabla 3). Las peroxidasas representan un grupo grande de enzimas que involucran el peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones para la reacción oxidativa específica que estas catalizan, dentro de esta familia están: la lignina peroxidasa (LiP, EC. 1.11.1.14), la manganeso peroxidasa (MnP, EC. 1.11.1.13), la peroxidasa versátil (VP, EC. 1.11.1.16), y la peroxidasa del rábano picante (HRP, EC.1.11.1.7). Las peroxidasas pertenecen a la superfamilia de las peroxidasas hemo-dependientes. Las lacasas representan otro grupo, por si mismas pertenecientes a la familia de multidominio de la cupredoxina, y a la superfamilia de las cupredoxinas. Las lacasas usan oxígeno como aceptor de electrones. Esta propiedad, evita la desactivación por peróxido de hidrógeno que algunas veces ocurre con las enzimas peroxidasas [16].

Las enzimas ligninolíticas tienen mecanismos complejos. El origen de las mismas, la estructura del sustrato y las condiciones exteriores juegan un papel importante en la expresión de su actividad. Las enzimas ligninolíticas pueden ser producidas por hongos y bacterias en un medio confortable, para después ser extraídas, purificadas y concentradas. La optimización de esta costosa producción, afecta la viabilidad

industrial de los procesos enzimáticos [8,24]. Sin embargo, en los últimos años se han llevado a cabo muchos estudios para la optimización de la producción de las enzimas ligninolíticas, en diferentes especies de microorganismos, con el fin de mejorar el desempeño enzimático, variando parámetros como temperatura, pH, composición del medio, agitación, uso de mediadores y cofactores, etcétera [25–29].

**Tabla 3.** Algunas propiedades de las enzimas ligninolíticas [14,30].

Parámetro	MnP E.C. 1.11.1.13	LiP E.C. 1.11.1.14	Lac E.C. 1.10.3.2
Aceptor de electrones	Mn (II): H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>
Clase	Oxidoreductasas	Oxidoreductasas	Oxidoreductasas
Grupo prostético	Hemo	Hemo	Cu tipo 1, Cu tipo 2, Cu tipo 3
MW (kDa)	32-62.5 (122)	38-47	59-110 (tetrámeros V 390c)
Glicosilación	Tipo-N	Tipo-N	Tipo-N
Isoformas	Monómeros (encima de 11)	Monómeros (encima de 15)	Mono-, di-, tetrámeros (varios)
pI	2.8-7.2	3.2-4.7	2.6-4.5
Rango pH	2.6-4.5	2.0-5.0	2.0-8.5
E <sub>0</sub> (mV)	1510	1450	500-800
Rompimiento C-C	Si	Si	No
Regulación H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Si	Si	No
Estabilidad	+++	+	+++
Mediadores nativos	Mn <sup>+2</sup> ; Mn <sup>+3</sup> Mn <sup>+2</sup>	Alcohol veratrílico	Ácido 3-hidroxi antranílico
Especificidad	Mn <sup>+2</sup>	Amplia; aromáticos incluyendo no fenólicos	Amplia; fenólicos
Mediadores secundarios y sintéticos	Tioles, ácidos grasos insaturados	No	ABTS, 1-hidroxibenzotiazol, siringaldazin
Principal efecto o reacción	Quelantes, tioles y lípidos insaturados Mn <sup>2+</sup> oxidados a Mn <sup>3+</sup> ; oxidación adicional de compuestos fenólicos a radicales fenoxi	Oxidación de anillos aromáticos a radicales catiónicos	Oxidación de fenoles a radicales fenoxil; radicales mediadores

### 2.3.1. Peroxidasas

Las peroxidasas son una categoría de las enzimas ligninolíticas. La lignina peroxidasa (LiP), la manganeso peroxidasa (MnP), la peroxidasa versátil (VP) y la peroxidasa de rábano picante (HRP) pertenecen a este grupo, con un potencial redox de 1.2 V, 0.8 V, 1.4 V y 0.95 V, respectivamente [31].

El potencial redox de la LiP permite oxidar estructuras fenólicas y no fenólicas de la lignina. El grupo hemo de estas enzimas es un ion ferroso contenido dentro de un centro de protoporfirina [31]. En estudios anteriores, se demostró que la LiP era capaz de romper el enlace C-C en la lignina sintética [32]. Sin embargo, en años más recientes se demostró también que el rompimiento del enlace C-C se da en diferentes modelos de enlaces  $\beta$ -1 [33]. La LiP también puede degradar enlaces éter. Además, también es capaz de romper enlaces  $\beta$ -O-4 con diferentes sustituyentes de grupo metoxil en anillos aromáticos [34]. La LiP tiene un parecido a la peroxidasa de rábano picante, que es una peroxidasa ampliamente estudiada, ya que contiene Fe (III) como cofactor y se encuentra pentacoordinada con cuatro nitrógenos de grupo hemo tetrapirrol y a un residuo de histidina. La lignina peroxidasa es dependiente del  $H_2O_2$  para llevar a cabo su reacción. El  $H_2O_2$  oxida la LiP resultando dos electrones intermediarios oxidados (Compuesto I) en el cual el hierro se encuentra como Fe (IV) dejando un radical libre en el anillo del tetrapirrol o en un aminoácido cercano. El Compuesto I después oxida el sustrato donador para formar un segundo intermediario (Compuesto II) y un radical libre del sustrato (Figura 2). Posteriormente, la reducción de la enzima a su estado de

reposo puede llevarse a cabo ya sea por la misma molécula de sustrato o con una segunda molécula de sustrato mediante liberación de radicales libres del sustrato [35]. Una diferencia funcional entre LiP y otra peroxidasa clásica, es que la primera enzima (LiP) puede oxidar anillos aromáticos que estén moderadamente activados por donadores de electrones sustituyentes, mientras que las peroxidosas clásicas pueden actuar solamente con sustratos aromáticos activados fuertemente. Por lo tanto, LiP y la peroxidasa de rábano picante pueden oxidar 1, 2, 4, 5- tetrametoxibenceno, fenoles y anilinas, al mismo tiempo que LiP es capaz de sustraer un electrón de los aromáticos que poseen dos o tres grupos éter como lo presentan las principales estructuras no fenólicas de la lignina [36].

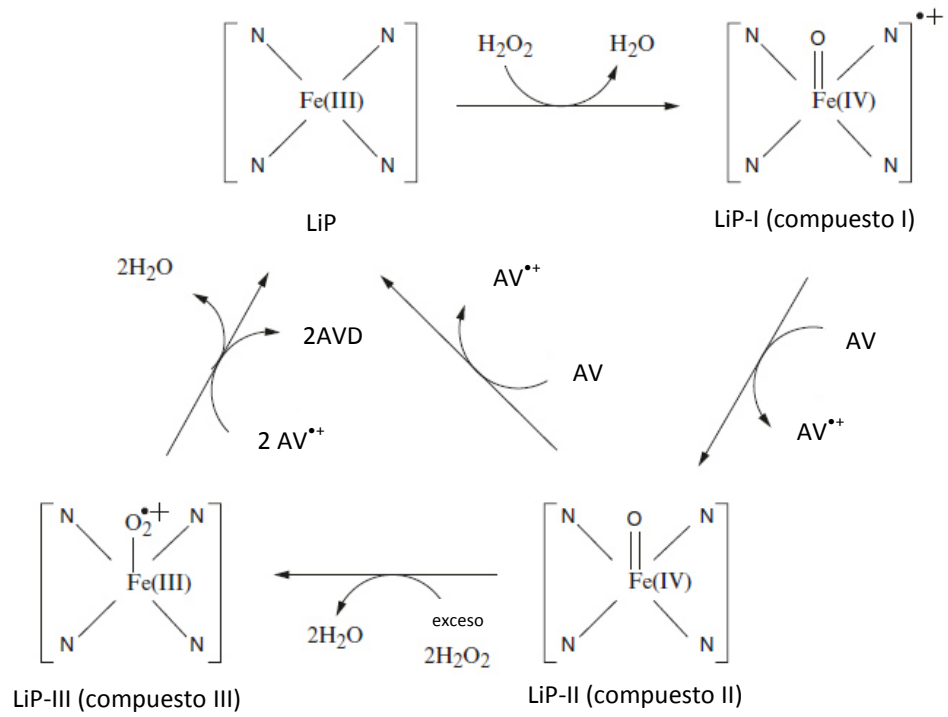
La manganeso peroxidasa es otra enzima segregada por los organismos con actividad ligninolítica. La MnP requiere peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), al igual que la LiP, para llevar a cabo la oxidación de la estructuras fenólicas. La MnP necesita iones  $Mn^{2+}$  en solución para ser completamente eficiente. En condiciones acidófilas, el Mn (II) es oxidado por el  $H_2O_2$  creando iones  $Mn^{+3}$  libres, los cuales son difundidos y oxidan las estructuras fenólicas. La estructura de la MnP es muy similar a la LiP, ya que ambas tienen iones ferrosos en su grupo hemo [31]. El mecanismo de reacción de la MnP es efectuado primero por la oxidación de Mn (II) por el Compuesto I (MnP-I), seguido por la oxidación del Compuesto II (MnP-II) dando Mn (III). La MnP posee un sitio de unión de manganeso el cual contiene varios aminoácidos ácidos además de grupos heme propionatos. Así, el transporte de un electrón al Compuesto I de MnP toma lugar desde el enlace  $Mn^{+2}$ . Además,  $Mn^{+3}$  es liberado desde el sitio activo en presencia de

quelantes bidentados como el oxalato, que ayuda a prevenir la desproporción a  $Mn^{+2}$  o  $Mn^{+4}$  insoluble. Esta reacción es requerida para la transferencia del poder oxidativo de la MnP al  $Mn^{+3}$ , el cual se difunde dentro de la pared celular lignificada para atacarla desde su interior [35]. El ciclo catalítico de la MnP comienza con la unión del peróxido de hidrógeno o el peróxido orgánico a la forma férrica nativa de la enzima, resultando en la formación de un complejo peróxido-hierro (Figura 3). También, el rompimiento del enlace oxígeno-oxígeno del peróxido depende de una reacción de transferencia de 2 electrones desde el grupo hemo resultando en la formación del MnP-compuesto I (complejo:  $Fe^{+4}$  radical -oxo-porfirin). El enlace dioxígeno es dividido resultando en la eliminación de agua y se produce una reducción adicional vía MnP-compuesto II. El ion  $MnP^{+2}$  (monoquelado) dona un electrón al intermediario porfirina y es oxidado a  $MnP^{+3}$ . De forma similar, el compuesto II es reducido por liberación de otro  $Mn^{+3}$  y a una segunda molécula de agua, conduciendo así al estado de reposo de la enzima (Figura 3) [20].

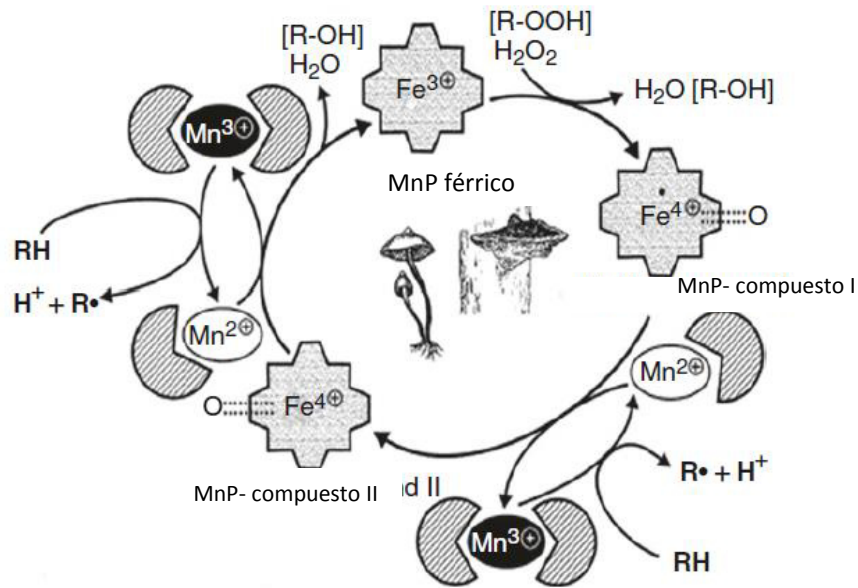
La peroxidasa versátil (VP), se encuentra en algunos hongos degradadores de lignina, presenta un potencial redox de 1.4 V, lo que le permite aceptar una amplia gama de sustratos comparados con otras enzimas ligninolíticas [31]. La VP es capaz de degradar enlaces  $\beta$ -O-4. Similar a la LiP, la peroxidasa versátil también inicia la ruta de transferencia de electrones de largo alcance [20].

La peroxidasa del rábano picante (HRP), se considera parte de la fenoloxidasas responsable de la degradación de la lignina. Por lo que, ésta enzima tiene un rol importante como promotor, para la polimerización de compuestos aromáticos. Por tal

motivo, la HRP es considerada como un biocatalizador de polimerización o como un agente modificador de la lignina [37–39].



**Figura 2.** Ciclo catalítico de la lignina peroxidasa (AV: alcohol veratrílico) [40]



**Figura 3.** Ciclo catalítico de la manganeso peroxidasa [41]

### 2.3.2. Lacasas

Las lacasas (E.C. 1.10.3.2, p-difenol: dioxígeno oxidoreductasas) junto con la lignina peroxidasa y la manganeso peroxidasa, pertenecen al grupo de las enzimas modificadoras de lignina. Los requerimientos de catálisis de las lacasas son la presencia del sustrato y del oxígeno, además que son muy estables y presentan baja inhibición a diferentes factores. Esto hace a estas enzimas, atractivas y adecuadas para diversas aplicaciones biotecnológicas [22,42,43].

Las lacasas son glicoproteínas monoméricas, diméricas o tetraméricas con cuatro átomos de cobre por monómero localizados en el sitio catalítico, estos átomos de cobre pertenecen a tres tipos. El Tipo 1 (T1) el cobre es responsable de la oxidación del sustrato, y le confiere una tonalidad color azul a la enzima. Las lacasas usan oxígeno molecular para oxidar una variedad de compuestos aromáticos y no aromáticos, por la

vía de donadores de hidrógeno, que es un mecanismo que involucra radicales. Estos radicales pueden someterse a reacciones catalizadas por lacasas y/o reacciones no enzimáticas como polimerización, hidratación y substracción de hidrógeno. Para sustancias fenólicas, la oxidación por lacasas resulta en la formación de un radical ariloxi, una especie activa que es convertida a una quinona, en una segunda etapa de la oxidación. Los intermediarios de la quinona, pueden reaccionar espontáneamente uno con otro para formar oligómeros solubles e insolubles, dependiendo del sustrato y de los parámetros ambientales [44]. Las lacasas pueden descarboxilar ácidos fenólicos y metoxifenólicos [45] , y también ataca grupos metoxil a través de la desmetilación [46]. La deshalogenación de los sustituyentes localizados en posición *ortho* y *para* también puede ocurrir en el caso de compuestos con sustituyentes de este tipo [47].

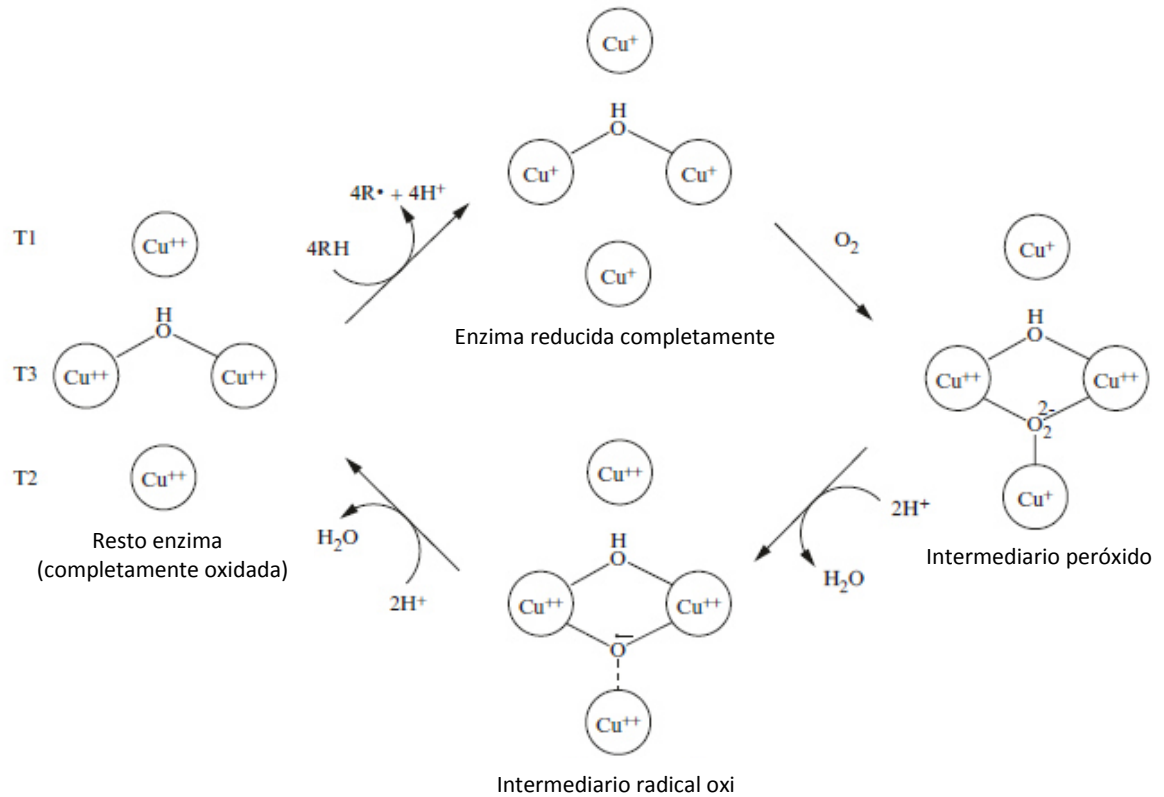
Los basidiomicetes, específicamente los hongos de la pudrición blanca son hasta ahora los mayores productores de lacasas [42]. La actividad de estas enzimas es más estable a pH ácidos, pero la temperatura óptima varía considerablemente dependiendo las diferentes fuentes de la enzima. A pesar de la existencia de numerosos estudios de lacasas en la literatura, sus propiedades bioquímicas y fisicoquímicas, y sus parámetros catalíticos están frecuentemente incompletos o son difíciles de comparar debido a la variedad de cepas, sustratos, inductores y condiciones de reacciones utilizadas.

### 2.3.2.1. Los sustratos de las lacasas

En los sustratos típicos de las lacasas se incluyen a los monofenoles, así como al ácido sinapínico o guayacol. La naturaleza y posición de los sustituyentes en el anillo fenólico influyen en la eficiencia de la oxidación para cada lacasa en particular. Los grupos funcionales electrofílicos, especialmente en la posición *ortho*, afectan negativamente la afinidad de la enzima al sustrato, contrario a lo que ocurre con los grupos funcionales nucleofílicos. El congestionamiento estérico y el potencial redox alto, afectan negativamente la velocidad de oxidación. Las lacasas también oxidan poliaminas, aminofenoles, lignina, aril diamina, algunos iones inorgánicos, además de que disminuyen la toxicidad de algunos hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs), pesticidas organofosforados y colorantes azo [48,49]. Algunos contaminantes pueden ser mineralizados completamente por hongos, a través de mecanismos desconocidos. Ryan *et al.* [50] demostraron que el fenol puede ser usado como fuente de carbono por *Trametes versicolor*, si el cultivo se mantiene al menos ocho días; esto implica que algunos subproductos de oxidación de las lacasas, pueden servir como sustratos para otras enzimas, dependiendo las especies microbianas, condiciones de reacción, tiempo de cultivo, tipo y concentración de sustrato. Lo antes mencionado remarca la complejidad de la actividad de las lacasas, en combinación con otras enzimas extracelulares.

### 2.3.2.2. Mecanismo de oxidación

El potencial redox del sitio de cobre T1 es el responsable directo de la capacidad catalítica de la lacasa. El mecanismo de interacción entre el sitio T1 de la lacasa y el sustrato, parece ser idéntico entre las lacasas provenientes de hongos [51]. En su estado nativo, la enzima mantiene los átomos de cobre en estado monovalente como  $\text{Cu}^+$ . Cuando el oxígeno se enlaza al aglomerado trinuclear formado por el sitio de cobre T2 y T3, los cuatro átomos de cobre son oxidados ( $\text{Cu}^{2+}$ ) en dos pasos [52]. El oxígeno, es entonces reducido a oxígeno divalente y subsecuentemente llega a ser agua. La oxidación del sustrato, es siempre llevada a cabo por el cobre T1. Los electrones son transferidos desde el sitio T1 al aglomerado trinuclear, por una estructura tripeptídica de His-Cys-His. Cada sustrato es oxidado por una etapa sucesiva de oxidación de un electrón. La captura de los cuatro electrones por el sustrato regresa a la enzima a su estado nativo. La relación estequiométrica correspondiente de la relación molar de la transformación del sustrato- $\text{O}_2$  es generalmente 4/1, es decir, hay cuatro electrones liberados de las cuatro moléculas del sustrato, por una de  $\text{O}_2$  reducido (Figura 4) [53].



**Figura 4.** Ciclo catalítico de la lacasa [40]

### 2.3.2.3. Efecto de los mediadores redox

El rango estándar del potencial redox para la actividad enzimática de las lacasas, se encuentra usualmente entre 0.5 – 0.8 V, no lo suficientemente alta para la oxidación de varios compuestos xenobióticos. El uso de mediadores redox aumenta la capacidad de las lacasas para oxidar compuestos de difícil degradación, ya que los mediadores son pequeñas moléculas que pueden incrementar la reactividad enzimática de las lacasas, hacia varios sustratos poco comunes o complejos. Los mediadores son sustratos

fácilmente oxidables, que puede actuar como intermediarios redox entre el sitio activo de la enzima y el sustrato no fenólico; moléculas con altos potenciales redox o que son estéricamente impedidas son buenas candidatas para formar un sistema mediador con las lacasas [54].

Existen tres mecanismos diferentes de oxidación mediada que pueden ocurrir dependiendo de la estructura química: (1) transferencia de electrones, (2) transferencia de radicales hidrógeno (grupo =N-OH) y (3) oxidación iónica [55]. La ruta por medio de la transferencia de electrones, es posible con un sustrato de bajo potencial de oxidación, mientras que los mediadores del grupo =N-OH atacan enlaces débiles C-H.

El adicionar mediadores se incrementa la eficiencia de oxidación de los contaminantes generalmente; sin embargo, éstos no son requeridos si en el medio de cultivo se encuentran sustratos lignocelulósicos, debido a que las moléculas fenólicas generadas durante la degradación del sustrato complejo, pueden actuar como mediadores naturales, ya que ellas se pueden oxidar fácilmente [56]. Algunos hongos, también producen metabolitos que pueden ser mediadores para la oxidación de moléculas no fenólicas [57].

#### 2.3.2.4. Fuentes de lacasas

Las lacasas provenientes de hongos son las más estudiadas, con más de 115 enzimas caracterizadas [42]. Los hongos de la familia de los basidiomicetes producen pequeñas cantidades de lacasa extracelular; sin embargo, este rendimiento puede aumentar al agregar inductores, como los compuestos aromáticos y fenólicos que sean estructuralmente similares a la lignina o sean derivados de ésta [58]. Las lacasas están asociadas con la degradación de la lignina, defensa contra el estrés y algunos otros procesos fisiológicos, como el desarrollo de cuerpos fructíferos de hongos, pigmentación de esporas, diferenciación sexual y formación rizomorfa [59].

Los basidiomicetes son los principales productores de lacasas, por esta razón, éstos han sido mayormente estudiados para entender el mecanismo de degradación de la lignina. Los hongos más estudiados en la producción de lacasas son del género *Trametes* sp, considerándose así a la especie *Trametes versicolor*, como un modelo de microorganismo [50, 60, 61]. Otros ejemplos de organismos productores de lacasas son *Pleurotus ostreatus*, *Marasmius quercophilus*, *Pleurotus pulmonarius*, *Ganoderma adpersum*, *Pycnoporus sanguineus*, etcétera [54]. En la Tabla 4 se muestran algunos estudios en la producción de lacasas, empleando hongos bajo diferentes sistemas de fermentación. La variabilidad en las configuraciones de reactores, el uso y tipo de inductor y la especie de hongo empleada juegan un papel crucial en el desempeño de las reacciones enzimáticas. Sin embargo, para llevar a cabo la remoción de

contaminantes en aguas residuales, es necesaria la presencia de otras enzimas ligninolíticas que mejoran la eficiencia de degradación.

**Tabla 4.** Producción de lacasas por diferentes hongos en biorreactores a escala de laboratorio.

Hongo	Tipo de reactor	Volumen (L)	Tipo de cultivo	Inductor	Actividad máxima de lacasa (U/mL)	Referencia
<i>Trametes versicolor</i>	Reactor de pulsos	0.5	sumergido	-	16	[62]
<i>Trametes versicolor</i>	<i>Airlift</i>	2	sumergido	xilidina 1 mM	1.676	[63]
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	STR	12	sumergido	-	2.8	[64]
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Cama con sustrato sólido	ND	sólido	bagazo de caña de azúcar	3.5	[65]
<i>Trametes versicolor</i>	Reactor fluidizado con pulsos de aire	10	sumergido	-	2.7	[66]
<i>Pycnoporus sp</i>	<i>Airlift</i>	65	sumergido	CuSO <sub>4</sub> 4 g/L maltosa 12 g/L	72	[6]
<i>Trametes pubescens</i>	<i>Airlift</i>	3.5	sumergido	efluente fenólico	11.8	[67]
<i>Trametes versicolor</i>	STR	1	sumergido	xilidina 30 µM	11.403	[61]
<i>Trametes versicolor</i>	Reactor fluidizado con pulsos de aire	1.5	sumergido	-	2.123	[68]

Continuación de Tabla 4.

Hongo	Tipo de reactor	Volumen (L)	Tipo de cultivo	Inductor	Actividad máxima de lacasa (U/mL)	Referencia
<i>Pycnoporus sp</i>	STR	5	sumergido	CuSO <sub>4</sub> 4 g/L maltosa 12 g/L	240	[69]
<i>Pycnoporus sp</i>	STR	500	sumergido	CuSO <sub>4</sub> 4 g/L maltosa 12 g/L	60	[69]
<i>Pycnoporus sp</i>	STR	5000	sumergido	CuSO <sub>4</sub> 4 g/L maltosa 12 g/L	80	[69]
<i>Coriolopsis gallica</i>	STR	50	sumergido	vainillina 200 μM	200.9	[70]

STR: Reactor de tanque agitado

### 2.3.3. Optimización de la producción de lacasas

La producción de lacasas de manera extracelular es un requisito fundamental para su aplicación a nivel industrial ya que permite obtener las enzimas con procesos simples de separación. Llevar a cabo la producción de lacasas es un proceso donde muchos parámetros juegan un papel importante, algunos por mencionar son la especie productora, el tipo de cultivo, la agitación, la aireación; algunas otros factores críticos a considerar son la fuente de carbono y nitrógeno a utilizar, las concentraciones y relaciones entre estos, y además la naturaleza y concentración del inductor en caso de ser adicionado [22,25,28,61]. Estos parámetros se describirán con mayor detalle en las siguientes secciones.

### **2.3.3.1. Fuente de carbono**

Algunas fuentes de carbono fácilmente disponibles como glucosa, manitol y celobiosa son utilizadas en la producción de lacasas, y han demostrado resultados satisfactorios al ser asimiladas rápidamente por la especie empleada. Sin embargo, otras fuentes de carbono como la fructosa y la celulosa son de lenta asimilación, por lo que resulta en la disminución de la actividad enzimática [71]. En algunas especies, el incremento de la actividad de lacasas va de la mano con el crecimiento del microorganismo, pero en varios reportes se ha demostrado que la actividad específica de las lacasas, puede aumentar por la elección de la fuente de carbono empleada [43]. Para muchas especies, la glucosa es un represor de la producción de lacasas. Los inductores y la fuente óptima de carbono, son específicos para cada especie. La concentración de carbono en el medio también es importante, un exceso en éste usualmente causa una represión en la expresión de lacasas, sin embargo, una cantidad mínima parece ser benéfica para mantener la viabilidad del cultivo y así propiciar la producción de lacasas [72].

Para una producción óptima de lacasas durante un periodo prolongado, es necesario implementar un proceso de alimentación de carbono a pequeñas cantidades, o bien emplear sustratos naturales lignocelulósicos que liberen lentamente la fuente de carbón durante la fermentación [73].

### **2.3.3.2. Fuente de nitrógeno**

La concentración óptima de nitrógeno en la producción de lacasas es aún más incierta que para el carbono, ya que la limitación del nitrógeno en la naturaleza ha sido el principal factor para la generación de enzimas ligninolíticas, al favorecer su producción cuando el nitrógeno disminuye. Tener una concentración limitante de nitrógeno en la producción de lacasas, ha sido benéfico en ciertas especies estudiadas como *P. sanguineus* [74] y *P. ostreatus* [75]. La expresión de lacasas varía dependiendo las condiciones de crecimiento, composición del medio, fuente de nitrógeno y cepa. La triptona y peptona, son empleadas frecuentemente como fuentes de nitrógeno; sin embargo, otras fuentes de nitrógeno como la asparagina, el extracto de levadura y el tartrato de amonio han sido evaluadas con resultados satisfactorios al incrementar la actividad enzimática [73,76].

### **2.3.3.3. Papel del cobre en la fermentación**

El cobre funciona como cofactor en el centro catalítico de la lacasa, éste es necesario para la actividad de la enzima a concentraciones milimolares. Los iones de cobre son también inductores de lacasas en varios hongos. Por ejemplo, en *Trametes versicolor*, el cobre regula la expresión de la enzima lacasa a un nivel de gen de transcripción [77]. Sin embargo, el exceso de cobre puede generar un efecto tóxico en el hongo y, por lo tanto, disminuye la producción de lacasas. La adición de cobre durante la fase

exponencial del crecimiento del hongo, provoca una mayor actividad de lacasas, mientras que el efecto de inhibición del crecimiento del hongo se ve disminuido [78,79].

#### **2.3.3.4. Uso de inductores en la fermentación**

El uso de un inductor apropiado aumenta la producción de lacasas considerablemente y, además, puede ser un prerrequisito para una producción eficiente a nivel industrial. Los inductores más comunes y más efectivos, para la producción de lacasas por hongos, son 2,5-xilidina y cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) aunque también se han utilizado inductores de compuestos naturales como guayacol y alcohol veratrílico, entre otros [50,80]. Durante la degradación de residuos lignocelulósicos pueden liberarse monómeros de lignina y otros compuestos, que funcionan como inductores naturales para la actividad de lacasas [81].

#### **2.3.3.5. Parámetros ambientales**

En términos generales, las condiciones más reportadas para la producción óptima de lacasas es a temperatura ambiente (25 °C a 30 °C) y en un medio ligeramente ácido (pH 4.5). Cuando el pH no se controla durante una fermentación, es común observar que éste va disminuyendo principalmente en la fase de producción enzimática, esto se asocia con la liberación de enzimas ligninolíticas y otros compuestos formados que

acidifican el medio [27,73]. Sin embargo, conforme la liberación de proteínas aumenta es posible que se registre un aumento en el pH debido a que éstas secuestran iones hidronio provocando un decremento en la actividad enzimática. No obstante, es necesario mencionar que la producción de lacasas, generalmente no está relacionada con el crecimiento del hongo.

La disponibilidad de oxígeno tiene un impacto favorable en la producción de lacasas por hongos, por lo que, la velocidad de aireación es un factor importante durante la operación de un reactor. Los resultados más prometedores en la producción enzimática fueron empleando mínimo 1 vvm (volumen de aire por volumen del líquido por minuto) en el proceso [6,63,67,82].

## **2.4. Tipo de fermentación**

### **2.4.1. Fermentación sumergida**

Los cultivos sumergidos o cultivos líquidos son aplicados para la producción de lacasas por hongos frecuentemente, a pesar de que este modo de aplicación es diferente a las condiciones naturales de estos organismos. Los parámetros de fermentación pueden ser controlados fácilmente en un cultivo líquido tipo *batch*, además que existen diversas configuraciones para implementar una producción satisfactoria de lacasas [82]. No obstante, la fermentación líquida no es óptima para todas las especies de hongos. Los hongos filamentosos crecen en medio líquido bajo agitación, formando

pequeños *pellets* compactos que varían en talla, dependiente el tipo de agitación y la configuración de la misma [83]. Los aglomerados de micelio son perjudiciales, ya que reducen la producción de lacasas y ocasionan problemas operacionales. El diseño de un biorreactor sumergido, la velocidad de aireación y el tipo de agitación son algunos factores que deben tomarse en cuenta para minimizar las fuerzas de corte que causan daño al micelio, y disminuyen la actividad de las lacasas [84]. Varios estudios han reportado el impacto negativo del estrés mecánico, causado por un tanque de agitación en comparación con un reactor tipo *airlift* donde este efecto es reducido [63,85].

#### **2.4.2. Fermentación en estado sólido**

El propósito de este tipo de fermentación es reproducir las condiciones naturales de crecimiento de los hongos filamentosos y, de esta manera, mejorar el rendimiento de producción de enzimas ligninolíticas. El procedimiento habitual consta en utilizar soportes sólidos inertes y naturales, en ausencia o presencia mínima de un medio líquido. Los organismos crecen en la superficie y dentro de los espacios que tenga el soporte. Los principales factores a cuidar son el pH, la temperatura y la agitación, mismos que son difíciles de controlar por la naturaleza del tipo de fermentación [86]. A pesar de que la fermentación en estado sólido ocasiona bajos costos, el principal inconveniente para su aplicación se debe a los problemas originados del escalamiento a un nivel industrial [87]. Un soporte sólido ideal, en la fermentación sólida, debe

proveer un buen crecimiento y colonización del mismo, además de que sea fácil de separar del medio líquido formado [88].

### **2.4.3. Fermentación en estado semi-sólido**

La fermentación semi-sólida es muy semejante a la fermentación en estado sólido, ya que se lleva a cabo en un medio libre de líquido; sin embargo, permite una recuperación más sencilla del producto obtenido. Los soportes no inertes como los residuos agroindustriales, usualmente dan mejores rendimientos que utilizando soportes inertes, esto se debe a que durante la fermentación se degradan compuestos simples que son utilizados como inductores y nutrientes, lo que provoca un aumento en la producción enzimática; no obstante, una desventaja importante es la baja transferencia de oxígeno en el medio [89].

### **2.4.4. Uso de residuos lignocelulósicos en la fermentación**

El uso de residuos provenientes de la agricultura, industrias procesadoras de alimentos y de la fabricación del papel, han sido implementados como sustratos o cosustratos para la producción de lacasas, esto debido a que los costos de producción se ven disminuidos considerablemente; además, debido a la composición química de éstos residuos, se observa un efecto favorable en la expresión de la actividad enzimática de las lacasas. Songulashvili *et al.* [90] evaluaron el uso de residuos de cáscara de

mandarina y granos de trigo obtenidos de un proceso de producción de etanol, y reportaron que el uso de estos desechos como sustrato inducían la actividad de lacasas (34,000 U/L). Algunos residuos lignocelulósicos, como las cáscaras de la mandarina, contienen alto contenido en azúcares solubles, ácidos orgánicos, celulosa, lignina y compuestos aromáticos capaces de promover la producción de lacasas. Otro sustrato prometedor para la producción de lacasas, en las diferentes modalidades de fermentación, es el salvado de trigo. Este sustrato comparado con otros residuos como la paja o el aserrín ha demostrado obtener mejores valores en actividad enzimática en sistemas en lote y con varios microorganismos como *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, etcétera [91].

Sin embargo, el uso de sustratos complejos como los residuos lignocelulósicos o efluentes de aguas residuales, pueden ocasionar disminución en la actividad de las lacasas [67].

## **2.5. Uso de enzimas en el tratamiento de aguas**

Las aguas residuales provenientes de procesos industriales como la refinería del petróleo, fundidoras, conversión del carbón, plantas químicas, fábricas de pulpeo y papel, entre otros, son ricas en contaminantes altamente tóxicos y de difícil degradación, lo que dificulta su tratamiento.

La remoción de contaminantes fenólicos o xenobióticos presentes en aguas residuales mediante el uso de lacasas puede realizarse a través de diferentes caminos, ya sea

utilizando enzimas purificadas en forma libre, empleando enzimas purificadas inmovilizadas en un soporte, utilizando el extracto (enzimas obtenidas directamente de un cultivo) y mediante la biorremediación, en reactores con células inmovilizadas o libres. Sin embargo, cada estrategia presenta diferentes complicaciones ya sea de costo, de operación o ambas. Se ha reportado que algunos fenoles inhiben el crecimiento de los hongos de la pudrición blanca, lo que afecta la producción de lacasas [92]. Sin embargo, éste efecto muchas veces se ha visto reducido al diluir los efluentes a utilizar, o por la etapa de desarrollo del hongo al momento de inocular el efluente a tratar. Ryan *et al.* [67] dosificaron el efluente de una planta de gasificación de carbón, para promover la adaptación de *T. pubescens* y promover la producción de lacasas, observaron que 5% del efluente podía ser tratado diariamente.

Las aguas residuales también pueden ser tratadas con fluidos extracelulares de un cultivo fúngico, omitiendo la purificación de las enzimas. La presencia de otras enzimas extracelulares y la presencia de células completas, presenta una ventaja para la biorremediación [93]. Muchos estudios de biorremediación de aguas residuales han sido desarrollados con efluentes estériles, con la finalidad de disminuir el efecto competitivo entre microorganismos por el sustrato principal. No obstante, algunos estudios reportados han demostrado una degradación exitosa de efluentes bajo condiciones no estériles, como Pedroza *et al.* [94] quienes trataron un efluente proveniente de la industria papelera.

La degradación de efluentes con colorantes, provenientes de efluentes de industrias textiles, es una aplicación potencial en el tratamiento de aguas residuales con lacasas.

Sin embargo, existen diferentes tipos de efluentes que además de colorantes en su contenido presentan mezclas de compuestos tóxicos como metales pesados, insecticidas, germicidas, etc., que hacen aún más desafiante su degradación [95]. Algunos sustratos presentes en las aguas residuales pueden inhibir la actividad de las lacasas. El efecto de los diferentes inhibidores potenciales varía entre las variedades de lacasas. Por ejemplo, el  $\text{Hg}^{+2}$  provoca inhibición irreversible, también elevadas concentraciones de metales como el cobre y hierro interfieren con la actividad de las lacasas. Kim & Nicell [96] evaluaron la concentración de diferentes metales presentes en la degradación de bisfenol A y encontraron que bajo una concentración de 1 mM de  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  o  $\text{Mn}^{2+}$  no existía un efecto inhibitor en la degradación de este compuesto.

## **2.6. Aguas azules**

Los grandes complejos aeroportuarios en el mundo consumen agua en la misma porción que una ciudad pequeña o mediana. El Aeropuerto Internacional de Atlanta (Hartsfield-Jackson) consumió la misma cantidad de agua que la consumida por una población de 13,000 habitantes en el 2009. El Aeropuerto London-Heathrow consumió 1,852,000  $\text{m}^3$  de agua en el 2010, que es el consumo de una ciudad de 25,000 habitantes. En el 2010, el Aeropuerto Internacional de Narita en Japón, con alrededor de 33 millones de pasajeros, consumió la misma cantidad de agua, que una ciudad de 24,000 habitantes [97].

La operación de un aeropuerto requiere grandes cantidades de agua, ya sea para actividades de rutina y mantenimiento. Algunas actividades utilizan agua no potable, como la que se ocupa en sistemas de enfriamiento de aire, riego de jardines, lavado de aeronaves, vehículos y pistas de aterrizaje, pruebas de control de incendios y para lavado de inodoros.

Los residuos de los aeropuertos son clasificados principalmente en ocho tipos: 1) residuos sólidos municipales; 2) residuos de construcción y demolición; 3) residuos verdes; 4) residuos de alimentos; 5) residuos de los vuelos; 6) residuos de inodoros; 7) residuos por limpieza de derrames y remediación; y 8) residuos peligrosos, según la Federal Aviation Administration (FAA) [98].

Los residuos de los inodoros caen en una categoría especial, ya que son generados cuando los tanques de los inodoros de los aviones son vaciados a un vehículo de servicio a través de una manguera o una bomba. Una vez que los tanques de los aviones se encuentran vacíos, esos son rellenados con una mezcla de agua y un concentrado de desinfectante, llamado comúnmente “jugo azul”. Los residuos de los inodoros que son removidos de las aeronaves, generalmente son transportados a un triturador que se encuentra al aire libre cerca de las operaciones del aeropuerto, esto con la finalidad de descargar este efluente a un sistema de tratamiento de aguas [98,99].

Los residuos de los inodoros, también conocidos como aguas azules por el color azul que toman al ser mezclados con el “jugo azul”, contienen químicos y potenciales microorganismos patógenos, que pueden presentar riesgos al ambiente y a la salud

humana si no son manejados apropiadamente. Por lo tanto, deben de manejarse con cuidados extremos para asegurar que no ocurran derrames o fugas, durante el procedimiento de transferencia de las aguas azules, de las aeronaves al vehículo transportador.

Las aguas azules se caracterizan por tener una alta demanda química de oxígeno (DQO), materia orgánica insoluble, papel de baño y la mezcla de químicos añadidos con la finalidad de inhibir el crecimiento y actividad de los microorganismos [1]. Dentro de la composición de químicos presentes se encuentran formaldehído, glioxal, glutaraldehído, amonio cuaternario, alquil fenoles, glicoles y colorante [100].

La presencia de químicos en el ambiente es más preocupante considerando que éstos no aparecen individualmente, sino como una mezcla compleja, la cual podría generar efectos sinérgicos no deseados. Por tal razón, es necesario conocer su procedencia, destino y su impacto ambiental.

## **2.7. Motivación de este proyecto**

La finalidad de este estudio es proponer una estrategia de tratamiento biológico, amigable con el medio ambiente, que sea capaz de degradar total o parcialmente, los contaminantes presentes en un efluente real de aguas azules generado en un aeropuerto. Cabe mencionar que no existe actualmente en la bibliografía, un estudio para el tratamiento de este tipo de efluentes utilizando un tratamiento enzimático.

## **2.8. Hipótesis**

Las enzimas ligninolíticas producidas en un reactor *airlift*, inoculado con un hongo de pudrición blanca en medio mineral y un residuo lignocelulósico, son capaces de incrementar un 50% el índice de biodegradabilidad de los contaminantes presentes en aguas azules residuales provenientes de un aeropuerto.

## **2.9. Objetivos**

### **2.9.1. Objetivo general**

Optimizar la producción de enzimas ligninolíticas en un sistema *air-lift* y evaluar su desempeño en el tratamiento de aguas azules provenientes de un aeropuerto.

### **2.9.2. Objetivos específicos**

- i. Optimizar la producción de enzimas ligninolíticas en reactores en lote, variando concentraciones de residuos lignocelulósicos y temperatura.
- ii. Reproducir condiciones óptimas para la producción de enzimas ligninolíticas en un reactor *airlift*.

- iii. Evaluar el extracto enzimático para la degradación de las aguas azules provenientes de un aeropuerto, bajo las condiciones óptimas de producción enzimática en un reactor *airlift*.
- iv. Caracterizar el efluente de aguas azules provenientes de un aeropuerto antes y después del tratamiento con el extracto enzimático.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

# CAPÍTULO 3

## METODOLOGÍA

### **3. METODOLOGÍA**

#### **3.1. Activación de cepa fúngica**

La cepa *Trametes versicolor* fue recolectada y aislada del parque San Nicolás, en el municipio de San Nicolás de los Garza, Nuevo León, en un estudio anterior del laboratorio de Fisicoquímica de Interfases y Biomateriales ubicado en el laboratorio de Ingeniería Química II [101].

Para la activación de la cepa fúngica, se preparó y esterilizó el medio agar papa dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) marca Bixon, bajo las condiciones estándar de esterilización (15 min a 121 °C y 15 psi), después se prosiguió con la siembra en placa con el PDA y se incubó a 30 °C ± 1 por 10 días, después las placas sembradas fueron almacenadas a 4 °C ± 1.

#### **3.2. Ensayo de actividad ligninolítica mediante reacción Bavendam**

Se efectuó la siembra de la cepa *Trametes versicolor* en placa en medio agar extracto de malta (marca BD) adicionado con ácido tánico (marca Sigma-Aldrich) al 0.01 %. Una vez sembradas las placas, se incubaron a 30 °C ± 1, periódicamente se fue observado el crecimiento y la coloración café característica de la reacción Bavendam [102].

### **3.3. Ensayo de actividad ligninolítica mediante la oxidación ABTS**

Se efectuó la siembra de la cepa *Trametes versicolor* en placa en medio (PDA), adicionado con ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS) (marca Sigma-Aldrich) 1 mM. Una vez sembradas las placas se incubaron a  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ , periódicamente se fue observado el crecimiento y la coloración morada característica de la oxidación del ABTS [7].

### **3.4. Determinación de las condiciones óptimas para la producción de lacasas en fermentación sumergida**

Después de activar la cepa *Trametes versicolor* se realizó la optimización de la producción de lacasas, mediante el uso de un diseño factorial central compuesto  $2^2$  con tres puntos centrales (CCD, por sus siglas en inglés). Los factores evaluados fueron concentración de residuo lignocelulósico y temperatura, con dos niveles por factor (Tabla 5). Además se evaluaron tres residuos lignocelulósicos diferentes (bagazo de agave (BA), fibras de cáscara de coco (CC) y salvado de trigo (ST)), como cosustratos para la producción de lacasas. Por esta razón, se realizó el diseño experimental CCD antes mencionado para cada residuo. La variable de respuesta analizada fue la actividad enzimática para lacasas. Además, se evaluó la cantidad de peso seco al final de las fermentaciones para cada diseño de experimentos.

**Tabla 5.** Factores y niveles a evaluar en el CCD 2<sup>2</sup>

Factor	Unidad	Código	Nivel				
			-α	-1	0	+1	+α
Temperatura	°C	A	25	25	30	35	35
Concentración de residuo lignocelulósico	g/L	B	3	3	4	5	5

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el software estadístico *Design Expert* 7.0, utilizando la metodología de superficie de respuesta. Los resultados obtenidos fueron ajustados a un modelo de segundo orden (Ecuación 1).

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

Donde  $y$  es la respuesta,  $X_i$  y  $X_j$  son las variables independientes de los factores A y B,  $\beta_0$  es el coeficiente constante,  $\beta_i$  es el coeficiente lineal del factor correspondiente,  $\beta_{ii}$  es el coeficiente cuadrático y  $\beta_{ij}$  es el coeficiente de la interacción entre A y B. También, se obtuvieron los análisis de varianza (ANOVA) con la finalidad de establecer los factores significativos del experimento.

La función de deseabilidad es uno de los métodos más utilizados en la industria para la optimización de procesos de respuesta múltiple. El método encuentra las condiciones de operación que ofrecen los valores de respuesta más deseables. El valor de deseabilidad (D) busca valores apropiados que se asignan a cada variable de entrada con el propósito de maximizar un índice de deseabilidad general que varía de 0 a 1, el

cual es el resultado de la optimización simultánea de varias variables de respuesta [103] (Ecuación 2).

$$D = d_1^{w1} \times d_2^{w2} \dots d_m^{wm} \quad (2)$$

### 3.5. Condiciones de cultivo iniciales de la fermentación sumergida

Los experimentos relacionados a la optimización de la producción de las lacasas fueron desarrollados en fermentación sumergida, en un volumen total de 100 mL en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Se utilizó una modificación del medio basal de Kirk [104]. La composición del medio de cultivo se muestra en la Tabla 6. Una vez preparado el medio basal, se añadió la concentración de residuo específica para cada tratamiento según el diseño de experimentos (Tabla 7); después se trasvasó a los matraces correspondientes y se esterilizaron por 15 min a 121 °C y 15 psi. Los residuos lignocelulósicos fueron secados previamente a 65 °C por tres horas para ser molidos con un molino vibracional, para obtener un tamaño de partícula de 0.5 mm aproximadamente. La inoculación de los reactores se llevó a cabo mediante la técnica del tapón de agar, donde cada reactor fue inoculado con cuatro *plugs* de un cm<sup>2</sup>. Luego, se incubaron a la temperatura de acuerdo a cada tratamiento del diseño de experimentos y se sometieron en agitación a 150 rpm.

Periódicamente fue tomada una muestra de cada biorreactor, centrifugada a 10,000 xg a 4 °C por 15 min. El sobrenadante fue separado y utilizado para la determinación de la actividad enzimática mediante la técnica descrita en el siguiente apartado.

**Tabla 6.** Composición del medio basal de Kirk modificado.

Componente	Concentración (por litro)
Glucosa (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> ) (marca Sigma-Aldrich)	5.00 g
Tartrato de amonio ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> ) (marca CTR)	0.22 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (marca Baker)	0.20 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (marca Fermont)	0.05 g
CaCl <sub>2</sub> (marca Fermont)	0.01 g
Elementos traza	10 mL
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O (marca Fermont)	0.08 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O (marca PQM)	0.05 g
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O (marca Fermont)	0.07 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (marca PQM)	0.043 g
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O (marca Fermont)	0.01 g

### 3.5.1. Ensayo enzimático para lacasas

La actividad de las lacasas fue determinada a través de la oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) [7,48,75], mediante un sistema de reacción conformado por agua bidestilada (700 µL), extracto crudo con la enzima (100 µL), buffer de acetatos 1 M a pH 5 (100 µL) y ABTS 5 mM (100 µL). La reacción comienza al añadir el ABTS, una vez que fue adicionado se incubó la muestra a 40 °C por un minuto, después se midió el cambio de la absorbancia en un espectrofotómetro

UV-Vis (marca Thermo Scientific, modelo Genesys 10S) en un minuto a 420 nm a temperatura ambiente.

Una unidad de enzima (U/mL), fue definida como 1  $\mu\text{mol}$  de ABTS oxidado por minuto por mililitro a las condiciones en las que se realizó el ensayo.

La actividad enzimática fue calculada mediante la Ecuación 3 [105]:

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\Delta Abs * V_r}{\xi * V_m * t * d} \quad (3)$$

Donde

$\xi$  = Coeficiente de extinción molar ( $0.036 \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) [42]

$\Delta Abs$  = Diferencial de absorbancia inicial y final

$V_r$  = Volumen total de la reacción ( $\mu\text{L}$ )

$V_m$  = Volumen de la muestra ( $\mu\text{L}$ )

$t$  = tiempo de la reacción (min)

$d$  = Paso de luz de la celda (cm)

### 3.5.2. Determinación de proteína

La determinación de proteína fue desarrollada a través del método de Bradford [106], empleando el ensayo estándar en microplaca. Se pipetearon 150  $\mu\text{L}$  de la muestra, se agregaron 150  $\mu\text{L}$  del reactivo *Quick Start* de Biorad por cada pocillo, después se mezclaron con ayuda del mixer del multilector y se sometieron a incubación por 15

minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se midió la absorbancia a 595 nm con un espectrofotómetro para microplacas (marca Thermo Scientific, modelo Multiskan GO). Previamente, se realizó la curva de calibración, para determinar la concentración de proteína usando como estándar albúmina sérica bovina a diferentes concentraciones (50, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 y 2000  $\mu\text{g/mL}$ ).

### **3.5.3. Determinación de azúcares reductores**

La determinación de los azúcares reductores se llevó a cabo según el método de Miller [107]. El ensayo consistió en agregar 0.25 mL de la muestra para después añadir 0.25 mL de solución de ácido 3, 5-dinitrosalicílico (1%) (marca Sigma-Aldrich) en un tubo de ensayo. Después, la preparación se llevó en baño maría a ebullición por 5 min, transcurrido este tiempo, las muestras fueron enfriadas en un baño maría. Posteriormente, se les adicionó 2.5 mL de agua bidestilada y se mezclaron con apoyo de un equipo vortex. Se dejaron reposar por 15 min y se midió la absorbancia a 575 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (marca Thermo Scientific, modelo Genesys 10S). La curva de calibración, fue realizada siguiendo la misma metodología, empleando dextrosa como estándar, a diferentes concentraciones (0.25, 0.5, 1, 3, 6 y 10 g/L).

#### **3.5.4. Determinación de peso seco**

Para la cuantificación del peso seco de la biomasa, primero se llevaron a peso constante filtros Whatman No. 1 a 80 °C. Estos filtros a peso contante se usaron para filtrar las muestras recolectadas al final de los cultivos. Una vez registrado el peso de cada filtro, se prosiguió a filtrar a vacío un volumen definido de las muestras resultantes de las cinéticas de producción de las lacasas. Posteriormente, los filtros fueron secados a 80 °C por 10 horas, para después enfriarse en un desecador y registrar su peso final. Finalmente, se obtuvo el peso seco de biomasa por diferencia durante el tiempo transcurrido de cada experimento.

#### **3.5.5. Determinación de compuestos fenólicos totales**

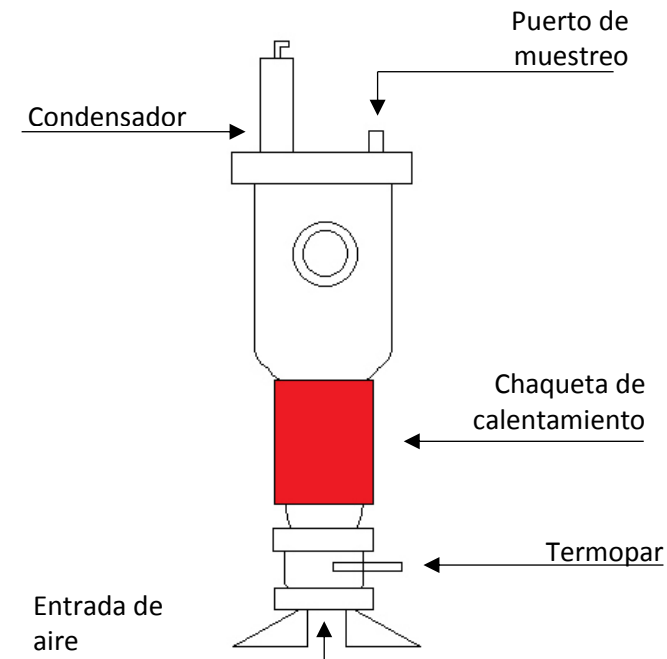
El contenido de fenoles totales se determinó mediante el uso del reactivo de Folin-Ciocalteu marca Sigma-Aldrich [108]. La preparación de la reacción se realiza al mezclar 0.5 mL del extracto enzimático, 0.75 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu, después se deja en reposo por 5 minutos, transcurrido este tiempo se le agrega 0.75 mL de solución de carbonato de sodio (20%). Se agitan fuertemente los tubos para asegurar su mezcla homogénea. Después, se dejan reposar los tubos de reacción por 90 minutos a temperatura ambiente. Una vez terminado el tiempo de reacción se mide la absorbancia a 760 nm.

Para la curva de calibración se realiza el mismo procedimiento pero la muestra de extracto enzimático es sustituida por la solución estándar de ácido tánico, la curva se construye a las siguientes concentraciones: 5, 10, 30, 60, 90, 120 mg/L.

### **3.6. Producción de lacasas en reactor *airlift***

Una vez obtenidas las condiciones óptimas para la producción de las lacasas por la metodología realizada en la sección 3.4, se llevó a cabo el escalamiento de dichas condiciones a un reactor *airlift* de 3.80 L (ez-Control CellReady Bioreactor 3 L Platform, marca Applikon Biotechnology). Para el cultivo sumergido en el reactor *airlift* se utilizó un volumen de reacción de 3.0 L y se inoculó el reactor con 8% del volumen total. Debido a la configuración del reactor tipo *airlift* se utilizó aire como fluido para la aireación; el flujo de aire utilizado fue de 1.0 vvm. El medio de cultivo empleado se preparó siguiendo la composición reportada en la Tabla 5. Previamente, se cultivó el hongo *Trametes versicolor* en el medio líquido a 30 °C bajo agitación constante (150 rpm) y dicho cultivo se empleó como inóculo en el reactor *airlift*. El pH no fue ajustado durante la fermentación.

Diariamente, se tomó una alícuota del medio para realizar los ensayos respectivos para la determinación de actividad enzimática, azúcares reductores, azúcares totales, proteína y peso seco. Además, se registró el valor de pH y temperatura durante los días que se llevó a cabo el crecimiento en medio sumergido en el reactor *airlift* (Figura 5).



**Figura 5.** Configuración del reactor *airlift* utilizado

### **3.7. Caracterización fisicoquímica del agua azul**

Para el presente trabajo se utilizó un efluente real de aguas azules recolectado en el aeropuerto internacional de la ciudad de Apodaca, Nuevo León. La caracterización fisicoquímica del efluente recolectado se realizó a través de pruebas de demanda química de oxígeno (DQO), demanda bioquímica de oxígeno ( $DBO_5$ ), sólidos suspendidos totales (SST), sólidos totales (ST), pH y temperatura [109].

### 3.8. Tratamiento enzimático de aguas azules en reactor *airlift*

Una vez obtenido el extracto de enzimas del cultivo sumergido, se evaluó la actividad de lacasas del extracto y se utilizó en la degradación de una muestra del efluente de aguas azules residuales provenientes del Aeropuerto Internacional de Monterrey empleando el reactor *airlift* (ez-Control CellReady Bioreactor 3 L Platform, marca Applikon Biotechnology). La dilución de las aguas azules en el reactor fue de 1:2. La actividad enzimática, probada en la degradación de aguas azules, fue de 280 U/mL. Las condiciones para la degradación se llevaron a cabo a temperatura ambiente ( $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ ), a 1.0 vvm de aireación, sin ajustar el pH del medio. El volumen de reacción fue de 1.0 L. Para evaluar el desempeño del tratamiento se llevaron a cabo las siguientes pruebas: demanda química de oxígeno (DQO) y demanda bioquímica de oxígeno ( $\text{DBO}_5$ ) mediante la metodología de la APHA [110]. Después se calculó el índice de biodegradabilidad (IB) mediante la siguiente ecuación (Ecuación 4):

$$IB = \frac{\text{DBO}_5}{\text{DQO}} \quad (4)$$

### 3.9. Disposición de los residuos generados

Los residuos generados en el presente trabajo fueron dispuestos en los contenedores asignados de acuerdo a lo establecido en el reglamento de los laboratorios y de seguridad e higiene de la Facultad de Ciencias Químicas.



**UANL**  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

# **CAPÍTULO 4**

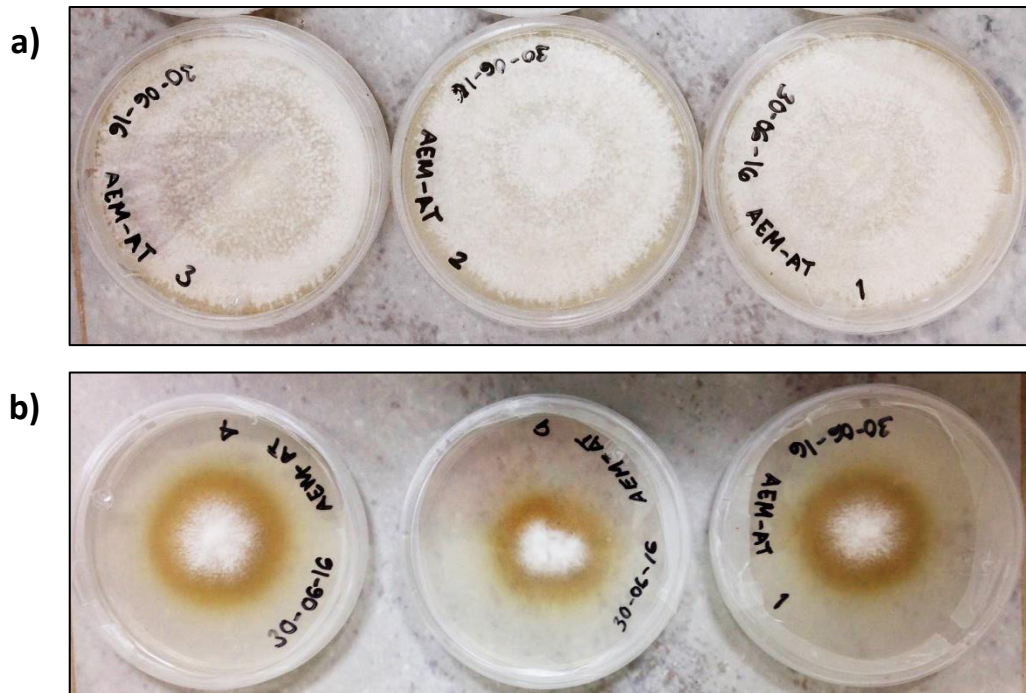
## **RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Actividad ligninolítica de *Trametes versicolor*

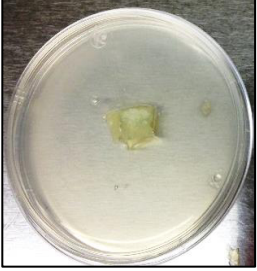
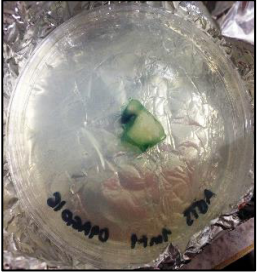
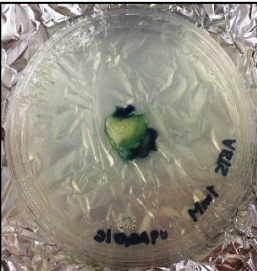
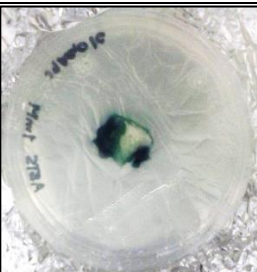

Se realizaron pruebas de confirmación de la actividad ligninolítica de la cepa *Trametes versicolor*, mediante la siembra en medio sólido empleando extracto de malta adicionado con ácido tánico al 0.01 %, así mismo se realizó la siembra en medio PDA adicionado con ABTS 1 mM.

En la Figura 6 se observa el ensayo de confirmación de actividad ligninolítica empleando ácido tánico en el medio de crecimiento, donde al metabolizar éste componente adicionado se desarrolla un color café, característico de los hongos de la pudrición blanca con actividad ligninolítica, de acuerdo a la reacción Bavendam (Figura 6b), y la coloración café no se desarrolla cuando el ácido tánico no está presente (Figura 6a) [102].



**Figura 6.** Crecimiento en placa de *Trametes versicolor* en medio extracto de malta (a) y extracto de malta adicionado con ácido tánico 0.01% (b)

Con la finalidad de realizar una segunda confirmación de la presencia de actividad ligninolítica de la cepa *Trametes versicolor*, se realizó la siembra en placa con medio PDA adicionado con ABTS 1 mM. En la Figura 7 se observa la coloración verde oscuro, propia de la oxidación del ABTS por *Trametes versicolor* al transcurrir el tiempo. Estos resultados confirman que la cepa fúngica utilizada produce enzimas con actividad ligninolítica.

a)		1 min
b)		30 min
c)		60 min
d)		180 min
e)		24 h

**Figura 7.** Crecimiento en placa de *Trametes versicolor* en PDA adicionado con ABTS 1 mM a diferentes tiempos de incubación a) 1 min, b) 30 min, c) 60 min, d): 180 min y e) 24 h

## 4.2. Condiciones de cultivo iniciales de la fermentación sumergida

### 4.2.1. Cinéticas de actividad de lacasas

Se llevó a cabo la optimización de la producción de lacasas en medio líquido según el diseño de experimentos de la Tabla 7. Complementario a la optimización, se realizó la cinética de la actividad enzimática de la cepa *Trametes versicolor*, para cada cosustrato a las temperaturas elegidas en el diseño, esto con la finalidad de conocer el comportamiento en el tiempo de la actividad de las lacasas y obtener el punto máximo de la actividad para cada tratamiento.

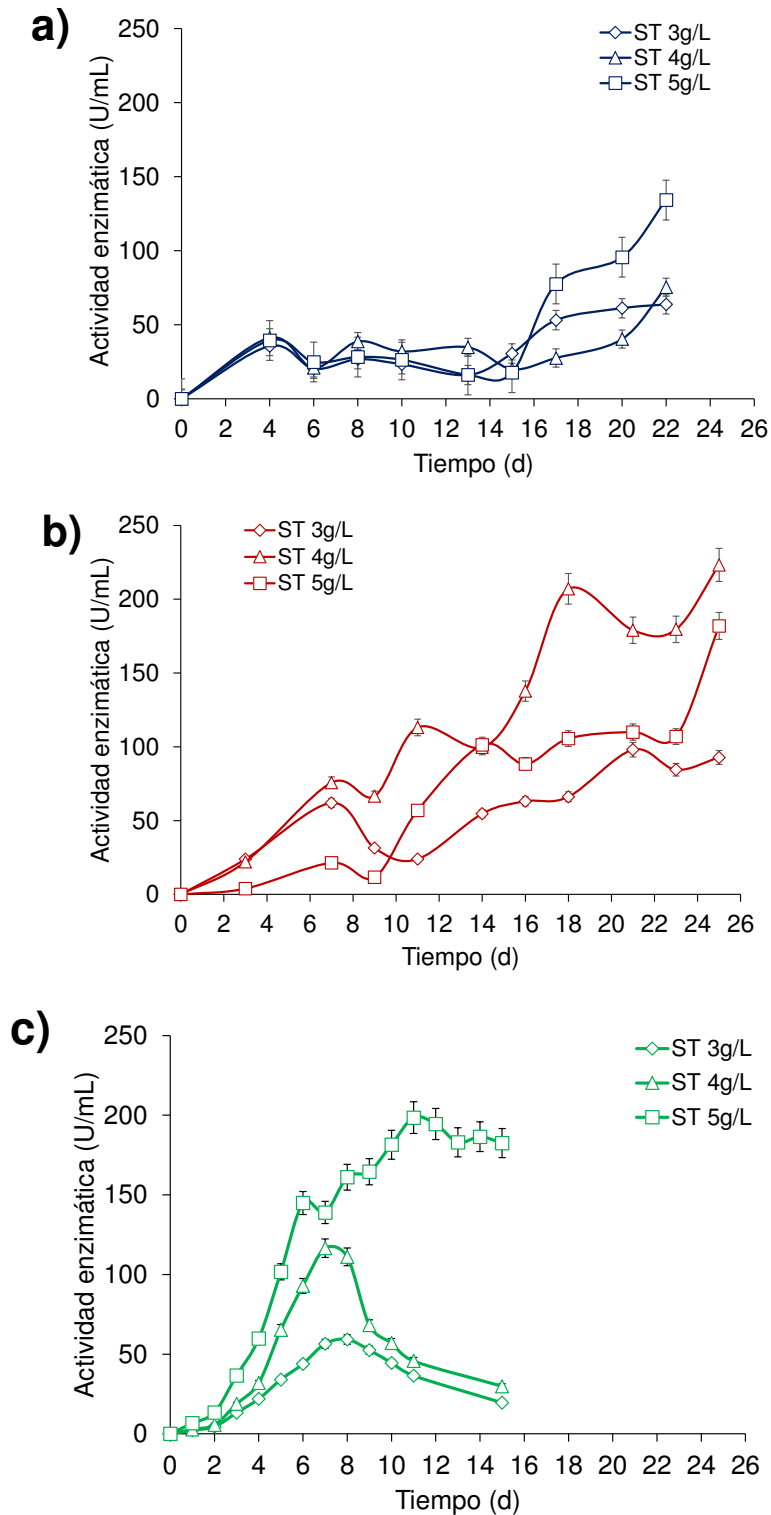
En la presente investigación, se evaluaron tres residuos lignocelulósicos como cosustratos en la producción de lacasas y, de acuerdo a la literatura reportada, los tres poseen diferente contenido de lignina. La estructura y composición química de los residuos lignocelulósicos es variable entre especies y, por esta razón, el proceso de degradación puede ser diferente entre sustratos [111]. En el caso del salvado de trigo esta reportado que su contenido de lignina puede variar entre 4.5 y 11.5 % [112,113], mientras que el bagazo de agave contiene entre 20 y 22 % de lignina [114–116] y las fibras de la cáscara de coco poseen aproximadamente 46 % de lignina en su contenido [117]. Conforme a los datos obtenidos, el salvado de trigo resultó ser el cosustrato con valores más altos de actividad de lacasas, en las tres temperaturas estudiadas.

En la Figura 8 se observa la actividad enzimática alcanzada por la cepa *Trametes versicolor* empleando salvado de trigo como cosustrato, a las diferentes temperaturas

evaluadas. De acuerdo a los resultados obtenidos, la mayor actividad se presentó a 30 °C con 4 g/L y 35 °C con 5 g/L logrando 223 U/mL y 198.47 U/mL, respectivamente; mientras que a 25 °C se alcanzaron 134 U/mL como máximo. Sin embargo, el tiempo en llegar a esta actividad varía según la temperatura, ya que para llegar a la actividad máxima a 30 °C fue necesario que transcurrieran 25 días, mientras que a 35 °C solo transcurrieron 11 días. Este comportamiento puede deberse a que la gran mayoría de los hongos basidiomicetes se desarrollan a una temperatura entre 25 °C y 30 °C, lo cual favorece su desarrollo celular y metabolismo enzimático; mientras que a 35 °C es posible que el metabolismo se aceleró alcanzando una máxima actividad en mayor tiempo [15]. Con relación a la concentración de cosustrato, se aprecia que a mayor concentración de salvado de trigo existe una mayor actividad de lacasas. El salvado de trigo ha sido reportado por diferentes autores como un cosustrato que incrementa la producción de lacasas. Por ejemplo, Castaño *et al.* [25] reportaron una actividad máxima de lacasas de 142 U/mL por el hongo *Xylaria sp.* empleando 40 g/L de salvado de trigo a 26 °C. De la misma forma, Songulashvili *et al.* [118] emplearon salvado de trigo para estimular la producción de lacasas y reportaron una actividad de 400 U/mL por el hongo *Cerrena unicolor*; sin embargo, es importante mencionar que ellos utilizaron CuSO<sub>4</sub> como inductor en la fermentación, lo que favoreció su actividad enzimática mayormente.

El salvado de trigo fue el cosustrato lignocelulósico mejor metabolizado por el hongo, ya que se alcanzaron valores de actividad enzimática mayores en relación a los otros dos sustratos evaluados. Esto puede deberse a que durante la fermentación, las

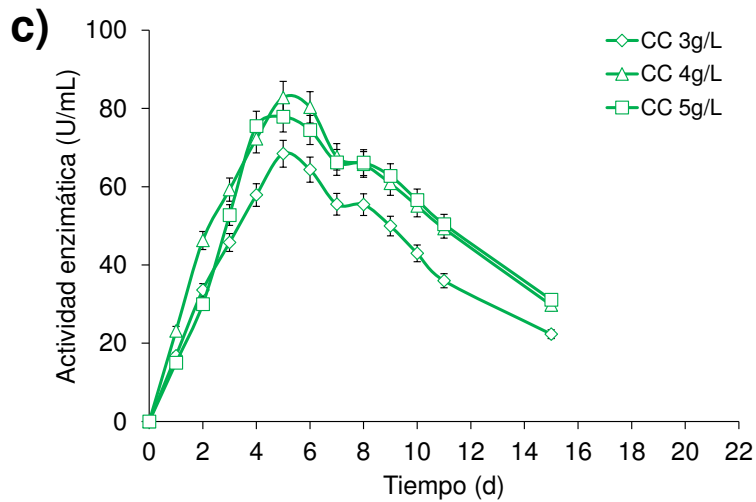
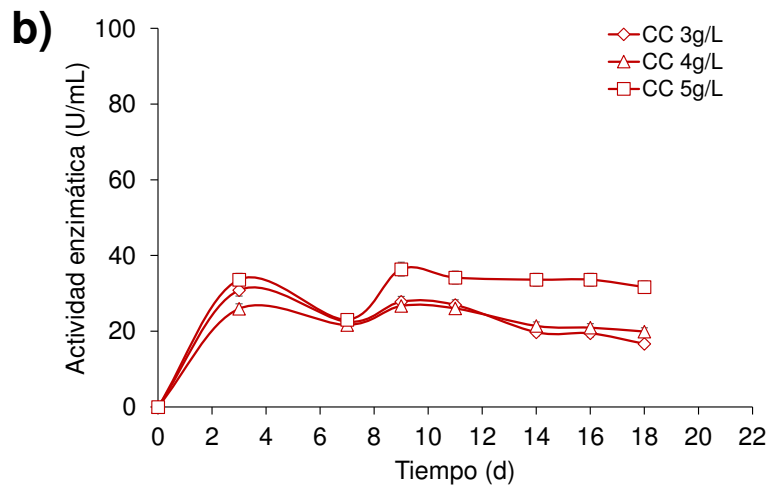
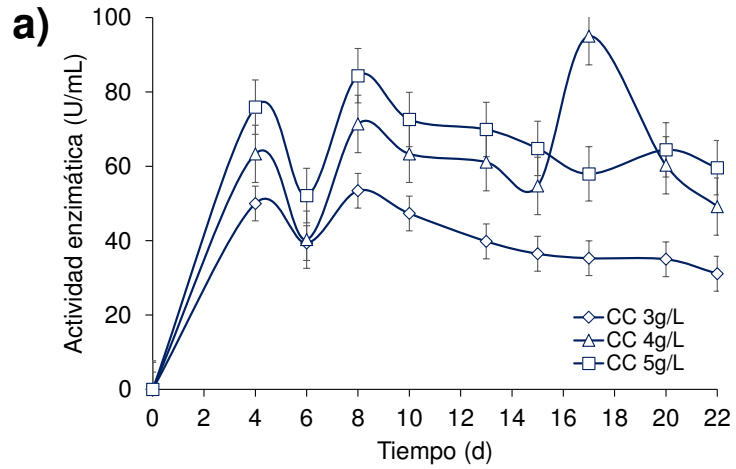
enzimas ligninolíticas presentaron mayor selectividad por la estructura lignocelulósica de este residuo, también debido a que en su conformación química existen extractivos fenólicos como el ácido ferúlico, ácido vanílico, ácido *p*-cumárico y ácido sirínico, entre otros [96,119], que pudieron servir como mediadores, favoreciendo la oxidación de las estructuras más complejas y convirtiendo a estas últimas en estructuras más simples que también tomaron el papel de mediadores en las reacciones enzimáticas posteriores. Esta idea será más detallada en el apartado 4.4.1 con otros experimentos adicionales realizados durante este proyecto.



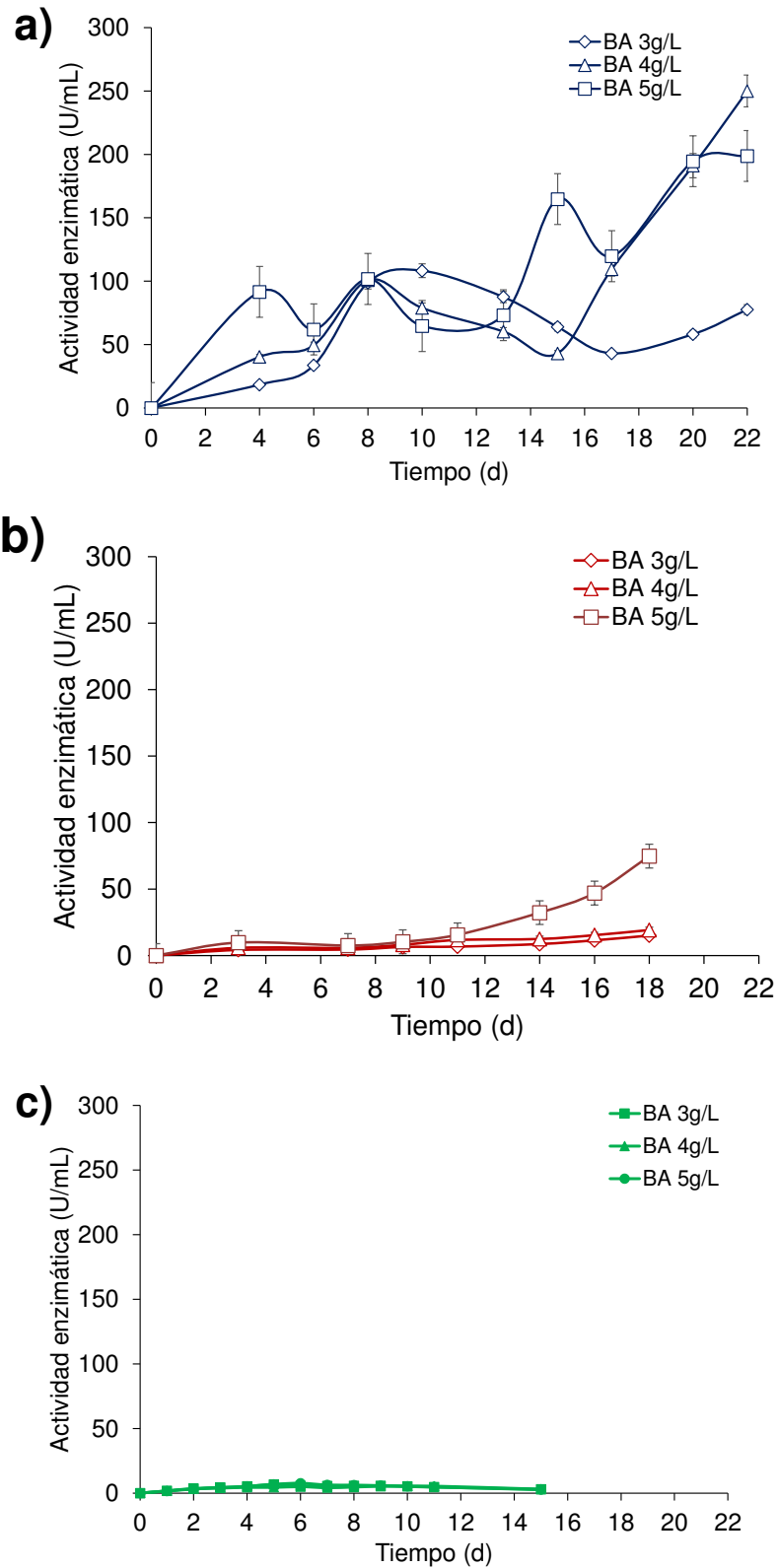
**Figura 8.** Producción enzimática de la cepa *Trametes versicolor* bajo diferentes concentraciones (3, 4 y 5 g/L) de salvado de trigo a 25 °C (a), 30 °C (b) y 35 °C (c)

El uso de las fibras de cáscara de coco resultó ser el cosustrato menos prometedor en la producción de lacasas, se alcanzó una actividad máxima de 95 U/mL a 25 °C a una concentración de 4 g/L. En la Figura 9 se observa una tendencia similar en las tres temperaturas evaluadas. No existe reporte en la literatura donde éste tipo de residuo haya sido empleado como cosustrato en un tratamiento enzimático ligninolítico, por lo que es difícil su comparación. Sin embargo, el contenido de lignina en este residuo es mayor en comparación a los otros dos residuos, además que su naturaleza lo hace un residuo más rígido y posiblemente de difícil asimilación por el hongo utilizado en este estudio [117]. La fibra de cáscara de coco, también posee polifenoles, flavonoides y taninos en su conformación; sin embargo, es posible que por ser moléculas más complejas resulta en una actividad enzimática menor.

Cuando se utilizó bagazo de agave como cosustrato, el comportamiento de la producción de lacasas fue notoriamente mejor a la temperatura más baja evaluada (25°C), la actividad enzimática máxima de lacasa registrada fue de 251 U/mL al día 22 con 4 g/L del cosustrato, mientras que a 30°C y 35°C se obtuvieron solamente 74 U/mL y 7.64 U/mL, respectivamente (Figura 10). El bagazo de agave contiene compuestos fenólicos, como por ejemplo algunos derivados del ácido benzoico, flavones y quercetin-3-o-glucósido, entre otros [120], los cuales pueden inducir la actividad de las lacasas en cultivos sumergidos de hongos.



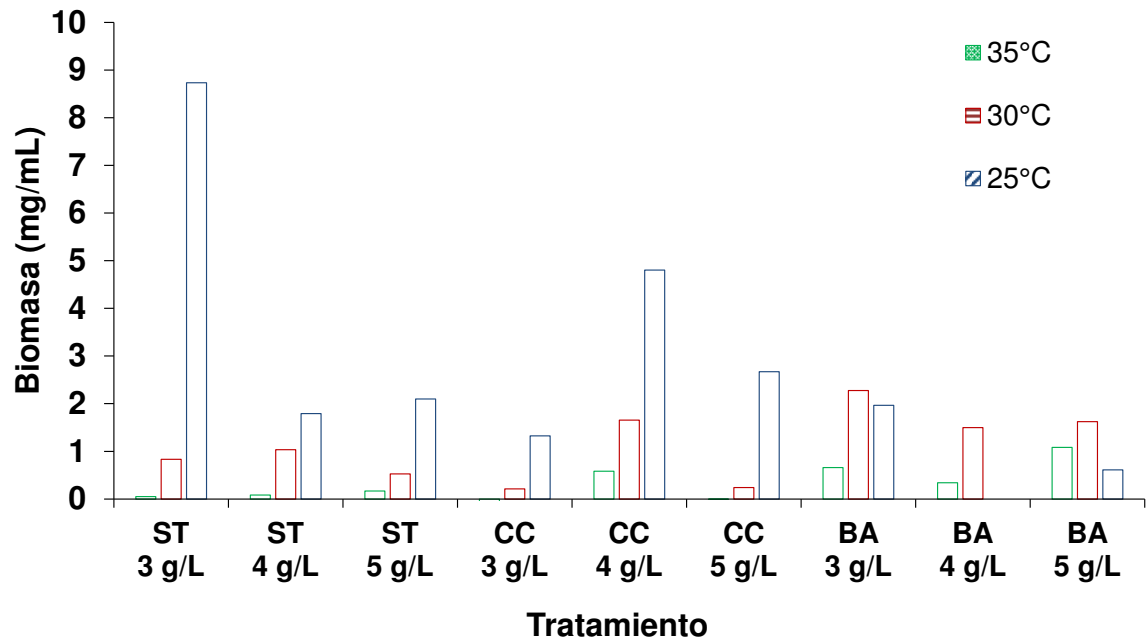
**Figura 9.** Producción enzimática de la cepa *Trametes versicolor* bajo diferentes concentraciones (3, 4 y 5 g/L) de fibra de cáscara de coco a 25 °C (a), 30 °C (b) y 35 °C (c)



**Figura 10.** Producción enzimática de la cepa *Trametes versicolor* bajo diferentes concentraciones (3, 4 y 5 g/L) de bagazo de agave a 25 °C (a), 30 °C (b) y 35 °C (c)

#### 4.2.2. Efecto en la producción de biomasa

El crecimiento de la biomasa total, durante la optimización de la producción de lacasas, se realizó al final de cada cinética enzimática mediante el ensayo de peso seco. En la Figura 11 se observan los resultados obtenidos de peso seco (mg/mL) de cada tratamiento efectuado. A partir de estos resultados, es posible observar que la temperatura juega un papel importante en el desarrollo del hongo, ya que a 25 °C fue la temperatura donde el hongo presentó mayor cantidad de biomasa (máximo 8.9 mg/mL), seguido por 30 °C (máximo 2 mg/mL) y, por último, a 35 °C (máximo 1.2 mg/mL). La mayoría de los hongos se encuentran en la categoría de mesófilos, es decir, que su rango de temperatura está entre 10 y 35 °C, mientras que su temperatura óptima de crecimiento ronda entre los 20 y 30 °C [15]. Sin embargo, no se observa una relación definida entre la biomasa desarrollada y la actividad de lacasa, ya que a 35 °C y 30 °C donde se produjo una menor cantidad de biomasa, la actividad de lacasas obtenida fue mayor. Sin embargo, esto concuerda con lo reportado por Galhaup *et al.* [73], quienes indican que la actividad de lacasas no se encuentra directamente relacionada con el crecimiento del hongo.



**Figura 11.** Peso seco obtenido de la cepa *Trametes versicolor* utilizando los diferentes residuos lignocelulósicos a 25, 30 y 35°C

### 4.3. Análisis estadístico

#### 4.3.1. Desarrollo de los modelos

Se llevó a cabo la optimización de la producción de lacasas en medio líquido según el diseño de experimentos mostrado en la Tabla 7. Los resultados experimentales del diseño de experimentos fueron analizados con la finalidad de obtener un modelo de segundo orden que incluyera términos de la interacción entre las variables experimentales mediante el software Design Expert 7.0. Los modelos obtenidos para cada residuo lignocelulósico (ST, CC y BA) describen la actividad enzimática de lacasa

(U/mL) en términos de los parámetros codificados y se estimaron basándose en el análisis estadístico de los datos experimentales mostrados en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Diseño de experimentos de CCD 2<sup>2</sup> y resultados correspondientes (actividad enzimática).

Tratamiento	Tipo	Temperatura A (°C)	Concentración residuo lignocelulósico B (g/L)	Actividad enzimática (U/mL)		
				ST	CC	BA
1	Factorial	-1	-1	24.44	36.67	43.05
2	Factorial	-1	-1	18.06	38.89	49.44
3	Factorial	-1	-1	27.22	42.50	36.67
4	Factorial	1	-1	47.78	56.94	2.92
5	Factorial	1	-1	33.61	78.06	2.92
6	Factorial	1	-1	28.06	70.28	3.06
7	Factorial	-1	1	15.56	53.06	162.78
8	Factorial	-1	1	38.33	57.78	76.67
9	Factorial	-1	1	25.00	45.56	119.72
10	Factorial	1	1	146.39	76.53	2.22
11	Factorial	1	1	198.47	79.17	3.19
12	Factorial	1	1	250.56	77.92	2.50
13	Axial	-1	0	31.94	40.28	109.44
14	Axial	1	0	45.69	82.78	3.06
15	Axial	0	-1	23.89	22.50	15.00
16	Axial	0	1	56.94	23.06	74.72
17	Central	0	0	105.28	9.44	23.61
18	Central	0	0	148.89	17.78	17.50
19	Central	0	0	85.28	37.78	16.39

*ST: salvado de trigo, CC: fibra de cáscara de coco, BA: bagazo de agave*

Además, se obtuvieron los análisis de varianza (ANOVA) para cada cosustrato evaluado, los datos obtenidos se muestran en las Tablas 8, 9 y 10.

**Tabla 8.** ANOVA de la actividad enzimática empleando salvado de trigo como cosustrato.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	Valor F	Valor $p$ Prob > F
Modelo	63563.89	5	12712.78	8.45	0.0009
A-Temperatura	23207.96	1	23207.96	15.42	0.0017
B-Concentración de residuo	19927.48	1	19927.48	13.24	0.0030
AB	18944.85	1	18944.85	12.59	0.0036
A <sup>2</sup>	458.63	1	458.63	0.30	0.5903
B <sup>2</sup>	349.10	1	349.10	0.23	0.6381
Residuales	19564.17	13	1504.94		
Falta de ajuste	11509.76	3	3836.59	4.76	0.0259
Error	8054.41	10	805.44		
Total	83128.06	18			

$R^2=0.7647$ ; C.V.= 54.54%;  $\alpha=0.05$ ; gl=grados de libertad

**Tabla 9.** ANOVA de la actividad enzimática empleando fibra de cáscara de coco como cosustrato.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	Valor F	Valor $p$ Prob > F
Modelo	8609.40	5	1721.88	24.82	< 0.0001
A-Temperatura	3058.87	1	3058.87	44.10	< 0.0001
B-Concentración de residuo	322.94	1	322.94	4.66	0.0502
AB	8.33	1	8.33	0.12	0.7344
A <sup>2</sup>	4204.45	1	4204.45	60.61	< 0.0001
B <sup>2</sup>	1.71	1	1.71	0.02	0.8775
Residuales	901.75	13	69.37		
Falta de ajuste	152.58	3	50.86	0.68	0.5847
Error	749.17	10	74.92		
Total	9511.15	18			

$R^2= 0.9052$ ; C.V.= 16.71%;  $\alpha=0.05$ ; gl=grados de libertad

**Tabla 10.** ANOVA de la actividad enzimática empleando bagazo de agave como cosustrato.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	Valor F	Valor <i>p</i> Prob > F
Modelo	35064.70	5	7012.94	16.66	< 0.0001
A-Temperatura	23854.89	1	23854.89	56.69	< 0.0001
B-Concentración de residuo	5955.06	1	5955.06	14.15	0.0024
AB	4446.75	1	4446.75	10.57	0.0063
A <sup>2</sup>	542.45	1	542.45	1.29	0.2767
B <sup>2</sup>	14.79	1	14.79	0.04	0.8542
Residuales	5470.70	13	420.82		
Falta de ajuste	1650.95	3	550.32	1.44	0.2886
Error	3819.74	10	381.97		
Total	40535.40	18			

R<sup>2</sup>= 0.865; C.V.= 50.96%; α=0.05; gl=grados de libertad

Las ecuaciones obtenidas que describen la actividad enzimática de lacasas, para los tres residuos, las cuales están dadas por las Ecuaciones 5, 6 y 7 (A: Temperatura, B: Concentración de residuo).

$$ST(y) = 88.43 + 40.72 A + 37.73 B + 39.73 AB - 12.54 A^2 - 10.94 B^2 \quad (5)$$

$$CC(y) = 22.42 + 14.78 A + 4.80 B - 0.83 AB + 37.98 A^2 - 0.77 B^2 \quad (6)$$

$$BA(y) = 28.54 - 41.28 A + 20.62 B - 19.25 AB + 13.64 A^2 + 2.25 B^2 \quad (7)$$

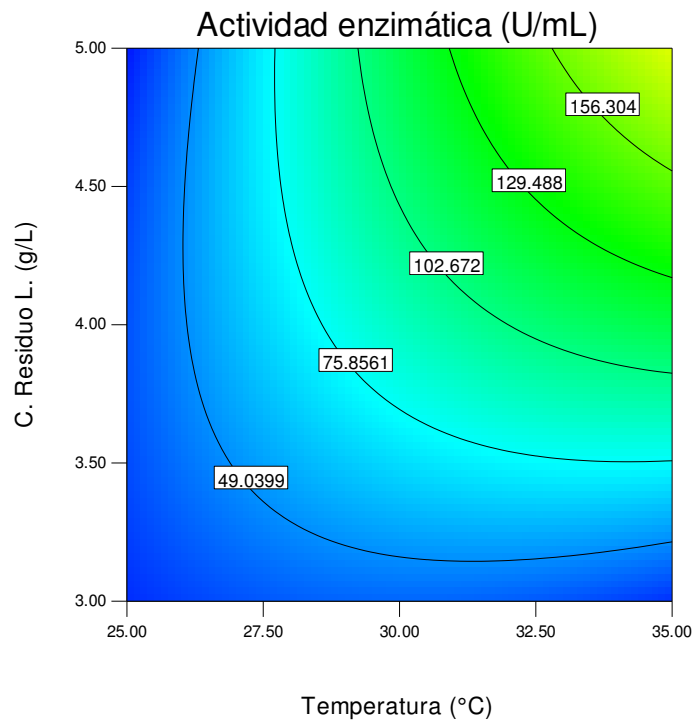
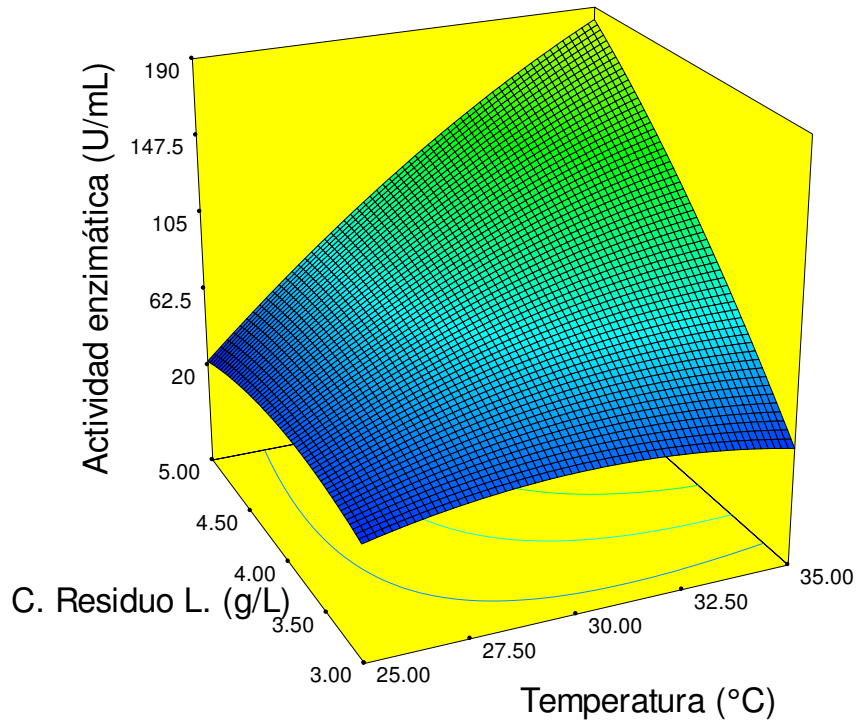
#### **4.3.2. Efecto de la temperatura y la concentración de residuo**

Los gráficos de superficie de respuesta y de contorno mostrados en las Figuras 12, 13 y 14, representan el efecto de la temperatura y la concentración del residuo seleccionado (ST, CC y BA).

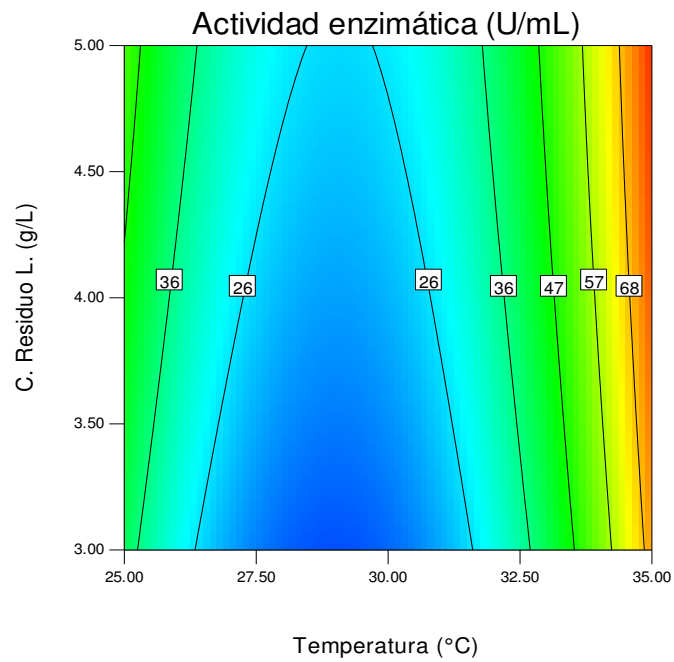
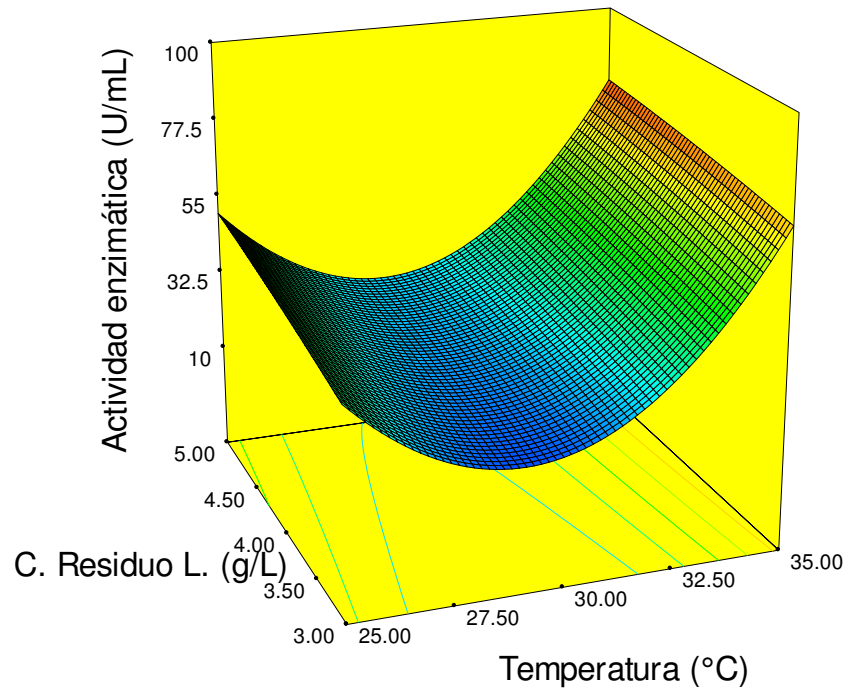
La Figura 12 muestra que existe una correlación en la concentración de salvado de trigo y la temperatura, ya que cuando estos dos parámetros aumentan, la actividad enzimática se incrementa. Esto puede deberse a que al aumentar la temperatura de la fermentación se acelera el metabolismo enzimático del hongo aunado a que existe mayor disponibilidad de cosustrato, dando como resultado mayor actividad enzimática [15].

En el caso de la fibra de cáscara de coco como cosustrato, la Figura 13 presenta un comportamiento similar al ST como cosustrato, ya que existe un aumento de la actividad enzimática cuando la temperatura y la concentración del residuo están en los límites superiores de los rangos estudiados, es decir, 35 °C y 5 g/L. Este comportamiento es análogo al discutido previamente para el salvado de trigo, el metabolismo del hongo se acelera cuando se aumenta la temperatura.

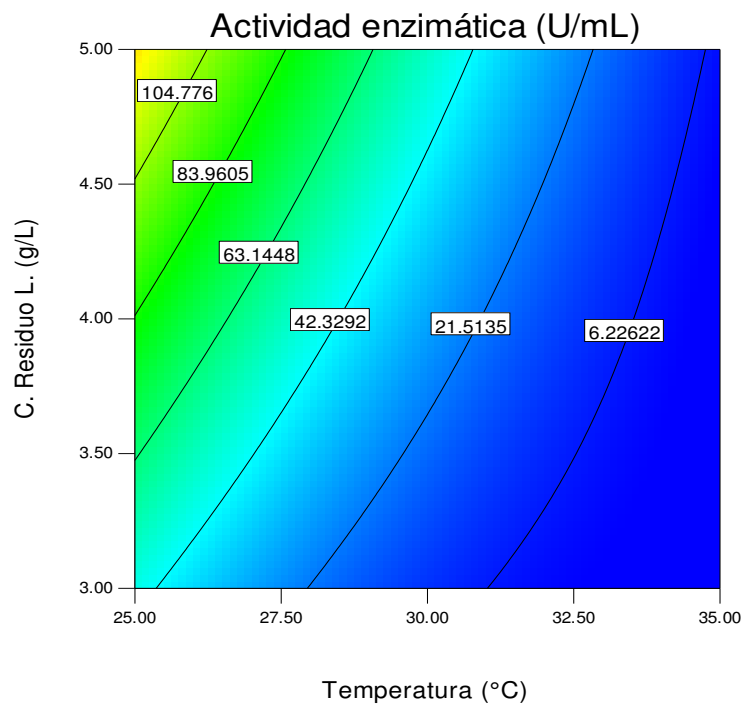
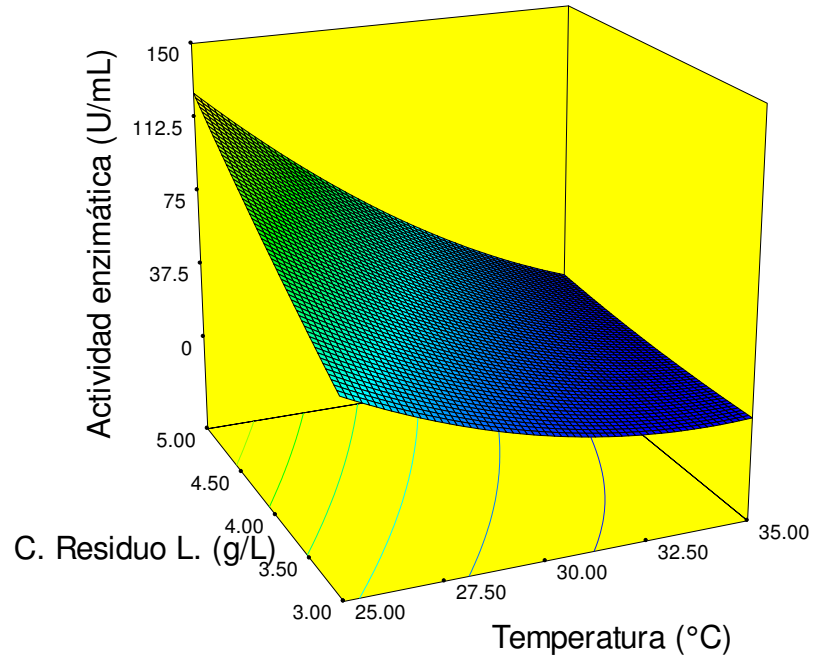
De forma contraria, el comportamiento del bagazo de agave fue inverso a los anteriores cosustratos en relación a la temperatura, dado que la actividad de lacasas fue mayor a 25 °C, el límite inferior de estudio. La tendencia con respecto a la concentración del residuo es la misma que con ST y BA, es decir, a mayor concentración del cosustrato mayor actividad enzimática (Figura 14).



**Figura 12.** Gráfico de superficie de respuesta y contorno de la interacción entre la temperatura y la concentración de salvado de trigo en la actividad enzimática



**Figura 13.** Gráfico de superficie de respuesta y contorno de la interacción entre la temperatura y la concentración de fibras de cáscara de coco en la actividad enzimática



**Figura 14.** Gráfico de superficie de respuesta y contorno de la interacción entre la temperatura y la concentración de bagazo de agave en la actividad enzimática

### 4.3.3. Función de deseabilidad

La función de deseabilidad fue utilizada para la optimización de la respuesta (actividad enzimática de lacasas). La optimización numérica se obtuvo manteniendo los rangos de estudio de cada variable, mientras que la respuesta se buscó ser maximizada. Las condiciones óptimas fueron obtenidas, así como el valor de deseabilidad para cada cosustrato utilizado (Tabla 11). Las condiciones óptimas fueron las mismas a las evaluadas en el diseño de experimentos, donde se encontraron resultados por encima de la predicción. Los valores máximos de deseabilidad fueron 0.713 para el salvado de trigo, bajo los valores más altos de los rangos evaluados para ambos factores, 35 °C y 5 g/L; mientras que el valor de deseabilidad para la fibra de cáscara de coco fue de 0.94, a las mismas condiciones del salvado de trigo, es decir, 35 °C y 5 g/L; por último, el valor de deseabilidad para el bagazo de agave fue 0.768 y los valores máximos de actividad enzimática se obtuvieron a 25 °C y una concentración de cosustrato de 5 g/L (Figura 15-17).

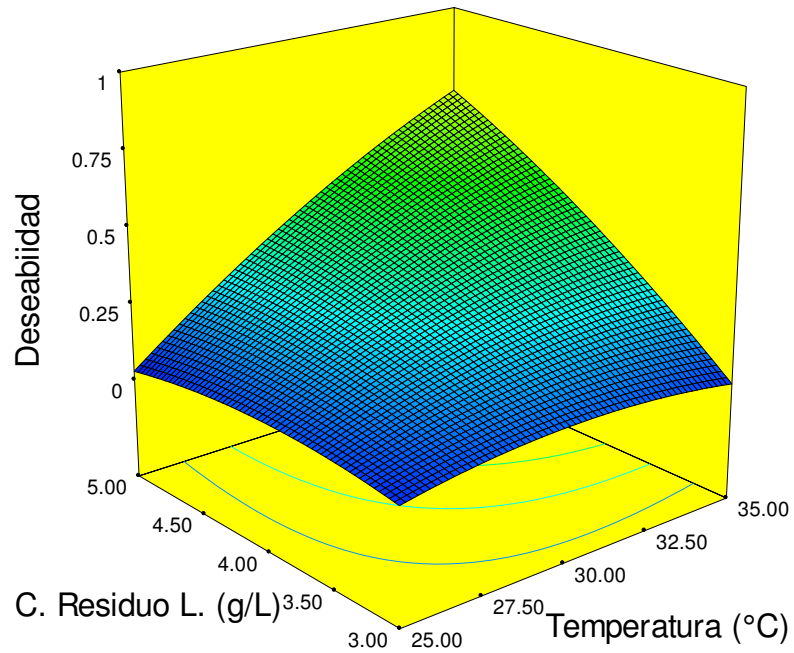
De acuerdo a los resultados obtenidos, la concentración óptima para los tres cosustratos estudiados fue el máximo valor estudiado (5 g/L), lo que demuestra que a mayor concentración la actividad enzimática aumenta. Sin embargo, en este estudio no se evaluó la concentración máxima de cosustrato fuera de los rangos de estudio. Por otro lado, la temperatura óptima fue la misma para el salvado de trigo y las fibras de cáscara de coco (35 °C), mientras que para el bagazo de agave fue distinta (25 °C). Esta variación puede deberse a la complejidad de los cosustratos evaluados y a la

disponibilidad de compuestos metabolizables por el organismo para la producción de lacasas [76,121]; otro factor que no se consideró en el estudio estadístico y que puede tener un efecto en la respuesta es el tiempo al cual se alcanzó la actividad enzimática máxima, ya que se optó por seleccionar el tratamiento que tardó menos tiempo en alcanzar este punto máximo y después se realizó el análisis estadístico seleccionando la actividad enzimática a el mismo día para todos los tratamientos.

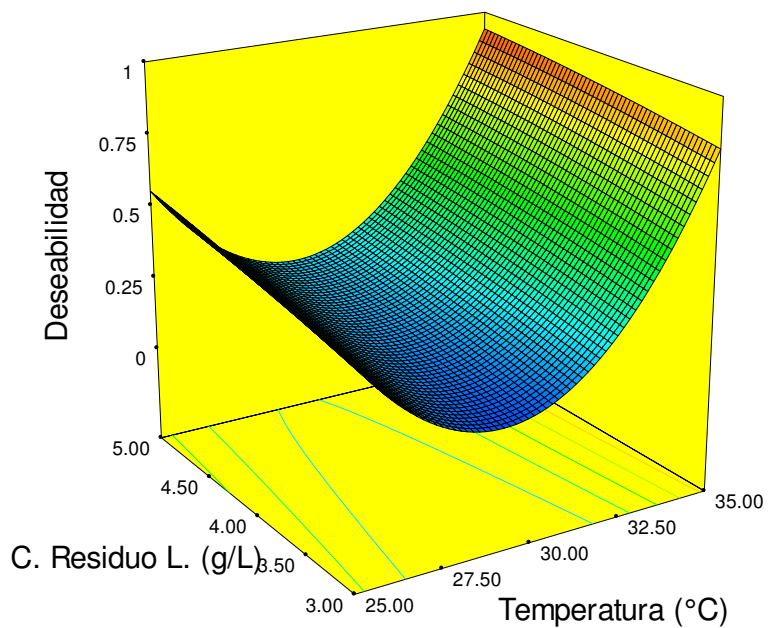
**Tabla 11.** Condiciones óptimas y valores de deseabilidad.

Residuo ligninolítico	Temperatura (°C)	Concentración de residuo (g/L)	Actividad enzimática, Predicción (U/mL)	Actividad enzimática, Experimental (U/mL)	D
Salvado trigo	35	5	183.12	198.47	0.713
Fibra de cáscara de coco	35	5	78.38	80	0.94
Bagazo de agave	25	5	125.5	200	0.768

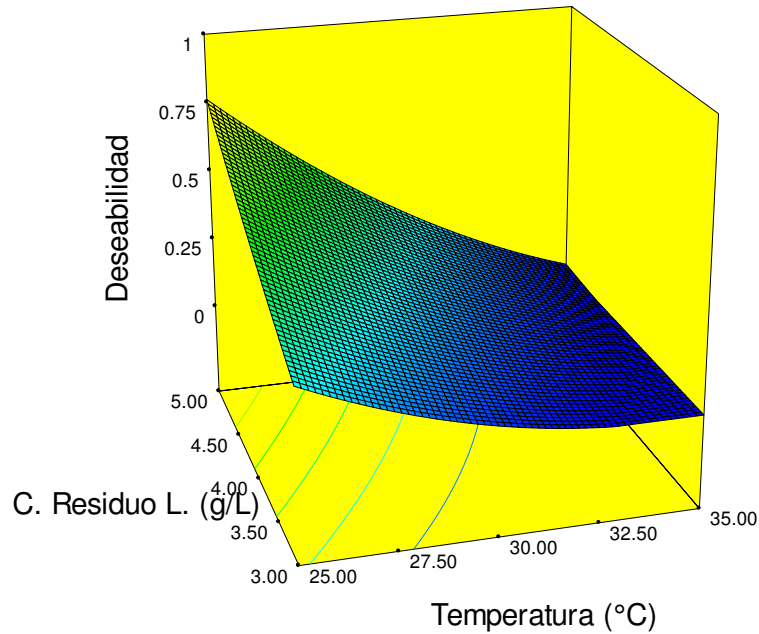
D: deseabilidad



**Figura 15.** Gráfico de superficie de respuesta de la función de deseabilidad usando como cosustrato el salvado de trigo



**Figura 16.** Gráfico de superficie de respuesta de la función de deseabilidad usando como cosustrato las fibras de cáscara de coco



**Figura 17.** Gráfico de superficie de respuesta de la función de deseabilidad usando como cosustrato el bagazo de agave

#### 4.4. Producción de lacasas por *Trametes versicolor* en reactor *airlift*

Una vez obtenidas las mejores condiciones de cultivo (temperatura, tipo y concentración de residuo lignocelulósico), se llevó a cabo la producción de lacasas mediante una fermentación sumergida en un reactor *airlift*, en un volumen de trabajo de 3.0 L. Las condiciones de operación del reactor *airlift* se describen en apartado 3.6. Previamente, se preparó el inóculo (250 mL) en medio líquido según la composición descrita en la Tabla 6 y se incubó por cinco días a  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y 150 rpm. A continuación, se preparó el medio de crecimiento descrito en la Tabla 6, adicionando 5 g/L de salvado de trigo y se efectuó la fermentación a  $30^{\circ}\text{C}$  y  $35^{\circ}\text{C}$ . La glucosa fue empleada como fuente de carbono principal, con la finalidad de favorecer el desarrollo del micelio en la

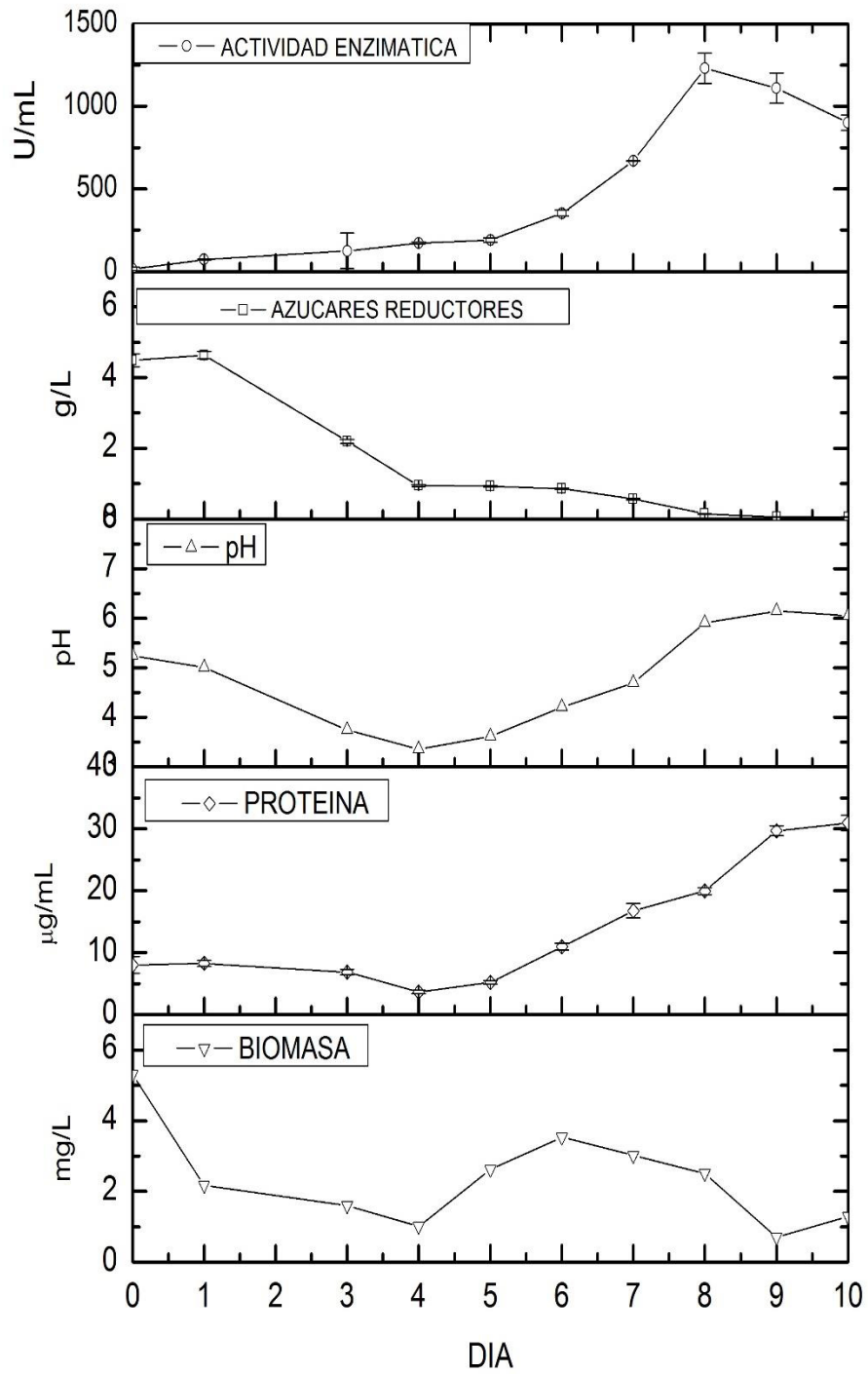
etapa inicial de cultivo. El salvado de trigo fue usado como cosustrato y como inductor en la producción de enzimas ligninolíticas, por su naturaleza lignocelulósica [26,118]. La cantidad total de azúcares solubles fue aproximadamente 5 g/L (Figura 18 y 19). La concentración de azúcares fue disminuyendo con relación al tiempo en ambas temperaturas de operación evaluadas; los azúcares presentes en el medio fueron consumidos completamente a partir del cuarto día para 30 °C y tercer día para 35 °C.

Por otro lado, se midió la concentración de proteína diariamente, para evaluar la relación entre la concentración de proteína y la actividad enzimática. En las Figura 18 y 19 se muestra que la concentración de proteína comenzó con 10 µg/mL y para el día 9 alcanzó un valor de 30 µg/mL a 30 °C; este mismo comportamiento ascendente se observó en la actividad enzimática, lo que permite relacionar la cantidad de proteína con la presencia de enzimas en el sistema, esta tendencia es de esperarse por la naturaleza proteica de las enzimas. Este mismo comportamiento se presentó a 35 °C, donde la concentración máxima de proteína fue 25 µg/mL. La relación directa de la producción enzimática y la concentración de proteína ha sido reportada por varios autores [118,122]. Al mismo tiempo se evaluó la concentración de biomasa, mediante la metodología de peso seco. En la Figura 18 y 19, se observa un incremento periódico en la cantidad de biomasa producida; sin embargo, ésta comienza a disminuir después del séptimo día. Esto puede deberse a que la fuente principal de azúcares disminuyó, provocando una disminución en la producción de la biomasa. Esta tendencia ha sido observada para varios microorganismos en diversos estudios [11,118,123]. Otro parámetro evaluado fue el pH, es importante mencionar que durante la fermentación

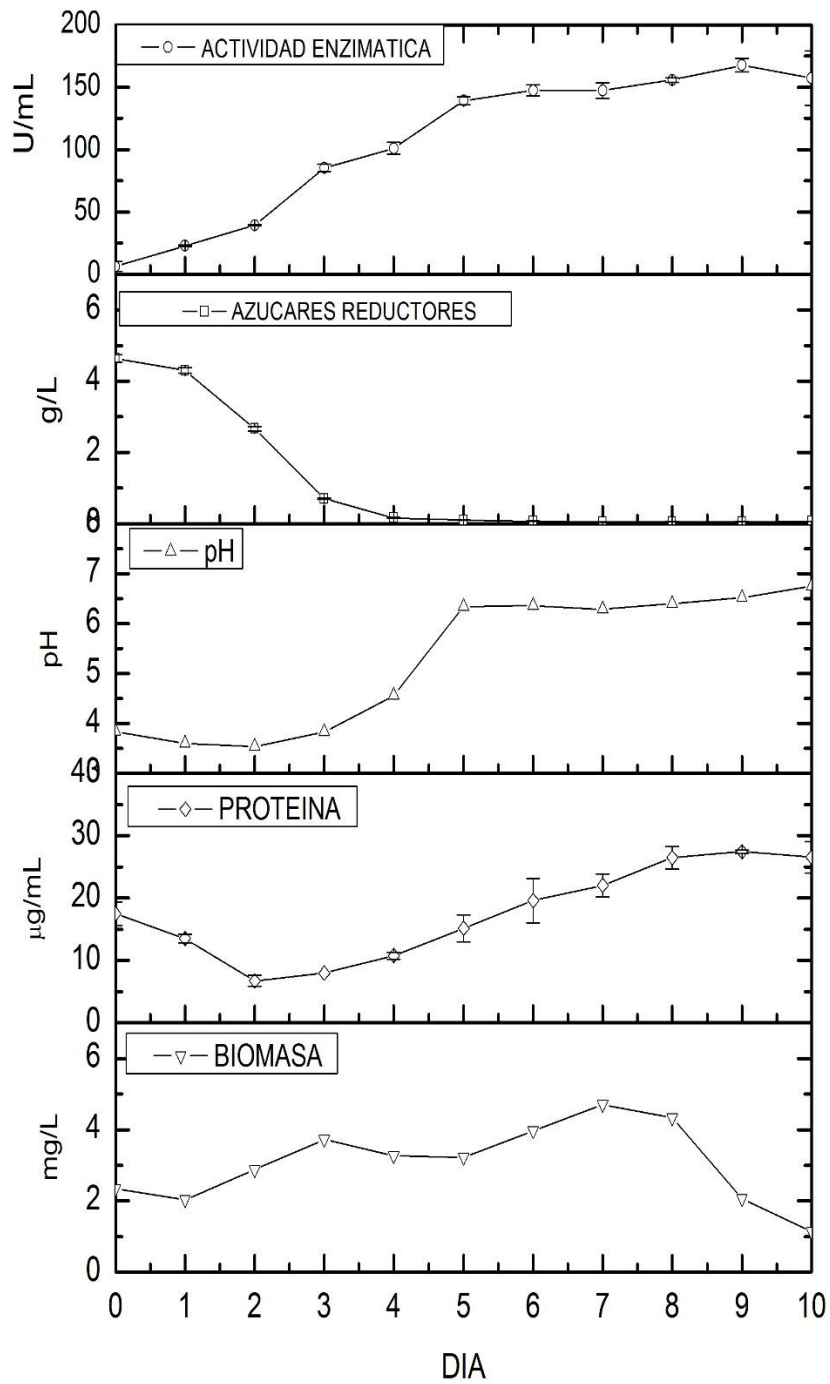
no se realizó ajuste del mismo con la finalidad de reproducir el tratamiento bajo las mínimas condiciones de operación. Sin embargo, durante el experimento fue monitoreado diariamente para conocer su comportamiento. El pH inicial de la fermentación fue 3.9. En las Figuras 18 y 19, se muestra la misma tendencia para las dos temperaturas evaluadas, ya que éste parámetro fue incrementando hasta lograr casi la neutralidad (6 – 6.5). Es posible que el aumento del pH en el medio, para ambas temperaturas de operación, se haya debido a la acumulación de células muertas y metabolitos extracelulares segregados por el hongo durante la fermentación. Este hecho provocó que la actividad enzimática no aumentará aún más su valor máximo alcanzado, ya que el pH óptimo para estas enzimas oscila entre 4 y 5 [25,42,51] . Específicamente, para la cepa *Trametes versicolor* utilizada en esta investigación se encontró que el pH óptimo que fue cercano a 4.5 [101], lo que soporta la idea de que se haya presentado una posible inhibición en la actividad enzimática. Una vez conocido el comportamiento de los distintos parámetros evaluados durante la fermentación, es importante interpretar los resultados obtenidos con relación a la respuesta clave de este estudio, la actividad enzimática. En las Figuras 18 y 19, se presentan los resultados de la cinética de la actividad de lacasas bajo las dos temperaturas evaluadas. Sin embargo, fue notorio observar que en la temperatura de 30 °C se obtuvo mayor actividad enzimática en comparación que a 35 °C. La actividad enzimática máxima a 30 °C fue de 1200 U/mL mientras que a 35 °C sólo se obtuvo 167 U/mL. Este hecho está relacionado directamente a la temperatura a la cual se llevó la reacción aunado al tipo de configuración empleado que estimuló la producción enzimática, específicamente

por la aireación y el consecuente aumento de la concentración de oxígeno disuelto presente en la reacción [15,63,67,124].

La implementación de los reactores tipo *airlift* en cultivos fúngicos ha sido promovida por sus ventajas sobre otras configuraciones de reactores, entre los beneficios se encuentran: menor consumo de energía, costos reducidos de operación, simplicidad mecánica, distribución homogénea de los constituyentes del medio y del calor, entre otros [83]. En la Tabla 4 se presenta una comparación de la producción de lacasas por hongos en biorreactores, a escala de laboratorio en los últimos años. Se puede observar que existen diferentes factores que juegan un papel importante en el desempeño del proceso, para alcanzar una actividad enzimática satisfactoria. Tales factores pueden ser la especie del hongo, configuración del reactor, composición del medio y uso de inductores, entre otros.



**Figura 18.** Perfil de diferentes parámetros en la producción de lacasas por *Trametes versicolor* en el reactor *airlift* a 30°C

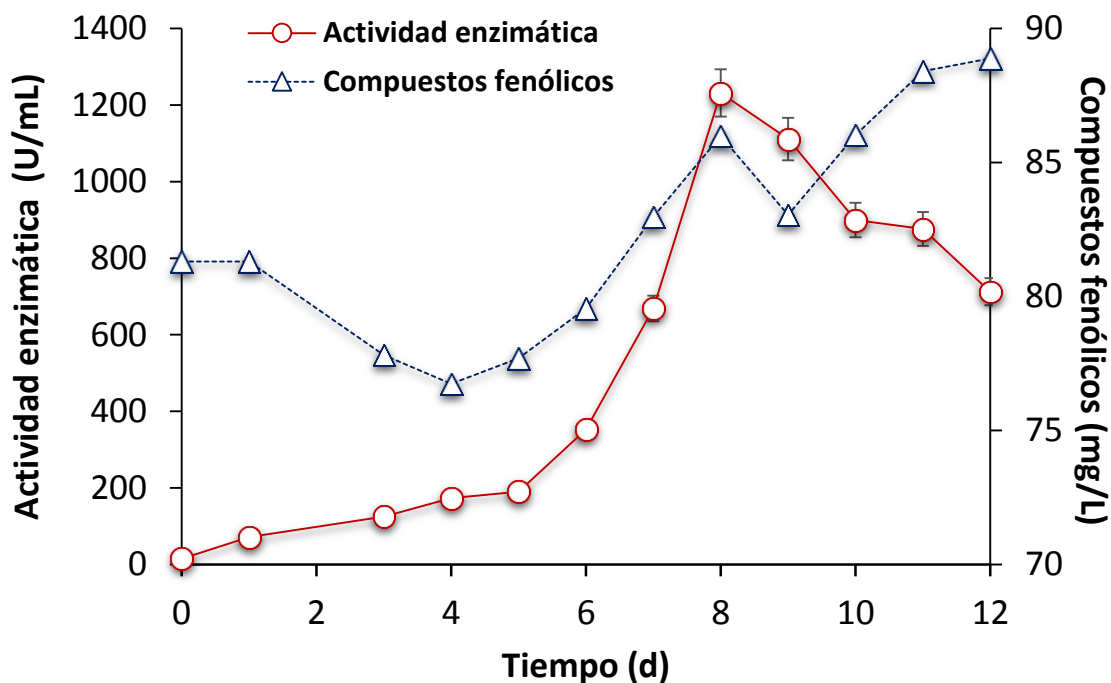


**Figura 19.** Perfil de diferentes parámetros en la producción de lacasas por *Trametes versicolor* en el reactor airlift a 35°C

#### 4.4.1. Formación de compuestos fenólicos en la producción de lacasas

Las enzimas ligninolíticas, especialmente las lacasas, juegan un papel importante en la descomposición natural de la lignina, aunado a que la lignina es el mayor componente estructural de las plantas, éstas enzimas son aprovechadas y aplicadas para diferentes usos como la degradación de contaminantes en efluentes reales como tecnología de bioremediación [16]. La formación de compuestos fenólicos monoméricos durante las distintas reacciones enzimáticas es el resultado directo de la degradación de la lignina [121]. Los compuestos fenólicos liberados durante la degradación de la lignina se desempeñan como inductores, al incrementar el poder oxidativo de las lacasas y actuar como mediadores redox [54].

La finalidad de medir la concentración de compuestos fenólicos durante la producción de lacasas, utilizando salvado de trigo como cosustrato en el reactor *airlift*, fue encontrar una relación directa en la actividad enzimática. En la Figura 20 se puede observar que la concentración de compuestos fenólicos tiene una tendencia ascendente durante la cinética enzimática, logrando los valores más altos cuando la actividad enzimática llega a su máximo valor. Por lo anterior, es posible relacionar la formación de compuestos fenólicos como el ácido siríngico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico y ácido vanílico que son unidades fenólicas que conforman a la estructura química del salvado de trigo [96,119] en el aumento de la actividad de lacasas [121].



**Figura 20.** Perfil de la actividad enzimática y la concentración de compuestos fenólicos en la producción de lacasas por *Trametes versicolor* en el reactor *airlift* a 30°C

#### 4.5. Caracterización del efluente de las aguas azules

Se recolectó una muestra de 20 L del Aeropuerto Internacional de Monterrey de la cisterna de aguas azules. Después, se prosiguió con la caracterización de la muestra para posteriormente realizar las pruebas de degradación mediante el tratamiento enzimático. Se llevó a cabo la caracterización fisicoquímica del efluente y los resultados se muestran en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Resultados de caracterización fisicoquímica del efluente de aguas azules.

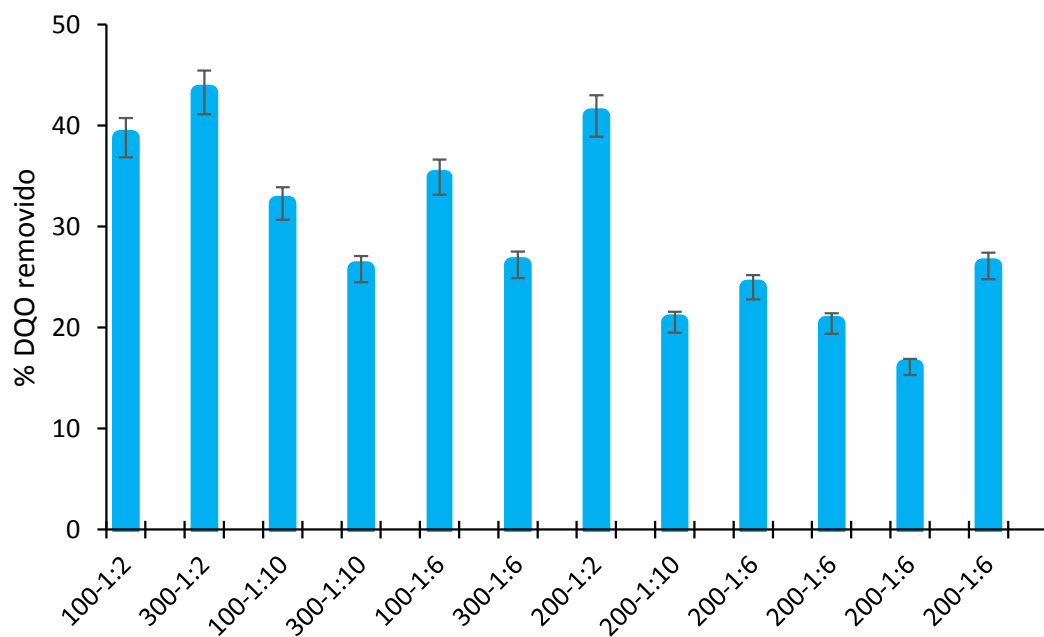
Parámetro	Valor
Sólidos totales (mg/L)	9012.89 ± 249
Sólidos volátiles totales (mg/L)	5249 ± 311
pH	6.24
DQO (mg/L)	4544.44 ± 78
DBO <sub>5</sub> (mg/L)	1766.67 ± 128
Índice de biodegradabilidad (IB)	0.3884

#### **4.6. Pruebas preliminares de la degradación de un efluente real de aguas azules**

Se llevaron a cabo pruebas preliminares para la degradación del efluente de aguas azules. Se llevó a cabo un diseño de experimentos, central compuesto 2<sup>2</sup> con cuatro puntos centrales. Los factores evaluados fueron el factor de dilución (1:2 y 1:10) y la actividad enzimática en la reacción (100 y 300 U/mL). Los experimentos se realizaron en un volumen total de 20 mL, a 30°C con agitación orbital a 150 rpm, y se optó por no ajustar el pH de reacción con la finalidad de reproducir el experimento a condiciones reales de operación. Se analizó como respuesta el porcentaje de remoción a través de la DQO, al inicio del tratamiento y al término del mismo, a las 48 horas.

En la Figura 21 se muestra el porcentaje de remoción de DQO alcanzado para cada tratamiento. La mayor remoción de DQO fue de 43.3% ± 2 empleando una actividad

enzimática de 300 U/mL bajo una dilución de 1:2. Se encontró que la actividad enzimática tiene un papel importante en el porcentaje de remoción; ya que se observó que a mayor actividad enzimática, se presentó mayor reducción de la DQO.



**Figura 21.** Porcentaje de remoción de DQO en efluente real de aguas azules.

#### 4.6.1. Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico de los resultados obtenidos para la remoción de DQO del efluente de aguas azules utilizando el software Design Expert 7.0. Las condiciones de cada tratamiento y los resultados del experimento se muestran en la Tabla 13. Además, se obtuvo el análisis de varianza (Tabla 14).

**Tabla 13.** Diseño de experimentos 2<sup>2</sup> y resultados de la remoción de DQO de las aguas azules.

Tratamiento	Tipo	Actividad enzimática (U/mL)	Factor de dilución	DQO 0 h (mg/L)	Desviación estándar (mg/L)	DQO 48 h (mg/L)	Desviación estándar (mg/L)
1	Factorial	100	2	4453.33	82.50	2725.00	23.57
2	Factorial	300	2	4373.33	11.79	2480.00	94.28
3	Factorial	100	10	805.00	160.28	885.00	372.41
4	Factorial	300	10	1055.00	141.42	870.00	18.86
5	Axial	100	6	1155.00	4.71	751.67	61.28
6	Axial	300	6	1351.67	51.85	996.67	9.43
7	Axial	200	2	4556.67	11.79	2690.00	11.79
8	Axial	200	10	811.67	0.00	645.00	23.57
9	Central	200	6	1261.67	70.71	958.33	33.00
10	Central	200	6	1241.67	70.71	1038.33	14.14
11	Central	200	6	1245.00	28.28	1071.67	14.14
12	Central	200	6	1291.67	150.85	945.00	51.85

**Tabla 14.** ANOVA de la remoción de DQO de las aguas azules.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	Valor F	Valor <i>p</i> Prob > F
Modelo	738.53	5	147.71	7.66	0.0139
A- Actividad enzimática	19.08	1	19.08	0.99	0.3582
B- Factor de dilución	330.04	1	330.04	17.12	0.0061
AB	30.25	1	30.25	1.57	0.2569
A <sup>2</sup>	116.16	1	116.16	6.03	0.0495
B <sup>2</sup>	123.31	1	123.31	6.40	0.0447
Residuales	115.64	6	19.27		
Falta de ajuste	57.95	3	19.32	1.00	0.4986
Error	57.69	3	19.23		
Total	854.18	11			

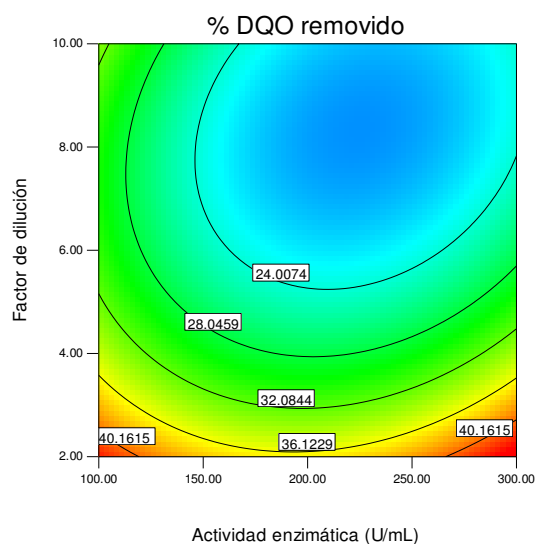
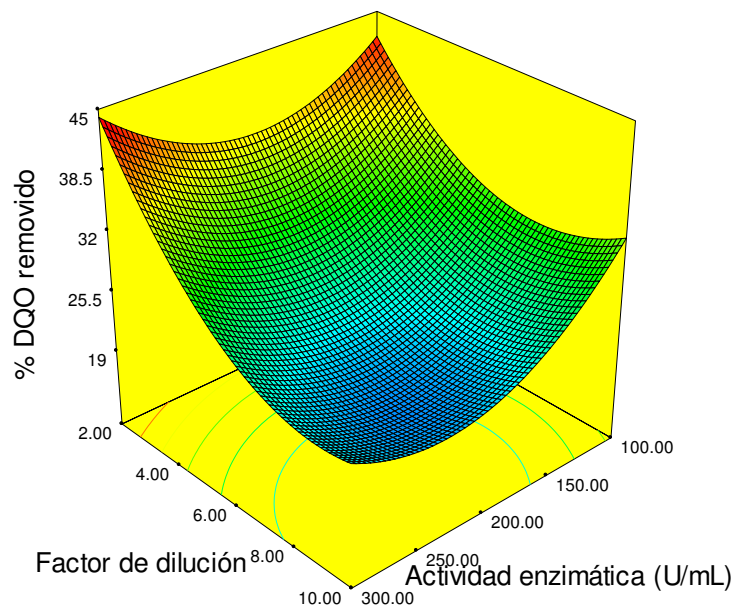
R<sup>2</sup>= 0.8646; C.V.= 15.08%; α=0.05; gl=grados de libertad

Por otro lado, se obtuvo el modelo estadístico que resultó significativo para su reproducibilidad (Ecuación 8).

$$\%DQO \text{ removido } (y) = 22.42 - 1.78 A - 7.42 B - 2.75 AB + 6.6 A^2 + 6.8 B^2 \quad (8)$$

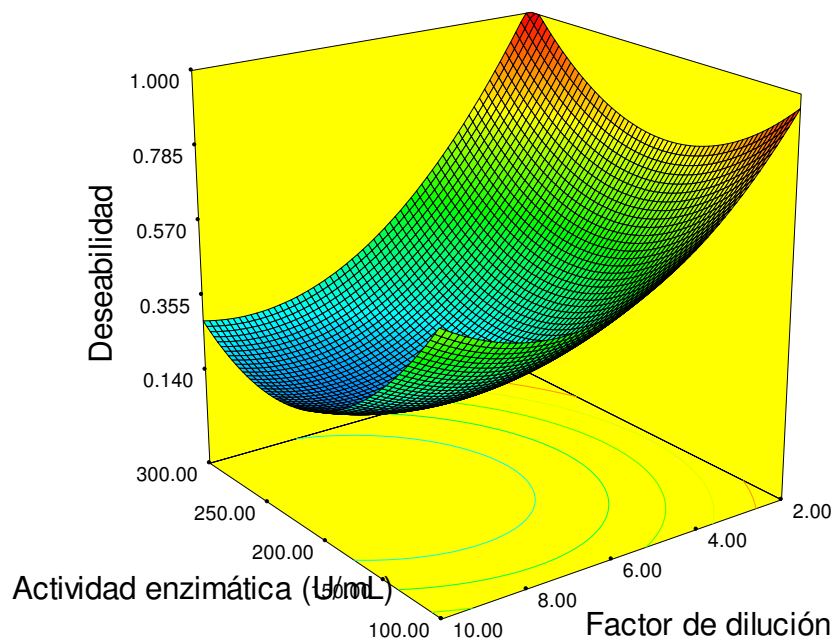
También se desarrolló el gráfico de superficie de respuesta y gráfico de contorno (Figura 22) para conocer el comportamiento de la interacción entre los dos factores evaluados, factor de dilución y actividad enzimática en la reacción, en la remoción de DQO de las aguas azules. En la Figura 22 se observa una tendencia favorable al presentarse los valores más altos de remoción de DQO utilizando el factor de dilución menor (1:2), bajo todos los niveles de actividad enzimática estudiados, lo que resulta

beneficioso al ser llevado a un ambiente real, por requerir menor cantidad de agua para diluirlo y poder ser tratado. En contraste, Moreno-Andrade *et al.* [1] lograron degradar 75% y 92% de DQO y DBO<sub>5</sub>, respectivamente, bajo una dilución de 1:10 con un tratamiento biológico con lodos activados.



**Figura 22.** Gráfico de superficie de respuesta y contorno de la interacción entre la actividad enzimática y el factor de dilución.

Las condiciones óptimas obtenidas de acuerdo al análisis estadístico fueron a 298.34 U/mL de actividad enzimática a una dilución de 1:2.04, prediciendo un porcentaje de remoción de DQO de 43.7%, con un valor de deseabilidad de 1 (Figura 23). De manera experimental, el tratamiento más similar fue a 300 U/mL de actividad enzimática en la reacción a una dilución de 1:2, alcanzando una remoción de DQO de 43.3%. Demostrando una relación satisfactoria en la reproducibilidad de las condiciones predichas.



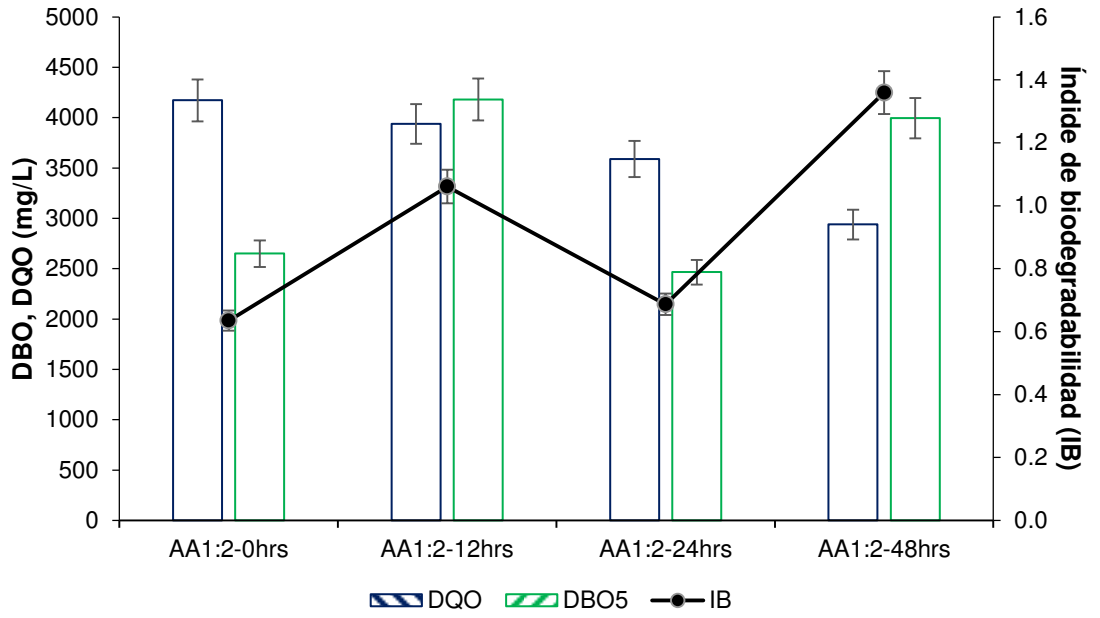
**Figura 23.** Gráfico de superficie de respuesta de la función de deseabilidad con relación a la actividad enzimática y el factor de dilución.

#### 4.7. Degradación de las aguas azules en reactor tipo *airlift*

La degradación del efluente de aguas azules se llevó a cabo en un reactor tipo *airlift*. Las condiciones de degradación se efectuaron a temperatura ambiente, con un flujo de aire de 1 vvm; el efluente se diluyó a una relación 1:2 en un volumen total de reacción de 1 L. El reactor se operó por 48 h para el tratamiento. En diferentes lapsos de tiempo se midieron los parámetros de DQO y DBO<sub>5</sub>, con la finalidad de evaluar el índice de biodegradabilidad al final del tratamiento enzimático. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 24

. Durante el tratamiento enzimático, la DQO fue disminuyendo hasta alcanzar un porcentaje de remoción de 30%. Por otro lado, la DBO<sub>5</sub> mostró un comportamiento irregular al aumentar su valor a las 12 h, disminuir a las 24 h pero después de 48 h, el tratamiento enzimático incrementó 50 % la DBO<sub>5</sub> con respecto al valor inicial. Esto puede deberse a que durante el tratamiento enzimático de las aguas azules en el reactor *airlift*, los compuestos más complejos propios del efluente fueron oxidados a compuestos más simples.

En relación al índice de biodegradabilidad ( $IB = DBO_5 / DQO$ ), el tratamiento enzimático de las aguas azules tiene un valor de 0.64 y, transcurridas 48 h, el índice aumentó hasta 1.36. Este resultado es favorable ya que se duplica el valor del índice biodegradabilidad y el efluente tratado no inhibirá el proceso convencional por lodos activados de las aguas residuales.



**Figura 24.** Cinética de degradación de DQO y DBO<sub>5</sub> de un efluente de aguas azules en el reactor *airlift* y perfil del índice de biodegradabilidad.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

# CAPÍTULO 5

## CONCLUSIONES

## 5. CONCLUSIONES

La fermentación sumergida con la adición del salvado de trigo como cosustrato durante el crecimiento de *Trametes versicolor* incrementa significativamente la actividad enzimática en comparación con la cáscara de coco y bagazo de agave. Las condiciones óptimas para la producción de enzimas tipo lacasas en reactores en lote se encuentran a 35 °C y 5 g/L de salvado de trigo, logrando una actividad enzimática máxima cercana a 200 U/mL.

Con respecto a la fermentación sumergida realizada en el reactor *airlift*, a 30 °C se alcanza una actividad enzimática mayor que a 35 °C aumentando seis veces (1200 U/mL) su valor aproximadamente. Además, esta configuración de reactor permite una reducción del 25 % en el tiempo necesario para alcanzar la actividad máxima de lacasas, en comparación con el cultivo en reactores en lote con agitación orbital. Por esta razón, el uso de un reactor *airlift* es una buena opción para cultivos sumergidos de hongos para la producción de lacasas.

De acuerdo a resultados de degradación de aguas azules, en sistemas en lote con agitación orbital, es posible alcanzar hasta 43 % de remoción de DQO en 48 horas usando el extracto enzimático. Por otro lado, la degradación de las aguas azules en el reactor *airlift* alcanzó un desempeño positivo al incrementar el índice de biodegradabilidad del efluente de 0.64 a 1.36 en 48 h del tratamiento con el extracto enzimático.

En resumen, el uso del extracto enzimático permite alcanzar resultados prometedores en la degradación de contaminantes presentes en efluentes reales como las aguas azules. Además, el pretratamiento enzimático es una opción viable en el tratamiento de aguas residuales convencional con efluentes de naturaleza recalcitrante.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

# REFERENCIAS

## REFERENCIAS

- [1] I. Moreno-Andrade, G. Moreno, G. Kumar, G. Buitrón, Biodegradation of toilet wastewaters generated in aircrafts, *J. Chinese Chem. Soc.* 61 (2014) 814–818.
- [2] J. Xu, J. Yang, N. Zhao, L. Sheng, Y. Zhao, Z. Tang, Evaluation of efficiency of aircraft liquid waste treatment and identification of daily inspection indices: A case study in Changchun, China, *Environ. Monit. Assess.* 185 (2013) 6063–6070.
- [3] W.H. Organization, Guide to Hygiene and Sanitation in Aviation, en: *Guid. to Hyg. Sanit. Aviat.*, 3rd ed., 2009: pp. 1–59.
- [4] J. Xu, J. Yang, N. Zhao, L. Sheng, Y. Zhao, Z. Tang, Preliminary evaluation of evaluation of the efficiency of aircraft liquid waste treatment using resolvable sanitizing liquid: a case study in Changchun, *Environ. Monit. Assess.* 183 (2011) 95–101.
- [5] M. Alcalde, M. Ferrer, F.J. Plou, A. Ballesteros, Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes, *Trends Biotechnol.* 24 (2006) 281–287.
- [6] J. Liu, Y. Cai, X. Liao, Q. Huang, Z. Hao, M. Hu, D. Zhang, Z. Li, Efficiency of laccase production in a 65-L air-lift reactor for potential green industrial and environmental application, *J. Clean. Prod.* 39 (2013) 154–160.
- [7] N. Durán, E. Esposito, Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: A review, *Appl. Catal. B Environ.* 28 (2000) 83–99.
- [8] S. Rodríguez Couto, J.L. Toca Herrera, Industrial and biotechnological applications of laccases: A review, *Biotechnol. Adv.* 24 (2006) 500–513.
- [9] C. Sánchez, Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi, *Biotechnol. Adv.* 27 (2009) 185–194.
- [10] D. Fengel, G. Wegener, *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions.*, 1989.
- [11] C.H. Ludwig, B.J. Nist, J.L. McCarthy, Lignin. XIII. High resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy of protons in acetylated lignins, *J. Am. Chem. Soc.* 86

- (1964) 1196–1202.
- [12] H. Nimz, Beech Lignin - Proposal of a constitutional scheme, *Angew. Chemie Int. Ed. English*. 13 (1974) 313–321.
- [13] M.E. Himmel, S.-Y. Ding, D.K. Johnson, W.S. Adney, M.R. Nimlos, J.W. Brady, T.D. Foust, Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production., *Science* (80-. ). 315 (2007) 804–7.
- [14] R.C. Kuhad, S. Kuhar, K.K. Sharma, B. Shrivastava, Microorganisms and Enzymes Involved in Lignin Degradation Vis-à-vis Production of Nutritionally Rich Animal Feed: An Overview, en: R.C. Kuhad, A. Singh (Eds.), *Biotechnol. Environ. Manag. Resour. Recover.*, Springer India, 2013: pp. 191–218.
- [15] M.C. Cepero de García, S. Restrepo Restrepo, A.E. Franco-Molano, M. Cárdenas Toquica, N. Vargas Estupiñán, *Biología de hongos*, 1st edition, Bogotá, 2012.
- [16] L. Longe, G. Garnier, K. Saito, *Lignin Biodegradation with Fungi , Bacteria and Enzymes for Producing Chemicals and Increasing Process Efficiency*, 2016.
- [17] E.M. Goltapeh, Y.R. Danesh, A. Varma, Fungi as Bioremediators, *Soil Biol.* 32 (2013) 203–226.
- [18] A. Leonowicz, a Matuszewska, J. Luterek, D. Ziegenhagen, M. Wojtaś-Wasilewska, N.S. Cho, M. Hofrichter, J. Rogalski, Biodegradation of lignin by white rot fungi., *Fungal Genet. Biol.* 27 (1999) 175–85.
- [19] T.M. Salame, D. Knop, D. Levinson, S.J. Mabweesh, O. Yarden, Y. Hadar, Inactivation of a *Pleurotus ostreatus* versatile peroxidase-encoding gene (mnp2) results in reduced lignin degradation, *Environ. Microbiol.* 16 (2014) 265–277.
- [20] A.K. Sista Kameshwar, W. Qin, Lignin Degrading Fungal Enzymes, en: Z. Fang, R.L. Smith Jr. (Eds.), *Prod. Biofuels Chem. from Lignin*, Springer Singapore, 2016: p. pp 81-130.
- [21] N.A. Khan, S. Hussain, N. Ahmad, S. Alam, M. Bezabhi, W.H. Hendriks, P. Yu, J.W. Cone, Improving the feeding value of straws with *Pleurotus ostreatus*, *Anim. Prod. Sci.* 55 (2015) 241–245.
- [22] P. Upadhyay, R. Shrivastava, P.K. Agrawal, Bioprospecting and biotechnological

- applications of fungal laccase, 3 Biotech. 6 (2016) 15.
- [23] S.J.A. van Kuijk, A.S.M. Sonnenberg, J.J.P. Baars, W.H. Hendriks, J.W. Cone, Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed ingredient: A review, Biotechnol. Adv. 33 (2015) 191–202.
- [24] T. Satyanarayana, A. Prakash, B.N. Johri, Microorganisms in sustainable agriculture and biotechnology, Springer Science. (2013) 1-829.
- [25] J.D. Castaño, C. Cruz, E. Torres, Optimization of the production, purification and characterization of a laccase from the native fungus *Xylaria sp.*, Biocatal. Agric. Biotechnol. 4 (2015) 710–716.
- [26] D.F. De Souza, G.K. Tychanowicz, C.G.M. De Souza, R.M. Peralta, Co-production of ligninolytic enzymes by *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state cultures, J. Basic Microbiol. 46 (2006) 126–134.
- [27] D.-W. Gao, X.-H. Wen, Y. Qian, Production of ligninolytic enzymes in bioreactor, Huanjing Kexue/Environmental Sci. 27 (2006) 333–337.
- [28] F. Gassara, S.K. Brar, R.D. Tyagi, R.P. John, M. Verma, J.R. Valero, Parameter optimization for production of ligninolytic enzymes using agro-industrial wastes by response surface method, Biotechnol. Bioprocess Eng. 16 (2011) 343–351.
- [29] R. Kumar, J. Kaur, S. Jain, A. Kumar, Optimization of laccase production from *Aspergillus flavus* by design of experiment technique : Partial purification and characterization, J. Genet. Eng. Biotechnol. (2016) 4–10.
- [30] R.M. Fakoussa, M. Hofrichter, Biotechnology and microbiology of coal degradation, Appl. Microbiol. Biotechnol. 52 (1999) 25–40.
- [31] L. Pollegioni, F. Tonin, E. Rosini, Lignin-degrading enzymes, FEBS J. 282 (2015) 1190–1213.
- [32] K.E. Hammel, K.A. Jensen, M.D. Mozuch, L.L. Landucci, M. Tien, E.A. Pease, Ligninolysis by a purified lignin peroxidase, J. Biol. Chem. 268 (1993) 12274–12281.
- [33] S.H. Lim, W.S. Lee, Y. Il Kim, Y. Sohn, D.W. Cho, C. Kim, E. Kim, J.A. Latham, D. Dunaway-Mariano, P.S. Mariano, Photochemical and enzymatic SET promoted C-

- C bond cleavage reactions of lignin model compounds containing varying number of methoxy substituents on their arene rings, *Tetrahedron*. 71 (2015) 4236–4247.
- [34] S.H. Lim, K. Nahm, C.S. Ra, D.W. Cho, U.C. Yoon, J.A. Latham, D. Dunaway-Mariano, P.S. Mariano, Effects of alkoxy groups on arene rings of lignin  $\beta$ -O-4 model compounds on the efficiencies of single electron transfer-promoted photochemical and enzymatic C-C bond cleavage reactions, *J. Org. Chem.* 78 (2013) 9431–9443.
- [35] K.E. Hammel, D. Cullen, Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis, *Curr. Opin. Plant Biol.* 11 (2008) 349–355.
- [36] P.J. Kersten, B. Kalyanaraman, K.E. Hammel, B. Reinhammar, T.K. Kirk, Comparison of lignin peroxidase, horseradish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes., *Biochem. J.* 268 (1990) 475–480.
- [37] A.M. Azevedo, V.C. Martins, D.M.F. Prazeres, V. Vojinović, J.M.S. Cabral, L.P. Fonseca, Horseradish peroxidase: A valuable tool in biotechnology, *Biotechnol. Annu. Rev.* 9 (2003) 199–247.
- [38] N.C. Veitch, Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme, *Phytochemistry*. 65 (2004) 249–259.
- [39] G.S. Zakharova, I. V. Uporov, V.I. Tishkov, Horseradish peroxidase: Modulation of properties by chemical modification of protein and heme, *Biochem.* 76 (2011) 1391–1401.
- [40] D.W.S. Wong, Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 157 (2009) 174–209.
- [41] M. Hofrichter, Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP), *Enzyme Microb. Technol.* 30 (2002) 454–466.
- [42] P. Baldrian, Fungal laccases-occurrence and properties, *FEMS Microbiol. Rev.* 30 (2006) 215–242.
- [43] P. Giardina, V. Faraco, C. Pezzella, A. Piscitelli, S. Vanhulle, G. Sannia, Laccases: A never-ending story, *Cell. Mol. Life Sci.* 67 (2010) 369–385.

- [44] J.D. Walker, J.D. Walker, Effects of chemicals on microorganisms, Res. J. Water Pollut. Control Fed. 62 (1990) 618–624.
- [45] H. Agetatu, N. Shibamoto, H. Nishida, R. Okamoto, T. Shin, S. Murao, Oxidative Decarboxylations of 4-Hydroxymandelic Acid and 2-(4-Hydroxyphenyl)glycine by Laccase from *Coriolus versicolor* and Bilirubin Oxidases from *Trachyderma tsunodae* and *Myrothecium verrucaria*, Biosci. Biotechnol. Biochem. 57 (1993) 1877–1881.
- [46] A. Leonowicz, R.U. Edgehill, J.M. Bollag, The effect of pH on the transformation of syringic and vanillic acids by the laccases of *Rhizoctonia praticola* and *Trametes versicolor*, Arch. Microbiol. 137 (1984) 89–96.
- [47] A. Schultz, U. Jonas, E. Hammer, F. Schauer, Dehalogenation of Chlorinated Hydroxybiphenyls by Fungal Laccase, Appl. Environ. Microbiol. 67 (2001) 4377–4381.
- [48] N.N. Pozdnyakova, J. Rodakiewicz-Nowak, O. V. Turkovskaya, Catalytic properties of yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1, J. Mol. Catal. B Enzym. 30 (2004) 19–24.
- [49] E. Torres, I. Bustos-Jaimes, S. Le Borgne, Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants, Appl. Catal. B Environ. 46 (2003) 1–15.
- [50] D. Ryan, W. Leukes, S. Burton, Improving the bioremediation of phenolic wastewaters by *Trametes versicolor*, Bioresour. Technol. 98 (2007) 579–587.
- [51] S.A. Smirnov, O. V. Koroleva, V.P. Gavrilova, A.B. Belova, N.L. Klyachko, Laccases from Basidiomycetes: Physicochemical characteristics and substrate specificity towards methoxyphenolic compounds, Biochem. 66 (2001) 774–779.
- [52] E.I. Solomon, P. Chen, M. Metz, S.-K. Lee, A.E. Palmer, Oxygen Binding, Activation, and Reduction to Water by Copper Proteins, Angew. Chemie Int. Ed. 40 (2001) 4570–4590.
- [53] E.I. Solomon, U.M. Sundaram, T.E. Machonkin, Multicopper Oxidases and Oxygenases., Chem. Rev. 96 (1996) 2563–2606.
- [54] J.A. Majeau, S.K. Brar, R.D. Tyagi, Laccases for removal of recalcitrant and

- emerging pollutants, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 2331–2350.
- [55] M. Fabbrini, C. Galli, P. Gentili, Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase, *J. Mol. Catal. - B Enzym.* 16 (2002) 231–240.
- [56] C.S. Evans, M.V. Dutton, F. Guillón, R.G. Veness, Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation, *FEMS Microbiol. Rev.* 13 (1994) 235–239.
- [57] C. Eggert, U. Temp, J.F.D. Dean, K.E.L. Eriksson, A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase, *FEBS Lett.* 391 (1996) 144–148.
- [58] J.M. Bollag, A. Leonowicz, Comparative studies of extracellular fungal laccases, *Appl. Environ. Microbiol.* 48 (1984) 849–854.
- [59] A. Leonowicz, N. Cho, J. Luterek, A. Wilkolazka, M. Wojtas-Wasilewska, A. Matuszewska, M. Hofrichter, D. Wesenberg, J. Rogalski, Fungal laccase: Properties and activity on lignin, *J. Basic Microbiol.* 41 (2001) 185–227.
- [60] C.E. Rodriguez-Rodriguez, A. Jelić, M. Llorca, M. Farré, G. Caminal, M. Petrović, D. Barceló, T. Vicent, Solid-phase treatment with the fungus *Trametes versicolor* substantially reduces pharmaceutical concentrations and toxicity from sewage sludge, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 5602–5608.
- [61] A.P.M. Tavares, M.A.Z. Coelho, M.S.M. Agapito, J.A.P. Coutinho, A.M.R.B. Xavier, Optimization and Modeling of Laccase Production by *Trametes versicolor* in a Bioreactor Using Statistical Experimental Design, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 134 (2006) 233–248.
- [62] X. Font, G. Caminal, X. Gabarrell, S. Romero, M.T. Vicent, Black liquor detoxification by laccase of *Trametes versicolor* pellets, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 78 (2003) 548–554.
- [63] G. Rancan, M. Lorenzo, N. Molares, S. Rodri, Production of laccase by *Trametes versicolor* in an airlift fermentor, 39 (2003) 467–473.
- [64] C. Sigoillot, E. Record, V. Belle, J.L. Robert, A. Levasseur, P.J. Punt, C.A.M.J.J. Van Den Hondel, A. Fournel, J.C. Sigoillot, M. Asther, Natural and recombinant fungal

- laccases for paper pulp bleaching, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64 (2004) 346–352.
- [65] J. Lenz, U. Hölker, Trickle-film Processing : An Alternative for Producing Fungal Enzymes, *BioForum Eur.* 6 (2004) 55–57.
- [66] P. Blánquez, N. Casas, X. Font, X. Gabarrell, M. Sarrà, G. Caminal, T. Vicent, Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*, *Water Res.* 38 (2004) 2166–2172.
- [67] D.R. Ryan, W.D. Leukes, S.G. Burton, Fungal bioremediation of phenolic wastewaters in an airlift reactor, *Biotechnol. Prog.* 21 (2005) 1068–1074.
- [68] P. Blánquez, G. Caminal, M. Sarrà, T. Vicent, The effect of HRT on the decolourisation of the Grey Lanaset G textile dye by *Trametes versicolor*, *Chem. Eng. J.* 126 (2007) 163–169.
- [69] J. Liu, Z. Yu, X. Liao, J. Liu, F. Mao, Q. Huang, Scalable production, fast purification, and spray drying of native *Pycnoporus* laccase and circular dichroism characterization, *J. Clean. Prod.* 127 (2016) 600–609.
- [70] G. Songulashvili, S. Flahaut, M. Demarez, C. Tricot, C. Bauvois, F. Debaste, M.J. Penninckx, High yield production in seven days of *Coriolopsis gallica* 1184 laccase at 50 L scale; enzyme purification and molecular characterization, *Fungal Biol.* 120 (2016) 481–488.
- [71] N. Mikiashvili, S.P. Wasser, E. Nevo, V. Elisashvili, Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22 (2006) 999–1002.
- [72] A.T. Thiruchelvam, J.A. Ramsay, Growth and laccase production kinetics of *Trametes versicolor* in a stirred tank reactor, (2007) 547–554.
- [73] C. Galhaup, H. Wagner, B. Hinterstoisser, D. Haltrich, Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*, *Enzyme Microb. Technol.* 30 (2002) 529–536.
- [74] A.S.B. Pointing, E.B.G. Jones, L.L.P. Vrijmoed, S.B. Pointing, Optimization of Laccase Production by *Pycnoporus sanguineus* in Submerged Liquid Culture, 92

- (2000) 139–144.
- [75] H. Hou, J. Zhou, J. Wang, C. Du, B. Yan, Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye, *Process Biochem.* 39 (2004) 1415–1419.
- [76] J.L. Dong, Y.W. Zhang, R.H. Zhang, W.Z. Huang, Y.Z. Zhang, Influence of culture conditions on laccase production and isozyme patterns in the white-rot fungus *Trametes gallica*, *J. Basic Microbiol.* 45 (2005) 190–198.
- [77] P.J. Collins, A.D.W. Dobson, Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 3444–3450.
- [78] C. Galhaup, D. Haltrich, Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56 (2001) 225–232.
- [79] M.S. Revankar, S.S. Lele, Enhanced production of laccase using a new isolate of white rot fungus WR-1, *Process Biochem.* 41 (2006) 581–588.
- [80] K. Ikehata, D.W. Smith, I.D. Buchanan, Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment, *J. Environ. Eng. Sci.* 3 (2004) 1–19.
- [81] M. a Pickard, H. Vandertol, R. Roman, R. Vazquez-Duhalt, High production of ligninolytic enzymes from white rot fungi in cereal bran liquid medium, *Can. J. Microbiol.* 45 (1999) 627–631.
- [82] A.T. Thiruchelvam, J.A. Ramsay, Growth and laccase production kinetics of *Trametes versicolor* in a stirred tank reactor, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74 (2007) 547–554.
- [83] E.J. Espinosa-Ortiz, E.R. Rene, K. Pakshirajan, E.D. van Hullebusch, P.N.L. Lens, Fungal pelleted reactors in wastewater treatment: Applications and perspectives, *Chem. Eng. J.* 283 (2016) 553–571.
- [84] A.D. Annibale, D. Quarantino, F. Federici, M. Fenice, Effect of agitation and aeration on the reduction of pollutant load of olive mill wastewater by the white-rot fungus *Panus tigrinus*, 29 (2006) 243–249.

- [85] M.T. Moreira, G. Feijoo, J.M. Lema, Fungal bioreactors: Applications to white-rot fungi, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 2 (2003) 247–259.
- [86] R.J.S. de Castro, H.H. Sato, Enzyme Production by Solid State Fermentation: General Aspects and an Analysis of the Physicochemical Characteristics of Substrates for Agro-industrial Wastes Valorization, *Waste and Biomass Valorization.* 6 (2015) 1085–1093.
- [87] V.L. Papinutti, F. Forchiassin, Lignocellulolytic enzymes from *Fomes sclerodermeus* growing in solid-state fermentation, *J. Food Eng.* 81 (2007) 54–59.
- [88] M. Kumar, A. Singhal, I.S. Thakur, Comparison of submerged and solid state pretreatment of sugarcane bagasse by *Pandoraea* sp. ISTKB: Enzymatic and structural analysis, *Bioresour. Technol.* 203 (2016) 18–25.
- [89] M. Fenice, G. Giovannozzi Sermanni, F. Federici, A. D’Annibale, Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media, *J. Biotechnol.* 100 (2003) 77–85.
- [90] G. Songulashvili, V. Elisashvili, S. Wasser, E. Nevo, Y. Hadar, Laccase and manganese peroxidase activities of *Phellinus robustus* and *Ganoderma adspersum* grown on food industry wastes in submerged fermentation, *Biotechnol. Lett.* 28 (2006) 1425–1429.
- [91] M.A. Ullah, H. Kadhim, R.A. Rastall, C.S. Evans, Evaluation of solid substrates for enzyme production by *Coriolus versicolor* for use in bioremediation of chlorophenols in aqueous effluents, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54 (2000) 832–837.
- [92] J. a Buswell, K.E. Eriksson, Effect of lignin-related phenols and their methylated derivatives on the growth of eight white-rot fungi., *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10 (1994) 169–74.
- [93] M. Tekere, J.S. Read, B. Mattiasson, Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in extracellular fluids and static batch cultures of selected subtropical white rot fungi., *J. Biotechnol.* 115 (2005) 367–77.
- [94] A.M. Pedroza, R. Mosqueda, N. Alonso-Vante, R. Rodríguez-Vázquez, Sequential

- treatment via *Trametes versicolor* and UV/TiO<sub>2</sub>/RuxSey to reduce contaminants in waste water resulting from the bleaching process during paper production, *Chemosphere*. 67 (2007) 793–801.
- [95] B. Petrie, R. Barden, B. Kasprzyk-hordern, ScienceDirect A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge , understudied areas and recommendations for future monitoring, *Water Res.* 72 (2014) 3–27.
- [96] Y.J. Kim, J.A. Nicell, Impact of reaction conditions on the laccase-catalyzed conversion of bisphenol A, *Bioresour. Technol.* 97 (2006) 1431–1442.
- [97] E. De Aguiar, M.L. Calijuri, P.P. Assemany, F. Santiago, I.D.C. Carvalho, Resources , Conservation and Recycling Greywater production in airports : Qualitative and quantitative assessment, *Resources, Conserv. Recycl.* 77 (2013) 44–51.
- [98] Federal Aviation Administration, Recycling, Reuse and Waste Reduction at Airports: A Synthesis Document, (2013) 52.
- [99] P. Mehta, Aviation waste management : An insight, 5 (2015) 179–186.
- [100] I.J. Wegner, United States Patent [ 191, (1978) 1–5.
- [101] L. Alvarado Ramírez, Inmovilización de Lacasas en esferas de SiO<sub>2</sub> para la degradación de rojo congo, Universidad Autónoma de Nuevo León, 2015.
- [102] W. Bavendam, Über das Vorkommen und den Nachweis von Oxydasen bei holzerstörenden Pilzen, *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz.* 38 (1928) 257–276.
- [103] A.-N. Elías Heriberto, R.-L. Armando Javier, V.-L. José Antonio, P.-G. Russell, Estudio comparativo entre los enfoques de diseño experimental robusto de Taguchi y tradicional en presencia de interacciones de control por control, *Ing. Investig. y Technol.* 16 (2015) 131–142.
- [104] I.K. Kapdan, F. Kargi, G. McMullan, R. Marchant, Effect of environmental conditions on biological decolorization of textile dyestuff by *C . versicolor*, 26 (2000) 381–387.
- [105] E. Baltierra-Trejo, L. Márquez-Benavides, J.M. Sánchez-Yáñez, Inconsistencias

- and ambiguities in calculating enzyme activity: The case of laccase, *J. Microbiol. Methods*. 119 (2015) 126–131.
- [106] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [107] G.L. Miller, Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Anal. Chem.* 31 (1959) 426–428.
- [108] A. Blainski, G.C. Lopes, J.C.P. De Mello, Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *limonium brasiliense* L., *Molecules*. 18 (2013) 6852–6865.
- [109] APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed., American Public Health Association, Washington, DC, 2005.
- [110] American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, *Stand. Methods*. (1999) 541.
- [111] L. Li, X.Z. Li, W.Z. Tang, J. Zhao, Y.B. Qu, Screening of a fungus capable of powerful and selective delignification on wheat straw, *Lett. Appl. Microbiol.* 47 (2008) 415–420.
- [112] R.D. Hartley, The lignin fraction of plant cell walls, *The American J. of Clinical Nutrition*. 31(1978) 90–93.
- [113] P.B. Schwarz, W.H. Kuerth, V.L. Youngs, The Distribution of Lignin and Other Fiber Components Within Hard Red Spring Wheat Bran.pdf, (1988).
- [114] S. Kestur G., T.H.S. Flores-Sahagun, L.P. Dos Santos, J. Dos Santos, I. Mazzaro, A. Mikowski, Characterization of blue agave bagasse fibers of Mexico, *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.* 45 (2013) 153–161.
- [115] A.I. Ávila-Lara, J.N. Camberos-Flores, J.A. Mendoza-Pérez, Optimization of alkaline and dilute acid pretreatment of agave bagasse by response surface methodology, 3 (2015) 1–10.
- [116] M. Hidalgo-Reyes, M. Caballero-Caballero, L.H. Hernández-Gómez, G. Urriolagoitia-Calderón, Chemical and morphological characterization of Agave

- angustifolia bagasse fibers, *Bot. Sci.* 93 (2015) 807–817.
- [117] J. Khedari, N. Nankongnab, J. Hirunlabh, S. Teekasap, New low-cost insulation particleboards from mixture of durian peel and coconut coir, *Build. Environ.* 39 (2004) 59–65.
- [118] G. Songulashvili, D. Spindler, G.A. Jimenéz-Tobón, C. Jaspers, G. Kerns, M.J. Penninckx, Production of a high level of laccase by submerged fermentation at 120-L scale of *Cerreña unicolor* C-139 grown on wheat bran, *Comptes Rendus - Biol.* 338 (2015) 121–125.
- [119] B. Verma, P. Hucl, R.N. Chibbar, Phenolic acid composition and antioxidant capacity of acid and alkali hydrolysed wheat bran fractions, *Food Chem.* 116 (2009) 947–954.
- [120] N. Almaraz-Abarca, M.D.S. González-Elizondo, M. de G. Campos, Z.E. Ávila-Sevilla, E.A. Delgado-Alvarado, J.A. Ávila-Reyes, Variability of the pholiar phenol profiles of the *Agave victoria-reginae* complex (Agavaceae), *Bot. Sci.* 91 (2013) 295–306.
- [121] J.O. Rich, A.M. Anderson, M.A. Berhow, Laccase-mediator catalyzed conversion of model lignin compounds, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 5 (2016) 111–115.
- [122] F. Wang, J.H. Hu, C. Guo, C.Z. Liu, Enhanced laccase production by *Trametes versicolor* using corn steep liquor as both nitrogen source and inducer, *Bioresour. Technol.* 166 (2014) 602–605.
- [123] G. Li, X. Liu, L. Yuan, Improved laccase production by *Funalia troglia* in absorbent fermentation with nutrient carrier, *J. Biosci. Bioeng.* 124 (2017) 381–385.
- [124] K. Schügerl, S.R. Gerlach, D. Siedenberg, Influence of the process parameters on the morphology and enzyme production of *Aspergilli.*, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 60 (1998) 195–266.

## PRODUCTOS DERIVADOS DEL PRESENTE PROYECTO:

1. María del Rosario Cázares Martínez, Alcione García González, Refugio Bernardo García Reyes, Marina Montserrat Atilano Camino, **Evaluación del uso del cofactor y cosustrato en la producción de lacasas a partir de *Trametes versicolor* y su aplicación en la degradación de ciprofloxacino**, IV Congreso Internacional de Química e Ingeniería Verde, Universidad Autónoma de Nuevo León, 6-8 de septiembre de 2017, Monterrey, Nuevo León, México.
2. Marina Montserrat Atilano Camino, Refugio Bernardo García Reyes, Alcione García González, Luis Humberto Álvarez Valencia, **Producción de enzimas ligninolíticas en reactor *airlift* y su potencial evaluación para el tratamiento de aguas azules**, IV Congreso Internacional de Química e Ingeniería Verde, Universidad Autónoma de Nuevo León, 6-8 de septiembre de 2017, Monterrey, Nuevo León, México.
3. Alcione García González, Marina Montserrat Atilano Camino, Luis H. Álvarez Valencia, Refugio Bernardo García Reyes, **Producción de enzimas ligninolíticas en reactor *airlift* y su potencial evaluación para el tratamiento de aguas azules**, XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, 25 al 30 de junio de 2017, Puerto Vallarta, Jalisco.
4. Marina Montserrat Atilano Camino, Refugio Bernardo García Reyes, Alcione García González, Luis Humberto Álvarez Valencia, **Efecto de diferentes residuos lignocelulósicos en la producción de lacasas por un hongo de pudrición blanca**, III Simposium Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina y I Simposium Nacional de Microbiología Aplicada, Universidad Autónoma de Nuevo León, 1 y 2 de septiembre 2016, Monterrey, Nuevo León, México (Primer Lugar en Modalidad Póster).

## Marina Montserrat Atilano Camino

Cel. +52-871-8973857  
[marina.atilano@hotmail.com](mailto:marina.atilano@hotmail.com)  
[marina.atilanocm@uanl.edu.mx](mailto:marina.atilanocm@uanl.edu.mx)

### Datos personales

**Dirección:** Calle Las Tuyas 4781C Col. Los Cedros. Monterrey, N.L.  
**CP:** 64370  
**Lugar de Nacimiento:** Torreón, Coahuila  
**Fecha de Nacimiento:** 5 de Agosto de 1988

**IDIOMAS:** Inglés (95%), Español (lengua nativa)

### EDUCACIÓN:

- 2015-2017**     **Aspirante a la Maestría en Ciencias con orientación en Procesos Sustentables**  
Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Monterrey, N.L.  
Promedio: 93/100
- 2006-2010**     **Ingeniero Bioquímico**  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Autónoma de Coahuila  
Torreón, Coahuila  
Promedio: 97/100

### RECONOCIMIENTOS:

- 2011             Mención Honorífica otorgada por la tesis “*Evaluación del sistema enzimático ligninolítico y su aplicación en la degradación de colorantes*”. Asesor de tesis: Dr. Nagamani Balagurusamy.
- 2010             Medalla “Juan Antonio de la Fuente” por obtener el más alto promedio de calificaciones al término de estudios profesionales.
- 2010             Primer Lugar de Generación 2006-2010 de la Carrera de Ingeniería Bioquímica.

### PUBLICACIONES:

Narayanasamy Rajeswari, Villegas Flores Noé, Betancourt Silva Fernando, Betancourt Hernández José, **Atilano Camino Marina Montserrat**, Balagurusamy Nagamani. 2010. Aplicación de bacterias en reparación de grietas en concreto. Revisión. Medicina de Torreón.

Flores Loyola E., Novoa de León I., **Atilano Camino M.**, Meza F. 2009. Estudio de la Polimerización de ácido láctico catalizada con lipasas de diferente naturaleza. Medicina de Torreón. Vol.1, No.Vol.2, Pg.63-66

## EXPERIENCIA EN INVESTIGACIÓN:

- Estancia académica de dos meses en “The University of Texas at Austin” en el Departamento de Arquitectura, Ingeniería Civil e Ingeniería Ambiental. Asesoría de la Dra. Kerry Kinney. Austin, Texas. Enero-Marzo 2017.
  - Expositor en el Congreso “IV International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld2011)”. *Ligninase activities and decolorization of Remazol Brilliant Blue and Methyl Orange by a ligninolytic fungus isolated from semi-arid region of North Mexico*. Torremolinos, Málaga, España. 14-16 Septiembre 2011
- 2010-2011      Prácticas Profesionales en el Laboratorio de Biorremediación de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Coahuila, a cargo del Dr. Nagamani Balagurusamy. Torreón, Coahuila, México.  
Proyecto de tesis: *Evaluación del sistema enzimático ligninolítico y su aplicación en la degradación de colorantes*
- 2009            Servicio Social en el Laboratorio de Investigación en el área de Enzimas y Biopolímeros de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Coahuila, a cargo de la Dra. Erika Flores Loyola. Torreón, Coahuila, México. Proyecto: *Estudio de la Polimerización de ácido láctico catalizada con lipasas de diferente naturaleza*
- 2009            Estancia de Investigación del XIX Verano de la Ciencia de la Académica Mexicana de Ciencias en el “Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas” del Instituto de Ingeniería UNAM, Unidad Académica, Campus Juriquilla, a cargo del Dr. Germán Buitrón Méndez. Proyecto: *Producción de Electricidad a partir de Aguas Residuales Mediante Celdas de Combustible Microbianas*.
- 2008            Estancia de Verano de la Investigación Científica en el laboratorio de “Metabolómica y Fisiología Celular” bajo la dirección del Dr. Axel Tiessen Favier, Investigador del Dpto. de Ingeniería Genética del CINVESTAV, Unidad Guanajuato. Proyecto: *Mejoramiento Genético del maíz. Calidad Nutricional y Tolerancia a Sequía*.
- 

## EXPERIENCIA LABORAL:

- 2013-2015      Supervisor de Control de Calidad**  
Bebidas Mundiales S. de R. L. de C. V. The Coca-Cola Company  
Torreón, Coahuila, México
- 2014            Instructor de Diplomado en FSSC 22000: Certificación de Sistemas de Inocuidad Alimentaria. (ISO 22000:2005 e ISO/TS 22002-1:2009)**
- 2011-2013      Analista de Control de Calidad**  
Bebidas Mundiales S. de R. L. de C. V. The Coca-Cola Company. Torreón, Coahuila, México.
- 2011            Coordinador de área de Energía Renovable**  
Avalon Inmobiliaria S.A. de C.V. Energía Renovable y Automatización.  
Gómez Palacio, Durango, México.