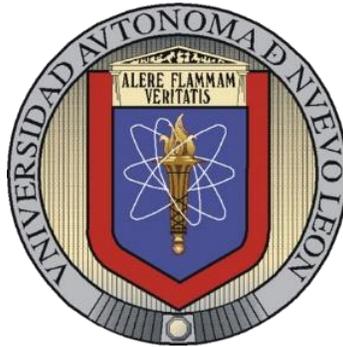


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**TESIS**

**OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS  
CON TRAMETES VERSICOLOR Y SU EVALUACIÓN PARA LA  
DEGRADACIÓN DE AGUAS AZULES**

**POR**

**L.B.G IRIS CRISTINA ARVIZU DE LEÓN**

**COMO REQUISITO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA  
APLICADA**

**JUNIO, 2020**

## **TESIS DE INVESTIGACIÓN**

Optimización de la producción de enzimas ligninolíticas con *Trametes versicolor* y su evaluación para la degradación de aguas azules

Presentada por

L.B.G. Iris Cristina Arvizu de León

**Como requisito para la obtención del grado de**

Maestría en Ciencias con Orientación en Procesos Sustentables

**Director de Tesis**

Dra. Alcione García González

**Co-Directores de Tesis**

Dr. Refugio Bernardo García Reyes

Dr. Luis Humberto Álvarez Valencia  
(Externo)

**Junio, 2020**

Optimización de la producción de enzimas ligninolíticas con *Trametes versicolor* y  
su evaluación para la degradación de aguas azules

Aprobación de la Tesis:

---

Dra. Alcione García González  
**Directora de Tesis**

---

Dr. Refugio Bernardo García Reyes  
**Co-Director de Tesis**

---

Dr. Luis Humberto Álvarez Valencia  
**Co-Director Externo de Tesis**

---

Dr. Dra. María Elena Cantú Cárdenas  
**Comité Tutorial**

---

Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño  
**Comité Tutorial**

---

Dr. Ulrico J. Lopez Chuken  
**Comité Tutorial**

---

Dra. María Elena Cantú Cárdenas  
**Subdirectora de Estudios de Posgrado**

# **Optimización de la producción de enzimas ligninolíticas con *Trametes versicolor* y su evaluación para la degradación de aguas azules**

Por L.B.G. Iris Cristina Arvizu de León

## **Resumen**

Iris Cristina Arvizu de León

Fecha de graduación: **Junio, 2020**

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: **Optimización de la producción de enzimas ligninolíticas con *Trametes versicolor* y su evaluación para la degradación de aguas azules**

Número de páginas: 101

Candidata para el grado de Maestría en  
Ciencias con Orientación Microbiología  
Aplicada

Los hongos de la pudrición blanca tienen muchas aplicaciones biotecnológicas. Esto debido a que tienen la capacidad de producir enzimas ligninolíticas de manera extracelular, con actividad oxidativa contra una amplia variedad de sustancias tóxicas recalcitrantes, entre esos hongos se encuentra *Trametes versicolor*. En este trabajo de investigación se realizó la optimización de la producción de enzimas ligninolíticas, primero se realizó un diseño exploratorio central compuesto  $2^3$ , donde se evaluó el efecto de los tipos de cofactor ( $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{CuCl}_2$  y  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ) a diferentes concentraciones (0, 0.25, 0.5 y 1 mM) y el tipo de cosustrato (salvado de trigo, cáscara de naranja, cáscara de plátano, bagazo de agave y tusa de maíz), una vez que seleccionaron los mejores cosustratos que fueron cáscara de naranja, cáscara de plátano y salvado de trigo junto con el mejor cofactor  $\text{CuSO}_4$  se llevó a cabo un diseño de experimento  $2^2$  para optimizar la producción enzimática variando la concentración de cosustrato (0, 2.5 y 5 g) y de cofactor (0, 0.5 y 1 mM) obteniendo 1,500 U/mL de lacasas, 0.277 U/mL de LiP y 5.21 U/mL de MnP, una vez obtenidos los extractos enzimáticos ricos para cada enzima se llevó a cabo el tratamiento de aguas azules sintéticas, para esto se realizó un diseño de experimentos  $2^2$ , donde se varió la cantidad de extracto enzimático, el pH y la temperatura, para cada extracto rico en su respectiva enzima, obteniendo porcentajes de decoloración del 32% utilizando en extracto rico en lacasas, 45% con LiP y 43% en MnP, los resultados obtenidos revelan que el uso de enzimas ligninolíticas pueden ser una alternativa para el tratamiento de las aguas azules en los transportes públicos.

Firma del Asesor

Dra. Alcione García González

## **Agradecimientos**

A lo largo de la vida contamos con metas, retos y oportunidades. Una de las metas personales es realizar una maestría y a pesar de ser esta una meta académica los retos que se presentan en el proceso no son solo académicos sino también personales, estos retos no se habrían podido superar sin el apoyo de tantas personas a las que me gustaría expresar mi gratitud.

Primeramente, a mi asesora, al Dra Alcione García González por brindarme la oportunidad de trabajar en este proyecto, por siempre motivarme y apoyarme a lograr un poco más de lo esperado. También me gustaría agradecer al Dr. Bernardo García Reyes por aconsejarme a lo largo de mi maestría y permitirme realizar parte de mis experimentos en su laboratorio.

También quiero expresar especial gratitud a mi gran familia, abuelos, padres, hermanos, tíos y primos, por siempre apoyarme y aplaudirme cada uno de los logros obtenidos. También a mis amigos que me han ayudado a hacer más ligera esta travesía.

Quiero agradecer a profesores y personal de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL por el apoyo brindado.

Finalmente agradecer al CONACyT por el apoyo financiero otorgado para llevar a cabo este proyec

# Índice

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	x
<b>ABREVIATURAS</b> .....	xii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 <i>Formulación del desinfectante para uso de limpieza de inodoros</i> .....	2
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	5
2.1 <i>Hongos xilófilos</i> .....	5
2.1.1 <i>Hongos de podredumbre marrón</i> .....	5
2.1.2 <i>Hongos de podredumbre blanda</i> .....	5
2.1.3 <i>Hongos de podredumbre blanca</i> .....	5
2.2 <i>Basidiomicetos</i> .....	5
2.2.1 <i>Trametes versicolor</i> .....	6
2.3 <i>Mecanismo de biodegradación de la lignina</i> .....	6
2.4 <i>Mecanismos de biodegradación de hongos</i> .....	7
2.5 <i>Enzimas ligninolíticas</i> .....	7
2.5.1 <i>Lacasa (Lac)</i> .....	8
2.5.2 <i>Manganeso peroxidasa (MnP)</i> .....	9
2.5.3 <i>Lignina Peroxidasa (LiP)</i> .....	10
2.6 <i>Tecnologías para el tratamiento de efluentes</i> .....	11
2.6.1 <i>Tratamientos físicos</i> .....	11
2.6.3. <i>Tratamientos químicos</i> .....	12
2.7 <i>Aguas azules</i> .....	12
2.7.1 <i>Tratamientos más comunes del agua en los aeropuertos</i> .....	13
3.1 <i>Consumo de agua en grandes aeropuertos</i> .....	15
3.2 <i>Tratamiento de los desinfectantes para limpieza de inodoros portátiles y de aerolíneas</i> .....	15
3.3 <i>Degradación de contaminantes usando enzimas ligninolíticas</i> .....	16
3.4 <i>Optimización del medio de cultivo</i> .....	17
<b>5. APORTACIÓN CIENTÍFICA</b> .....	20
<b>6. HIPÓTESIS</b> .....	20
<b>7. OBJETIVOS Y METAS</b> .....	20
7.1 <i>Objetivo general</i> .....	20

7.2	<i>Objetivos específicos</i>	20
7.3	<i>Metas</i>	21
<b>8.</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	22
8.1.	<i>Propagación de la cepa fúngica y obtención de la biomasa</i>	23
8.2.	<i>Preparación y caracterización de cosustratos</i>	23
8.3	<i>Diseño exploratorio para la producción de las enzimas por fermentación sumergida</i>	23
8.3	<i>Diseño para la optimización de la producción de las enzimas ligninolíticas por fermentación sumergida utilizando los mejores cosustratos y cofactores.</i>	25
8.4	<i>Optimización de la producción de las enzimas ligninolíticas por fermentación sumergida</i>	26
8.4.	<i>Determinación de azúcares reductores</i>	27
8.5.	<i>Determinación de azúcares totales</i>	27
8.6.	<i>Determinación de proteína</i>	28
8.7	<i>Determinación de la concentración de compuestos fenoles</i>	28
8.8	<i>Ensayo enzimático para determinar lacasas</i>	28
8.9.	<i>Ensayo de actividad enzimática para determinar lignina peroxidasas</i>	29
8.10	<i>Ensayo de actividad enzimática para determinar manganeso peroxidasas</i>	29
8.11	<i>Tratamiento enzimático de aguas azules</i>	30
<b>9.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	32
9.1	<i>Propagación de la cepa fúngica y producción de biomasa en sólido</i>	32
9.2	<i>Preparación y caracterización de cosustratos</i>	32
9.3	<i>Diseño exploratorio para la producción de las enzimas por fermentación sumergida</i>	38
9.4	<i>Diseños de experimentos para la optimización de la producción de las enzimas ligninolíticas por fermentación sumergida utilizando los mejores cosustratos y cofactores</i>	48
9.4.1	<i>Cinética de cáscara de naranja</i>	49
9.4.2	<i>Cinética de cáscara de plátano</i>	56
9.4.3	<i>Cinética de salvado de Trigo</i>	64
9.5	<i>Tratamiento enzimático de aguas azules sintéticas</i>	72
<b>10.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	79
<b>11.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	82

## LISTA DE FIGURAS

Figura. 1: Modelo estructural de la lignina de madera aserrada.....	7
Figura 2. En a) se presenta el esquema de la estructura de la lacasa, el cual muestra la posición de los iones de cobre y en b) el mecanismo de reducción de oxígeno en su sitio activo.....	8
Figura 3. Ciclo catalítico de la enzima MnP. ....	9
Figura 4. Ciclo catalítico de la LiP. El catión radical del alcohol veratrílico funciona como un mediador redox y el compuesto III vuelve a la forma de la LiP nativa .....	11
Figura 5. Crecimiento en placa del hongo en medio PDA .....	32
Figura 6. Concentración de azúcares totales en los residuos lignocelulósicos.....	33
Figura 7. Concentración de azúcares reductores en los residuos lignocelulósicos. ....	34
Figura 8. Concentración de compuestos fenólicos en los residuos lignocelulósicos. ....	36
Figura 9. Concentración de demanda química de oxígeno (DQO) en los residuos lignocelulósicos.....	37
Figura 10. Relación de la concentración de azúcares reductores y activada enzimática del mejor tratamiento Salvado-Sulfato de Cobre (1 mM) para obtener lacasas. ....	40
Figura 11. Relación de la concentración de proteína y compuestos fenólicos del mejor tratamiento Salvado-Sulfato de Cobre (1 mM). ....	41
Figura 12. Superficie de respuesta para actividad de lacasa, cofactor vs cosustrato.....	41
Figura 13. Relación de la concentración de azúcares reductores y activada enzimática del mejor tratamiento para obtener MnP, con Cáscara naranja-Sulfato de cobre (0.5 mM). ..	43
Figura 14. Superficie de respuesta para actividad de MnP. ....	44
Figura 15. Relación de la concentración de proteína y compuestos fenólicos del mejor tratamiento Cáscara naranja-Sulfato de cobre (0.5 mM) para obtener MnP.....	45
Figura 16. Relación de la concentración de azúcares reductores y activada enzimática del mejor tratamiento para obtener LiP, Cáscara de plátano-sulfato de Magnesio (0.75mM). 47	47
Figura 17. Relación de la concentración de proteína y compuestos fenólicos del mejor tratamiento Cáscara de plátano-sulfato de Magnesio (0.75mM) para obtener LiP. ....	47
Figura 18. Superficie de respuesta para actividad de LiP. ....	48
Figura 19. Cinética de proteína extracelular en cultivo sumergido a 30°C variando la concentración del cosustrato y de cofactor, para cáscara de Naranja.....	49
Figura 20. Cinética de azúcares reductores en cultivo sumergido a 30°C modificando la concentración del cosustrato y de cofactor, para cáscara de Naranja.....	50
Figura 21. Cinética de compuestos fenólicos en cultivo sumergido a 30°C modificando la concentración del cosustrato y de cofactor, para cáscara de Naranja.....	51
Figura 22. Cinética de la actividad enzimática de lacasa en cultivo sumergido a 30°C modificando la concentración del cosustrato y de cofactor, para cáscara de Naranja.....	53
Figura 23. Cinética de la actividad enzimática de MnP en cultivo sumergido a 30°C modificando la concentración del cosustrato y de cofactor, para cáscara de Naranja.....	54

Figura 24. Cinética de la actividad enzimática de LiP en cultivo sumergido a 30°C modificando la concentración del cosustrato y de cofactor, para cáscara de Naranja. ....	55
Figura 25. Superficies de respuesta de la actividad enzimática de Lac 1), LiP 2) y MnP 3), utilizando cáscara de naranja como cosustrato y sulfato de cobre como cofactor.....	56
Figura 26. Cinética de proteína extracelular en cultivo sumergido a 30°C variando la concentración del cosustrato y de cofactor, para cáscara de plátano .....	57
Figura 27. Cinética de azúcares reductores en cultivo sumergido a 30°C modificando la concentración del cosustrato y de cofactor, para cáscara de plátano. ....	58
Figura 28. Cinética de compuestos fenólicos durante el cultivo sumergido a 30°C modificando la concentración del cosustrato y de cofactor, para cáscara de plátano.....	59
Figura 29. Cinética de la actividad enzimática de lacasa en cultivo sumergido a 30°C variando la concentración del cosustrato y de cofactor, usando cáscara de plátano.....	60
Figura 30. Cinética de la actividad enzimática de MnP en cultivo sumergido a 30°C variando la concentración del cosustrato y de cofactor, usando cáscara de plátano.....	62
Figura 31. Cinética de la actividad enzimática de LiP en cultivo sumergido a 30°C modificando la concentración del cosustrato y de cofactor. ....	63
Figura 32. Superficies de respuesta de la actividad enzimática de Lac 1), LiP 2) y MnP 3), utilizando cáscara de plátano, como cosustrato y sulfato de cobre como cofactor.....	64
Figura 33. Cinética de Proteína extracelular en cultivo sumergido a 30°C modificando la concentración del cosustrato y de cofactor, usando salvado de trigo.....	65
Figura 34. Cinética de azúcares reductores en cultivo sumergido a 30°C modificando la concentración del cosustrato y de cofactor, usando salvado de trigo.....	66
Figura 35. Cinética de compuestos fenólicos en cultivo sumergido a 30°C modificando la concentración del cosustrato y de cofactor, usando salvado de trigo.....	67
Figura 36. Cinética de la actividad enzimática de Lacasa en cultivo sumergido a 30°C modificando la concentración del cosustrato y de cofactor. ....	68
Figura 37. Cinética de la actividad enzimática d MnP en cultivo sumergido a 30°C modificando la concentración del cosustrato y de cofactor, usando salvado de trigo. ....	70
Figura 39. Superficies de respuesta de la actividad enzimática de Lac 1), LiP 2) y MnP 3), utilizando salvado de trigo, como cosustrato y sulfato de cobre como cofactor.....	72
Figura 40. Cinética de decoloración de aguas azules por los extractos con lacasas.....	74
Figura 41. Superficie de respuesta de degradación de aguas azules utilizando un extracto rico en Lacasa en la hora 51.....	74
Figura 42. Cinética de decoloración de aguas azules por los extractos crudos ricos LiP.	76
Figura 43. Superficie de respuesta de la degradación de aguas azules utilizando un extracto rico en LiP en la hora 2. ....	76
Figura 44. Cinéticas de decoloración de aguas azules por los extractos crudos ricos en MnP. ....	77

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Compuestos orgánicos degradados por enzimas ligninolíticas.....	2
Tabla 2. Formulación del desinfectante para uso de limpieza de inodoros portátiles y de aerolíneas (14).....	3
Tabla 3. Antecedentes de remoción biológica de aguas azules. ....	16
Tabla 4. Materiales necesarios para el proyecto. ....	22
Tabla 5. Composición del medio basal de Kirk modificado.....	23
Tabla 7. Corriás obtenidas por el programa a Desing expert del diseño exploratorio.....	25
Tabla 8. Optimizar la producción de enzimas ligninolíticas .....	26
(Diseño central compuesto de 2 <sup>2</sup> ) .....	26
Tabla 9. Diseño de experimentos (DE), factorial 2 <sup>2</sup> con los mejores Cosustratos.....	26
Tabla 10. Parámetros de optimización arrojados por el programa Desing Expert. ....	27
Tabla 11 Diseño de experimentos factorial 2 <sup>3</sup> para el tratamiento de aguas azules con extracto rico en Lacasa.....	30
Tabla 12. Diseño de experimentos factorial 2 <sup>2</sup> para el tratamiento de aguas azules con extracto rico en Lignina Peroxidasa. ....	31
Tabla 13. ANOVA de 1 Factor de los resultados de la concentración de los azúcares totales en los residuos lignocelulósicos sometidos al tratamiento estéril.....	33
Tabla 14. ANOVA de 1 Factor de los resultados de la concentración de los azúcares reductores en los residuos lignocelulósicos sometidos al tratamiento estéril. ....	35
Tabla 15. ANOVA de 1 Factor de los resultados de la concentración compuestos fenólicos en los residuos lignocelulósicos sometidos al tratamiento estéril. ....	36
Tabla 16. ANOVA de 1 Factor de los resultados de la concentración de demanda química de oxígeno (DQO) en los residuos lignocelulósicos sometidos al tratamiento estéril. ....	38
Tabla 17. ANOVA del DCC 2 <sup>3</sup> exploratorio, para la respuesta de la actividad enzimática de lacasas. ....	39
Tabla 18. ANOVA del DCC 2 <sup>3</sup> exploratorio, para la respuesta de la actividad enzimática de MnP. ....	42
Tabla 19. ANOVA del DCC 2 <sup>3</sup> exploratorio, para la respuesta de la actividad enzimática de LiP. ....	46
Tabla 20. ANOVA sobre la respuesta de la actividad enzimática de lacasa utilizando cáscara de naranja como cosustrato. ....	52
Tabla 21. ANOVA sobre la respuesta de la actividad enzimática de MnP utilizando cáscara de naranja como cosustrato. ....	53
Tabla 22. ANOVA sobre la respuesta de la actividad enzimática de LiP utilizando cáscara de naranja como cosustrato.....	55
Tabla 23. ANOVA sobre la respuesta de la actividad enzimática de lacasas utilizando cáscara de plátano como cosustrato.....	59

Tabla 24. ANOVA sobre la respuesta de la actividad enzimática de MnP utilizando cáscara de plátano como cosustrato.....	61
Tabla 25. ANOVA sobre la respuesta de la actividad enzimática de LiP utilizando cáscara de plátano como cosustrato. ....	62
Tabla 26. ANOVA sobre la respuesta de la actividad enzimática de lacasas utilizando salvado de trigo como cosustrato.....	67
Tabla 27. ANOVA sobre la respuesta de la actividad enzimática de MnP utilizando salvado de trigo como cosustrato.....	69
Tabla 28. ANOVA sobre la respuesta de la actividad enzimática de LiP utilizando salvado de trigo como cosustrato.....	71
Tabla 29. ANOVA de la superficie de respuesta de degradación de aguas azules utilizando un extracto rico en Lacasa en la hora 51. ....	73
Tabla 30. ANOVA de la superficie de respuesta de la degradación de aguas azules utilizando un extracto rico en LiP en la hora 2.....	75
Tabla 31. Tabla con las mejores condiciones para la decoloración de aguas azules. ....	78

## **ABREVIATURAS**

**Lac** \_\_\_\_\_ Lacasa

**LiP** \_\_\_\_\_ Lignina peroxidasa

**MnP** \_\_\_\_\_ Manganeso Peroxidasa

**HBP** \_\_\_\_\_ Hongo de pudrición blanca

**VA** \_\_\_\_\_ Alcohol veratrílico

**CCD** \_\_\_\_\_ Diseño factorial central compuesto

**DE** \_\_\_\_\_ Diseño de experimental

**ST** \_\_\_\_\_ Salvado de trigo

**CN** \_\_\_\_\_ Cáscara de naranja

**CP** \_\_\_\_\_ Cáscara de plátano

**ABTS** \_\_\_\_\_ 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

**ANOVA** \_\_\_\_\_ Análisis de varian

# 1. INTRODUCCIÓN

Mil cien millones de personas carecen de agua potable en el mundo (1). El agua es una sustancia abiótica, la más importante de la tierra y uno de los principales constituyentes del medio en que vivimos, se le considera un recurso vital tanto para los seres vivos como para los ecosistemas (2). Las fuentes de agua potable están bajo la amenaza de la contaminación, con consecuencias de gran alcance para la salud, el desarrollo económico y social tanto de comunidades así como naciones (3). En este siglo, la escasez de agua para el consumo humano e higiene, es uno de los principales problemas (4).

Una fuente de contaminación del agua que no ha sido muy estudiada es aquella generada en transportes públicos como aviones, camiones, trenes, vehículos marinos y otros medios de transporte. Las aguas residuales generadas en este tipo de transportes públicos son conocidas como *aguas azules* debido a la presencia de productos con colorantes azules para sanitizar, aromatizar y romper los residuos sólidos en tanques de retención (5). Este producto desinfectante puede contener formaldehído, glioxal, gluteraldehído, compuestos de amonio cuaternario, alquilfenoles y glicoles (6). Esta mezcla es, por lo tanto, difícil de degradar por lodos activados.

Los tratamientos químicos como la oxidación convencional, usando cloro es una de las opciones utilizada para estos efluentes. Sin embargo, al utilizar químicos no se pueden descargar el agua tratada directamente al medio ambiente, ya que podría dar lugar a una grave contaminación ambiental (6). Esto puede conducir a una disminución notable en el contenido de oxígeno disuelto como resultado de la oxidación aeróbica, lo cual afectaría enormemente el crecimiento y la proliferación de especies acuáticas, por lo que es necesario llevar a cabo una segunda oxidación convencional, aumentando así los costos de operación. Por esta razón, se buscan otras alternativas de tratamiento que abarate los costos de tratamiento, como son los tratamientos biológicos.

Los tratamientos biológicos se pueden dividir en aerobios (hongos, bacterias y enzimas) o anaerobios (bacterias y enzimas), el método más utilizado es el uso de consorcios microbianos, utilizando reactores continuos y discontinuos con microorganismos aclimatados, donde se han obtenido resultados con diferentes eficiencias de degradación (5).

Una alternativa de tratamiento biológico aerobio viable es el tratamiento con hongos de pudrición blanca (HPB), como el *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* o *Pleurotus ostreatus*, los cuales son considerados métodos biológicos no convencionales de alta eficiencia. Estos hongos son ampliamente utilizados para el tratamiento de aguas residuales debido a su capacidad de degradación de un compuesto complejo como la lignina (7), por lo que se consideran como una posible alternativa para la degradación total o parcial de un gran número de contaminantes recalcitrantes y tóxicos como los colorantes azo (8), los clorofenoles (9) y diversos fármacos como tamoxifeno (10).

La capacidad de estos hongos de degradar una gran variedad de contaminantes se debe a que producen enzimas inespecíficas llamadas enzimas ligninolíticas.

Entre estas enzimas se encuentran la lacasa, manganeso peroxidasa (MnP), lignino peroxidasa (LiP) y la peroxidasa versátil, las cuales catalizan reacciones de óxido reducción, además no requieren otros componentes celulares para poder desarrollar su función y son capaces de transformar una gran variedad de compuestos tóxicos (11), como se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1.** *Compuestos orgánicos degradados por enzimas ligninolíticas.*

Compuesto	Enzima	Referencia
Cloroformo	Lacasa	(Majeau <i>et al.</i> ,2010)
	LiP+AV	(Khindaria <i>et al.</i> ,1995)
Pentaclorobenceno	LiP+AV	(Ajeng <i>et al.</i> ,2016)
Bisfenol	Lacasa	(Rim <i>et al.</i> ,2018)
PCP	MnP+Mn <sup>2</sup>	(Reddy y Gold, 2000)
	Lacasa	(Reddy y Gold, 2000)
	LiP+AV	(Ullah <i>et al.</i> ,2000)
2,4,6-TCP	MnP+Mn <sup>2</sup>	(Reddy y Gold, 2000)
	LiP+AV	(Reddy y Gold, 200)
2-CDD	LiP+AV	(Hammel <i>et al.</i> ,1986)
2,7-DCDD	LiP+AV	(Valli <i>et al.</i> , 1992)
Antraceno	Lip+MnP+Lacasa	(Pozdnyakova <i>et al.</i> ,2018)
Antraquinona		
Fenantreno		
Paraquat	Lacasa+MnP	(Camacho <i>et al.</i> ,2017)
Glifosato	Lacasa+MnP+HRP	(Pizzul <i>et al.</i> ,2009)
Clothianidin	MnP	(Toshio <i>et al.</i> ,2017)

LiP: Lignino peroxidasa; AV: Alcohol veratril; MnP: Manganeso peroxidasa; PCP: Pentoclorofenol; 2,4,6-TCP: 2,4,6-Tri-clorofenol; 2-CDD: 2-Clorodibenzo-p-dioxina; 2,7-DCDD: 2,7-diclorodibenzo-p-dioxina.

Las enzimas como la lacasa, MnP y LiP son generalmente extracelulares y las producen hongos cuya función natural es degradar la lignina. La habilidad de los HPB para degradar colorantes y otros compuestos xenobióticos se debe a la naturaleza no específica de su sistema enzimático. El uso de lacasas y peroxidasas para la degradación de compuestos xenobióticos resulta muy prometedor(12,13) sobre todo para las aguas azules debido a su composición, entre las cual se encuentran compuestos con actividad antimicrobiana (5).

### 1.1 Formulación del desinfectante para uso de limpieza de inodoros.

En una patente de 1978, (Tabla 2) se enlistan los componentes que pueden tener la formulación del desinfectante para uso de limpieza de inodoros.

**Tabla 2.** Formulación del desinfectante para uso de limpieza de inodoros portátiles y de aerolíneas (14).

Componentes	% por peso
Formaldehído	5.20
Glioxal	0-1.5
Gluteraldehído	2-13
Compuestos de amonio cuaternario o aminas cuaternarias	
Bactericida	4.5-5
Agente humectante	0-5
Fragancia	0-5
Colorantes azules	0-1
Solvente	

Algunos de los componentes de la formulación de los desinfectantes usados en inodoros portátiles y de aerolíneas, han sido biotransformados con enzimas ligninolíticas, como los colorantes azules y compuestos fenólicos(16-18).

El sistema oxidativo de los hongos del grupo de la pudrición blanca de la madera es eficaz para degradar los colorantes y disminuir su toxicidad (15). Romero-Suárez en 2015 demostró que la lacasa de la cepa LMBTM5 del hongo basidiomiceto *Trametes polyzona* fue capaz de decolorar el 97.5% tinte azul de un solución de 100 mg/L a las 24 horas utilizando un pH de 4.5 a un temperatura de 40 C. (16).

Ferreira-Leitão en el 2016 demuestran el potencial oxidativo y la baja especificidad de las peroxidasas, logrando degradar el 98% de una solución de azul de metileno a 30 ppm en 30 minutos a 30 C, utilizando una concentración de 0.176 U/mL de Lignina peroxidasa adicionando pulsos de peróxido cada 5 minutos a una relación molar Azul de metileno: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 1:5(17).

En el 213 Thanunchanok y colaboradores purificaron una lacasa del hongo *Trametes polizona* la cual la utilizaron para la degradación de bisfenol y 6 tintes azul de bromofenol, azul brillante de remazol , naranja de metilo, negro 5, rojo congo y naranja acido, utilizaron 0.45 U/mL de lacasa para el experimento con las condiciones de 28 C y un pH de 4, el bisfenol se degrado un 100% a las primeras 3 horas, en el caso de los tintes el tiempo para llevar acabo la degradación fue de 24 horas logrado porcentajes de decoloración del 80 a 98%(18).

Linhartová y colaboradores en 2020 Presentaron un estudio donde un hongo de podredumbre blanca *Pleurotus ostreatus* fue capaz de degradar dos compuestos de amonio cuaternario (antimicrobianos) clorhexidina y la octenidina, que aun que se no se mencionan en la Tabla 3 como tal se presentan en diversos productos de desinfección, obteniendo el 70% de degradación clorhexidina y 48% de octenidina en un tiempo de 21 días, llegando a la conclusión que las enzimas MnP y Lacasa eran las responsables de la degradación(19).

Como se puede destacar la capacidad de degradación de los contaminantes está asociada a la actividad enzimática de los hongos de pudrición blanca, así como al uso de mediadores redox, los cuales son compuestos de bajo peso molecular que, una vez oxidados por las enzimas, pueden oxidar otros compuestos que en principio no son sustrato de la enzima (20). Sin embargo, agregar mediadores redox puede encarecer el tratamiento, por lo que es más conveniente enfocarse en mejorar la actividad enzimática optimizando la producción de las mismas. Una forma de optimizar la producción enzimática es usar inductores, tales como cosustratos, los cuales son diferentes fuentes de carbono / nitrógeno, un ejemplo son los residuos agroindustriales (21). Otro tipo de inductores de la producción y actividad enzimática son los cofactores, que para el caso de la lacasa al ser una enzima con un centro activo de cobre se utilizan sales divalentes como los son los iones  $\text{Cu}^{+2}$ , por otra parte las enzimas MnP y LiP al ser hemo-proteínas las sales del grupo hemo como el ion ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) en pequeñas cantidades pueden mejorar el rendimiento en la producción enzimática de los hongos (22). Un factor que estimula la producción de peroxidasas es también la adición del peróxido de hidrógeno ya que este funciona como mediador (17), en especial para la LiP. Esta enzima en particular tiene un potencial redox superior a las demás enzimas y, por esta razón, es importante su producción para la potencial aplicación en tratamiento de efluentes recalcitrantes como las aguas azules.

La mezcla de los componentes del satirizante utilizado en los sanitarios de los transportes públicos está diseñada especialmente para inactivar y/o eliminar el crecimiento bacteriano, para así evitar enfermedades en los pasajeros, Esto dificulta el tratamiento de las aguas azules utilizando lodos activados provocando que el tratamiento resulte ser lento y poco rentable

Para abordar este problema surge una alternativa enzimática, en este trabajo se optimizó la producción de enzimas ligninolíticas (lacasas, lignina y manganeso peroxidasa) a partir de un hongo *Trametes versicolor* nativo de la región y se degradaron aguas azules sintéticas con extractos enzimáticos ricos en cada una de las enzimas estudiadas. La optimización de la producción enzimática se llevó a cabo usando un diseño central compuesto de 2 factores, en cultivo sumergido. Los factores estudiados fueron la concentración de cofactor ( $\text{CuSO}_4$ ) y la concentración de cosustrato, esto para tres distintos cosustratos (salvado de trigo, cascará de plátano y cascará de naranja). Con los extractos optimizados para lacasas, MnP y LiP, respectivamente, se realizó la degradación de aguas azules, siguiendo el cambio de color de dichas soluciones sintéticas por UV-vis, en sistemas batch.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Hongos xilófilos**

Los hongos son reconocidos por sus aptitudes superiores para producir una gran variedad de proteínas extracelulares, ácidos orgánicos y otros metabolitos, así como por su capacidad para adaptarse a medios ambientes severos, sin restricciones. Más allá de la producción de tales metabolitos, los hongos han llamado la atención con creciente interés por el biotratamiento (eliminación o destrucción) de contaminantes inorgánicos y componentes orgánicos (23). Los hongos con capacidad de degradar lignina pueden ser clasificados dentro de tres categorías, marrón, blanco y suave basadas en el tipo de descomposición de la madera. La podredumbre marrón ataca la celulosa, mientras que la podredumbre blanca y suave ataca tanto la celulosa como la lignina. Hongos de pudrición blanca (basidiomicetos) son los más eficaces para el pretratamiento biológico de materiales lignocelulósicos (24).

#### **2.1.1 Hongos de podredumbre marrón**

Son capaces de degradar hemicelulosas y celulosa de la pared celular de la madera. La pudrición ocasionada por estos hongos es la más grave, causando un daño severo, porque produce una falla estructural en la madera infectada, la cual es seca y frágil, se debilita rápidamente, decreciendo su resistencia por la despolimerización de la celulosa antes de que se pueda ver cualquier evidencia externa de degradación.

#### **2.1.2 Hongos de podredumbre blanda**

Los ascomicetes y deuteromicetes ocasionan la llamada podredumbre blanda y solo degradan la celulosa y hemicelulosa de la madera, secretan celulasa de sus hifas, la cual descompone la celulosa en la madera y provoca la formación de cavidades microscópicas dentro de la madera, y algunas veces una decoloración y agrietamiento, patrón similar al de la podredumbre marrón (25)

#### **2.1.3 Hongos de podredumbre blanca**

Los hongos de pudrición blanca comprende un grupo heterogéneo de hongos micro y macroscópicos, los más conocidos son los basidiomicetos y algunos ascomicetos del género *Xylaraceae* (26). Sin embargo, los más estudiados son los primeros, debido a que son productores de metabolitos biológicamente activos, degradan todos los componentes mayores de la madera, como la celulosa, hemicelulosa y lignina, casi de manera simultánea, y ocasionan la pudrición de la madera hasta sentirla húmeda, esponjosa, blanda o fibrosa y de apariencia blanqueada. (27).

### **2.2 Basidiomicetos**

Constituyen una clase de hongos, representada por más de 30 000 especies, cuyo metabolismo y capacidad de producción ha sido apenas investigada. Los

basidiomicetos producen una amplia gama de productos naturales que abarca desde componentes con actividad antitumoral e inmunológicamente activos hasta agentes antimicrobianos, antifúngicos, antivirales, citostáticos, enzimas, reguladores de crecimiento y aromas (26), hasta componentes ligninolíticos (conjunto de enzimas extracelulares) para metabolizar la lignina que les confieren, asimismo, la capacidad de degradar un amplio abanico de contaminantes. La aplicación de estos hongos para tratar y recuperar espacios contaminados tiene un interés creciente(28).

### **2.2.1 *Trametes versicolor***

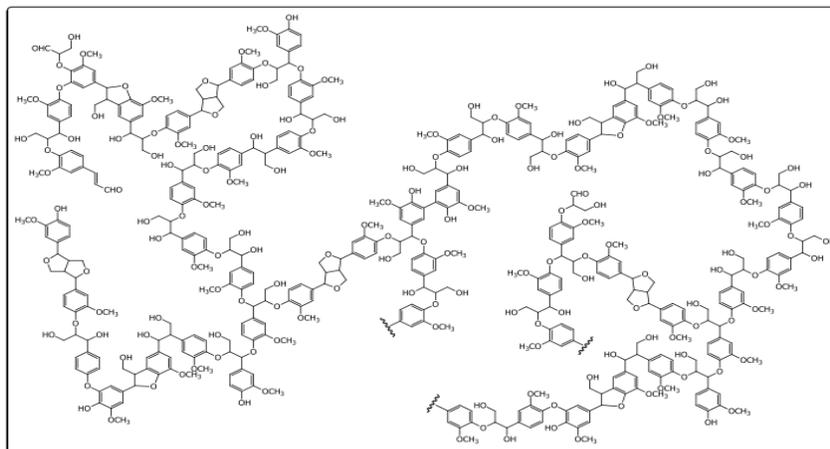
También es conocido como *Coriolus versicolor* y *Polyporus versicolor*, es un hongo saprófito, se desarrolla en bosques templados sobre madera muerta y pertenece a la familia *Poliporaceae* es un hongo basidomiceto causante de pudrición blanca, produce enzimas lignolíticas, inespecíficas y altamente oxidativas, con capacidad para degradar distintos contaminantes (29) produce micelio blanco, afelpado, con ocasionales fíbulas y a veces clamidosporas; sus hifas son de hialinas a blanquecinas y miden en promedio 3  $\mu\text{m}$  de diámetro, presenta septos nudosos y ramas laterales cortas, sin formar estructuras reproductivas en el medio de cultivo, cuando se encuentra en medio líquido con agitación orbital se forman pellets con tamaño de 2 a 5 mm (30).

Se ha demostrado que la producción de metabolitos secundarios de los hongos a partir del micelio, no muestra diferencias con aquellos producidos, en el cuerpo fructífero silvestre (31).

### **2.3 Mecanismo de biodegradación de la lignina**

Aun no se tiene conocimiento exacto sobre el proceso por el cual se degrada la lignina, es uno de los biopolímeros más abundantes en las plantas y junto con la celulosa y la hemicelulosa conforma la pared celular de las mismas en una disposición regulada a nivel nano-estructural, dando como resultado redes de lignina-hidratos de carbono, es un compuesto insoluble en agua y amorfo. Está formada por polimerización al azar de unidades radicales de alcohol sinapílico, p-cumarílico y coniferílico las cuales son el resultado de deshidrogenaciones mediadas por peroxidación. Esta polimerización resulta en una estructura fenilpropanoide muy heterogénea donde los precursores se unen por diferentes tipos de ligaduras C-C y aril éter (C-O-C) (32), ver Figura 1.

La composición o distribución de los tres componentes en esas redes varía dependiendo del tipo de planta. En el caso de la composición de la madera, los rangos más comúnmente encontrados son: Celulosa: 38-50%; Hemicelulosa: 23-32% y Lignina: 15-25%(33), Se ha postulado un esquema general sobre la degradación de este biopolímero y únicamente los hongos de pudrición blanca tienen la capacidad para romper los enlaces éter, similares a los de la lignina y sólo ellos producen enzimas fenol-oxidasas extracelulares involucradas en la degradación de lignina(34).



**Figura. 1:** Modelo estructural de la lignina de madera aserrada (Tomada de Chávez-Sifontes & Domine 2013).

## 2.4 Mecanismos de biodegradación de hongos

Se conocen tres principales mecanismos enzimáticos que son empleados por los hongos de la pudrición blanca de la madera para degradar contaminantes ambientales, dos de tipo oxidativo y uno reductivo: 1) sistema de degradación de la lignina, que realiza ataques oxidativos a moléculas orgánicas por medio de radicales libres generados por las enzimas ligninolíticas peroxidasas; 2) metabolismo, mecanismo oxidativo en que intervienen las enzimas citocromo P-450 monooxigenasas y 3) metabolismo donde un conjunto de enzimas cataliza reacciones de conjugación reduciendo los contaminantes. Estos mecanismos degradan o modifican los contaminantes sin ser empleados como sustratos para su crecimiento, es decir, la degradación se hace por cometabolismo. Aún no se han desarrollado trabajos para evaluar si algunos compuestos intermediarios de la degradación de xenobióticos son empleados como sustratos(35).

## 2.5 Enzimas ligninolíticas

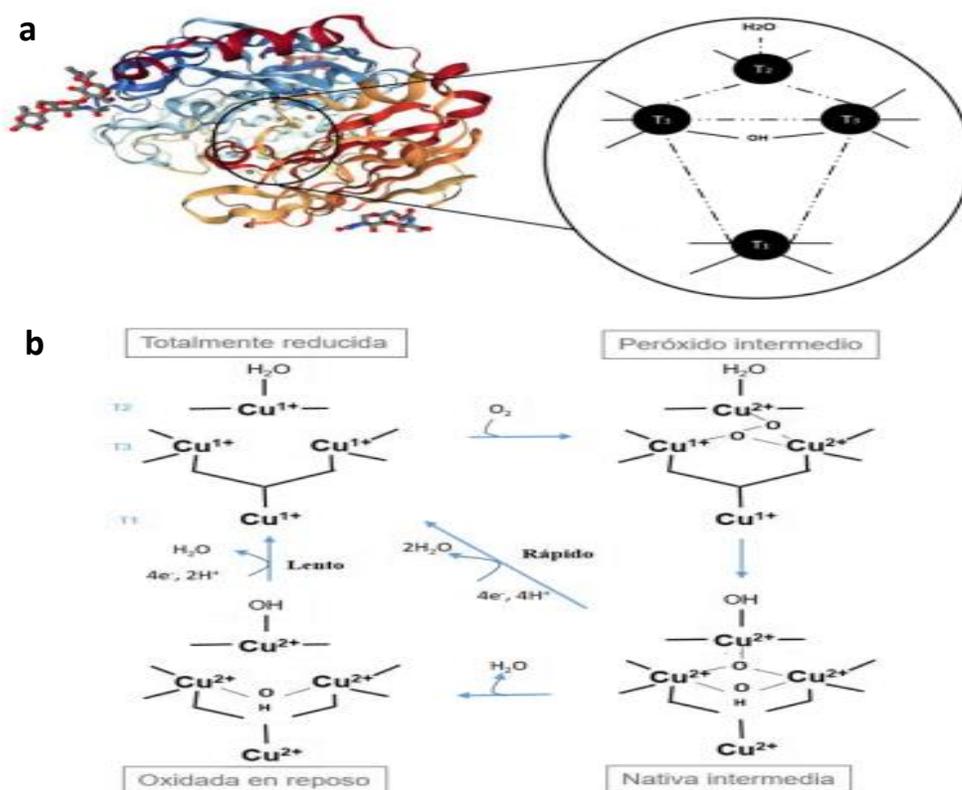
Los hongos de pudrición blanca son los degradadores de lignina más eficientes que existen en la naturaleza. Son productores de un amplio espectro de metabolitos secundarios. Diversos estudios indican que la Lacasa, Manganese Peroxidasa y Lignino Peroxidasa juegan un papel muy importante en la degradación de la lignina. Basado en el patrón de producción, los hongos de pudrición se han clasificado en dos grupos, aquellos productores de Lacasa y Manganese Peroxidasa y aquellos productores de estas enzimas además de la LiP. Las condiciones de cultivo afectan la fisiología del microorganismo y por consiguiente, la síntesis de las enzimas. Al producir una serie de enzimas poco específicas y de tipo extracelular, les permite degradar compuestos insolubles y altamente peligrosos para el ambiente. El estudio de estos hongos ha llevado a considerarlos como posibles candidatos en diversos procesos de bioremediación (34).

### 2.5.1 Lacasa (Lac)

Es una enzima bien conocida, es tipo cobre oxidasa ya que contiene átomos de cobre como se muestra en la Figura 2 y es capaz de oxidar polifenoles, fenoles sustituidos con metoxi, diaminas, aminas aromáticas y un rango considerable de otros compuestos, a través de la utilización de ciertos compuestos redox puede ser capaz de ampliar su espectro de sustratos, logrando así la oxidación de porciones no fenólicas de la lignina(36).

Se encuentra ampliamente distribuida en las plantas superiores, diversas clases de hongos y algunas bacterias, todas las lacasas son glicoproteínas extracelulares con pesos moleculares entre 60 y 80 kDa, de los cuales entre el 15 al 20% de su peso molecular(37) está dado por carbohidratos.

La lacasa fúngica (bencendiol-oxígeno oxidorreductasa) es una fenoloxidasas extracelular producida por el micelio de los hongos ligninolíticos son “oxidases azules”, que a diferencia de la mayoría de estas enzimas, reducen el oxígeno y producen agua en lugar de peróxido, además, han sido caracterizadas como enzimas de baja especificidad de sustrato(38), el potencial redox de la lacasa depende del organismo de origen, variando entre 0.5 y 0.8 V. (39).

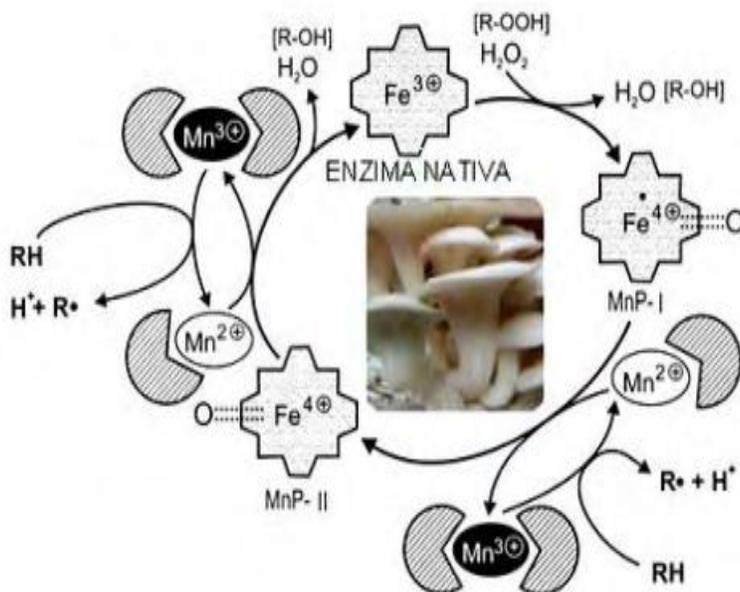


**Figura 2.** En a) se presenta el esquema de la estructura de la lacasa, el cual muestra la posición de los iones de cobre y en b) el mecanismo de reducción de oxígeno en su sitio activo (Tomado de Jones y Solomon, 2015).

## 2.5.2 Manganeso peroxidasa (MnP)

Es una enzima ligninolítica extracelular y al igual que la lignina peroxidasa, utiliza el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) como un oxidante para transformar el  $\text{Mn}^{2+}$  hasta el ion mangánico  $\text{Mn}^{3+}$ . El  $\text{Mn}^{3+}$ , estabilizado por quelación, actúa como un oxidante no específico, participando en la degradación de la lignina por el microorganismo que la produce(40).

El ciclo catalítico típico comienza con la oxidación de la enzima férrica por dos electrones del  $\text{H}_2\text{O}_2$  para formar el compuesto I, intermediario se puede observar en la (Figura 3). Este compuesto puede oxidar el  $\text{Mn}^{2+}$  a  $\text{Mn}^{3+}$  o puede oxidar sustratos fenólicos a sus correspondientes radicales y la enzima es reducida a un intermediario de un electrón oxidado a un intermediario de un electrón oxidado, Compuesto 2. El compuesto 2 de la MnP exhibe un requerimiento absoluto de Mn (2) como reductor. En la presencia de un exceso de peróxido, la enzima es oxidada al Compuesto 3 ( $\text{Fe}^{3+}\text{O}_2$ ), el cual no es parte del ciclo catalítico. La MnP también muestra tener la habilidad para acarrear la desproporción del peróxido en la presencia de  $\text{Mn}^{2+}$ (34).



**Figura 3.** Ciclo catalítico de la enzima MnP.

La enzima MnP posee un ambiente hemo similar a otras peroxidasa. No obstante, se distingue por su capacidad única de oxidar  $\text{Mn}^{2+}$  a  $\text{Mn}^{3+}$ . Este último catión, en forma quelada es capaz de oxidar una gama amplia de sustancias

orgánicas, incluyendo compuestos fenólicos simples, subestructuras fenólicas de lignina, sustancias húmicas. La aparente inespecificidad de MnP es causada por reacciones secundarias de iones  $Mn^{3+}$ . Para la oxidación de sustratos orgánicos, esta enzima requiere  $H_2O_2$  y lactato (41).

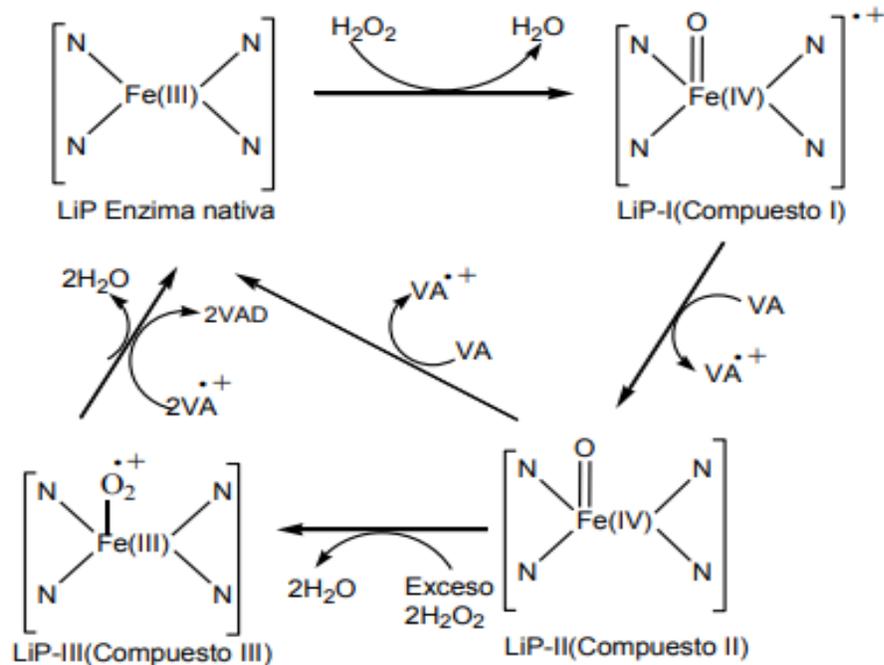
### 2.5.3 Lignina Peroxidasa (LiP)

Es una hemoproteína, conocida como ligninasa es una de las enzimas más importantes involucradas en la degradación de la lignina, esta enzima cataliza la despolimerización oxidativa de la lignina, esta reacción es dependiente del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )(42).

La producción de LiP está fuertemente regulada a nivel de su transcripción por nitrógeno, altas concentraciones de este nutriente inhiben su producción, también está regulada por carbono, pero se trata de regulaciones independientes.

El oxígeno también influye fuertemente en la regulación, es una práctica común ventilar con oxígeno puro a los cultivos para obtener una buena producción de LiP, la actividad peroxidasa depende de la presencia extracelular de  $H_2O_2$ , el cual es suministrado por enzimas tales como la glioxal oxidasa y la glucosa-Z-oxidasa o por sistemas no enzimáticos como por ejemplo las reacciones via Fenton (32).

El ciclo catalítico de LiP (Figura 4) está compuesto por tres reacciones consecutivas involucra primeramente la reacción del sitio activo de la enzima con el peróxido de hidrógeno. Esto produce la reducción del  $H_2O_2$  a  $H_2O$  y la oxidación por dos electrones de la proteína férrica un intermediario denominado compuesto I. Este intermediario posee dos equivalentes reductores, y contiene un centro oxiferril [ $FeP^{IV}=O$ ] y un radical  $\pi$ -catiónico. Este radical puede estar localizado ya sea en el grupo hemo o en algún residuo de la proteína, dependiendo de la isoenzima. Después, el estado de la proteína denominado compuesto I, se reduce mediante un electrón de una molécula de sustrato reductor (AH) dando lugar a un radical del sustrato y al compuesto II, en el cual el radical catiónico ha sido reducido a su estado nativo. Finalmente el compuesto II es reducido con un electrón por una segunda molécula de sustrato reductor (AH) hasta el estado nativo de la enzima que contiene el  $FeP^{3+}$  (43).



**Figura 4.** Ciclo catalítico de la LiP. El catión radical del alcohol veratrílico funciona como un mediador redox y el compuesto III vuelve a la forma de la LiP nativa (Tomada de Wong, D., 2009)

## 2.6 Tecnologías para el tratamiento de efluentes

### 2.6.1 Tratamientos físicos

Son los menos utilizados, dentro de este tipo de tratamientos se puede incluir la aplicación de temperatura pero además de ser costoso, deja un mal olor ya que elimina el oxígeno disuelto y las sales presentes en el agua. Otro de los procesos que se utilizan es el dejar pasar el tiempo, para que los gérmenes fecales disminuyan su concentración al ser el agua retenida en ambiente hostil.

### 2.6.2 Tratamiento fisicoquímico

Este método consiste en la combinación de operaciones físicas unitarias y procesos químicos para el tratamiento de aguas tanto residuales como naturales, dentro de los que puede mencionarse, la coagulación floculación, ozonación, osmosis inversa, entre otros, teniendo como ventajas la reducción de sólidos en suspensión y materia orgánica (DQO y DBO) como alternativa al tratamiento biológico, laminado o estabilización de cargas contaminantes para controlar la entrada a los tratamientos biológicos, reducción de contaminantes industriales no biodegradables (sobre todo metales pesados), eliminación de fósforo y espesamiento de lodos(44).

### **2.6.3. Tratamientos químicos**

Los agentes químicos desinfectantes más utilizados son el cloro, el dióxido de cloro y el ozono. Dentro de los que tenemos el cloro en su forma gaseosa o como hipoclorito de sodio o calcio es el más usado.

La aceptación del cloro es debida a 3 factores: su capacidad de oxidar sustancias inorgánicas (hierro, manganeso, nitritos, etc) que causan mal sabor, corrosión y deterioro en las líneas de transmisión del agua, la acción microbicida del cloro como algicida, bactericida y en menor medida virucida. Y la capacidad de mejorar los procesos de coagulación y floculación, ya que favorece la formación de flóculos, adicionalmente a las ventajas anteriores su uso es de bajo costo y es bastante seguro. El equipo que requiere para su dosificación no es sofisticado ni complejo.

#### **2.6.3.1 Dióxido de Cloro (ClO<sub>2</sub>)**

Es un gas relativamente inestable que se obtiene a partir de la mezcla de cloro con clorito sódico. Es relativamente inestable por lo que normalmente se genera en el lugar de aplicación. Una de sus ventajas es que no se ve afectado por el pH e incluso aumenta su potencialidad frente a amebas y enterovirus.

#### **2.6.3.2 Ozono**

Constituye la tercera alternativa tras el cloro y el dióxido de cloro. La aplicación de ozono también requiere de aplicación in situ debido a su inestabilidad(45).

#### **2.6.3.3 Radiación**

Hay varias formas que pueden desempeñar un papel desinfectante. Las radiaciones más útiles son UV y los rayos X . La radiación que más se utiliza es la UV debido a su costo, un inconveniente que tiene este tratamiento es su baja eficacia frente a la turbidez del agua.

### **2.7 Aguas azules**

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 con colorantes azules para sanitizar, aromatizar y romper los residuos sólidos en tanques de retención(5). 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 son usados para mitigar el impacto ambiental de los desechos(46) y pueden inhibir el crecimiento y la actividad de los microorganismos, usados comúnmente en un tratamiento biológico, dificultando el tratamiento de las agua azules(47).

En el caso de los aviones, las aguas azules en general son retiradas por camiones especiales de empresas tercerizadas (por ej.: Intercargo) y llevadas a una planta de tratamiento. El control de la gestión de aguas residuales por parte de dichas empresas deberá ser monitoreado por el organismo responsable del aeropuerto (ORSNA) y supervisado por la autoridad sanitaria(48).

### **2.7.1 Tratamientos más comunes del agua en los aeropuertos**

Las aguas que más frecuentemente pasan por el tratamiento, son provenientes de fuentes de pozos tubulares profundos, bien protegidos. Para que el tratamiento pueda ser evitado, esas aguas deberán tener poca dureza, poco color, no deberán presentarse turbias, bajos valores de hierro y sobre todo, deberán ser de buena calidad bacteriológica. La cloración de las aguas debe ser siempre prevista como medida de seguridad, vigilando que en los aeropuertos, exista preocupación constante por la no contaminación de las reservas. Los procesos de tratamientos usualmente adoptados en los aeropuertos son(49):

- Remoción del hierro
- Corrección de pH
- Desinfección

#### **2.7.1.1 Descripción de los procesos de remoción del hierro**

Los procesos de remoción del hierro en las aguas incluyen los siguientes:

- Aireación, seguida de contacto o filtración.
- Aireación, seguida de coagulación, decantación y filtración. La selección del proceso dependerá de la forma como se presenten las impurezas.

En el caso de aguas limpias que prescinden de tratamiento químico, como son las aguas subterráneas (pozos, galerías de infiltración), conteniendo bicarbonato ferroso disuelto (en la ausencia de oxígeno), el proceso más indicado es la aireación, seguida de contacto o filtración.

#### **2.7.1.2 Corrección del pH**

Cuando el agua a ser tratada tiene un PH bajo (ácida), se deben adicionar al agua sustancias alcalinas, tales como

- Cal hidratada (CaO)
- Carbonato de calcio (CaCO<sub>3</sub>)
- Carbonato de sodio (Barrilla Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)

Después de la aplicación de las sustancias alcalinas adecuadas, se tendrá el agua neutralizada y por tanto, no corrosiva. Cuando el agua a ser tratada tiene un pH

alto (básica), es alcalina y dura, formando incrustaciones debido a la precipitación de  $\text{CaCO}_3$ , se deben adicionar al agua sustancias ácidas, tales como:

- Gas Carbónico
- Ácido Clorhídrico
- Ácido Sulfúrico

Después de la aplicación del ácido adecuado, se tendrá el agua menos dura.

### **2.7.1.3 Desinfección**

La cloración es la desinfección más común del agua, buscando la destrucción de microorganismos causantes de enfermedades. La acción bactericida del cloro resulta de la reacción química entre el  $\text{HOCl}$  y la estructura celular de la bacteria o virus, tornando inactivos los procesos necesarios para la vida. La tasa de desinfección depende de la concentración y forma del residual de cloro disponible, período de contacto, pH, temperatura y otros factores. El ácido hipocloroso es más eficiente que el ión hipoclorito así, el poder residual libre de cloro decrece con el aumento del pH. La acción bactericida del cloro combinado disponible es significativamente inferior que la del cloro residual libre(49)

Los productos químicos utilizados como oxidantes son

- Cloro
- Hipoclorito de calcio
- Hipoclorito de sodio
- Ozono

### **3. ANTECEDENTES**

#### **3.1 Consumo de agua en grandes aeropuertos**

Los aeropuertos son instalaciones que tienen gran consumo de agua, generalmente para fines no potable tales como sistemas de enfriamiento de agua, control de incendios, limpieza (lavado de vehículos, pistas y aviones) y también usos públicos (WC y servicio de comida) (49).

El agua que consumen los aeropuertos de Culiacán, Mazatlán, Tampico, Torreón y Monterrey procede del suministro municipal, mientras que los aeropuertos de Acapulco, Chihuahua, Cd. Juárez, Durango, Monterrey, Reynosa, San Luis Potosí, Zacatecas y Zihuatanejo proviene de la extracción de pozos subterráneos, En 2016 en México el consumo total de agua de los aeropuertos fue de 722,988 m<sup>3</sup> de agua, de la cual el agua proveniente de red municipal fue de 378,358 m<sup>3</sup>, mientras que el agua proveniente de extracción subterránea fue de 344,630 m<sup>3</sup>(50), consumiendo la misma cantidad de agua que una pequeña o mediana ciudad(51)., Del 100% del agua utilizada en un aeropuerto entre el 23 y 26% corresponde a agua utilizada en servicios sanitarios(52) las cuales son llamadas aguas azules.

Según la Manifestación de Impacto Ambiental (MIA) presentada por la secretaria de defensa Nacional (Sedena) ante la Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat) en el 2021 el aeropuerto de Santa Lucia en el estado de México consumirá al día 6 millones de litros de agua lo equivalente al consumo diario de 15 mil familias de cuatro personas.

A nivel mundial la cantidad de agua utilizada por los aeropuertos es igual de alarmante en el 2018 Merve y Boyacioglu realizaron un estudio donde reportaron que en ese año un aeropuerto ubicado en Turquía tubo un consumo anual de agua de 436000 m<sup>3</sup> atendiendo a 12 millones pasajeros y 81 mil aviones, cuantificando que el agua utilizada para WC por pasajero fue de 6-8.5 L (52).

#### **3.2 Tratamiento de los desinfectantes para limpieza de inodoros portátiles y de aerolíneas**

Los trabajos de degradación de los componentes de desinfectantes de inodoros portátiles son recientes y se han enfocado en la complejidad de los componentes de las sustancias del satirizante empleado, el cual debe tener una alta capacidad desinfectante y antibacterial para evitar propagar enfermedades como el cólera, las fiebres entéricas (*Salmonella*), la disentería bacilar y amebiana y otras infecciones(53).

Xu y colaboradores en 2013, llevaron a cabo una evaluación de la eficiencia del tratamiento de aguas azules mediante oxidación con cloro diluido, así como la calidad del agua residual procesada a través de una segunda etapa de oxidación.

Los resultados indicaban que a pesar de que los contaminantes de primera categoría en aviones cumplían con los requisitos del estándar de descarga, el tratamiento únicamente a través de desinfección con cloro no era suficiente, debido a la presencia de varios contaminantes de segunda clase como la demanda bioquímica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>), demanda química de oxígeno (DQO), contenido de nitrógeno (amino), contenido total de fósforo, tensoactivo aniónico, el cobre total, sulfuros y compuestos orgánicos halogenados y fenoles. Por lo tanto, era necesario un tratamiento adicional a través de una segunda etapa de tratamiento de aguas residuales (6).

Moreno-Andrade y colaboradores en 2014, evaluaron la aclimatación y la degradación de aguas azules de una aeronave con biorreactores, uno discontinuo y otro continuo, operados durante 10 días. La aclimatación de lodos activados se realizó en sistemas en lote. En el proceso biológico discontinuo se trabajó con una concentración inicial de DQO de 1150 mg DQO/L, donde la eficiencia de eliminación fue superior al 80%, medido como DQO y DBO<sub>5</sub>. El total de sólidos suspendidos en el efluente fue inferior a 60 mg/L. En el caso del sistema continuo se aplicó una concentración inicial de 850 mg DQO/L de aguas residuales azules y se obtuvieron eficiencias de eliminación de hasta 72 y 88% como DQO y DBO<sub>5</sub>, respectivamente. Para ambos procesos, la aplicación de la alta concentración puntual de agua azul resultó en una disminución de la eficiencia de eliminación (<40%) (5), ver Tabla 3.

**Tabla 3. Antecedentes de remoción biológica de aguas azules.**

<b>Remoción de aguas azules</b>					
<b>PROCESO</b>	<b>Concentración Inicial de DQO</b>	<b>Eficiencia de eliminación de DQO</b>	<b>Sólidos suspendidos totales</b>	<b>DBO<sub>5</sub></b>	<b>Autor</b>
<b>Proceso biológico discontinuo</b> (lodos activados)	1150 mg/L	80%	60 mg /L	80%	Moreno-Andrade <i>et al.</i> ,2014
<b>Proceso biológico continuo</b> (lodos activados)	850 mg/L	72%		88%	Moreno-Andrade <i>et al.</i> ,2014

### **3.3 Degradación de contaminantes usando enzimas ligninolíticas**

Los hongos de pudrición blanca son los microorganismos más eficientes en el tratamiento de moléculas xenobióticas, se les atribuye esta habilidad por su capacidad de producir un complejo enzimático con actividad oxidativa(54).

Varios estudios demuestran que las enzimas ligninolíticas (complejo enzimático) son capaces de degradar diferentes compuestos, especialmente colorantes (7,55,56), clorofenoles (9), fenoles (29,57), antibióticos (10,58) entre otros.

En 2016 Zuleta-Correa y colaboradores utilizaron un hongo de podredumbre blanca (*Trametes versicolor*) en un proceso de degradación del colorante rojo

básico 46, bajo fermentación en estado sólido con una humedad del 90%, una proporción carbono: nitrógeno de 12:1 a 20°C, alcanzando una degradación máxima de 63.0% a los 17 días de incubación cuando en el medio se tenía la presencia de tres enzimas, la lacasa con una actividad enzimática de 15.6 (U/gss), Manganeso Peroxidasa 6.4 (U/gss) y Lignina Peroxidasa 1.8 (U/gss).

Carabajal, en el 2014, identificó un número considerable de las enzimas de *Trametes versicolor* relacionadas con la degradación de la biomasa lignocelulósica y con capacidad para degradar distintos compuestos fenólicos (fenol, ácido gálico, 2,6 dimetoxifenol y guayacol) , debido a su habilidad para utilizar el fenol como única fuente de carbono. Se purificaron diversas enzimas ligninolíticas: una lacasa, tres Mn y una peroxidasa versátil, del hongo *T. versicolor*. Se demostró que removieron eficientemente el fenol y nitrofenol, decolorando también el tinte Azure B y el licor negro, residuo proveniente de la producción de papel. El hongo *T. versicolor* removió el 71, 62, 74 y 73% del fenol (15 mM) en un periodo de 23 días. Se cuantificaron la actividad enzimática obtenida por acción de sus enzimas purificadas obteniendo 7.97 U/L de lacasa, 427 U/L Mnp y, 72 U/L Peroxidasa versátil. El hongo produjo lacasa como principal enzima (29).

Montoya y colaboradores en 2014 evaluaron la degradación del herbicida paraquat y su efecto en la producción de enzimas ligninolíticas por parte de algunos hongos de pudrición blanca aislados del sur de México., Tres de las 6 cepas evaluadas, correspondientes a las especies *Polyporus tricholoma*, *Cilindrobasidium laeve* y *Deconica citrispora* mostraron niveles de degradación del 32, 26 y 47%, a los 12 días de cultivo en presencia del herbicida. *P. tricholoma* ECS-58 y *D. citrispora* ECS-77 en el cultivo con paraquat mostraron aumentos en las actividades enzimáticas de lacasas y MnP durante los 12 días de crecimiento. En las cepas que presentaron el mayor porcentaje de degradación, se realizaron ensayos, después de 24 h de incubación, se obtuvo una degradación del 49% del paraquat inicial con los extractos de *D. citrispora*. Los resultados obtenidos indican que la degradación del herbicida estaría asociada a la presencia de enzimas extracelulares en los hongos de la pudrición blanca(59).

### 3.4 Optimización del medio de cultivo

Una manera de optimizar el medio para la producción de enzimas es adicionando sales como lo presenta Bonugli-Santos y colaboradores en 2010 quienes trabajaron con tres hongos de origen marino (*Aspergillus sclerotiorum*, *Cladosporium cladosporioides* y *Mucor racemosus*) bajo diferentes fuentes de carbono y condiciones de salinidad variando la concentración de glucosa, salvado de trigo, NH<sub>4</sub>Cl y NaCl con un diseño de experimentos 2<sup>3</sup>, usando como respuesta las actividades enzimáticas de Lac, MnP y LiP, obteniendo los mejores resultados con la combinación que contenía 0.5/L g de glucosa; 0.0750 g/L de extracto de levadura; 0.025 g/L de NH<sub>4</sub>Cl, 6.25 g/L de NaCl, suplementado con salvado de trigo 2.4 mg/L utilizando el hongo *Mucor racemosus* obteniendo actividades enzimáticas de 4484.30 U/L para MnP y 898.15 U/L de lacasa, no se obtuvo presencia de LiP(60)

Otra manera de llevar a cabo la optimización variando la concentración de sales como el ion  $\text{Cu}^{2+}$  es, como lo hizo Cruz en el 2016 donde utilizó tres sustratos como fuente de carbono (glucosa, cascarilla de arroz y salvado de trigo) y una sal de cobre. Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con 0.2 g/L  $\text{Cu}^{2+}$  y 9.23 g/L de glucosa presentó la mayor actividad enzimática al día 38 obteniendo 100.62 U/mL de lacasa con las condiciones de pH 6.05 y 30°C (61). Otro ejemplo lo presenta Yasmeeen y colaboradores en el 2013 donde utilizaron dos residuos agroindustriales la mazorca de maíz y el tallo del plátano de manera individual y combinado, utilizando los hongos *Schizophyllum commune* y *Ganoderma lucidum* así mismo optimizaron factores físicos como el pH, la temperatura, la humedad, el tamaño del inóculo y el tiempo de incubación llevando a cabo un diseño de experimentos central compuesto, encontrando que las condiciones óptimas fueron con la combinación de mazorca de maíz de 5 g/L, pH 4.5, temperatura de 35 ° C, un tamaño de inóculo 4 mL, con humedad del 60% obteniendo actividades de lignina peroxidasa 1,270.40 U/mL, manganeso peroxidasa 715.08 U/mL y lacasa 130.80 U/mL(62).

Posteriormente en el 2018 Moqueem y colaboradores optimizaron el proceso de fermentación en estado líquido usando el hongo *Coriolus versicolor* variando el tipo de sustrato utilizando olote de maíz, cascará de arroz, cáscara de trigo, bagazo de caña de azúcar y tallo de plátano para la producción de enzimas ligninolíticas, el medio que contenía bagazo de caña de azúcar como sustrato mostró la actividad máxima de enzimas lignolíticas que incluyen MnP  $377 \pm 2.7$  U/mL, LiP  $289 \pm 1.5$  U/mL y Lacasa ( $381 \pm 4.2$  U/mL en el quinto día de incubación a 35 ° C, posteriormente variaron parámetros de fermentación tanto físicos como los productos nutricionales, se concluyó que un pH de 4.5 con tamaño de inóculo de 3 ml, 2 g de sustrato, melaza como fuente de C, extracto de carne como fuente de N,  $\text{MnSO}_4$  y  $\text{CuSO}_4$  obtuvieron actividades de MnP  $641 \pm 7.6$  U/mL, LiP  $488 \pm 5.9$  U/mL y Lacasa  $675 \pm 9.1$  U/mL(63).

Una de las enzimas importantes para llevar el tratamiento de agua contaminada es lignina peroxidasa LiP debido a que tiene un potencial de degradación más alto que la MnP y lacasa(64). Con el fin de optimizar las condiciones para obtener la enzima LiP Wen y colaboradores en 2009 evaluaron condiciones físicas (pH, temperatura) y sustancias químicas (concentraciones de alcohol veratrílico (VA) y  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a diferentes concentraciones con el hongo *Phanerochaete chrysosporium*., obteniendo que las concentraciones optimizadas se determinaron como pH 4.2, 37 grados, utilizando concentraciones de alcohol veratrílico a 2 mM y 0.4 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  obteniendo una actividad de 40 U/L.

## 4. ANÁLISIS CRÍTICO DE LA LITERATURA

La descarga de desechos líquidos de aeronaves sin un adecuado manejo puede causar problemas graves de contaminación ambiental. En particular, puede deteriorar la calidad del agua, En consecuencia, esto puede ejercer un efecto negativo en la producción de la industria, la agricultura y la pesca, y puede conducir a la propagación de enfermedades infecciosas, a su vez existen solo dos estudios reportados en la literatura en lo que se aborde este problema de los cuales solo uno es utilizando un proceso biológico.

Las enzimas ligninolíticas como la lacasa y MnP han sido ampliamente estudiadas para su optimización y su uso para la posterior remoción de diferentes contaminantes, pero para la enzima LiP son pocos los estudios que se centran a su producción y optimización, siendo esta la enzima ligninolítica con el mayor poder oxidativo, lo cual es muy útil para la tratar diferentes contaminantes.

Por lo tanto, en este estudio se optimizó la producción de enzimas ligninolíticas (lacasas, lignina y manganeso peroxidasa) a partir de un hongo *Trametes versicolor* nativo de la región y se degradaron aguas azules sintéticas con extractos enzimáticos ricos en cada una de las enzimas estudiadas. La optimización de la producción enzimática se llevó a cabo usando un diseño central compuesto de 2 factores, en cultivo sumergido. Los factores estudiados fueron la concentración de cofactor ( $\text{CuSO}_4$ ) y la concentración de cosustrato, esto para tres distintos cosustratos (salvado de trigo, cascará de plátano y cascará de naranja). Con los extractos optimizados para lacasas, MnP y LiP, respectivamente, se realizó la degradación de aguas azules, siguiendo el cambio de color de dichas soluciones sintéticas por UV-vis, en sistemas batch.

## **5. APORTACIÓN CIENTÍFICA**

La optimización de la producción de enzimas ligninolíticas usando tres tipos de residuos agroindustriales (cosustratos), y variando para cada residuo la concentración de cosustrato y la concentración de cofactor ( $\text{CuSO}_4$ ). Así como la degradación de aguas azules sintéticas con los extractos enzimáticos optimizados.

## **6. HIPÓTESIS**

Los extractos enzimáticos ligninolíticos obtenidos con *Trametes versicolor* en cultivo sumergido usando cosustratos y cofactor, incrementan más del 50% de la actividad enzimática, en comparación con el medio de Kirk convencional. Además, los extractos enzimáticos obtenidos durante la optimización permiten una decoloración de soluciones sintéticas de aguas azules en más del 50%.

## **7. OBJETIVOS Y METAS**

### **7.1 Objetivo general**

Optimizar la producción de enzimas ligninolíticas usando cosustratos y cofactores con un *Trametes versicolor* nativo de la región, para la degradación de las aguas azules sintéticas.

### **7.2 Objetivos específicos**

1. Propagar la cepa fúngica y obtener la biomasa necesaria para inocular los reactores batch.
2. Estandarizar las técnicas analíticas necesarias para la determinación de azúcares reductores, azúcares totales, proteína extracelular y compuestos fenólicos.
3. Preparar y caracterizar los cosustratos, midiendo azúcares totales, azúcares reductores, concentración de compuestos fenólicos y demanda química de oxígeno.
4. Encontrar las condiciones óptimas de la producción de enzimas ligninolíticas con un diseño factorial central compuesto (CCD) de 3 factores con 6 puntos centrales, variando el residuo agroindustrial (cosustrato), el tipo de cofactor y la concentración de cofactor y considerando como

respuestas la actividad enzimática de Lac, LiP, MnP, azúcares reductores, azúcares totales, proteína extracelular y compuestos fenólicos.

5. Optimizar la producción de enzimas ligninolíticas con un diseño factorial central compuesto  $2^2$ , para tres cosustratos diferentes, tomando como factores la concentración de cosustrato y la concentración del cofactor seleccionado. Tomando como respuestas la actividad enzimática de Lac, LiP, MnP, azúcares reductores, azúcares totales, proteína extracelular y compuestos fenólicos.
6. Degradar aguas azules con los extractos con mayor actividad enzimática para lacasa, lignina y manganeso peroxidasa, respectivamente con un diseño de experimentos central compuesto  $2^3$ , usando la T, el pH y la concentración de extracto como factores y midiendo el % de degradación por espectrofotometría de UV-Vis.

### **7.3 Metas**

1. Determinación de las condiciones óptimas para la producción de enzimas ligninolíticas con el hongo nativo usando cosustratos y cofactores.
2. Evaluación del extracto enzimático para degradar aguas azules sintéticas.
3. Obtención del grado de maestría en 2 o 2.5 años.
4. Difusión de resultados de la investigación de tesis en un congreso nacional o internacional.
5. Publicación de un artículo de investigación en una revista indizada.

## 8. METODOLOGÍA

Los reactivos, así como los equipos que se usaron para la realización del trabajo experimental de la tesis, se encuentran en listados en la Tabla 4. La mayoría de los reactivos y equipos mencionados se encuentran en el Laboratorio de Físicoquímica de Interfases, Laboratorio de Farmacología molecular y Modelos Biológicos, así como en el Laboratorio de Tratamiento de aguas II, de la Facultad de Ciencias Químicas.

**Tabla 4.** *Materiales necesarios para el proyecto.*

<b>Materiales</b>	<b>Equipo</b>	<b>Reactivos</b>
Caja Petri	Incubadora	Papa Dextrosa Agar (PDA)
Filtros Whatman 0.45µm, 1µm	Espectrofotómetro UV-Visible	Glucosa Mineral
Espátula	NanoDrop	Extracto de levadura
Matraz Erlenmeyer 250ml, 500ml, 1000ml	Termociclador	Fosfato de potasio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )
Tubo de ensayo	Lector de Gel	Sulfato de magnesio, heptahidratado (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)
Tubo eppendorf	Centrífuga	Cloruro de Potasio (KCl)
Matraz quitasato	Autoclave	Tetraborato disódico, decahidratado (B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> Na <sub>2</sub> ·10H <sub>2</sub> O)
Vasos de precipitado 100ml, 250ml y 500ml	Campana de flujo laminar	Sulfato de cobre, pentahidratado (CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O)
Manguera	Cámara de electroforesis (SDS-PAGE)	Sulfato de manganeso, tetrahidratado (MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O)
Probetas 100ml y 250ml		Molibdato de amonio, tetrahidratado ((NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O)
Guantes de nitrilo		Alcohol veratrílico
Micropipetas 1mL, 500µm		Ácido acético CH <sub>3</sub> COOH
Pipetas 5mL y 10mL		2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS)
Puntillas para micropipeta		Reactivo de Bradford (Bio-Rad)
		Albúmina sérica bovina
		Tartato de sodio C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>6</sub> Na·H <sub>2</sub> O
		Malonato CH <sub>2</sub> (COO) <sub>2</sub> <sup>2-</sup>
		Azul de metileno
		Bolsa de sanitizante
		Peróxido de hidrógeno H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
		Cáscara de plátano Cáscara de naranja Salvado de trigo Tusa u olote de Maíz

### 8.1. Propagación de la cepa fúngica y obtención de la biomasa

El hongo de la pudrición blanca (HPB) fue recolectado y aislado en un trabajo previo del grupo de investigación(55) y se ha identificado como *Trametes versicolor*. Para la activación de la cepa fúngica, se preparó agar papa dextrosa (PDA), bajo las condiciones estándar de esterilización (15 min a 121 °C y 15 psi), posteriormente se realizó una siembra con la metodología de agar plots en placa y se incubaron a 30 °C ± 1 por 10 días aproximadamente, después las placas sembradas fueron almacenadas a 4 °C ± 1.

### 8.2. Preparación y caracterización de cosustratos

Se trabajó con 5 cosustratos salvado de trigo, olote de maíz, cáscara de naranja, cáscara de plátano y bagazo de agave, todos fueron secados en un horno con aire a 65 °C durante 24 horas y 48 horas en caso de la cáscara de plátano, posteriormente fueron molidos en un molino vibracional durante 10 minutos y se tamizaron utilizando una malla de 0.5 µm.

Una vez tamizados cada uno de los residuos lignocelulósicos, se adicionaron 6 g/L de residuo y 100 mL del medio Kirk modificado en matraces Erlenmeyer de 250 mL, ver la Tabla 5. Se trabajó por triplicado, obteniendo un total de 30 matraces de los cuales 15 matraces que se llevaron a esterilizar con las condiciones de 15 min a 121 °C y 15 psi y 15 que no se esterilizaron, a cada uno de los matraces de les midió azúcares totales, azúcares reductores, concentración de compuestos fenólicos y demanda química de oxígeno.

**Tabla 5.** Composición del medio basal de Kirk modificado.

Componente	Concentración (por litro)
Glucosa (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	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> )	0.22 g
Fosfato monopotásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.20 g
Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0.05 g
Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> )	0.01 g
Elementos traza	10 ml
Sulfato de cobre (CuSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0.08 g
Molibdato de amonio (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.05 g
Sulfato de manganeso (MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	0.07 g
Sulfato de zinc (ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0.043 g
Cloruro de hierro (FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O)	0.01 g

### 8.3 Diseño exploratorio para la producción de las enzimas por fermentación sumergida

Se realizó un diseño experimental central compuesto (CCD), factorial 2<sup>3</sup> con 6 puntos centrales y un alfa de 2, como se muestra en la Tabla 6, para evaluar el efecto del cosustrato (salvado de trigo, tusa u olote de maíz, cáscara de naranja, cáscara de plátano y bagazo de agave), del cofactor (cloruro de cobre (CuCl<sub>2</sub>),

sulfato de magnesio ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ), sulfato de cobre ( $CuSO_4$ ), sulfato de manganeso ( $MnSO_4$ ) y nitrato de cobre ( $Cu(NO_3)_2$ ), y de la concentración del cofactor (0, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 mM) en la producción enzimática. La producción de las enzimas ligninolíticas se llevó a cabo mediante fermentación sumergida. Para ello, se prepararon 5L de medio kirk utilizando un total de 20 matraces Enrlenmeyer de 500 mL, fueron vertidos 250 mL del medio de cultivo recientemente preparado, a los que posteriormente se les agregaron las cantidades y tipo de cofactor y cosustrato que se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 6.** Factores y niveles a evaluar en el CCD 2<sup>3</sup>.

<b>VARIABLE INDEPENDIENTE</b>	<b>-<math>\alpha</math></b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>+<math>\alpha</math></b>
<b>Tipo de Cosustrato</b>	Tusa	Bagazo de agave	Salvado de trigo	Cáscara de plátano	Cáscara de naranja
<b>Tipo de Cofactor</b>	Cloruro de cobre	Sulfato de magnesio	Sulfato de cobre	Sulfato de manganeso	Nitrato de cobre
<b>Concentración de cofactor</b>	0	0.25 mM	0.5 mM	0.75 mM	1 mM

Antes de esterilizar los biorreactores se ajustó el pH a 4 con NaOH 0.1 M. Ya agregadas las cantidades anteriormente descritas, se esterilizaron los biorreactores a 121 °C, a una presión de 15 psi, durante 15 min y se inoculan con el HPB utilizando 10 plugs de 1 cm<sup>2</sup> para cada uno.

Antes de esterilizar los biorreactores se ajustó el pH a 4 con NaOH 0.1 M. Ya agregadas las cantidades anteriormente descritas, se esterilizaron los biorreactores a 121 °C, a una presión de 15 psi, durante 15 min y se inoculan con el HPB utilizando 10 plugs de 1 cm<sup>2</sup> para cada uno. Por último, se efectuó la fermentación a 30 °C por 22 días a 150 rpm. Se tomaron muestras diariamente de 2 mL de cada uno de los biorreactores, para realizar la medición de actividad enzimática, proteína extracelular, concentración de fenoles y de azúcares reductores.

**Tabla 7.** Corrias obtenidas por el programa a Desing expert del diseño exploratorio.

No Corrida	Cosustrato	Cofactor	Concentración de cofactor
1	Bagazo de agave	CuCl <sub>2</sub>	0.25 mM
2	Cáscara de plátano	CuCl <sub>2</sub>	0.25 mM
3	Bagazo de agave	M <sub>n</sub> SO <sub>4</sub>	0.25 mM
4	Cáscara de plátano	M <sub>n</sub> SO <sub>4</sub>	0.25 mM
5	Bagazo de agave	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.75 mM
6	Cáscara de plátano	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.75 mM
7	Bagazo de agave	M <sub>n</sub> SO <sub>4</sub>	0.75 mM
8	Cáscara de plátano	M <sub>n</sub> SO <sub>4</sub>	0.75 mM
9	Tusa de maíz	CuSO <sub>4</sub>	0.50 mM
10	Cáscara naranja	CuSO <sub>4</sub>	0.50 mM
11	Salvado de trigo	CuCl <sub>2</sub>	0.50 mM
12	Salvado de trigo	(Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> )	0.50 mM
13	Salvado de trigo	CuSO <sub>4</sub>	0.50 mM
14	Salvado de trigo	CuSO <sub>4</sub>	1 mM
15	Salvado de trigo	CuSO <sub>4</sub>	0.50 mM
16	Salvado de trigo	CuSO <sub>4</sub>	0.50 mM
17	Salvado de trigo	CuSO <sub>4</sub>	0.50 mM
18	Salvado de trigo	CuSO <sub>4</sub>	0.50 mM
19	Salvado de trigo	CuSO <sub>4</sub>	0.50 mM
20	Salvado de trigo	CuSO <sub>4</sub>	0.50 mM

### 8.3 Diseño para la optimización de la producción de las enzimas ligninolíticas por fermentación sumergida utilizando los mejores cosustratos y cofactores

Se realizó un diseño experimental (DE), factorial 2<sup>3</sup> como se muestra en la Tabla 8 con 4 puntos centrales, replica en los puntos axiales y un alfa de 2, para evaluar el efecto de los mejores cosustratos (salvado de trigo, cáscara de naranja y cáscara de plátano) a las concentraciones de (0, 1.2, 2.5, 3.75 y 5 g/L) y el mejor cofactor (sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>), a las concentraciones de (0. 0.25, 0.5, 0.75 y 1 mM). La producción de las enzimas ligninolíticas se llevó a cabo mediante fermentación sumergida. Para ello se prepararon 4L de medio Kirk utilizando un total de 16 matraces Enrlenmeyer de 500 mL para cada cosustrato, cada uno de los puntos del diseño se llevaron por triplicado, Se vertió 250 mL del medio Kirk modificado, posteriormente se les agregaron las cantidades de tipo de cofactor y cosustrato que se muestran en la Tabla 9., se ajustó el pH a 4 con NaOH 0.1 M. Ya agregadas las cantidades anteriormente descritas, se esterilizaron los biorreactores a 121 °C, a una presión de 15 psi, durante 15 min, posteriormente se inoculan con el HPB utilizando 10 plugs de 1 cm<sup>2</sup> para cada uno, la cinética se corrió durante 12 días, tomando muestra de 2 mL cada 24 para realizar la medición de las actividades enzimática, proteína extracelular, concentración de fenoles y de azúcares reductores.

**Tabla 8.** Optimizar la producción de enzimas ligninolíticas  
(Diseño central compuesto de 2<sup>2</sup>)

VARIABLE INDEPENDIENTE	-α	-1	0	+1	+α
<b>Concentración de cosustrato</b>	0	1.25 0 g	2.5 g	3.7 g	5 g
<b>Concentración de cofactor</b>	0	0.25 mM	0.5 mM	0.75 mM	1 mM

**Tabla 9.** Diseño de experimentos (DE), factorial 2<sup>2</sup> con los mejores Cosustratos.

CORRIDA	Glucosa	Cosustrato (salvado de trigo, cáscara de naranja o cáscara de plátano)	Cofactor sulfato de cobre (CuSO <sub>4</sub> )
	g/L	g/L	mM
1	3.75	1.25	0.25
2	1.25	3.75	0.25
3	3.75	1.25	0.75
4	1.25	3.75	0.75
5	5	0	0.5
6	5	0	0.5
7	0	5	0.5
8	0	5	0.5
9	2.5	2.5	0
10	2.5	2.5	0
11	2.5	2.5	1
12	2.5	2.5	1
13	2.5	2.5	0.5
14	2.5	2.5	0.5
15	2.5	2.5	0.5
16	2.5	2.5	0.5

#### 8.4 Optimización de la producción de las enzimas ligninolíticas por fermentación sumergida

Se utilizó el programa Desing Expert con la función de optimización con la función de deseabilidad, para encontrar las condiciones óptimas, las cuales son mostradas en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Parámetros de optimización arrojados por el programa *Desing Expert*.

Enzima	Glucosa	Cosustrato (salvado de trigo)	Cofactor sulfato de cobre (CuSO <sub>4</sub> )
	g/L	g/L	mM
Lacasa	0.5	4.5	1
	0	5	1
	0.6	4.4	1
MnP	0.17	4.83	0.43
	0.53	4.47	0.5
LiP	3.73	1.27	0.18
	3.6	1.4	0.25

Se corrieron fermentaciones en dichas condiciones para corroborar las actividades predichas por el software. Para ello se prepararon 5.5 L de medio Kirk utilizando un total de 21 matraces Enrlenmeyer de 500 mL, se vertió 250 mL del medio Kirk modificado, posteriormente se les agregaron las cantidades de cada tipo de cofactor y cosustrato que se muestran en la Tabla 10, se ajustó el pH a 4 con NaOH 0.1 M. Ya agregadas las cantidades anteriormente descritas, se esterilizaron los biorreactores a 121 °C, a una presión de 15 psi, durante 15 min, fueron enfriados a temperatura ambiente. Se realizó el inóculo de *Trametes versicolor* con 10 plugs de 1 cm<sup>2</sup>, tomando muestra de 2 mL cada 48 horas para realizar la medición de las actividades enzimática, proteína extracelular, concentración de fenoles y de azúcares reductores, se llevó por triplicado cada punto de la optimización.

#### **8.4. Determinación de azúcares reductores**

La determinación de los azúcares reductores, se llevó a cabo según el método de Miller (1959). Se adicionó 0.25 ml de la muestra para después añadir 0.25 ml de solución de ácido 3, 5-dinitrosalicílico en un tubo de ensayo. Después, la preparación se pasó a baño maría a ebullición por 5 min, transcurrido este tiempo, las muestras se sometieron a cambio de temperatura en un baño de agua fría. Una vez enfriados los tubos, se les adicionó 2.5 ml de agua bidestilada y se mezcló vigorosamente en el 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 será realizada siguiendo la misma metodología, empleando dextrosa como estándar, a diferentes concentraciones (0.25, 0.5, 1, 3, 6 y 10 g/L).

#### **8.5. Determinación de azúcares totales**

La determinación de los azúcares totales se llevó a cabo según el método Dubois y colaboradores en 1956. El ensayo consistió en adicionar 1 ml de la muestra,

después se añadió 1 ml de solución de fenol al 5 % en un tubo de ensayo, y 2.5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Después, la preparación se dejó en reposo por 10 min, transcurrido este tiempo las muestras se pasaron a agitación, posteriormente a un baño de agua fría. Una vez enfriados los tubos, se midió la absorbancia a 490 nm, en un espectrofotómetro UV-Vis (marca Thermo Scientific, modelo Genesys 10S). La curva de calibración se realizó siguiendo la misma metodología, empleando sacarosa como estándar, a diferentes concentraciones (10, 20, 30, 40, 50 y 60 mg/L).

### **8.6. Determinación de proteína**

La determinación de proteína se llevó a cabo utilizando el método de Bradford (1976), el reactivo fue preparado con 100 mg de Azul de Comassie, 50 mL de etanol al 95%, 100 mL de Ácido Fosfórico concentrado y 250 mL de agua, dejando el reactivo a una concentración de 5X. Se realizó la curva de calibración, usando como estándar albúmina sérica bovina a diferentes concentraciones (125, 250, 500, 750, 1000, 1500 y 2000 µg/ml). Para determinar la concentración de proteína, se tomó 20 µl de la muestra, se adicionó 1 ml del reactivo de Bradford en cada tubo eppendorf, después se mezcló con ayuda del vortex y se sometió a incubación por 15 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se midió la absorbancia a 595 nm con un espectrofotómetro UV-vis (Thermo, Genesys 10S).

### **8.7 Determinación de la concentración de compuestos fenoles**

Se tomaron 500 µL de muestra y se le agregaron 500 µL del reactivo R-Folin-Ciocalteu, 5 mL de agua destilada y 1.5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20% p/p. Se dejó reposar 2 horas, después se midió por UV-vis la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm. Posteriormente se construyó una curva de calibración de un estándar de ácido tánico en un rango de concentraciones de (4, 25, 50, 75, 100, 150, 200 mg/L).

### **8.8 Ensayo enzimático para determinar lacasas**

La actividad de las lacasas fue determinada a través de la oxidación del ABTS, 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 5mM (100 µl). La reacción comienza al añadir el ABTS, una vez que fue adicionado se incubó la muestra a 40°C por un min, 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 µmol de ABTS oxidado por minuto por mililitro a las condiciones en las que se realizó el ensayo.

La actividad enzimática fue calculada mediante la siguiente Ecuación (1):

$$\frac{U}{ml} = \frac{\Delta Abs * V_r}{\xi * V_m * t * d} \quad \text{Ecuación}$$

(1)

Donde

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

$\Delta Abs$  = 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)

### 8.9. Ensayo de actividad enzimática para determinar lignina peroxidasas

Se utilizará el ensayo para determinación de la actividad enzimática de LiP reportado por Linko y Haapala (1993). En este ensayo el sustrato de la reacción será con 3,4-Dimethoxybenzyl alcohol. La mezcla de reacción contendrá: 300  $\mu\text{L}$  de buffer tartrato 0.393M pH 3.0, 400  $\mu\text{L}$  de agua destilada, 200  $\mu\text{L}$  de muestra adecuadamente diluida, 100  $\mu\text{L}$  de 3,4-Dimethoxybenzyl alcohol 4 mM y 6  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  54 mM. Para iniciar la reacción se añadirá 6  $\mu\text{L}$  de la solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  54 mM. La reacción enzimática se llevará a cabo por 5 minutos a 23 °C. Para detener la reacción se añadirán 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M. El producto de la reacción, veratraldehído, se detectará mediante espectrofotometría a 310 nm. La actividad enzimática fue calculada mediante la siguiente Ecuación (2):

$$\frac{U}{ml} = \frac{\Delta Abs * V_r}{\xi * V_m * t * d} \quad \text{Ecuación (2)}$$

Donde

$\xi$  = Coeficiente de extinción molar ( $0.093001 \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )

$\Delta Abs$  = 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)

### 8.10 Ensayo de actividad enzimática para determinar manganeso peroxidasas

El ensayo de determinación de actividad de MnP está basado en lo reportado por Castillo y colaboradores en 1994. En la reacción hay dos sustratos: 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) y ácido 3-(dimetilamino) benzoico (DMAB). La mezcla de reacción: 250  $\mu\text{L}$  de buffer succinato-lactato 400 mM pH 4.5, 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{MnSO}_4$  3 mM, 250  $\mu\text{L}$  de DMAB 3.96 mM, 250  $\mu\text{L}$  de MBTH 0.28 mM, 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.1 mM y 150  $\mu\text{L}$  de muestra adecuadamente diluida. Para iniciar la reacción

se añadirá la muestra adecuadamente diluida. La reacción se llevará a cabo a 37 °C durante 2 minutos. Para detener la reacción se añadirán 500 µL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M. El producto coloreado de la reacción se detectará mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 590 nm. La actividad enzimática fue calculada mediante la siguiente Ecuación (3):

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

Donde

$\xi$  = Coeficiente de extinción molar (0.011519 µmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

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

$V_r$  = Volumen total de la reacción (µl)

$V_m$  = Volumen de la muestra (µl)

$t$  = tiempo de la reacción (min)

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

### 8.11. Tratamiento enzimático de aguas azules

Una vez obtenido el extracto de enzimas del cultivo sumergido con la mayor actividad enzimática para lacasa, MnP y LiP, respectivamente, se llevaron a cabo 3 diseños de experimentos correspondientes a cada enzima como se presentan en las Tablas 11 y 12. Fueron diseños centrales compuestos 2<sup>3</sup>, usando pH, T y concentración de extracto como factores y el % de degradación como respuesta. La concentración de aguas azules se fijó para todos los casos en 20 mg/L.

**Tabla 11** Diseño de experimentos factorial 2<sup>3</sup> para el tratamiento de aguas azules con extracto rico en Lacasa.

No Corrida	pH de Buffer de Acetatos	Temperatura	Concentración de extracto enzimático
	pH	Grados °C	Porcentaje %
1	4	35	25
2	5	35	25
3	4	45	25
4	5	45	25
5	4	35	75
6	5	35	75
7	4	45	75
8	5	45	75
9	3.66	40	50
10	5.34	40	50
11	4.5	31.59	50
12	4.5	48.41	50
13	4.5	40	7.96
14	4.5	40	92.04

<b>15</b>	4.5	40	50
<b>16</b>	4.5	40	50
<b>17</b>	4.5	40	50
<b>18</b>	4.5	40	50
<b>19</b>	4.5	40	50
<b>20</b>	4.5	40	50

**Tabla 12.** Diseño de experimentos factorial 2<sup>2</sup> para el tratamiento de aguas azules con extracto rico en Lignina Peroxidasa.

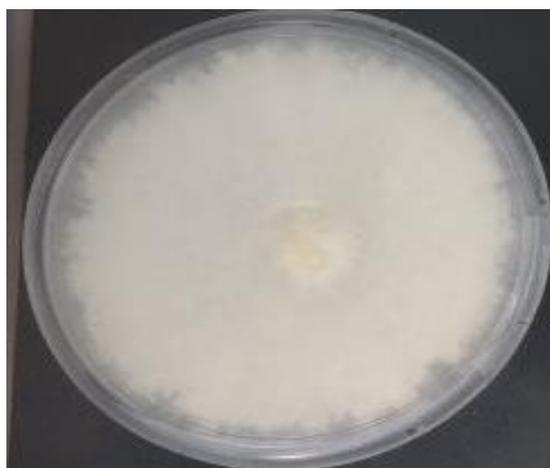
No Corrida	pH de Buffer de Tartratos	Temperatura	Concentración de extracto enzimático
	pH	Grados °C	Porcentaje %
<b>1</b>	2.5	25	25
<b>2</b>	4.5	25	25
<b>3</b>	2.5	45	25
<b>4</b>	4.5	45	25
<b>5</b>	2.5	25	75
<b>6</b>	4.5	25	75
<b>7</b>	1.82	45	75
<b>8</b>	5.18	45	75
<b>9</b>	3.5	35	50
<b>10</b>	3.5	35	50
<b>11</b>	3.5	18.18	50
<b>12</b>	3.5	51.82	50
<b>13</b>	3.5	35	7.96
<b>14</b>	3.5	35	92.04
<b>15</b>	3.5	35	50
<b>16</b>	3.5	35	50
<b>17</b>	3.5	35	50
<b>18</b>	3.5	35	50
<b>19</b>	3.5	35	50
<b>20</b>	3.5	35	50

Se prepararon las botellas serológicas según la condición que se menciona anteriormente, con un volumen final de 50 ml en la cual se adicionó 1mg del sanipak (sanitizante), posteriormente se llevó a cabo la cinética de degradación durante 72 horas para cada tratamiento, en el caso de la cinética de LiP se adicionaron 6 pulsos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cada 5 minutos durante la primera media hora completando una concentración total de 1 mM, para ambas cinéticas se tomó muestra cada hora durante las primeras 4 horas posteriormente se tomó muestra cada 4 horas, a cada muestra se le llevó a cabo un barrido en el Espectrofotómetro UV-Visible.

## 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 9.1 Propagación de la cepa fúngica y producción de biomasa en sólido

El primer objetivo de esta tesis fue propagar el hongo en fase sólida llevándolo de manera exitosa, como se muestra en la Figura 5 donde se aprecia el hongo *Trametes versicolor* con una apariencia algodonosa y de micelio blanco, desarrollando zonas de micelio hialino de rápido crecimiento, cubriendo toda la placa a los 9 días, el reverso de la placa se observa el micelio de color blanquecino donde se puede notar anillos castaños, tal como lo describe L. Sevilla, 2013(67) lo cual nos indica que el hongo se propago de forma correcta y sin contaminación.

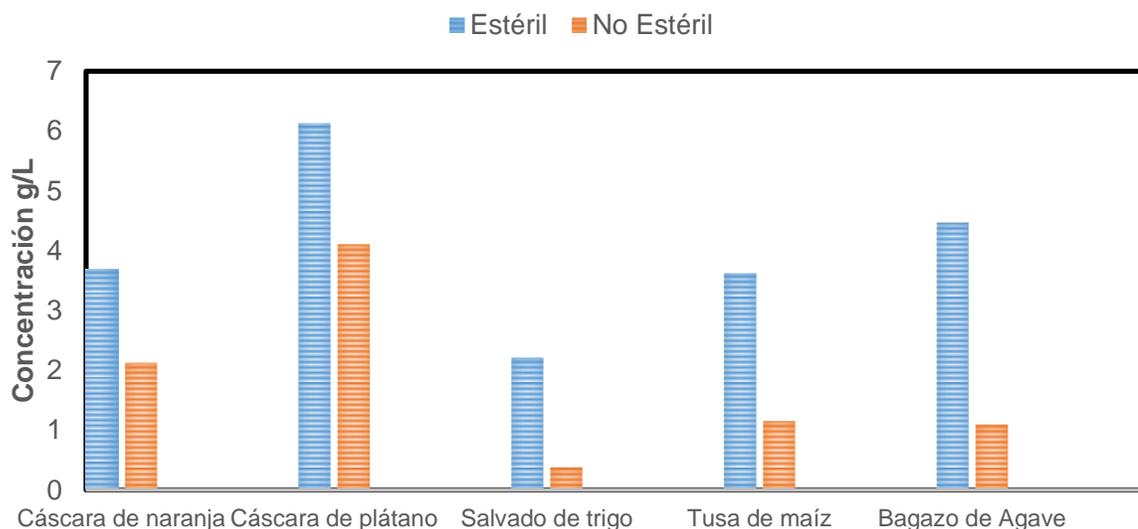


**Figura 5.** Crecimiento en placa del hongo en medio PDA.

### 9.2 Preparación y caracterización de cosustratos

Los cinco tipos de residuos lignocelulósicos, usados durante la optimización de la producción enzimática, fueron caracterizados antes y después de esterilización. Los residuos lignocelulósicos seleccionados fueron la cáscara de naranja, cáscara de plátano, salvado de trigo, tusa de maíz y bagazo de agave, debido a que estos residuos son la mayor fuente de energía renovable y de fácil acceso en el mundo(68). Se midió la cantidad de azúcares totales y reductores que tendría el medio al utilizar cada tipo de cosustrato, ya que el hongo utiliza el azúcar en el medio como fuente de carbono(69), como se puede apreciar en la Figura 6 y 7, todos los residuos analizados presentan mayor cantidad de azúcares totales y reductores después de esterilizar el medio, siendo la cáscara de plátano el que presenta mayor cantidad de azúcar totales después y antes de esterilizar presentando 6.1 g/L y 1.3, seguido de la de naranja con 3.8 g/L y 2.30 g/L, después la tusa de maíz 3.6 g/L y 0.81g/L, bagazo de agave 4.4 g/L y 1.47 g/L el cosustrato con menor cantidad de azúcares fue el salvado de trigo con 2.2 g/L y 0.04 g/L, este comportamiento es el mismo que el reportado por Valdés en el

2002., donde al aplicar temperatura a distintos residuos se aumenta la concentración de azúcares totales, debido a la hidrólisis que sufren.



**Figura 6.** Concentración de azúcares totales en los residuos lignocelulósicos.

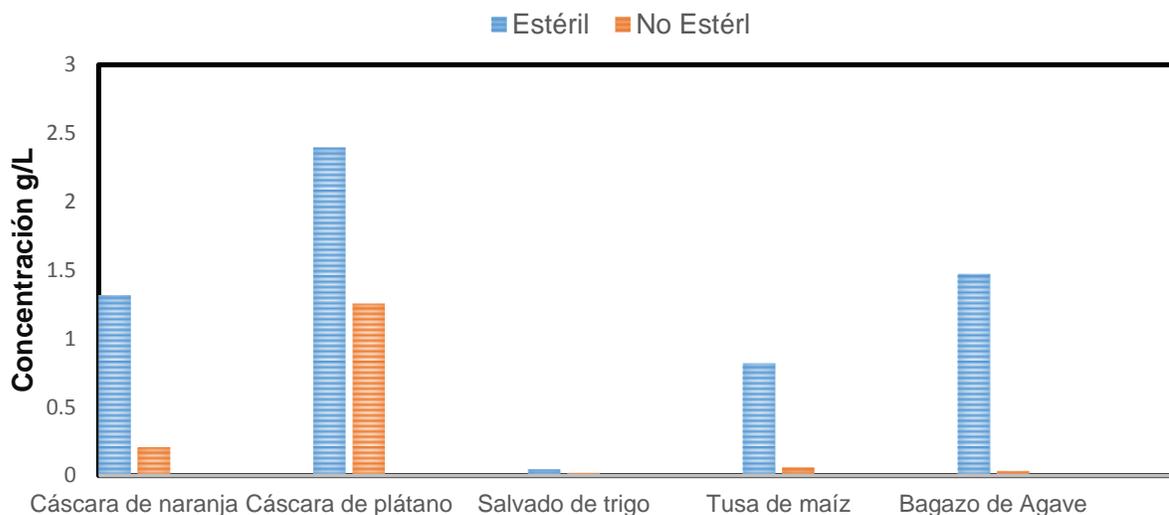
Se realizó un ANOVA para azúcares totales, para saber si hay diferencias significativas entre las cantidades de azúcares presentes en los residuos lignocelulósicos, después de la esterilización, debido a que es la condición en la que se trabajó.

**Tabla 13.** ANOVA de 1 Factor de los resultados de la concentración de los azúcares totales en los residuos lignocelulósicos sometidos al tratamiento de esterilización.

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Cáscara de naranja	3	11.05	3.68	0.03		
Casará de plátano	3	18.37	6.12	0.19		
Salvado de Trigo	3	6.63	2.21	0.19		
Tusa de maíz	3	10.87	3.62	0.16		
Bagazo de Agave	3	13.63	4.54	0.03		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	24.706	4	6.177	51.338	1.2E <sup>-06</sup>	3.5E <sup>+00</sup>
Dentro de los grupos	1.203	10	0.120			
Total	25.909	14				

Como se puede observar en la Tabla 13, si hay diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de azúcares totales presentes en los residuos, lo que puede afectar las curvas de crecimiento en cada caso.

En el caso de azúcares reductores se presentó el mismo comportamiento que en azúcares totales, siendo la cáscara de plátano la que tiene la mayor cantidad de azúcares reductores después de esterilizar que antes con 2.3 g/L y 1.1 g/L, seguido de la cáscara de naranja con 1.3 g/ y 0.20 g/L, bagazo de agave 1.47 y 0.03 g/L, tusa de maíz 0.81 y 0.05 por último el salvado de trigo con 0.04 g/L y 0.01 g/L, ese comportamiento es el esperado debido que al esterilizar los residuos y someterlos a alta temperatura (180 grados) y presión (15 psi) por 15 minutos, se lleva a cabo una hidrólisis térmica donde parte de los azúcares totales se hidrolizan y pasan a azúcares reductores (70) como lo muestra Mejía Giraldo 2007.



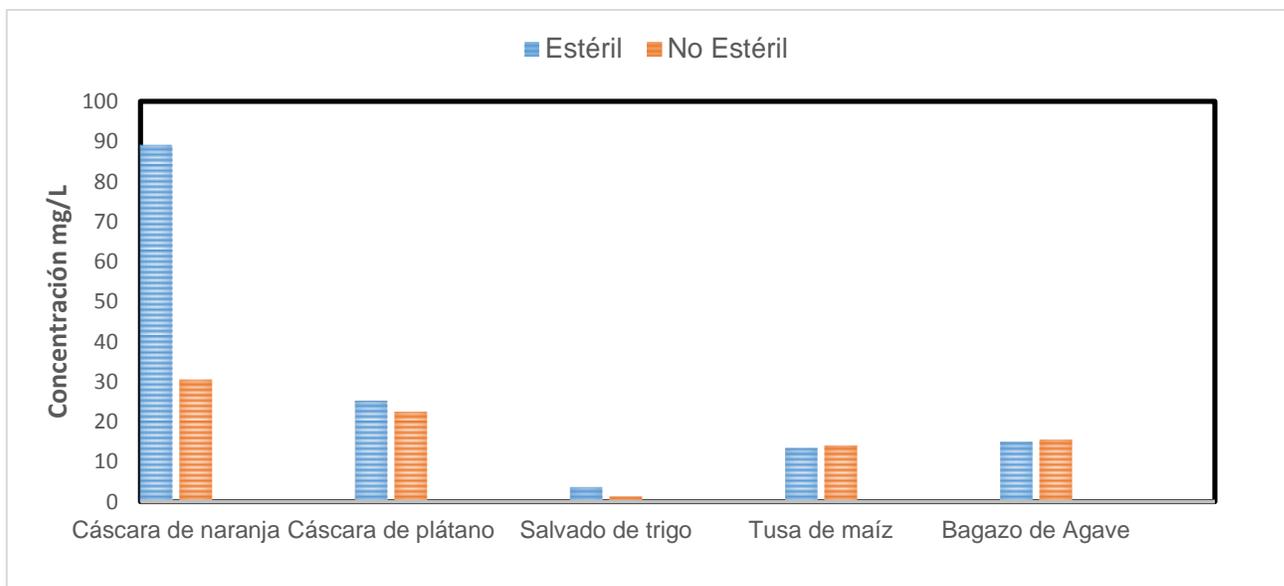
**Figura 7.** Concentración de azúcares reductores en los residuos lignocelulósicos.

También se realizó un ANOVA para los azúcares reductores después de esterilizar y se observó diferencia estadísticamente significativa, entre los azúcares reductores presentes entre los diferentes residuos. Como hemos mencionado el Salvado de trigo es el que tiene menos azúcares, y posiblemente sea una de las razones de porque es tan buen inductor para la producción de enzimas ligninolíticas especialmente para lacasas. Esto es debido a que las enzimas son un metabolito secundario, por lo que aparecen cuando el crecimiento entra a la fase estacionaria

**Tabla 14.** ANOVA de 1 Factor de los resultados de la concentración de los azúcares reductores en los residuos lignocelulósicos sometidos al tratamiento de esterilización.

<b>RESUMEN</b>						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
Cáscara de plátano	3.00	7.19	2.40	0.01		
Cáscara de naranja	3.00	3.95	1.32	0.00		
Salvado de trigo	3.00	0.13	0.04	0.00		
Tusa de maíz	3.00	2.46	0.82	0.02		
Bagazo de Agave	3.00	4.42	1.47	0.07		
<b>ANÁLISIS DE VARIANZA</b>						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	8.99	4.00	2.25	99.50	0.00310	3.48
Dentro de los grupos	0.23	10.00	0.02			
Total	9.22	14.00				

En la Figura 8, se presentan los compuestos fenólicos de los 5 residuos, a diferencia de los azúcares totales y reductores, al esterilizar los residuos no todos presentaron el mismo comportamiento. La cáscara de naranja, de plátano y el salvado de trigo aumentan la concentración de compuestos fenólicos después de la esterilización, mientras que la tusa de maíz y el bagazo de agave, prácticamente no cambian, siendo ligeramente mayor antes de la esterilización. El residuo que presenta mayor concentración incluso antes de esterilizar es la cáscara de naranja con 30.38 mg/L, mientras que después de la esterilización alcanza 89 mg/L. En segundo lugar, está la cáscara de plátano con 22.41 mg/L y 25.31 mg/L, antes y después de esterilizar, la Tusa de maíz 14.05 mg/L y 13.47 mg/L, respectivamente, el Bagazo de agave con 15.51 mg/L y 15.02 mg/L y el de menor cantidad fue el salvado de trigo 1.25 mg/L y 3.61 mg/L. Se puede apreciar en la Figura 8, la cáscara de naranja es la que presenta mayor cantidad de compuestos fenólicos, seguida por la cáscara de plátano, esto se debe a que los cítricos son una fuente natural de antioxidantes, debido a su contenido alto de polifenoles, flavonoides y terpenos. Además, de que la cáscara de naranja representa aproximadamente el 30% de la masa de la fruta y las concentraciones más altas de flavonoides en los cítricos ocurren en la cáscara(71). Mientras que para la cáscara de plátano, trabajos anteriores como el de Rebello en el 2014, han reportado un alto contenido fenólico total (alrededor de 29 mg/g, como GAE) debido a la presencia de cantidades importantes de fenoles flavonoides como: prodelphinidinas altamente polimerizadas(72).



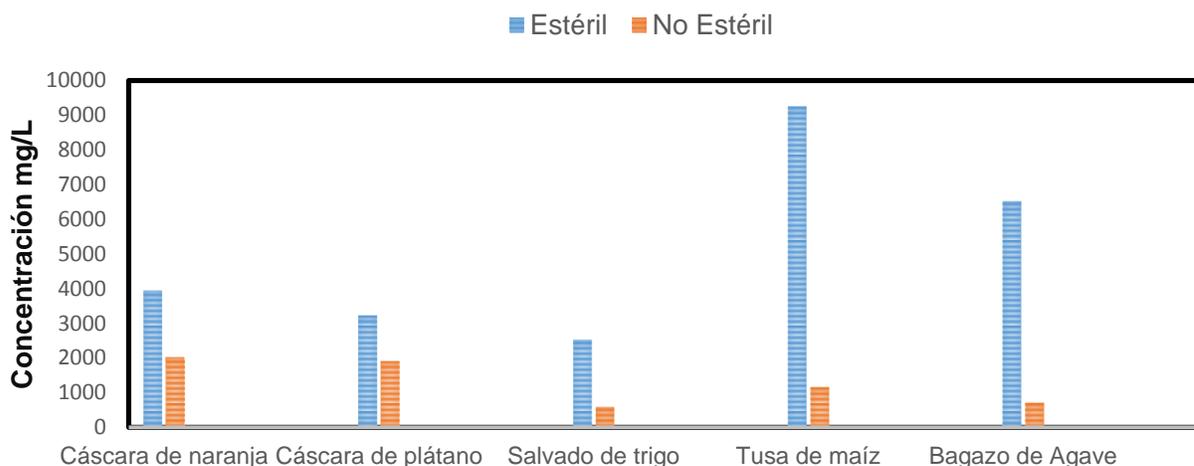
**Figura 8.** Concentración de compuestos fenólicos en los residuos lignocelulósicos.

El ANOVA realizado para los compuestos fenólicos mostró que nuevamente hay diferencia significativa en las concentraciones de compuestos fenólicos entre los residuos. Esto es importante ya que podría desencadenar diferencias importantes sobre las cinéticas de crecimiento, debido a que este tipo de compuestos a altas concentraciones pueden inhibir el crecimiento microbiano, ver Tabla 15. El estudio se hizo nuevamente con los datos para residuos ya estériles, debido que serán estos con los que estaremos trabajando.

**Tabla 15.** ANOVA de 1 Factor de los resultados de la concentración compuestos fenólicos en los residuos lignocelulósicos sometidos al tratamiento de esterilización.

<b>RESUMEN</b>						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Cáscara de plátano	3	75.94	25.31	0.7211		
Cáscara de naranja	3	267.25	89.08	3.41		
Salvado de trigo	3	10.87	3.62	0.44		
Tusa de maíz	3	40.43	13.48	0.02		
Bagazo de Agave	3	45.07	15.02	1.10		
<b>ANÁLISIS DE VARIANZA</b>						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	14109.65	4.00	3527.41	3098.52	1.70E-07	3.48
Dentro de los grupos	11.38	10.00	1.14			
Total	14121.03	14.00				

La demanda química de oxígeno (DQO), es un parámetro que indica la cantidad de oxígeno requerido para oxidar los compuestos orgánicos presentes en una muestra (73). En la Figura 9, se puede apreciar que al igual que en los azúcares totales se observó un incremento de concentración al momento de llevar a cabo la esterilización, este mismo comportamiento se observó con la DQO siendo la tusa de maíz, el residuo con mayor cantidad de compuestos oxidables, alcanzando después de la esterilización 9,253 mg/L, seguido por el bagazo de agave con 6,520 mg/L, la cáscara de naranja 3946.6 mg/L, cáscara de plátano 3228.8 mg/L y por último salvado de trigo con 2537.7 mg/L.



**Figura 9.** Concentración de demanda química de oxígeno (DQO) en los residuos lignocelulósicos

El ANOVA para el DQO, muestra en la Tabla 16, que si hay diferencia significativa para este parámetro, y que nuevamente el salvado de trigo para ser un residuo entre sus bondades no aporta una cantidad importante en el DQO. Lo que sería muy productivo como cosustrato para una fermentación cuyo destino del extracto es el tratamiento de contaminantes, en especial bajando el índice de biodegradabilidad.

**Tabla 16.** ANOVA de 1 Factor de los resultados de la concentración de demanda química de oxígeno (DQO) en los residuos lignocelulósicos sometidos al tratamiento estéril.

<b>RESUMEN</b>						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
Cáscara de naranja	3	11840.00	3946.67	43911.11		
Casará de plátano	3	9686.67	3228.89	637.04		
Salvado de trigo	3	7613.33	2537.78	66059.25		
Tusa de maíz	3	27760.00	9253.33	1091377.82		
Bagazo de agave	3	19560.00	6520.00	136311.10		
<b>ANÁLISIS DE VARIANZA</b>						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	91988278.34	4.00	22997069.58	85.92	0.0067	3.48
Dentro de los grupos	2676592.64	10.00	267659.26			
Total	94664870.97	14.00				

### 9.3 Diseño exploratorio para la producción de las enzimas por fermentación sumergida

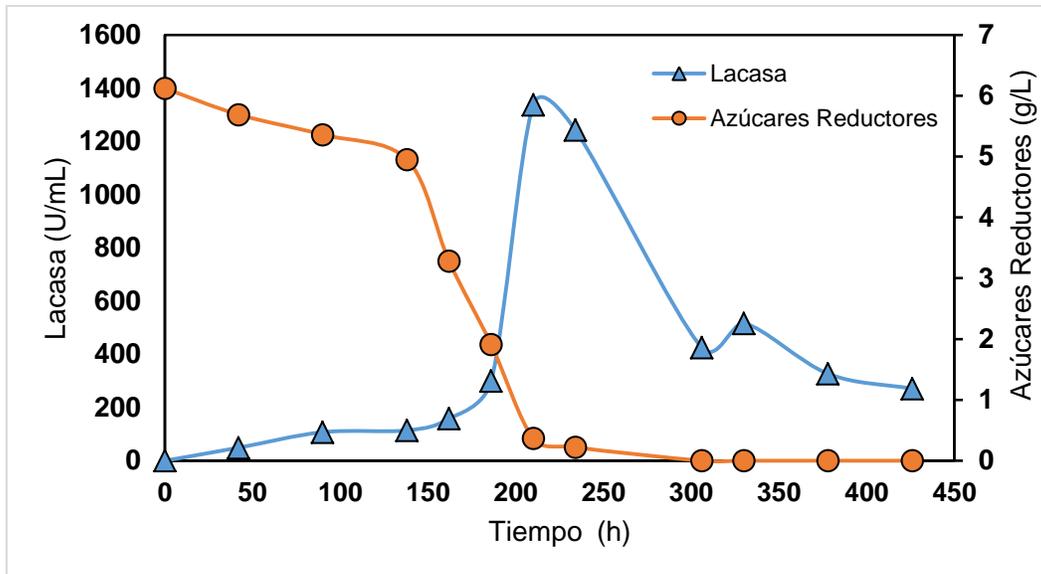
Las lacasas, MnP y LiP extracelulares pueden ser producidas constitutivamente en pequeñas cantidades; sin embargo, la producción puede ser incrementada considerablemente por una amplia variedad de sustancias, principalmente por inducción con compuestos relacionados con la lignina o derivados de ella, se realizó un diseño de experimentos  $2^3$  donde se varió el tipo de cosustrato, como la tusa de maíz, bagazo de agave, salvado de trigo, cáscara de plátano y cáscara de naranja, así como el tipo de cofactor, cloruro de cobre, sulfato de magnesio, sulfato de cobre, sulfato de manganeso y nitrato de cobre, además de la concentración de los cofactores. Las respuestas evaluadas fueron las actividades enzimáticas para lacasa, MnP y LiP.

El diseño de experimentos para lacasa, se muestran en la Tabla 17, donde podemos observar que el modelo no es significativo, y que solo los términos cuadráticos son significativos, así como que no hay interacción entre los factores estudiados.

**Tabla 17.** ANOVA del DCC 2<sup>3</sup> exploratorio, para la respuesta de la actividad enzimática de lacasas.

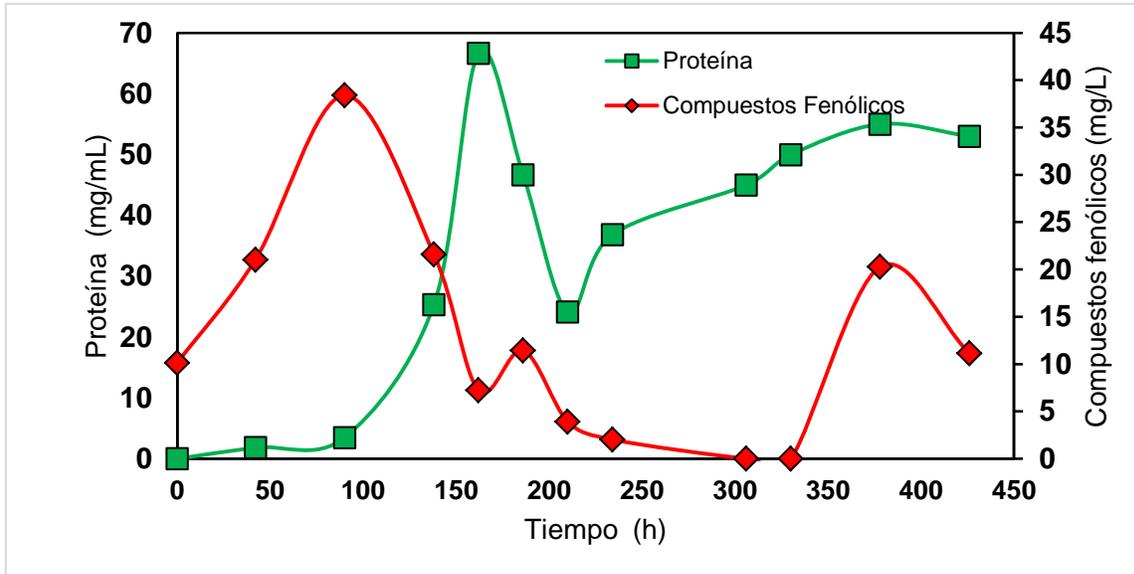
Tabla de Análisis de Varianza Suma parcial de cuadrados						
Fuente	Suma de cuadrados	df	Media de cuadrados	F	p-valor	
				Valor	Prob > F	
Modelo	3.96E+06	9	4.40E+05	2.63	0.0743	<b>no significativo</b>
A-Tipo de cosustrato	2.15E+05	1	2.15E+05	1.28	0.2838	
B-Cofactor	24544.71	1	24544.71	0.15	0.7097	
C-Concentración de cofactor	2.88E+05	1	2.88E+05	1.72	0.2189	
AB	88.91	1	88.91	5.31E-04	0.9821	
AC	9799.3	1	9799.3	0.059	0.8137	
BC	4150.97	1	4150.97	0.025	0.878	
A <sup>2</sup>	1.21E+06	1	1.21E+06	7.25	0.0226	
B <sup>2</sup>	2.73E+06	1	2.73E+06	16.33	0.0024	
C <sup>2</sup>	6.17E+05	1	6.17E+05	3.69	0.0838	
Residual	1.67E+06	10	1.67E+05			
Falta de ajuste	1.67E+06	5	3.33E+05	251.26	< 0.0001	<b>significativo</b>
Error	6633.33	5	1326.67			
Total	5.63E+06	19				

En la Figura 10, se analiza el comportamiento de actividad enzimática de lacasas en la cinética de *T. versicolor*, contra los azúcares reductores, en la mejor condición para esta enzima, la cual fue con salvado de trigo y sulfato de Cobre a 1 mM. Podemos observar que al inicio de la cinética en el medio líquido hay un total de 6 g/L y conforme pasa el tiempo los azúcares reductores disminuyen, y justo cuando estos bajan de 2 g/L, la actividad enzimática inicia a su aumento de manera exponencial, hasta llegar a su actividad máxima de 1,337.7 U/mL, a las 210 horas, este es un comportamiento esperado, ya que varios autores han reportado que en condiciones limitadas de nutrientes se dispara el metabolismo secundario, donde las enzimas se expresan(74), la actividad obtenida de 1,337.7 U/mL supera los reportados por Vrsanska y colaboradores en 2016 con 1,291.17 U/L, Manjarrés y colaboradores 19.4 U/mL y Cruz en 2016 100.66 U/mL todos usaron hongos de pudrición blanca(40,61,75) como el nuestro.



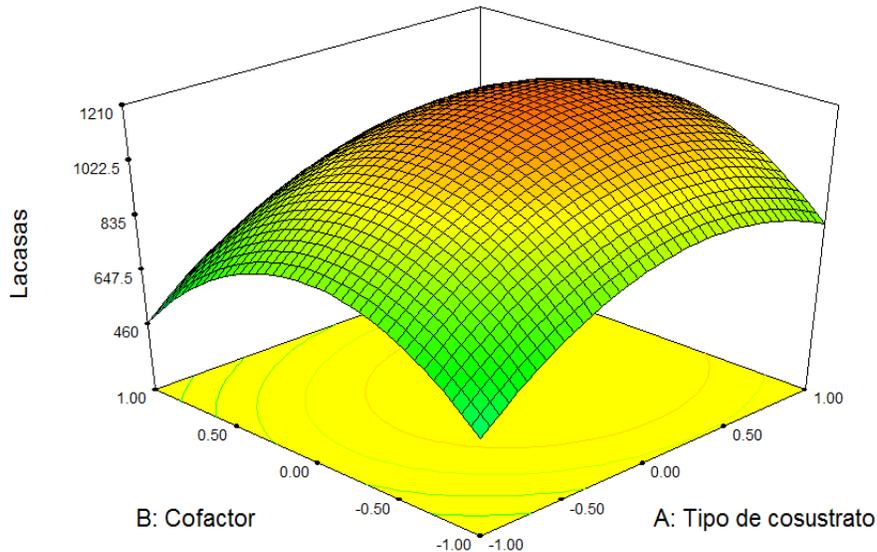
**Figura 10.** Relación de la concentración de azúcares reductores y actividad enzimática del mejor tratamiento Salvado-Sulfato de Cobalto (1 mM) para obtener lacasas.

En la Figura 11, se observa la concentración de proteína extracelular contra los compuestos fenólicos, durante la cinética para la condición mencionada arriba. Los compuestos fenólicos más abundantes en el salvado de trigo son los ácidos hidroxicinámicos, siendo el ácido ferúlico el principal, seguido por los ácidos diferúlicos y cumárico(76), como se mencionó anteriormente la mayor cantidad de actividad enzimática se presentó a las 210 horas, cuando la concentración de compuestos fenólicos era de 3.94 mg/L, siendo que la concentración inicial fue de 10 mg/L, esto debido a que poca cantidad de compuestos fenólicos funcionan como inductor para la actividad enzimática(73). La cantidad de proteína en este tiempo fue de 24.16 mg/mL, se esperaría que a la hora que se presentó mayor actividad enzimática de lacasa se presentara la máxima cantidad de proteína, pero el hongo *T. versicolor* no solo produce enzimas como lacasas, sino también MnP y LiP como se aprecia en la gráfica 3 y 5 así como xilanasas, celulasas, sin embargo no todas se producen al mismo tiempo(77).



**Figura 11.** Relación de la concentración de proteína y compuestos fenólicos del mejor tratamiento Salvado-Sulfato de Cobre (1 mM).

La superficie de respuesta para la actividad de lacasa mostrada en la Figura 12, con datos codificados, muestra un máximo justo en el área central correspondiente a una concentración de cofactor de 1 mM, con sulfato de cobre y salvado de trigo.



**Figura 12.** Superficie de respuesta para actividad de lacasa, cofactor vs cosustrato, 1 Mm.

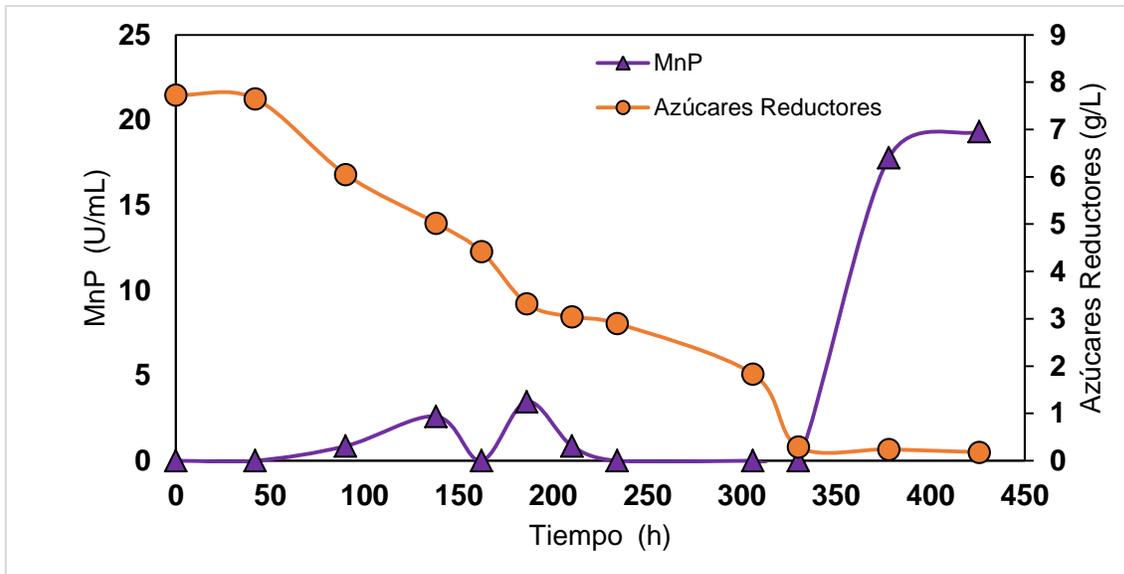
Para la respuesta de la actividad enzimática de MnP del DCC exploratorio, podemos observar en la Tabla 18, que para la MnP el modelo si es significativo,

sin embargo, solo el efecto cuadrático del tipo de cosustrato ( $A^2$ ) es significativo, y el efecto lineal de este a pesar de ser muy bajo no llega a ser significativo. De manera similar que, para el caso de las lacasas, no hay interacción entre los factores. Sin embargo, hay que recalcar lo sensible que es la inducción de MnP al tipo de cosustrato.

**Tabla 18.** ANOVA del DCC  $2^3$  exploratorio, para la respuesta de la actividad enzimática de MnP.

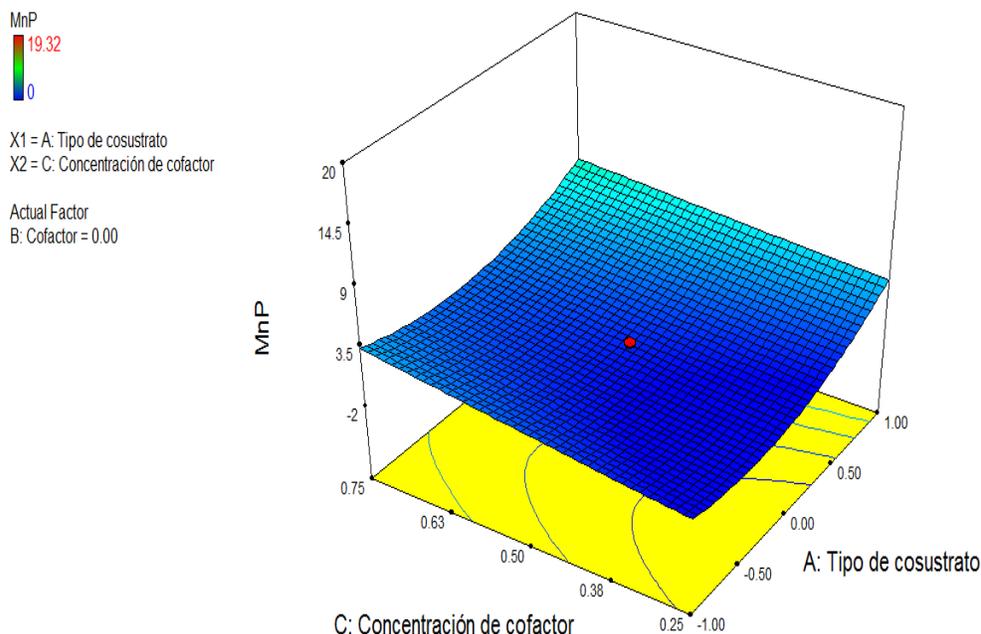
Tabla de Análisis de Varianza Suma parcial de cuadrados						
Fuente	Suma de cuadrados	df	Media de cuadrados	F	p-valor	
				Valor	Prob > F	
Modelo	338.28	9	37.59	3.21	0.0417	<b>significativo</b>
A-Tipo de cosustrato	46.92	1	46.92	4.01	0.0732	
B-Cofactor	21.9	1	21.9	1.87	0.2014	
C-Concentración de cofactor	32.66	1	32.66	2.79	0.1259	
AB	0.52	1	0.52	0.044	0.8373	
AC	1.31	1	1.31	0.11	0.7448	
BC	43.8	1	43.8	3.74	0.0819	
$A^2$	167.46	1	167.46	14.3	0.0036	
$B^2$	2.81	1	2.81	0.24	0.6349	
$C^2$	0.11	1	0.11	9.65E-03	0.9237	
Residual	117.13	10	11.71			
Falta de ajuste	117.12	5	23.42	11049.18	< 0.0001	<b>significativo</b>
Error	0.011	5	2.12E-03			
Total	455.42	19				

En la Figura 13 se observa la cantidad de azúcares reductores contra la actividad enzimática de MnP, lo cual indica que cuando la actividad fue máxima, los azúcares reductores están muy disminuidos, lo que indica que se dispara en el metabolismo secundario. Esta corrida corresponde a la cáscara de naranja, con sulfato de cobre a 0.5 mM, se puede apreciar cómo se repite el comportamiento de la Figura 10. Esto indica que cuando se alcanzó la máxima actividad de MnP con 19.32 U/mL, la concentración de azúcares reductores era mínima de 0.18 g/L, a las 426 horas.



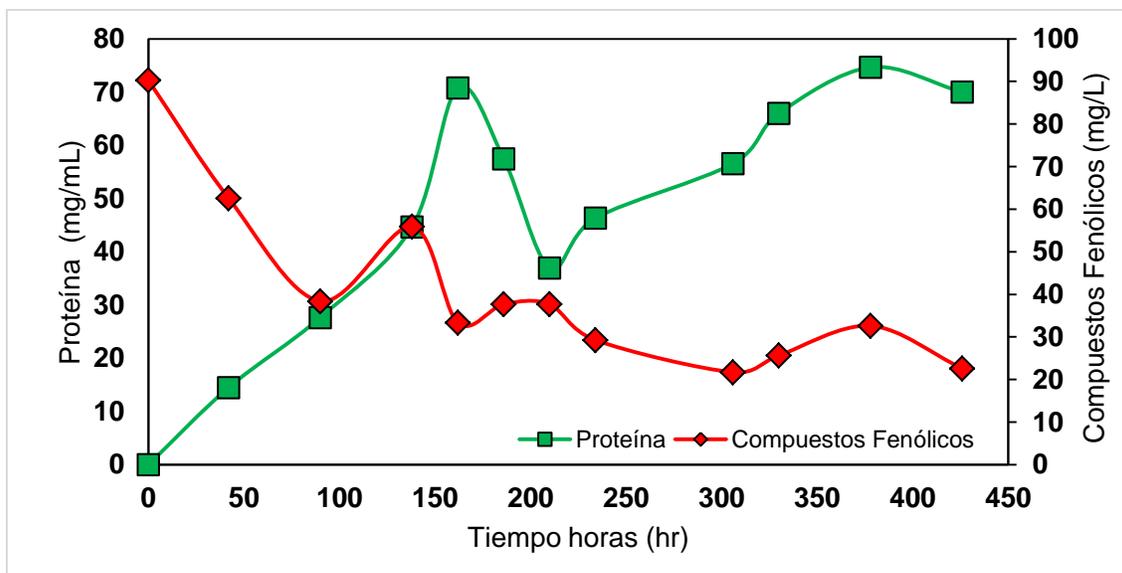
**Figura 13.** Relación de la concentración de azúcares reductores y la actividad enzimática del mejor tratamiento para obtener MnP, con Cáscara de naranja-Sulfato de cobre (0.5 mM).

En Figura 14 podemos ver la superficie de respuesta obtenido de esta corrida, donde se realza que el  $\text{CuSO}_4$ , tiene un efecto significativo sobre la actividad enzimática aumentándola. El ion  $\text{Cu}^{2+}$  ha sido ampliamente estudiado para aumentar la actividad de la enzima lacasa, pero en este estudio pudimos observar que éste, genera un aumento también en la enzima MnP, pero este aumento puede estar más relacionado a las concentraciones de sulfatos que a la misma acción del ion  $\text{Cu}^{2+}$ , esto debido a que además de la importancia de la concentración de carbono y nitrógeno para la actividad de las enzimas ligninolíticas, también son importantes las concentraciones de sulfatos en el medio(78), a la actividad enzimática obtenida sobrepasa la reportada por Vrsanska y colaboradores en 2016, la cual fue de 0.001217 U/mL, (1.217 U/L) y Naveed y colaboradores en 2015, con 0.993 U/mL, sin embargo en este caso no parece que alcanzamos el óptimo.



**Figura 14.** Superficie de respuesta para actividad de MnP.

La cáscara de naranja es el residuo que presentó mayor cantidad de compuestos fenólicos, se sabe que contiene distintos compuestos como las flavononas en forma glicosada (hesperidina y naringina) y las flavonas (diosmina y rutina) como polimetoxilada (sinensetina, nobiletina y tangerina) (79)., En la Figura 15 se expone la relación entre la concentración de proteína extracelular y la cantidad de compuestos fenólicos, la cáscara de naranja presenta una cantidad  $0.9 \text{ Cu}^{2+}$  ppm y  $\text{Mn}^{2+}$   $0.4 \text{ ppm}$  según Ćilerdžić y colaboradores en 2013, ellos mencionan que estas cantidades juegan un papel importante en la oxidación de los compuestos fenólicos y la estabilización de la estructura de la proteína(80), este comportamiento se refleja en la Figura 15, donde se observa como al inicio mientras bajan los compuestos fenólicos, la proteína va aumentando, pero al paso del tiempo se ve cómo hay segmentos donde el hongo empieza a producir enzimas que al cortar la lignina presente, libera los compuestos fenólicos y la concentración de proteína va aumentando.



**Figura 15.** Relación de la concentración de proteína y compuestos fenólicos del mejor tratamiento Cáscara de naranja-Sulfato de cobre (0.5 mM) para obtener MnP.

La LiP, también denominada ligninasa se ha considerado como la enzima clave en el proceso ligninolítico, principalmente por su alto potencial redox, que la hace capaz de oxidar las unidades no-fenólicas que representan más del 80% del polímero de la lignina. Sin embargo, muchos hongos de pudrición blanca degradadores de lignina parecen llevar a cabo la degradación de este polímero con una muy baja expresión de la actividad de ligninasa. Esta es una de las razones por las que queremos optimizar su producción. Durante el DCC exploratorio, también se midió como respuesta la actividad enzimática de LiP.

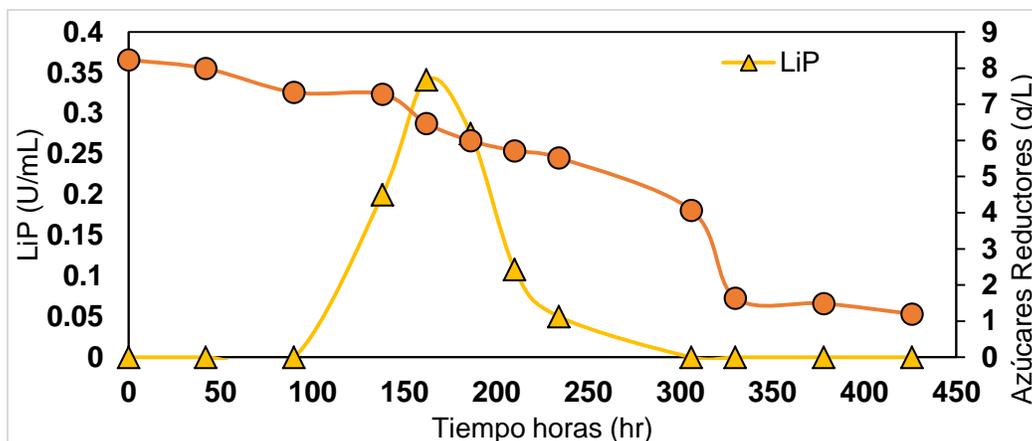
El ANOVA del DCC de LiP es mostrado en la Tabla 19, donde podemos observar que el modelo es significativo, así como que el efecto del tipo de cofactor es significativo, y de hecho es más sensible la LiP al tipo de cosustrato, esto habla de que son enzimas inducibles solo con ciertos cosustratos, y aunque en nuestro caso no salió significativo a la concentración del cofactor, hay trabajos previos que indican que la LiP es sensible a las concentraciones de cofactor. Otro dato importante es que en las condiciones estudiadas encontramos que el modelo no es cuadrático, sino lineal y que no hay interacción entre los factores.

**Tabla 19.** ANOVA del DCC 2<sup>3</sup> exploratorio, para la respuesta de la actividad enzimática de LiP.

Tabla de Análisis de Varianza Suma Parcial de cuadrados						
Fuente	Suma de cuadrados	df	Media de cuadrados	F	p-valor	
				Valor	Prob > F	
Modelo	0.091	9	0.01	3.12	0.0456	<b>significativo</b>
A-Tipo de cosustrato	0.023	1	0.023	7.17	0.0232	
B-Cofactor	7.27E-03	1	7.27E-03	2.25	0.1647	
C-Concentración de cofactor	7.27E-03	1	7.27E-03	2.25	0.1647	
AB	0.015	1	0.015	4.5	0.06	
AC	0.015	1	0.015	4.5	0.06	
BC	0.015	1	0.015	4.5	0.06	
A <sup>2</sup>	9.18E-03	1	9.18E-03	2.84	0.1229	
B <sup>2</sup>	1.39E-04	1	1.39E-04	0.043	0.8398	
C <sup>2</sup>	1.39E-04	1	1.39E-04	0.043	0.8398	
Residual	0.032	10	3.23E-03			
Falta de ajuste	0.032	5	6.47E-03			
Error	0	5	0			
Total	0.12	19				

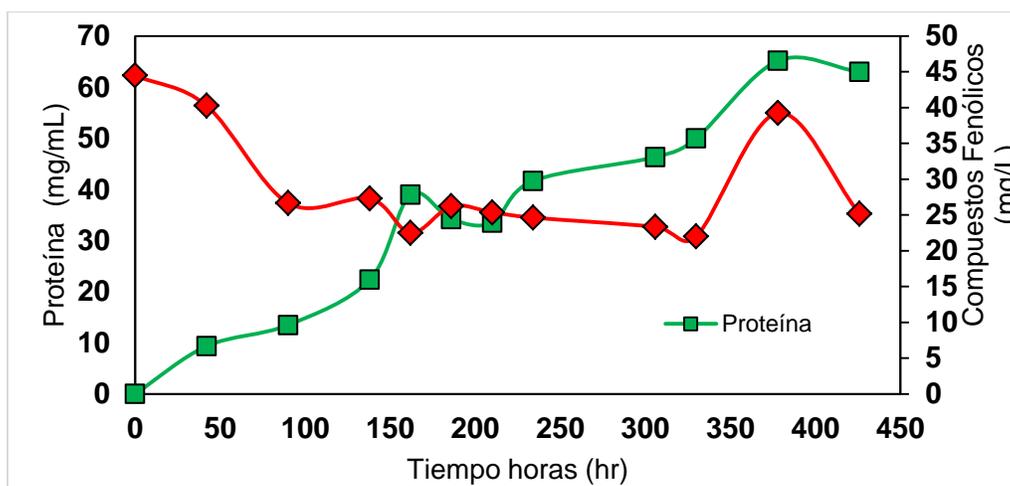
En el caso de la enzima LiP el mejor tratamiento para producirse fue el utilizar cáscara de plátano con sulfato de Magnesio 0.75 mM. En la Figura 16, se presenta la relación de los azúcares reductores y la actividad enzimática, a diferencia del comportamiento observado en las Figuras 10 y 13, en este caso, cuando aún quedaba una alta cantidad de azúcares en el medio (6.12 g/L) se obtuvo una actividad enzimática máxima de 0.341U/mL, a las 162 horas.

La cáscara de plátano presenta una alta cantidad de compuestos fenólicos como galocatequina, epigalocatequina, sinensetina y ácido cafeo tartárico (83), mismo que puede aportar al crecimiento del hongo y a la producción enzimática.



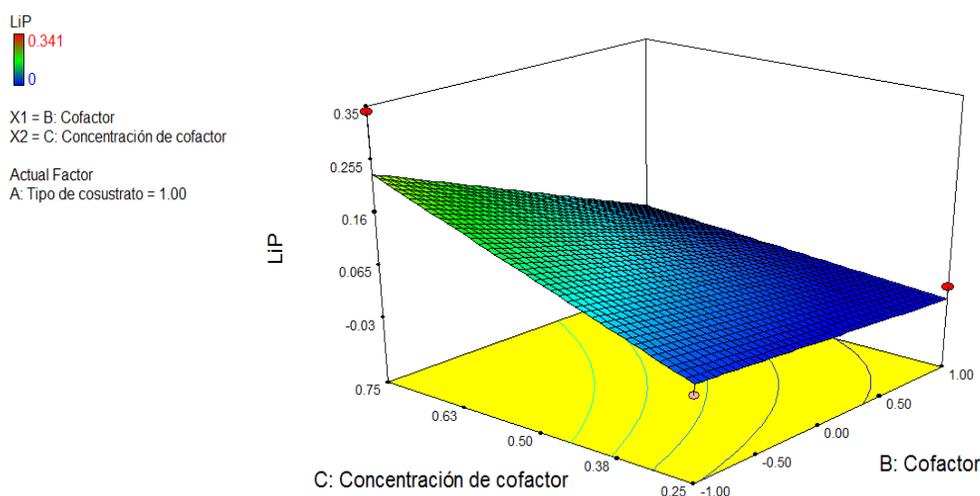
**Figura 16.** Relación de la concentración de azúcares reductores y actividad enzimática del mejor tratamiento para obtener LiP, Cáscara de plátano-sulfato de Magnesio (0.75mM).

En la Figura 17, tenemos la gráfica de compuestos fenólicos y la proteína extracelular, a diferencia de las Figura 11 y 15, donde el comportamiento de *T. versicolor* fue distinto, ya que al inicio iba bajando la concentración de compuestos fenólicos, y aunque en algún punto esta concentración subía, siempre terminaban bajando. Sin embargo, en la cinética de LiP se muestra que al inicio los compuestos fenólicos bajan, luego se mantuvieron alrededor de un valor constante y a las 400 horas subieron casi a su valor inicial. Para la proteína extracelular fue aumentando, sin embargo, alrededor de las 200 horas, esta concentración bajó ligeramente y luego siguió aumentando. Esto puede deberse a que este hongo produce varias enzimas, y que a tiempos largos produce enzimas en mayores concentraciones, como es el caso de la lacasa, que alrededor de las 200 horas su producción se dispara.



**Figura 17.** Relación de la concentración de proteína y compuestos fenólicos del mejor tratamiento Cáscara de plátano-sulfato de Magnesio (0.75mM) para obtener LiP.

Al analizar la Figura 18 se evidencia que la presencia de la sal de manganeso interviene de manera positiva sobre todo el ciclo biológico del hongo, teniendo un mayor efecto sobre la actividad enzimática ligninolítica de LiP, se esperaba que, el  $MnSO_4$  presentara un efecto positivo sobre MnP como lo mencionan Muhammad y colaboradores en 2013 (81), por otro lado Perez y colaboradores en 2017 menciona los efectos de oligoelementos en la producción de LiP encontrando que Mn (II) de 1.6 a 11.2 ppm aumenta la actividad bruta de LiP en 1.8 veces(82) como lo obtenido en este trabajo.



**Figura 18.** Superficie de respuesta para actividad de LiP.

Estos resultados indican que el *Trametes versicolor* nativo con el que se trabajó es capaz de producir las tres enzimas, induciendo esta producción con cosustratos y cofactores, esto concuerda con lo reportado en la literatura, donde indican que estos hongos pueden producir las tres enzimas. Sin embargo, las peroxidasas son más sensibles a la inducción, en especial la lignino peroxidasa, que en muchas de las combinaciones usadas no se detectó, mientras que las lacasas se detectaron en todos los casos en mayor o menor medida.

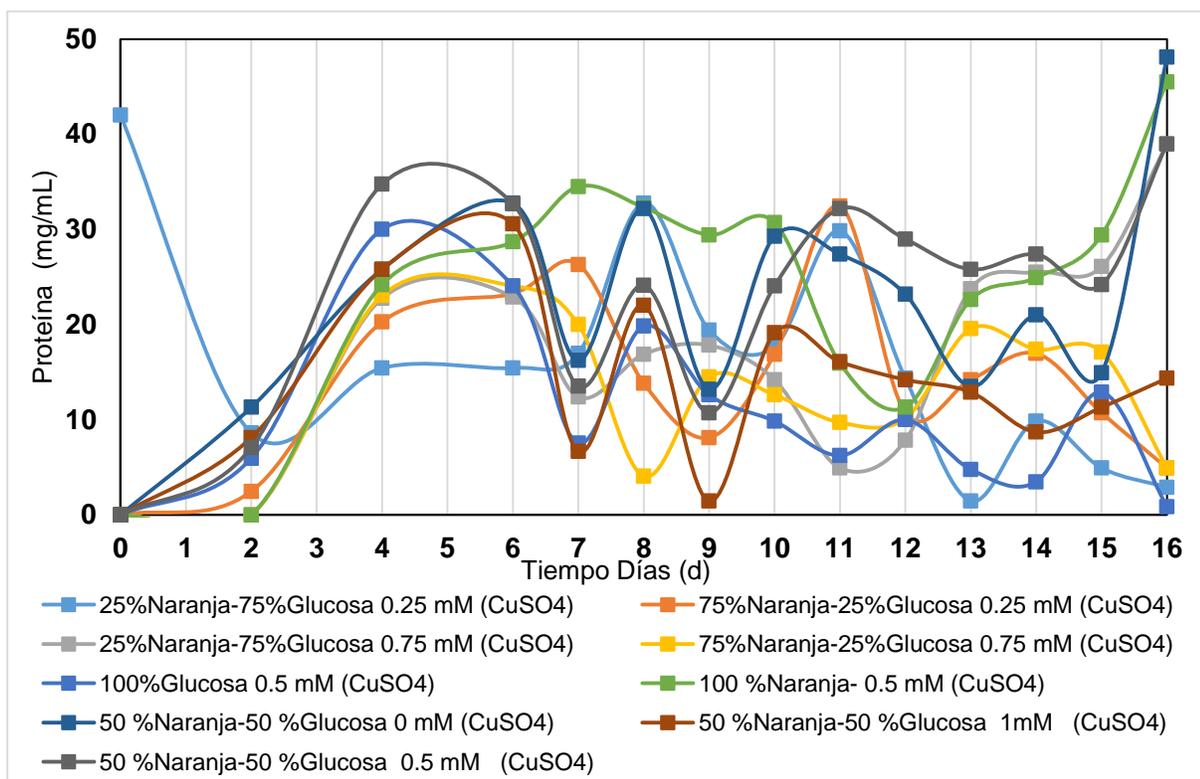
#### **9.4 Diseños de experimentos para la optimización de la producción de las enzimas ligninolíticas por fermentación sumergida utilizando los mejores cosustratos y cofactores**

Del diseño de experimentos anterior, se seleccionaron los tres mejores cosustratos, que en este caso fueron: el salvado de trigo (ST), cáscara de naranja (CN) y cáscara de plátano (CP), el otro factor de estudio fue la concentración del

cofactor ( $\text{CuSO}_4$ ). Se realizó un diseño de experimentos CCD  $2^2$  para cada cosustrato, variando la concentración de cosustrato y de cofactor, y teniendo como respuestas las actividades enzimáticas de Lac, LiP, MnP, azúcares reductores, proteína y compuestos fenólicos. Se corrió un DCC  $2^2$ , para cada cosustrato y se tomaron para cada uno tres respuestas: las actividades enzimáticas de lacasa, LiP y MnP. Sin embargo, de manera adicional se medirán durante las cinéticas la proteína extracelular, los azúcares reductores y los compuestos fenólicos.

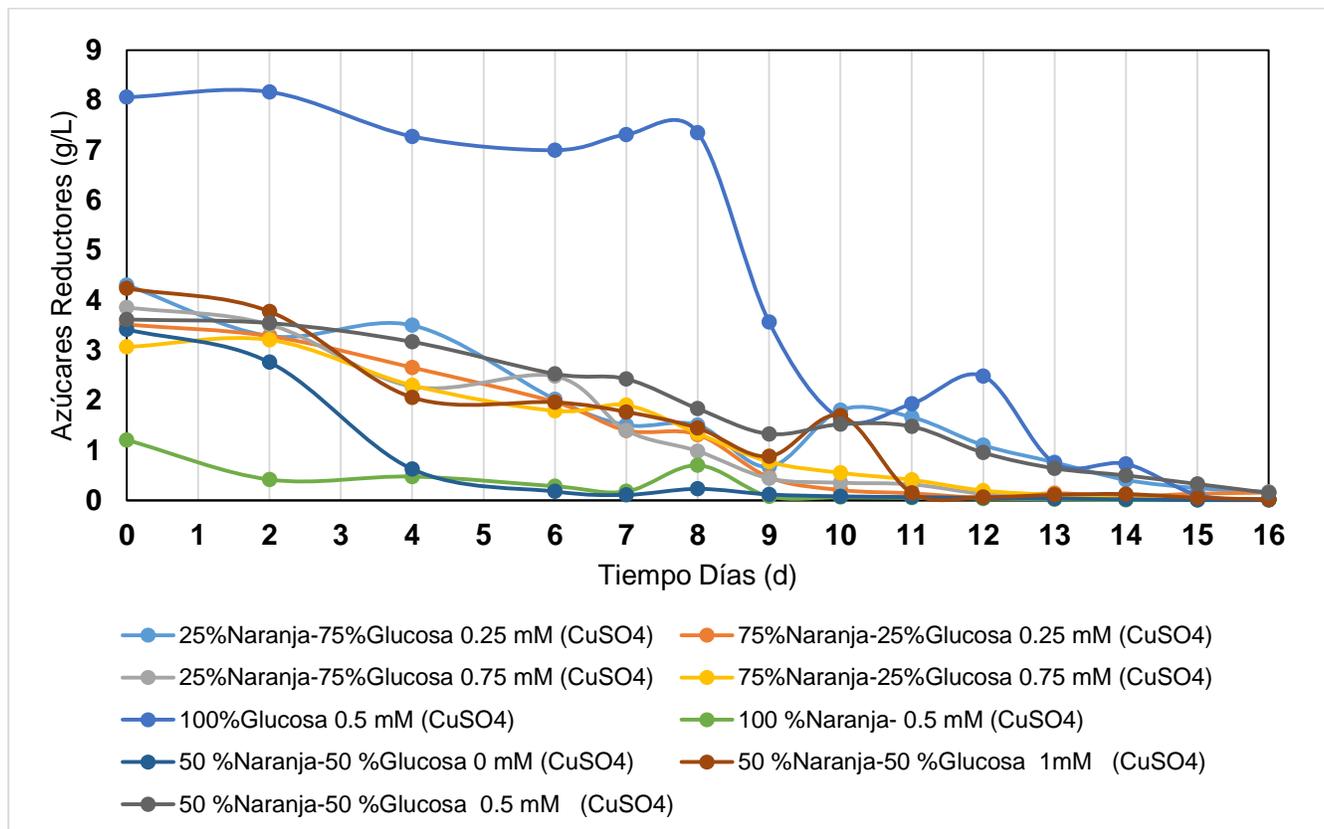
#### 9.4.1 Cinética de cáscara de naranja

En las Figuras 19-24, se presentan las cinéticas obtenidas de la cáscara de naranja, para todas las respuestas estudiadas. La CN, tiene poco contenido de polisacáridos y alta cantidad de nitrógeno, lo que estimula la biosíntesis enzimática (80), así como compuestos aromáticos tales como el guaiacol, el catecol y el alcohol veratrílico que se ha demostrado que aumentan la producción de lacasa, MnP y LiP (84) y que se usan también como mediadores redox. En la Figura 19, se presenta el comportamiento de la proteína extracelular obtenida durante la cinética presentando un crecimiento exponencial hasta el día 8 que es cuando empieza a presentarse comportamientos fluctuantes en la concentración.



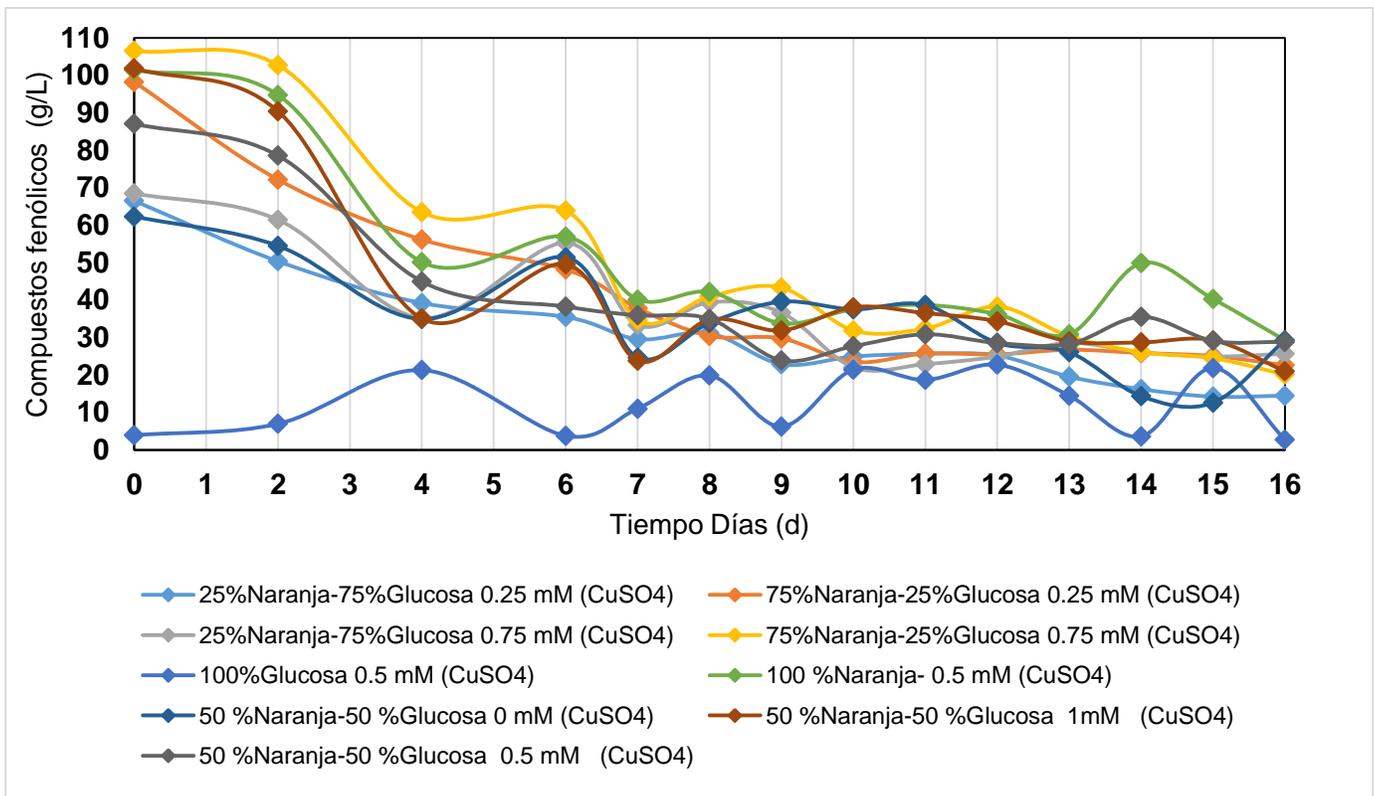
**Figura 19.** Cinética de proteína extracelular en cultivo sumergido a  $30^\circ\text{C}$  variando la concentración del cosustrato y de cofactor, para cáscara de Naranja.

En la Figura 20, se presenta el consumo de azúcares durante la cinética donde se aprecia que con el paso de los días existió un decremento en la concentración inicial de azúcares reductores este es un comportamiento esperable.



**Figura 20.** Cinética de azúcares reductores en cultivo sumergido a 30°C modificando la concentración del cosustrato y de cofactor, para cáscara de Naranja.

El consumo de compuestos fenólicos presentes en la cáscara de naranja, durante la fermentación se presenta en la Figura 21, como ya se mencionó anteriormente este residuo presenta una alta cantidad de compuestos fenólicos, más que los presentados por los otros residuos estudiados, se puede apreciar cómo se presenta un consumo de los compuestos fenólicos al paso del tiempo iniciando casi todas la combinaciones con 100 mg/L de compuestos fenólicos observando que al final de la cinética ya se presenta entre 20 y 16 mg/L lo que nos demuestra que el hongo hace uso tanto de los compuestos fenólicos como de los azúcares presentes en el medio para su crecimiento y producción enzimática.



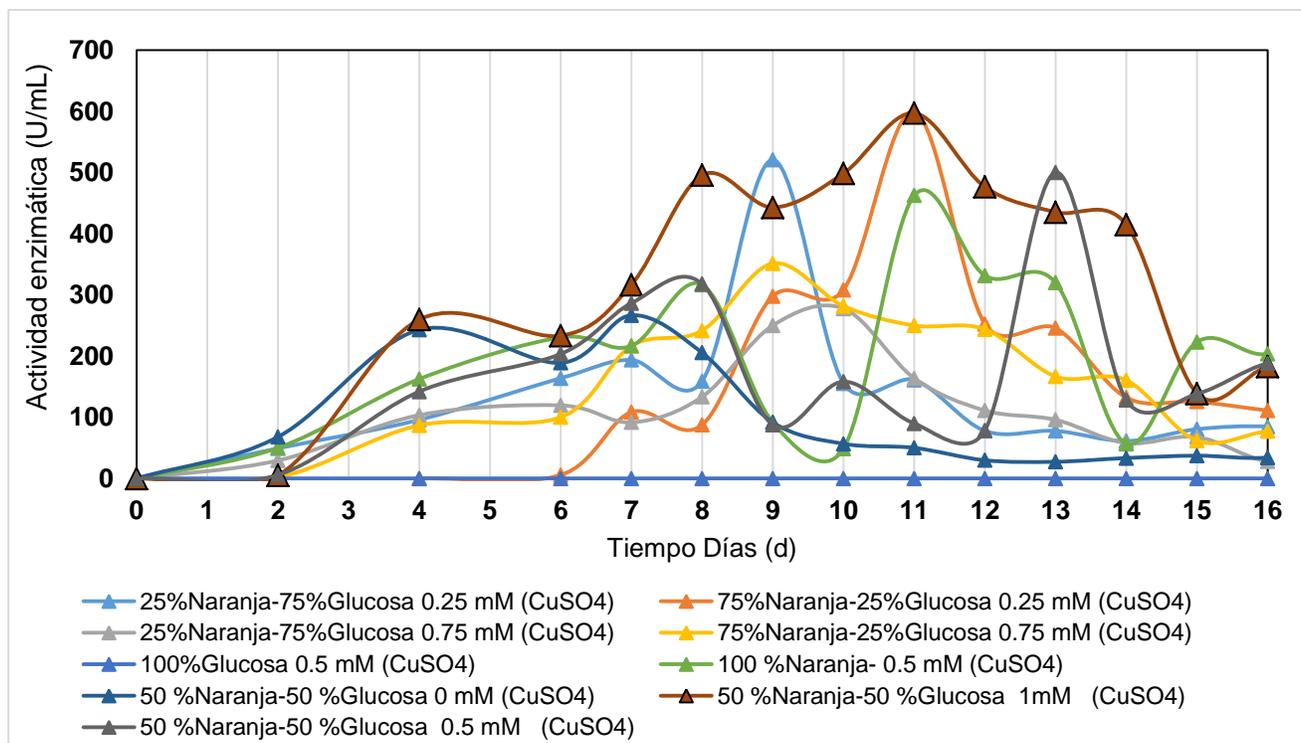
**Figura 21.** Cinética de compuestos fenólicos en cultivo sumergido a 30°C modificando la concentración del cosustrato y de cofactor, para cáscara de Naranja.

El ANOVA del DCC 2<sup>2</sup> para la cáscara de Naranja tomando como respuesta la actividad enzimática de lacasa se muestra en la Tabla 20. Aquí se observa que tanto el modelo, como los efectos lineal y cuadrático de la concentración del cosustrato son significativos, además de no haber interacción entre los factores de concentración de cofactor y concentración de cosustrato.

**Tabla 20.** ANOVA sobre la respuesta de la actividad enzimática de lacasa utilizando cáscara de naranja como cosustrato.

Tabla de Análisis de Varianza Suma parcial de cuadrados						
	Suma de cuadrados	df	Media de cuadrados	F	p-valor	
Fuente				Valor	Prob > F	
Modelo	1.38E+05	5	27620.02	4.6	0.0195	<b>significativo</b>
A-Cosustrato	82331.69	1	82331.69	13.7	0.0041	
B-Cofactor	9844.61	1	9844.61	1.64	0.2295	
AB	794.81	1	794.81	0.13	0.7237	
A <sup>2</sup>	34161.07	1	34161.07	5.68	0.0383	
B <sup>2</sup>	1378.59	1	1378.59	0.23	0.6423	
Residual	60100.65	10	6010.07			
Falta de ajuste	60098.2	3	20032.73	57143.08	< 0.0001	<b>significativo</b>
Error	2.45	7	0.35			
Total	1.98E+05	15				

En la Figura 22 la actividad máxima de lacasa se observa con la combinación de 50% de cáscara de naranja/glucosa al 50% y con 1mM de CuSO<sub>4</sub>, alcanzando 597 U/mL al día 11, sin embargo, ese mismo día se alcanzaron 600 U/mL, con 75%Cáscara de naranja/25% glucosa y 0.25 mM de sulfato de cobre. También, se alcanzaron 495 U/mL el día 8 con, con 50% de cáscara de naranja/glucosa al 50% y con 1mM de CuSO<sub>4</sub>, así como 520 U/mL, el día 9, con 25%Cáscara de naranja/75% glucosa y 0.25 mM de sulfato de cobre. A pesar de que estos resultados son superiores a muchos reportados, el diseño preliminar indicó que para lacasas posiblemente el mejor cosustrato como inductor es el salvado de trigo, ya que ahí se alcanzaron 1,337 U/mL.



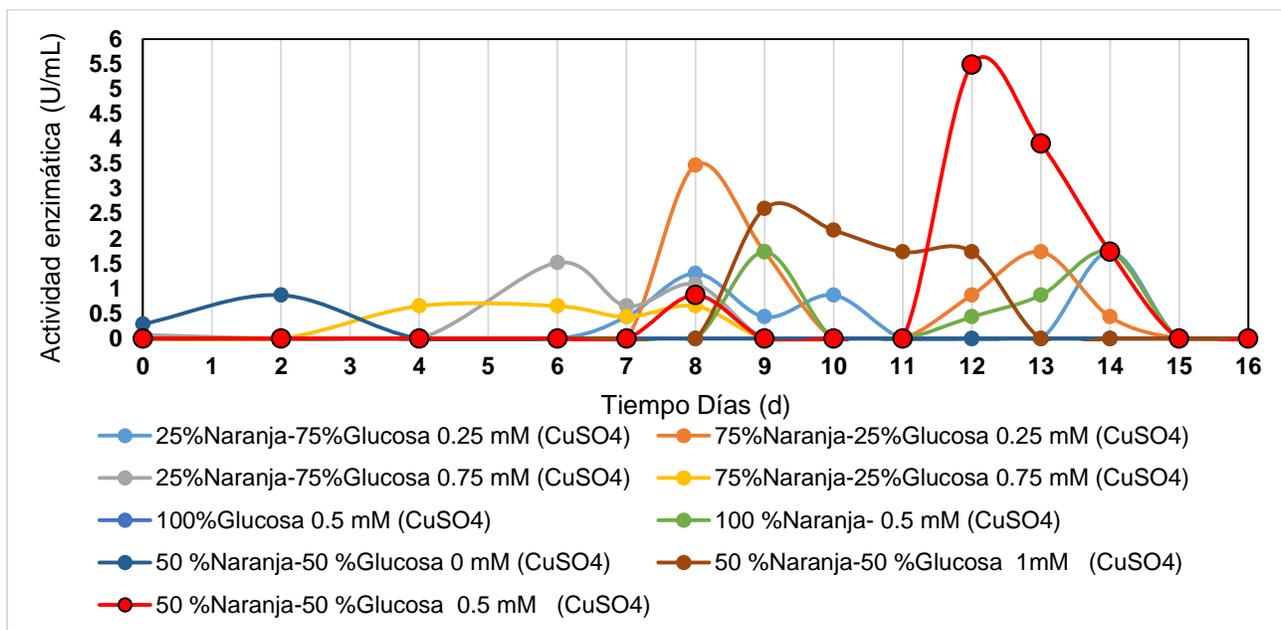
**Figura 22.** Cinética de la actividad enzimática de lacasa en cultivo sumergido a 30°C modificando la concentración del cosustrato y de cofactor, para cáscara de Naranja.

El ANOVA para la cáscara de naranja midiendo MnP, se muestra en la Tabla 21, donde se indica que ningún factor es estadísticamente significativo.

**Tabla 21.** ANOVA sobre la respuesta de la actividad enzimática de MnP utilizando cáscara de naranja como cosustrato.

Tabla de Análisis de Varianza Suma parcial de cuadrados						
Fuente	Suma de cuadrados	df	Media de cuadrados	F	p-valor	
				Valor	Prob > F	
Modelo	4.56	5	0.91	0.59	0.7065	<b>no significativo</b>
A-Cosustrato	1.43	1	1.43	0.93	0.357	
B-Cofactor	1.39	1	1.39	0.9	0.3648	
AB	1.74	1	1.74	1.13	0.3126	
A <sup>2</sup>	0	1	0	0	1	
B <sup>2</sup>	0	1	0	0	1	
Residual	15.37	10	1.54			
Falta de ajuste	15.37	3	5.12	5226.44	< 0.0001	<b>significativo</b>
Error	6.86E-03	7	9.80E-04			
Total	19.93	15				

Durante la cinética de la actividad enzimática de MnP, observada en la Figura 23, se muestra en este caso, que la combinación con la actividad más alta fue con un 50% CN/glucosa 50% y 0.5 mM de CuSO<sub>4</sub> con 5.48 U/mL al día 12. A pesar de que son actividades enzimáticas altas, no se alcanzó la actividad de ~19 U/mL, que se había alcanzado en el diseño preliminar, sin embargo, la relación cosustrato/sustrato fue variada y posiblemente por esta razón no se alcanzó dicha actividad.



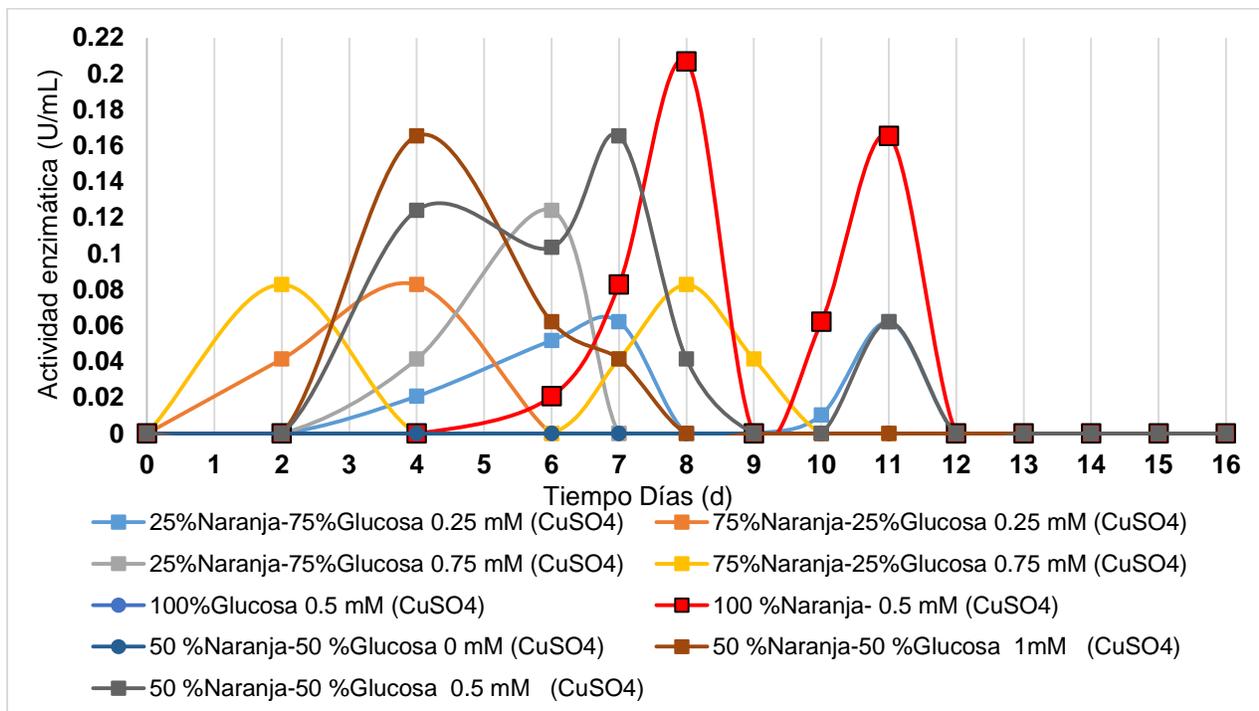
**Figura 23.** Cinética de la actividad enzimática de MnP en cultivo sumergido a 30°C modificando la concentración del cosustrato y de cofactor, para cáscara de Naranja.

En la Tabla 22, se muestra el ANOVA del DCC, donde indica que tanto el modelo, así como el factor A (concentración de sustrato) y la interacción entre la concentración de cosustrato y la concentración de cofactor, son significativos. Lo que nos indica que la inducción de la LiP depende fuertemente de la concentración del cosustrato y de la interacción que pueda haber entre ellos. Además, comparándolo con el estudio preliminar también depende del tipo de cosustrato y del tipo de cofactor, ya que bajo condiciones diferentes alcanzó un máximo de ~0.300 U/mL. En la literatura han reportado, que la LiP es sensible a las variaciones de la concentración de cofactor, sin embargo, en el ANOVA, no aparece significativo, pero está muy cerca de serlo, debido a que el valor P, está muy cercano a 0.05.

**Tabla 22.** ANOVA sobre la respuesta de la actividad enzimática de LiP utilizando cáscara de naranja como cosustrato.

Tabla de Análisis de Varianza Suma parcial de cuadrados						
Fuente	Suma de cuadrados	df	Media de cuadrados	F	p-valor	
				Valor	Prob > F	
Modelo	0.79	5	0.16	4.37	0.0227	<b>significativo</b>
A-Cosustrato	0.27	1	0.27	7.38	0.0217	
B-Cofactor	0.17	1	0.17	4.73	0.0547	
AB	0.34	1	0.34	9.46	0.0117	
A <sup>2</sup>	2.95E-03	1	2.95E-03	0.081	0.7815	
B <sup>2</sup>	4.18E-03	1	4.18E-03	0.12	0.7412	
Residual	0.36	10	0.036			
Falta de ajuste	0.36	3	0.12	4739.54	< 0.0001	<b>significativo</b>
Error	1.79E-04	7	2.55E-05			
Total	1.16	15				

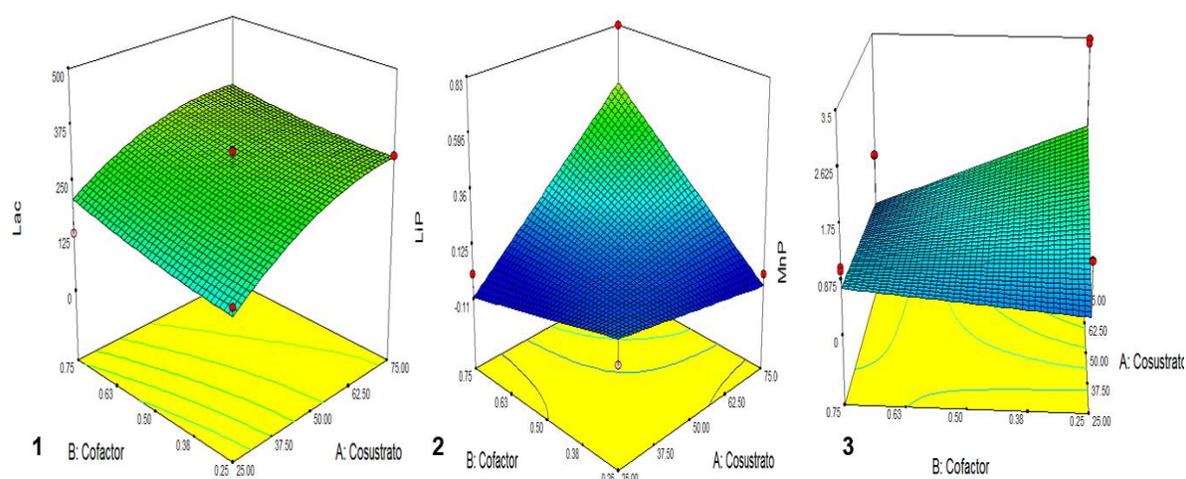
LiP alcanzó su actividad máxima con la combinación de 100% cáscara de naranja y con 0.5 mM de CuSO<sub>4</sub>, obteniendo una actividad enzimática de 0.206 U/mL al día 8, como se muestra en la Figura 24. Esta actividad enzimática es menor a la encontrada en el preliminar usando otro residuo y otra sal como inductor, sin embargo, la cantidad de LiP es superior a los trabajos ya reportados en la literatura.



**Figura 24.** Cinética de la actividad enzimática de LiP en cultivo sumergido a 30°C modificando la concentración del cosustrato y de cofactor, para cáscara de Naranja.

Las enzimas MnP y lacasa presentaron un comportamiento similar en su producción enzimática debido a que actúan de manera sinérgica y es posible definir las condiciones de sustrato y cultivo para una alta producción simultánea de ambas enzimas(80), esto demuestra que el utilizar cáscara de naranja como cosustrato tiene un buen potencial para obtener un extracto rico en las tres enzimas.

En la Figura 25 se muestran las superficies de respuesta para las actividades enzimáticas de lacasa (Lac), MnP y LiP. En esta Figura se muestran los comportamientos de las actividades enzimáticas, variando la concentración de cosustrato (cáscara de naranja) y de la concentración de cofactor, que para todos los casos es sulfato de cobre.



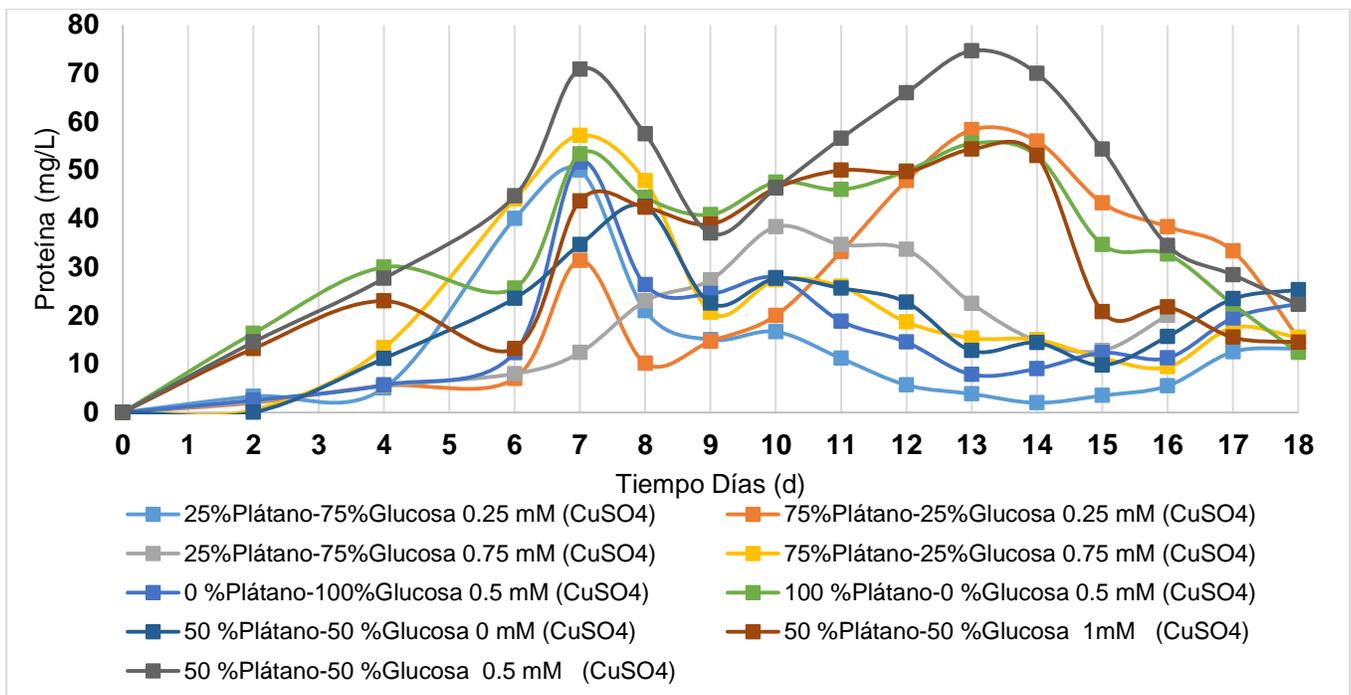
**Figura 25.** Superficies de respuesta de la actividad enzimática de Lac 1), LiP 2) y MnP 3), utilizando cáscara de naranja como cosustrato y sulfato de cobre como cofactor.

En la Figura 25, podemos observar que las tendencias de los máximos de actividad enzimática coinciden con los porcentajes de las relaciones cosustrato/glucosa y la concentración del cofactor, que fueron determinados durante las cinéticas.

#### 9.4.2 Cinética de cáscara de plátano

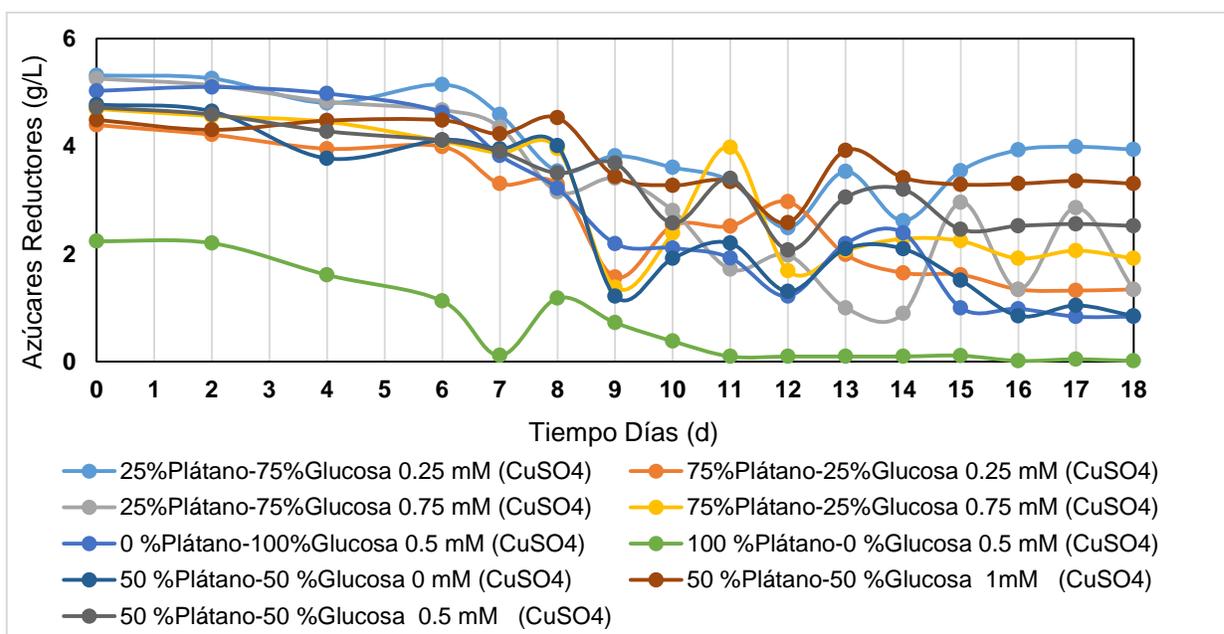
De las Figuras 26 a la 31, se presenta el comportamiento de las diferentes cinéticas a partir del uso de cáscara de plátano como cosustrato. Estas corresponden a la cinética de proteína, azúcares reductores, compuestos fenólicos, actividad enzimática de lacasas, MnP y LiP.

El comportamiento de la proteína extracelular se observa en Figura 25, donde observamos un comportamiento cíclico, es decir, inicia aumentando la proteína extracelular hasta que alcanza un máximo entre los días 6 y 7, sin embargo, disminuye y luego vuelve a aumentar. Esto se debe a que no solo produce estas enzimas (proteínas) y que puede producir otras proteínas que sean de almacenamiento de energía. Además, puede deberse a que a hay enzimas como la LiP que se produce a tiempos cortos, y posteriormente se producen enzimas que están en mayor cantidad como la MnP y la lacasas.



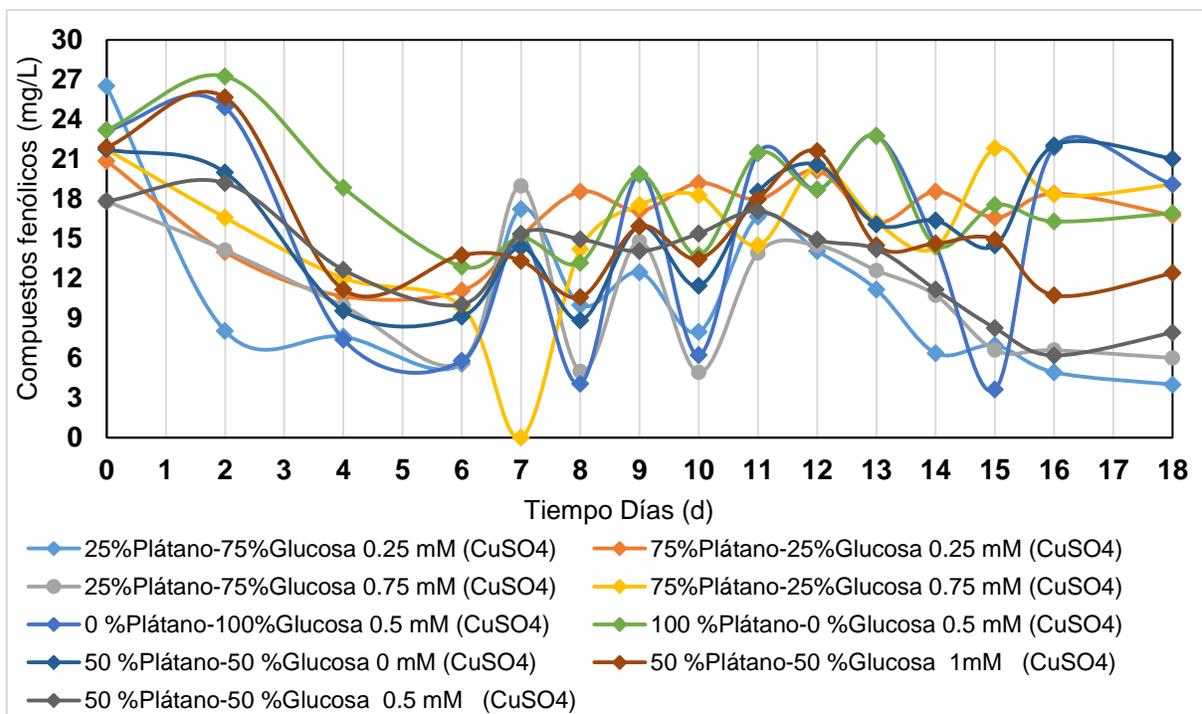
**Figura 26.** Cinética de proteína extracelular en cultivo sumergido a 30°C variando la concentración del cosustrato y de cofactor, para cáscara de plátano.

En la Figura 27, se presenta el comportamiento de los azúcares reductores (AR) durante la cinética, en esta grafica se observa como al inicio de la cinética la mayoría de las combinaciones presentan entre 4 y 5 g/L de azúcar. La concentración de AR decrece conforme pasa el tiempo, sin embargo, a partir del día 6 se comienza a presentar un comportamiento fluctuante, donde bajan y luego vuelven a subir, esto se debe a la hidrólisis de diferentes biopolímeros presentes en los residuos, cuyos monómeros aportan a la concentración de este tipo de azúcares, tales como el almidón, la hemicelulosa y la celulosa. Se ha reportado que el principal componente de la cáscara de plátano es la lignina con un contenido entre 12%- 16.8%(85). Por lo que el sistema enzimático debe hidrolizar primero la lignina, para tener acceso a los biopolímeros que aportan AR.



**Figura 27.** Cinética de azúcares reductores en cultivo sumergido a 30°C modificando la concentración del cosustrato y de cofactor, para cáscara de plátano.

En la Figura 28, se presenta el comportamiento de los compuestos fenólicos durante la cinética, como se ha mencionado anteriormente la cáscara de plátano (CP) presenta diversos compuestos fenólicos y a diferencia de la cinética de cáscara de naranja, se ve como con el paso de tiempo se presenta un consumo de compuestos fenólicos pero el comportamiento es fluctuante, ya que en algunos momentos estos vuelven aumentar y luego disminuyen de nuevo. Esto se debe como ya se mencionó, a que la cáscara de plátano puede estar conformada hasta con un 16% de lignina, que con el paso del tiempo es degradada por el complejo enzimático del hongo, este lo consume durante su metabolismo, por lo que vuelve a bajar, hasta que produce más enzima y vuelve el ciclo de nuevo. Este comportamiento de los compuestos fenólicos se debe a que la lignina es una cadena (biopolímero) de compuestos fenólicos conformado por monómeros de aldehído siríngico, alcoholes coniferílicos, sinapílicos y cumarílicos, que al ser degradada, se van liberando, luego se consumen, y luego produce más enzimas que los liberan de nuevo, ésta es la razón del comportamiento fluctuante de los compuestos fenólicos(85). Esta hidrólisis puede deberse principalmente a la lacasa, ya que durante la fermentación no se adiciona peróxido de hidrógeno, y las peroxidasa no pueden actuar sin él.



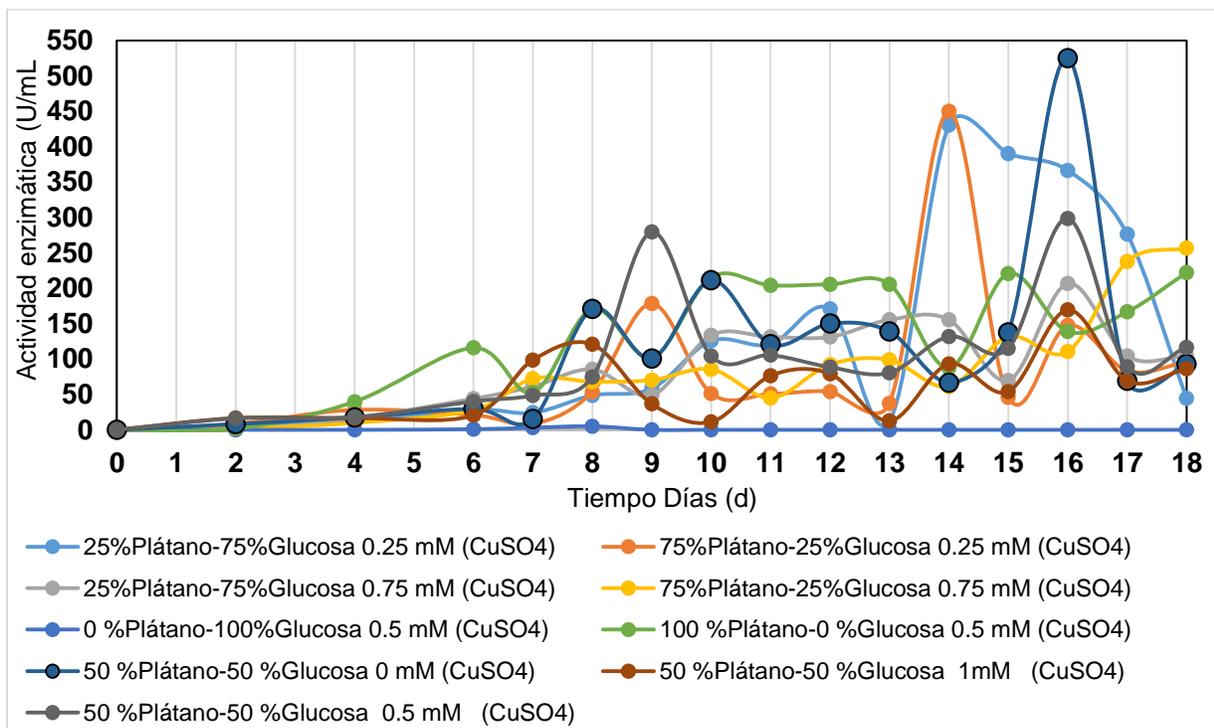
**Figura 28.** Cinética de compuestos fenólicos durante el cultivo sumergido a 30°C modificando la concentración del cosustrato y de cofactor, para cáscara de plátano.

El ANOVA del DCC para la respuesta de la actividad enzimática de lacasa muestra en la Tabla 23, que tanto el modelo, como el efecto de la concentración de cosustrato son significativos, al igual que ambos efectos cuadráticos (concentración de cosustrato y cofactor). Esto muestra nuevamente que estas enzimas son inducibles variando tanto la concentración de cosustrato (CP) y cofactor (CuSO<sub>4</sub>).

**Tabla 23.** ANOVA sobre la respuesta de la actividad enzimática de lacasas utilizando cáscara de plátano como cosustrato.

Tabla de Análisis de Varianza Suma parcial de cuadrados						
Fuente	Suma de cuadrados	df	Media de cuadrados	F	p-valor	
				Valor	Prob > F	
Modelo	1.24E+05	5	24707.4	9.14	0.0017	significativo
A-Cosustrato	14631.32	1	14631.32	5.41	0.0423	
B-Cofactor	7978.06	1	7978.06	2.95	0.1166	
AB	4761.9	1	4761.9	1.76	0.2139	
A <sup>2</sup>	69193.49	1	69193.49	25.6	0.0005	
B <sup>2</sup>	58816.8	1	58816.8	21.76	0.0009	
Residual	27031.18	10	2703.12			
Falta de ajuste	27019.23	3	9006.41	5275.81	< 0.0001	significativo
Error	11.95	7	1.71			
Total	1.51E+05	15				

En la Figura 29, se muestra la cinética de la actividad enzimática de lacasa, en cultivo sumergido a 30°C, modificando la concentración del cosustrato y de cofactor, para la cáscara de plátano, donde hay un primer máximo importante de 279 U/mL al día 9, con 50% de cáscara de plátano/50% de glucosa y 0.5 mM de CuSO<sub>4</sub>, seguido por otro máximo al día 14, con ~400 U/mL en condiciones de 75%CP/25% glucosa y 0.25 mM de sulfato de cobre y con 25%CP/75% de glucosa y 0.25 mM de sulfato de cobre. Finalmente, otro máximo de 525 U/mL al día 16 con 50% de CP/50% glucosa y 0 mM de sulfato de cobre. Esto muestra que las lacasas se producen para todas las combinaciones, sin embargo, para la cáscara de plátano se tarda más en producir una actividad comparable con la cáscara de naranja, la cual alcanzó 520 U/mL, el día 9, con 25%Cáscara de naranja/75% glucosa y 0.25 mM de sulfato de cobre. Esto se debe, a que las lacasas disparan su producción cuando se agotan los azúcares reductores y la cáscara de plátano contenía la mayor concentración de azúcares reductores, lo que hace que la fase lag de la cinética se alargue.



**Figura 29.** Cinética de la actividad enzimática de lacasa en cultivo sumergido a 30°C variando la concentración del cosustrato y de cofactor, usando cáscara de plátano.

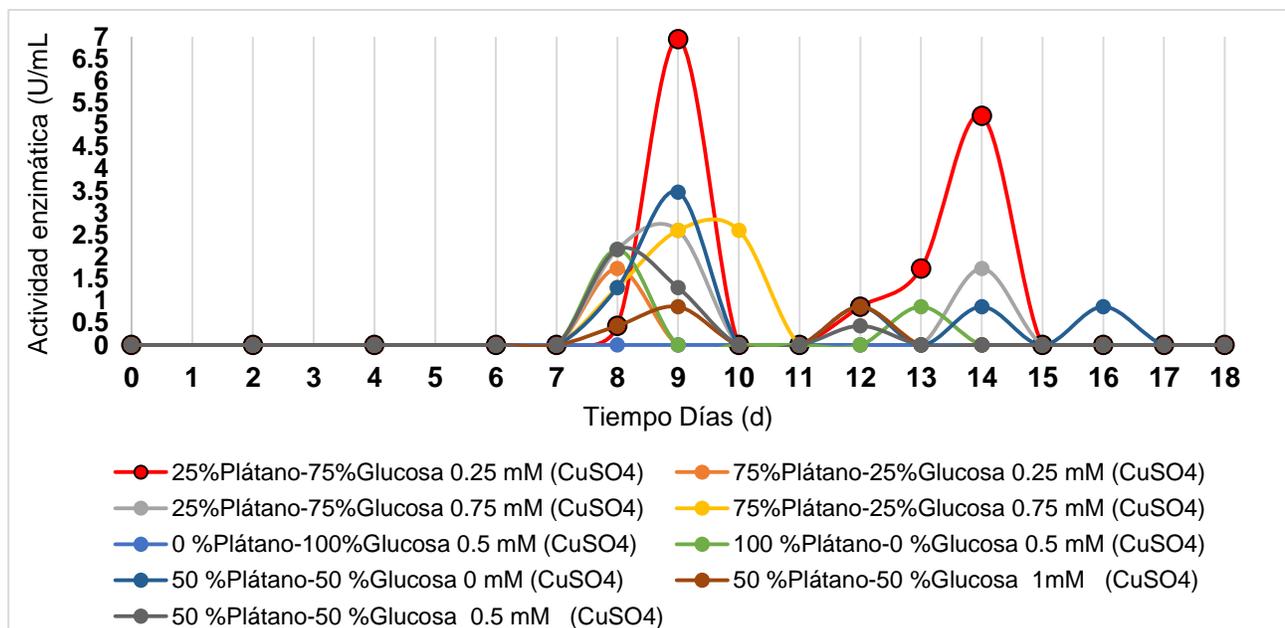
El DCC para la cáscara de plátano teniendo como respuesta la actividad enzimática de MnP, ver Tabla 24, muestra que hay diferencia significativa con el factor A, que representa la concentración de cosustrato y también se observa que

es significativa la interacción entre los factores estudiados, es decir, entre la concentración de cosustrato y cofactor, demostrando nuevamente que éstas enzimas son inducibles con estos factores. En todos los análisis de diseño de experimentos realizados hasta el momento, para la optimización, ha salido que son significativos para la concentración de cosustrato.

**Tabla 24.** ANOVA sobre la respuesta de la actividad enzimática de MnP utilizando cáscara de plátano como cosustrato.

Tabla de Análisis de Varianza Suma parcial de cuadrados						
	Suma de cuadrados	df	Media de cuadrados	F	p-valor	
Fuente				Valor	Prob > F	
Modelo	46.23	5	9.25	4.36	0.0229	<b>significativo</b>
A-Cosustrato	11.73	1	11.73	5.53	0.0405	
B-Cofactor	7.16	1	7.16	3.37	0.0961	
AB	22.38	1	22.38	10.55	0.0087	
A <sup>2</sup>	2.17	1	2.17	1.02	0.3359	
B <sup>2</sup>	1.18	1	1.18	0.56	0.4732	
Residual	21.21	10	2.12			
Falta de ajuste	21.14	3	7.05	719.1	< 0.0001	<b>significativo</b>
Error	0.069	7	9.80E-03			
Total	67.44	15				

En la Figura 30, podemos observar que la MnP se produce entre los días 8 y 16, además, no está presente para todas las combinaciones probadas. La actividad enzimática máxima fue de 6.94 U/mL, y se alcanzó con 25% de cáscara de plátano/75% glucosa como cosustrato y con 0.25 mM de sulfato de cobre como cofactor, en el día 9 de la fermentación. Esta actividad es mayor que la alcanzada para la optimización con cáscara de naranja y se alcanzó en menor tiempo, sin embargo, es menor que la que se alcanzó en el diseño preliminar, con cáscara de naranja.



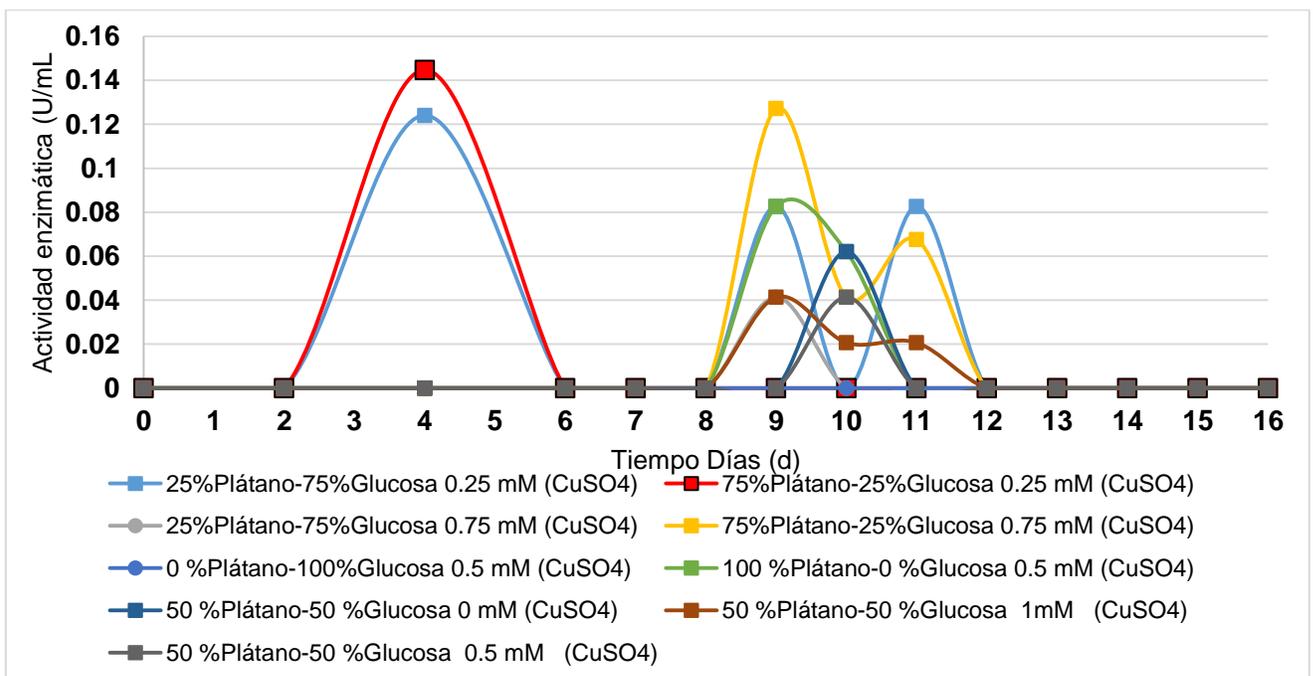
**Figura 30.** Cinética de la actividad enzimática de MnP en cultivo sumergido a 30°C variando la concentración del cosustrato y de cofactor, usando cáscara de plátano.

En el ANOVA para la actividad enzimática de LiP usando cáscara de plátano como cosustrato, podemos observar que es significativo el modelo y el factor de interacción de la concentración de cosustrato y cofactor, ver Tabla 25, a diferencia con lo obtenido en el preliminar, donde salió significativo al tipo de cosustrato. Esto se puede deber a que justamente con la cáscara de plátano obtuvo su mayor actividad enzimática en el diseño preliminar. Sin embargo, si lo comparamos en la optimización para LiP con la cáscara de naranja, en donde sale significativo tanto para la concentración de cosustrato y de cofactor, podemos inferir que los compuestos fenólicos están jugando un papel importante en la inducción de esta enzima.

**Tabla 25.** ANOVA sobre la respuesta de la actividad enzimática de LiP utilizando cáscara de plátano como cosustrato.

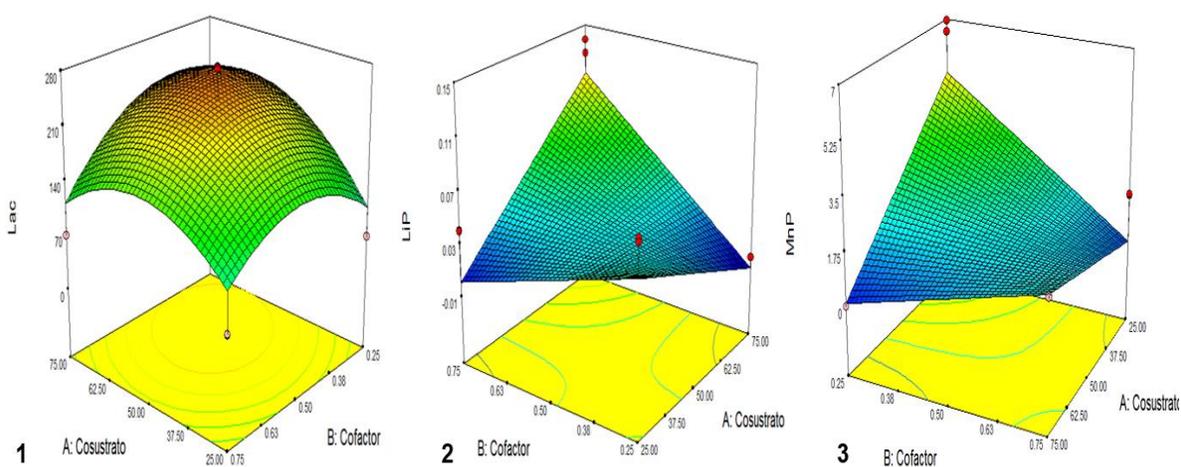
Tabla de Análisis de Varianza Suma parcial de cuadrados						
Fuente	Suma de cuadrados	df	Media de cuadrados	F	p-valor	
				Valor	Prob > F	
Modelo	0.024	5	4.77E-03	4.26	0.0246	<b>significativo</b>
A-Cosustrato	2.19E-03	1	2.19E-03	1.95	0.1924	
B-Cofactor	4.46E-03	1	4.46E-03	3.98	0.0739	
AB	0.015	1	0.015	13.3	0.0045	
A <sup>2</sup>	2.24E-03	1	2.24E-03	2	0.1873	
B <sup>2</sup>	5.60E-04	1	5.60E-04	0.5	0.4953	
Residual	0.011	10	1.12E-03			
Falta de ajuste	0.011	3	3.71E-03	396.19	< 0.0001	<b>significativo</b>
Error	6.55E-05	7	9.36E-06			
Total	0.035	15				

Durante la cinética de la optimización de la producción de LiP con cáscara de plátano, podemos observar que la actividad máxima alcanzada se dio el día 4, con dos condiciones, una con 25% de cáscara de plátano/75% glucosa y una concentración de sulfato de cobre de 0.25 mM (0.124 U/mL) y otra mayor con 75% de cáscara de plátano/25% glucosa, con 0.25 mM de sulfato de cobre, alcanzando 0.145 U/mL de actividad enzimática de LiP. Esta actividad es superior o bien comparable con lo reportado en la literatura, y en menos tiempo que para el caso de la cáscara de naranja, aunque con naranja alcanzó más de 0.200 U/mL, lo que podría deberse a la concentración de compuestos fenólicos. Sin embargo, sigue siendo menor que para el diseño preliminar, esto significa que el tipo de cofactor es importante, ya que para el diseño preliminar funcionó mejor el sulfato de Magnesio y a una concentración mayor. Hay reportes en la literatura que indican que para *Trametes versicolor*, la concentración óptima de sulfato de cobre como inductor es alrededor de 30 mM (75), lo cual concuerda con lo que hemos obtenido. Sin embargo, sería interesante explorar otros cofactores para esta enzima, al igual que para la MnP. Se observa también, que en el día 9, hay un máximo con 0.127 U/mL, con 75% de cáscara de plátano/25% glucosa y 0.75 mM de sulfato de cobre. Además, no en todas las combinaciones se puede inducir la LiP, y hay tiempos en los que no está o está inhibida.



**Figura 31.** Cinética de la actividad enzimática de LiP en cultivo sumergido a 30°C modificando la concentración del cosustrato y de cofactor.

En la Figura 32, podemos observar que para la cáscara de plátano alcanzamos un máximo en la actividad alcanzada para lacasas, ver Figura 32.1. Sin embargo, para los casos de MnP y LiP, ver Figuras 32.2 y 32.3, no se ve que se hayan alcanzado los máximos, al igual que con la cáscara de naranja, esto abre la posibilidad de explorar otros cofactores y cosustratos para mejorar la producción de las peroxidasas.



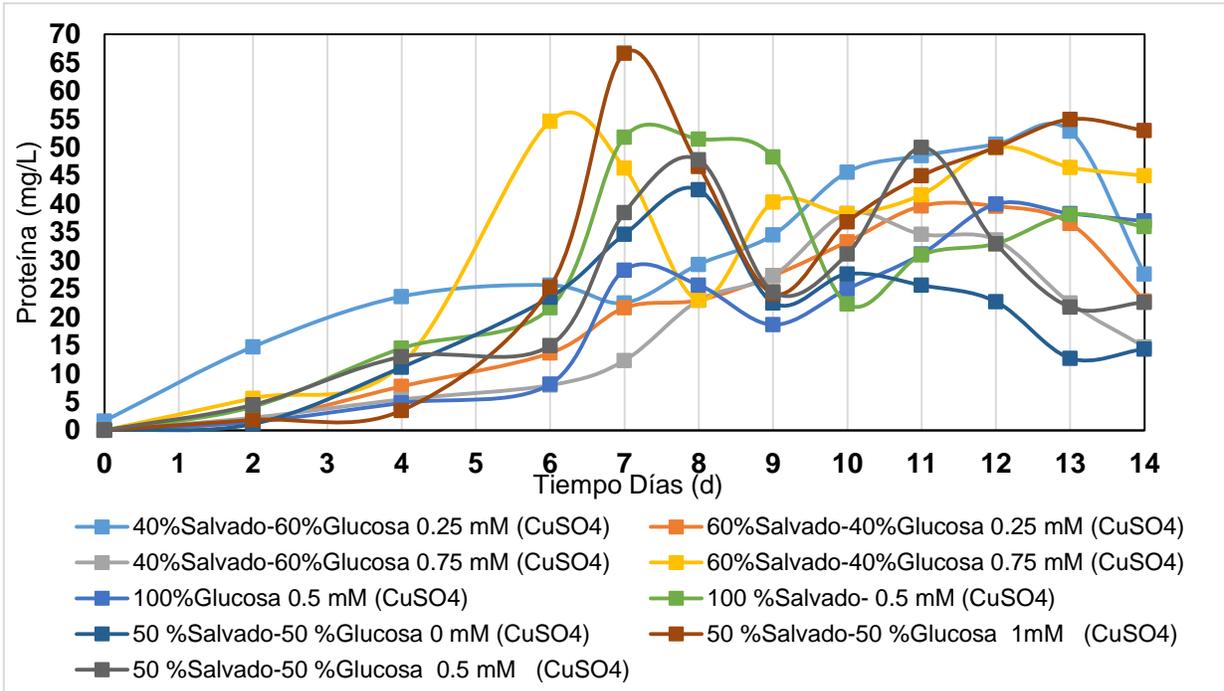
**Figura 32.** Superficies de respuesta de la actividad enzimática de Lac 1), LiP 2) y MnP 3), utilizando cáscara de plátano, como cosustrato y sulfato de cobre como cofactor.

### 9.4.3 Cinética de salvado de Trigo

En la optimización de la producción de enzimas ligninolíticas usando como cosustrato el salvado de trigo, se varió al igual que para los residuos anteriores la concentración de cosustrato y la concentración de cofactor ( $\text{CuSO}_4$ ). En las Figuras 33-38, se presenta el comportamiento obtenido por las cinéticas de proteína, azúcares reductores, compuestos fenólicos, actividad de lacasas, MnP y LiP, utilizando el salvado de trigo como cosustrato, siendo éste, el residuo más estudiado para la producción de lacasa (12,86,87), teniendo un contenido aproximado de 4.4 a 10% de lignina y 10% de celulosa.

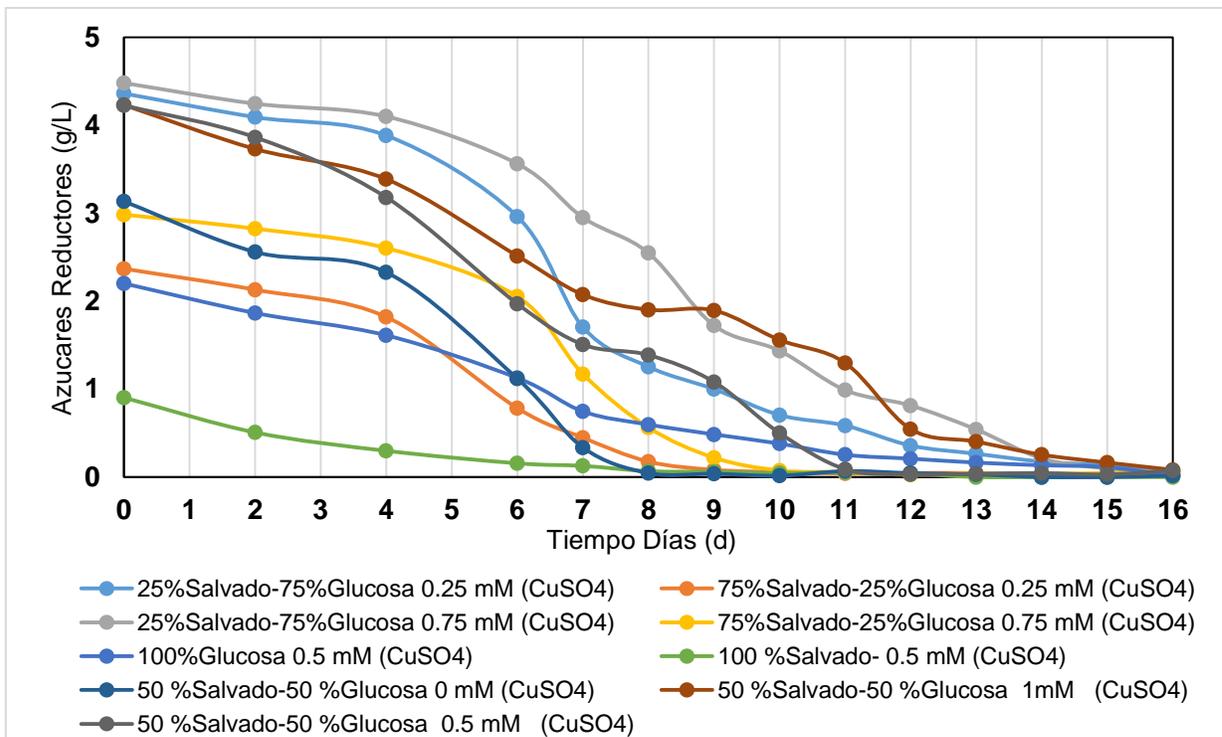
En la Figura 33, podemos observar la cinética de proteína extracelular, la cual se comporta de manera cíclica, como en los casos anteriores con los otros cosustratos. Primero aumenta hasta un máximo de concentración de proteína extracelular entre los días 6-8, luego baja y después vuelve a subir. Como se ha

explicado para los otros dos cosustratos, esto se debe a que *T. versicolor* no solo produce lacasas, también produce un paquete de proteínas extracelulares entre las cuales pueden estar otras peroxidasas, como ya se ha mostrado para este hongo nativo, además de otro tipo de proteínas de almacenamiento de energía, que en algún momento se pierden.



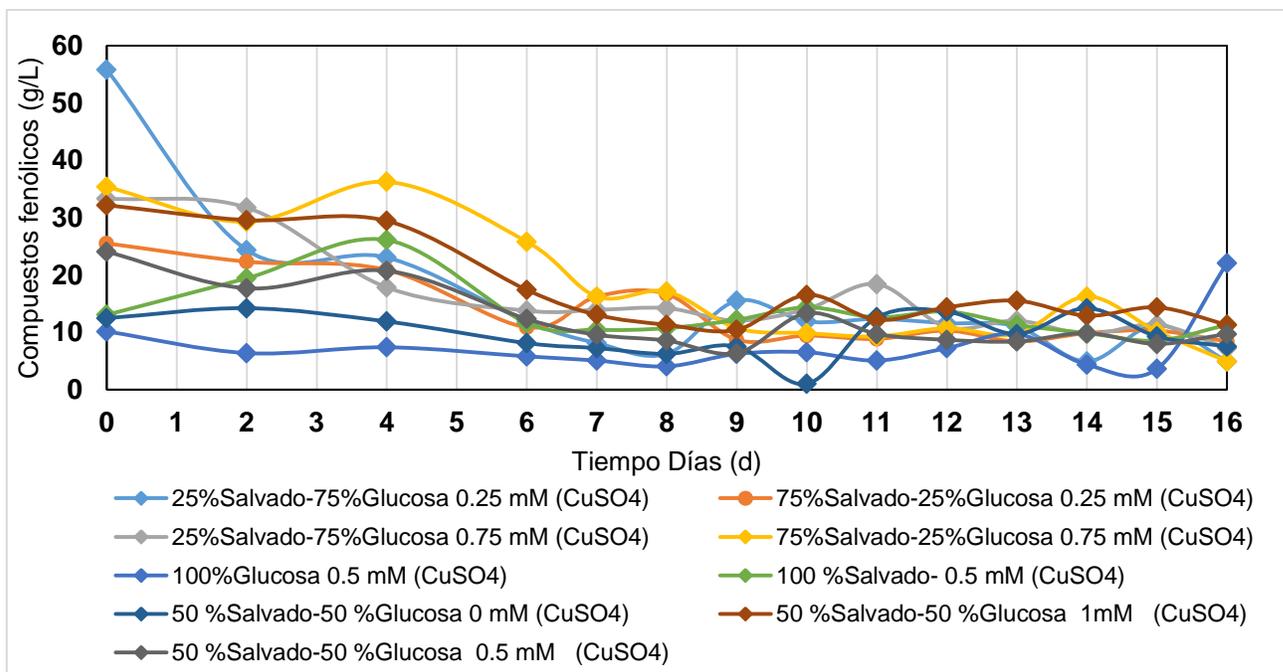
**Figura 33.** Cinética de Proteína extracelular en cultivo sumergido a 30°C modificando la concentración del cosustrato y de cofactor, usando salvado de trigo.

En la Figura 34, se presenta el comportamiento del consumo de los azúcares en el medio, donde se puede apreciar que, de forma similar al comportamiento con la cáscara de naranja, la cantidad de azúcares va disminuyendo con el tiempo. Recordando que este fue el residuo que presentó menor concentración inicial de azúcar, se ve que algunas combinaciones como 50% salvado de trigo/50% glucosa o 100% salvado de trigo, a partir del día 6 ya no tienen azúcares.



**Figura 34.** Cinética de azúcares reductores en cultivo sumergido a 30°C modificando la concentración del cosustrato y de cofactor, usando salvado de trigo.

Para ver el comportamiento de los compuestos fenólicos, en la Figura 35, se puede observar que los compuestos fenólicos inician disminuyendo, luego aumentan ligeramente y vuelven a disminuir hasta quedar alrededor de 16 mg/L. Este comportamiento cualitativamente es igual que para los otros dos cosustratos, lo que indica que el aumento en los compuestos fenólicos se puede deber a la hidrólisis de la lignina, por acción del complejo enzimático. Sin embargo, este aumento depende del contenido de lignina y de compuestos fenólicos que trae el cosustrato. Recordemos que este residuo fue el que tenía menor concentración tanto de azúcares como de compuestos fenólicos, y sin embargo es el más reportado para inducir la producción de lacasas. Esto significa, que al menos para las lacasas, la concentración de compuestos fenólicos no debe ser muy alta.



**Figura 35.** Cinética de compuestos fenólicos en cultivo sumergido a 30°C modificando la concentración del cosustrato y de cofactor, usando salvado de trigo.

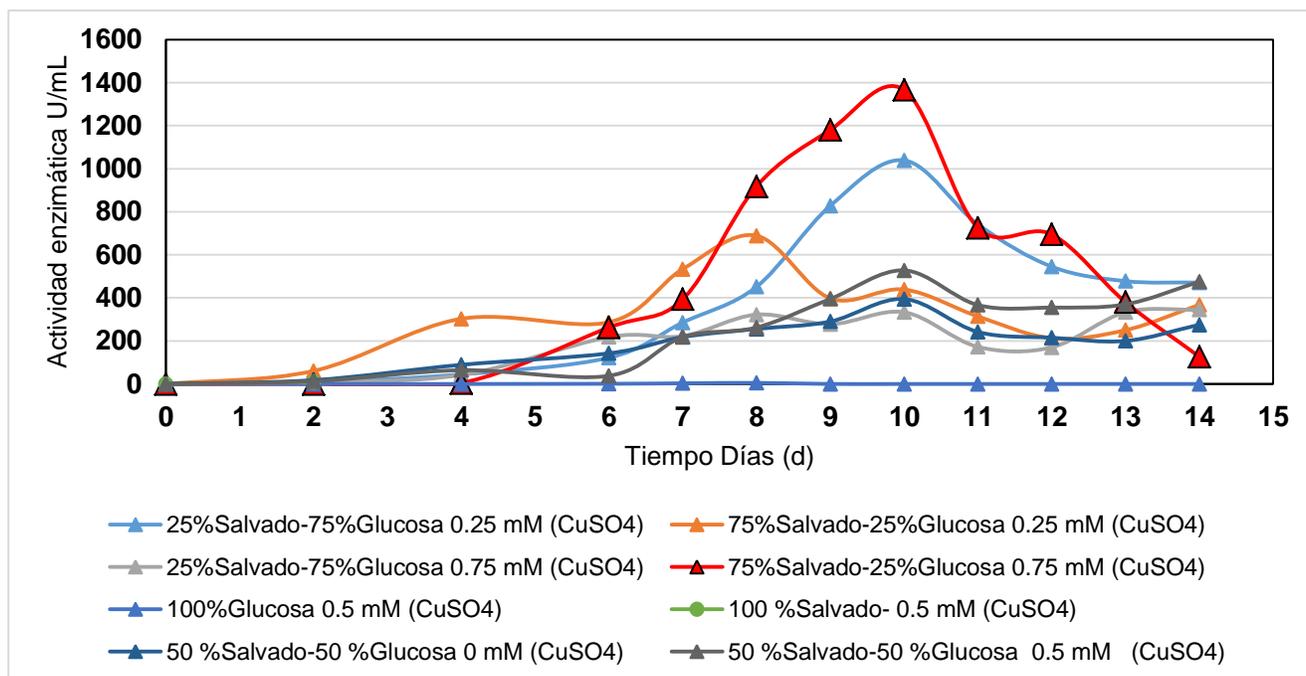
En la Tabla 26, observamos que el ANOVA para actividad de lacasas usando como cosustrato salvado de trigo, no es significativo para la concentración de cosustrato, pero si es significativo para concentración de cofactor (sulfato de cobre) y para la interacción entre las concentraciones de cosustrato y de cofactor. También es significativo el efecto cuadrático de la concentración de cosustrato. Este comportamiento, donde no es significativo para el efecto lineal de la concentración de cosustrato, puede deberse a que el salvado de trigo es el mejor cosustrato para inducir la actividad enzimática de lacasas, independientemente de la concentración, como podrá observarse también en la Figura 36.

**Tabla 26.** ANOVA sobre la respuesta de la actividad enzimática de lacasas utilizando salvado de trigo como cosustrato.

Tabla de Análisis de Varianza Suma parcial de cuadrados						
Fuente	Suma de cuadrados	df	Media de cuadrados	F Valor	p-valor Prob > F	
Modelo	2.72E+06	5	5.44E+05	8.2	0.0026	<b>significativo</b>
A-Cosustrato	1.64E+05	1	1.64E+05	2.48	0.1467	
B-Cofactor	7.09E+05	1	7.09E+05	10.69	0.0084	
AB	7.55E+05	1	7.55E+05	11.39	0.0071	
A <sup>2</sup>	9.80E+05	1	9.80E+05	14.8	0.0032	
B <sup>2</sup>	311.3	1	311.3	4.70E-03	0.9467	
Residual	6.63E+05	10	66246.82			
Falta de ajuste	6.39E+05	3	2.13E+05	64.39	< 0.0001	<b>significativo</b>

Error	23167.25	7	3309.61			
Total	3.38E+06	15				

En la Figura 36, se puede observar el comportamiento de la actividad enzimática de lacasas, durante la optimización con salvado de trigo. Encontramos que la mejor combinación para la obtención de lacasa fue de 50% de salvado de trigo/50% de glucosa, con 1 mM CuSO<sub>4</sub>, alcanzando una actividad de 1,819 U/mL al día 9.



**Figura 36.** Cinética de la actividad enzimática de Lacasa en cultivo sumergido a 30°C modificando la concentración del cosustrato y de cofactor.

Esta actividad enzimática de lacasa, es más del triple de las actividades alcanzadas con la cáscara de naranja y plátano, y además lo hace en menor tiempo. Si recordamos, la caracterización de los cosustratos, el salvado de trigo tiene menos azúcares (totales y reductores), menos compuestos fenólicos y menos DQO, que los otros dos cosustratos estudiados durante la optimización, y sin embargo es donde obtenemos una mayor actividad enzimática de lacasas. Esto se debe, a que aporta mucho menos azúcares, por lo que se acorta la fase lag de la cinética, tiene menos compuestos fenólicos que evitan inhibir el crecimiento del hongo y la actividad enzimática por producto (por la hidrólisis de la lignina) y es más fácilmente oxidable que los otros cosustratos. También se observa que para casi todas las combinaciones la actividad es bastante alta, y que no hay actividad cuando no se usa el salvado de trigo como inductor, esto es en

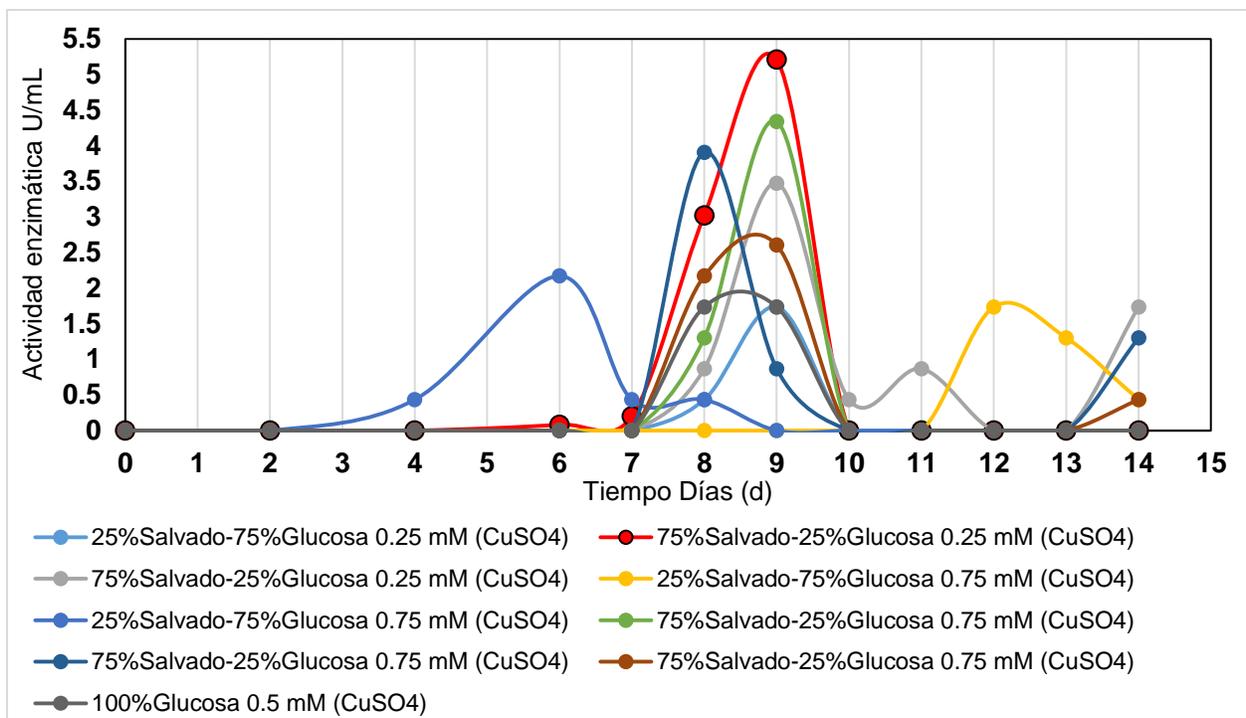
un punto axial con cero de concentración de cosustrato, a pesar de tener 0.5 mM de cofactor (CuSO<sub>4</sub>), esto deja en evidencia que la concentración de cosustrato y la interacción entre las concentraciones de cosustrato y cofactor son muy importantes, como muestra el ANOVA del diseño de experimentos.

Para el análisis estadístico para la MnP, podemos ver en la Tabla 27, que el ANOVA muestra que ningún factor es estadísticamente significativo, cuando se usa salvado de trigo para producir MnP.

**Tabla 27.** ANOVA sobre la respuesta de la actividad enzimática de MnP utilizando salvado de trigo como cosustrato.

Tabla de Análisis de Varianza Suma parcial de cuadrados						
Fuente	Suma de cuadrados	df	Media de cuadrados	F	p-valor	
				Valor	Prob > F	
Modelo	12.59	5	2.52	1.15	0.397	<b>no significativo</b>
A-Cosustrato	6.74	1	6.74	3.08	0.11	
B-Cofactor	4.46	1	4.46	2.03	0.1842	
AB	1.1	1	1.1	0.5	0.494	
A <sup>2</sup>	0.28	1	0.28	0.13	0.7287	
B <sup>2</sup>	0.031	1	0.031	0.014	0.9077	
Residual	21.92	10	2.19			
Falta de ajuste	21.79	3	7.26	376.11	< 0.0001	<b>significativo</b>
Error	0.14	7	0.019			
Total	34.51	15				

En la Figura 37, podemos observar la cinética de producción de MnP, donde observamos que la producción de MnP se da entre los días 6 y 13 de la fermentación. También, podemos observar que al día 9 se presentó su máxima actividad enzimática con la combinación de 75% de salvado de trigo/25% de glucosa, con 0.25mM de CuSO<sub>4</sub>, alcanzando 5.21 U/mL de actividad enzimática de MnP. Este valor es muy cercano a los máximos encontrados para esta enzima con los otros dos sustratos. Sin embargo, en el diseño exploratorio se encontró una mejor condición que logró alcanzar 19 U/mL. Esto, significa que el tipo de cosustrato no le afecta significativamente y si queremos optimizar los valores de las actividades enzimáticas, deberíamos usar otros cofactores.



**Figura 37.** Cinética de la actividad enzimática d MnP en cultivo sumergido a 30°C modificando la concentración del cosustrato y de cofactor, usando salvado de trigo.

Finalmente, en la Tabla 28, tenemos el ANOVA para la producción de LiP con salvado de trigo, la cual muestra que solo el término de la interacción entre los factores, concentración de cosustratos y de cofactores, es estadísticamente significativo.

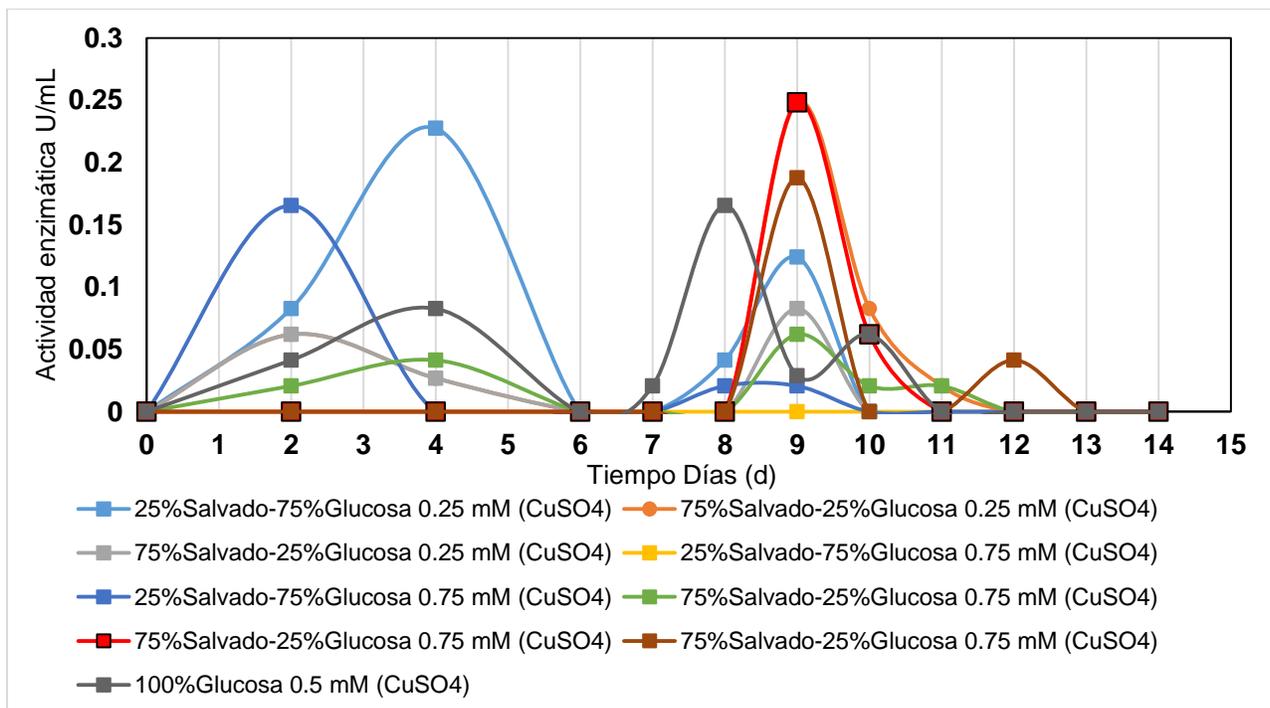
En la Figura 38, tenemos la cinética de producción enzimática para LiP, en ella podemos observar que tenemos dos distribuciones de la producción de esta enzima, recordemos que esta enzima no se produce en todas las combinaciones, excepto para la cáscara de naranja. La primera distribución de actividad enzimática se da en tiempos cortos entre el día 2 y 5 de la fermentación, logrado un máximo de actividad enzimática de LiP de 0.227 U/mL, en el día 4, con la combinación de 25% de salvado de trigo/75% glucosa, con 0.25 mM de CuSO<sub>4</sub>.

El hecho de que las enzimas MnP y LiP requieran poca cantidad de cofactor para producirse, corresponde con lo reportado Cervantes y Gutiérrez en 1994, donde señalaron que el cobre, presentado como CuSO<sub>4</sub>, es un inductor de la actividad enzimática de peroxidasas a bajas concentraciones(88).

**Tabla 28.** ANOVA sobre la respuesta de la actividad enzimática de LiP utilizando salvado de trigo como cosustrato.

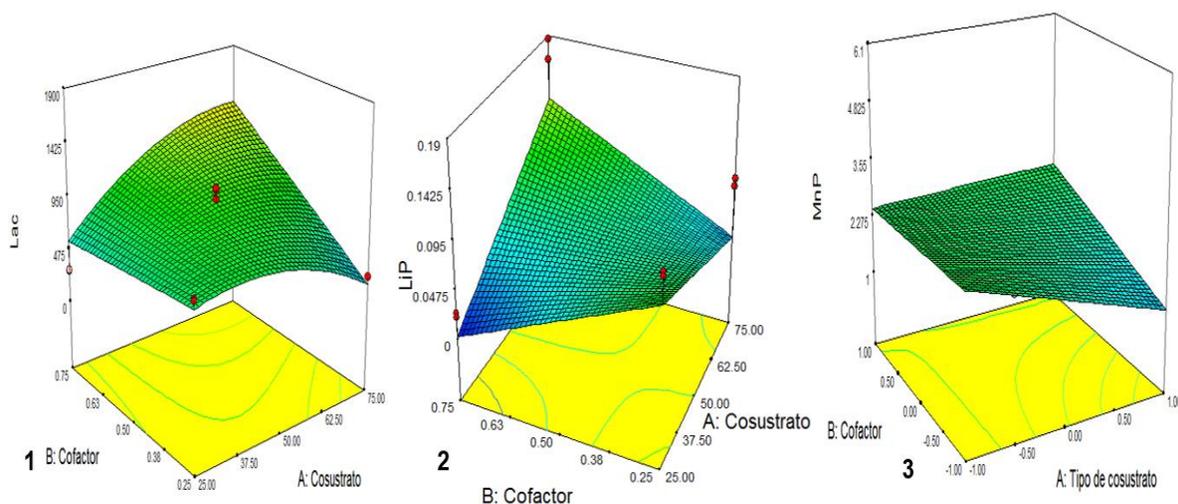
Tabla de Análisis de Varianza Suma parcial de cuadrados						
	Suma de cuadrados	df	Media de cuadrados	F	p-valor	
Fuente				Valor	Prob > F	
Modelo	0.028	5	5.54E-03	1.99	0.1654	<b>no significativo</b>
A-Cosustrato	3.51E-03	1	3.51E-03	1.26	0.2875	
B-Cofactor	2.76E-05	1	2.76E-05	9.91E-03	0.9227	
AB	0.018	1	0.018	6.39	0.03	
A <sup>2</sup>	1.12E-03	1	1.12E-03	0.4	0.5397	
B <sup>2</sup>	6.35E-03	1	6.35E-03	2.28	0.1618	
Residual	0.028	10	2.78E-03			
Falta de ajuste	0.028	3	9.18E-03	239.35	< 0.0001	<b>significativo</b>
Error	2.69E-04	7	3.84E-05			
Total	0.056	15				

La segunda distribución de las actividades enzimáticas para la LiP, fue entre los días 7 y 12 de la cinética, alcanzando otros dos máximos de actividad enzimática de LiP de 0.248 U/mL, a los 9 días con las combinaciones de 75% salvado de trigo/25% glucosa, uno con 0.25 mM y el otro con 0.75 mM de sulfato de cobre, lo que indica que no hay diferencia si hay 0.25 o 0.75 mM de sulfato, en realidad afecta más la concentración de cosustrato, obteniendo casi la misma actividad pero con 5 días de diferencia.



**Figura 38.** Cinética de la actividad enzimática de LiP en cultivo sumergido a 30°C modificando la concentración del cosustrato y de cofactor, usando salvado de trigo.

En la Figura 39, tenemos las superficies de respuesta de los diseños de experimentos realizados para salvado de trigo, usando como respuesta las actividades enzimáticas de lacasas, MnP y LiP, donde podemos observar cualitativamente el comportamiento de la actividad enzimática en función de las concentraciones de cosustrato y cofactor.



**Figura 39.** Superficies de respuesta de la actividad enzimática de Lac 1), LiP 2) y MnP 3), utilizando salvado de trigo, como cosustrato y sulfato de cobre como cofactor.

### 9.5 Tratamiento enzimático de aguas azules sintéticas

Los tratamientos enzimáticos se realizaron con tres extractos distintos, cada uno rico en alguna de las enzimas, por ejemplo, se usó un extracto rico en lacasas, otro rico en MnP y finalmente uno rico en LiP.

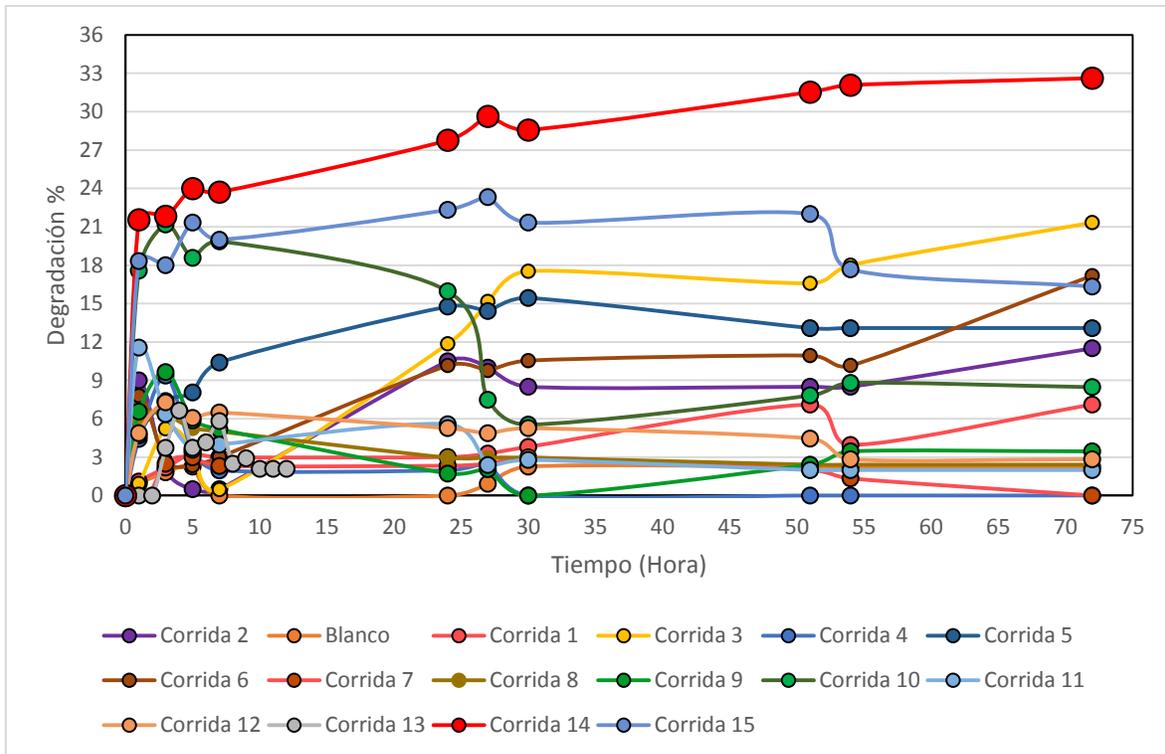
Estos tratamientos enzimáticos se llevaron a cabo con diseños centrales compuestos  $2^3$ , usando el pH, la T y concentración de extracto, como factores y el % de degradación como respuesta. La concentración de aguas azules se fijó para todos los casos en 20 mg/L.

El ANOVA para el extracto optimizado para lacasas se muestra en la Tabla 29, donde se observa que solo los efectos cuadráticos de la Temperatura y la concentración de extracto fueron significativo para la degradación, la cual se midió por decoloración con UV-vis, alcanzando un máximo de decoloración del 32%, a las 51 horas, con un 92% de extracto en la muestra, ver Figura 40.

**Tabla 29.** ANOVA de la superficie de respuesta de degradación de aguas azules utilizando un extracto rico en Lacasas en la hora 51.

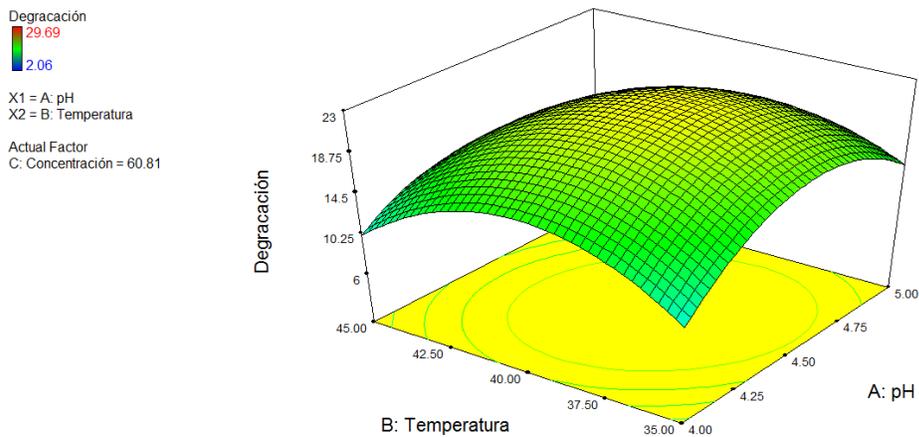
<b>Tabla de Análisis de Varianza Suma parcial de cuadrados</b>						
	Suma de cuadrados		Media de cuadrados	F	p-valor	
Fuente		df		Valor	Prob > F	
Modelo	1225.25	9	136.14	3.72	0.0262	<b>significativo</b>
A-pH	0.17	1	0.17	4.61E-03	0.9472	
B-Temperatura	8.5	1	8.5	0.23	0.6401	
C-Concentración enzima	148.09	1	148.09	4.05	0.0719	
AB	23.77	1	23.77	0.65	0.4388	
AC	0.21	1	0.21	5.69E-03	0.9414	
BC	69.68	1	69.68	1.91	0.1975	
A <sup>2</sup>	495.23	1	495.23	13.54	0.0042	
B <sup>2</sup>	566.63	1	566.63	15.5	0.0028	
C <sup>2</sup>	50.04	1	50.04	1.37	0.2692	
Residual	365.66	10	36.57			
Falta de ajuste	352.05	5	70.41	25.88	0.0014	<b>significativo</b>
Error	13.6	5	2.72			
Total	1590.91	19				

La decoloración de aguas azules se realizó con los extractos crudos que eran ricos en lacasas, con una actividad de 1,500 U/mL. En la Figura 40, se observa un máximo de decoloración en la corrida 14 con las condiciones de pH 4.5, Temperatura de 40 y con una concentración de 92% de extracto enzimático, el porcentaje de decoloración alcanzada fue de 32% en 51 h. Las demás corridas de extractos enzimáticos mostraron porcentajes de decoloración entre 5% y 21%. Las condiciones de pH y T, coinciden con sus condiciones óptimas de las lacasas.



**Figura 40.** Cinética de decoloración de aguas azules por los extractos crudos ricos en lacasas.

En la Figura 41, se observa la superficie de respuesta de la decoloración de las aguas azules, en función de la temperatura y el pH, donde en las condiciones centrales se da el % máximo de decoloración.



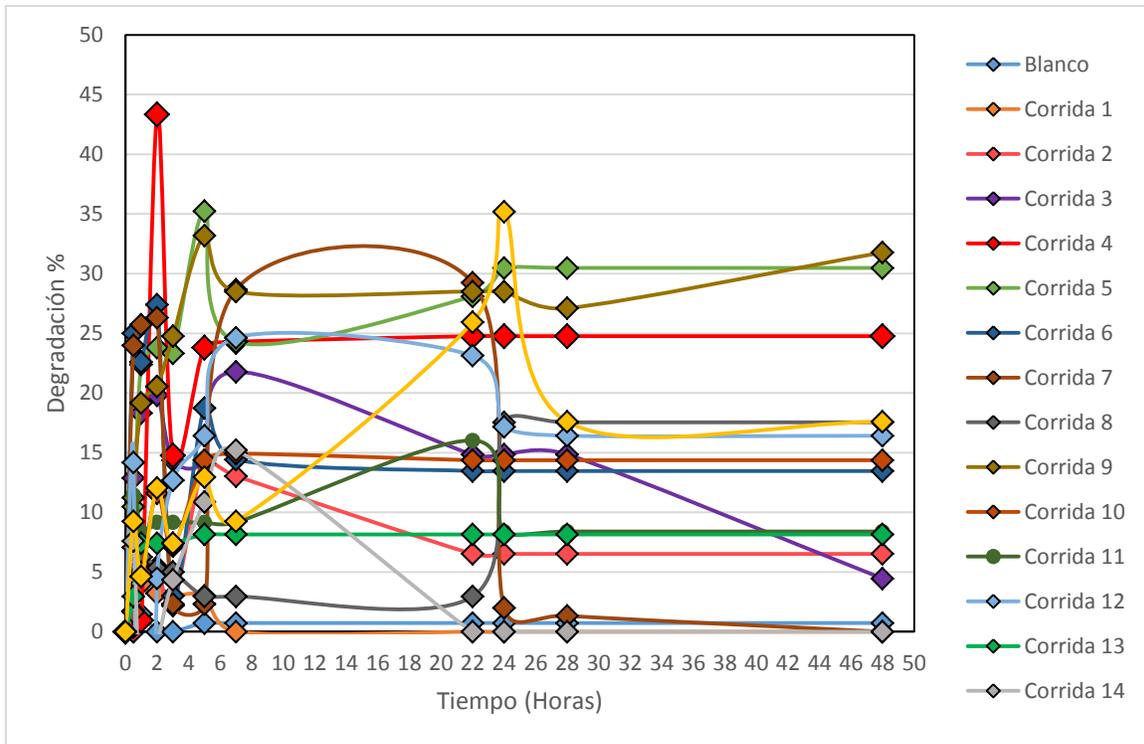
**Figura 41.** Superficie de respuesta de degradación de aguas azules utilizando un extracto rico en Lacasa en la hora 51.

En la Tabla 30, tenemos el ANOVA, para el diseño aplicado para la decoloración de las aguas azules, con el extracto rico en LiP. Aquí podemos observar que solo el efecto de la interacción entre la temperatura y la concentración de la enzima LiP es significativo.

**Tabla 30.** ANOVA de la superficie de respuesta de la degradación de aguas azules utilizando un extracto rico en LiP en la hora 2.

Tabla de Análisis de Varianza Suma parcial de cuadrados						
Fuente	Suma de cuadrados	df	Media de cuadrados	F	p-valor	
				Valor	Prob > F	
Modelo	1164.258	9	129.362	1.756	0.1964	<b>no significativo</b>
A-pH	7.630	1	7.630	0.104	0.7542	
B-Temperatura	35.062	1	35.062	0.476	0.5059	
C-Concentración enzima	18.518	1	18.518	0.251	0.6269	
AB	0.316	1	0.316	0.004	0.9491	
AC	290.526	1	290.526	3.945	0.0751	
BC	598.407	1	598.407	8.125	0.0172	
A <sup>2</sup>	200.347	1	200.347	2.720	0.1301	
B <sup>2</sup>	2.677	1	2.677	0.036	0.8526	
C <sup>2</sup>	0.771	1	0.771	0.010	0.9205	
Residual	736.516	10	73.652			
Falta de ajuste	735.780	5	147.156	998.954	< 0.0001	<b>significativo</b>
Error	0.73655	5	0.14731			
Total	1900.774	19				

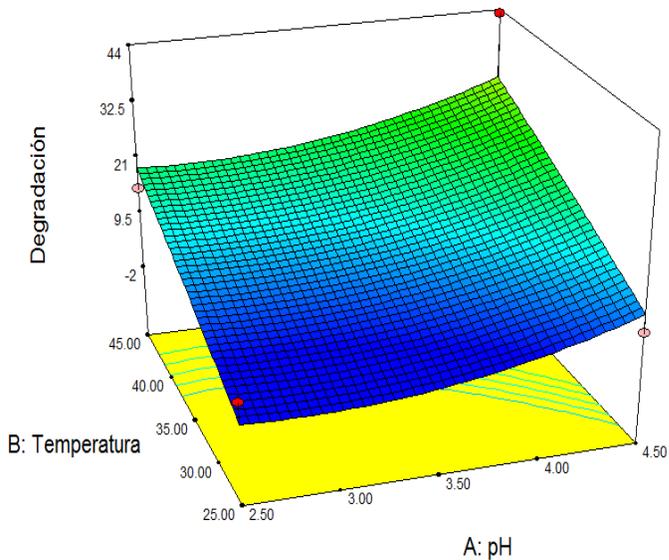
La decoloración de aguas azules se realizó con los extractos crudos que era rico en LiP con 0.295 U/mL. En la Figura 42, se observa un máximo de decoloración en la corrida 4 con las condiciones de pH 5, Temperatura de 45 y con una concentración de 25% de extracto enzimático, el porcentaje de decoloración alcanzado fue de 43% en 2 h. Las demás corridas de extractos enzimáticos mostraron porcentajes de decoloración entre 2.3 % y 35%. Estos valores son comparables con lo reportado en el 2007 por Ferreira y colaboradores(17), donde lograron una degradación de azul de metileno del 90%, a los 60 minutos utilizando un temperatura de 30 grados, aunque se reporta un mayor porcentaje de decoloración la enzima LiP se encontraba en estado puro, lo que promueve la decoloración (89).



**Figura 42.** Cinética de decoloración de aguas azules por los extractos crudos ricos en LiP.

En la Figura 43, tenemos la superficie de respuesta de la decoloración de las aguas azules, en función de la temperatura y el pH, donde se observa que, a T de 45 °C y pH de 4.5, tiende el máximo de decoloración.

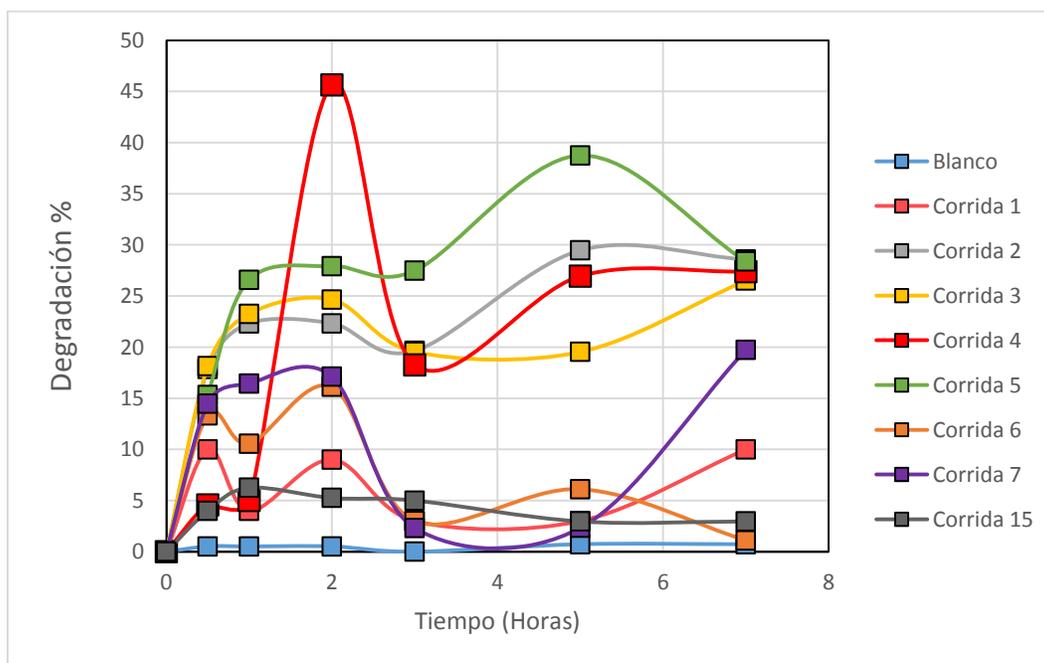
Degradación  
 43.33  
 3.22  
 X1 = A: pH  
 X2 = B: Temperatura  
 Actual Factor  
 C: Concentración enzima = 25.00



**Figura 43.** Superficie de respuesta de la degradación de aguas azules utilizando un extracto rico en LiP en la hora 2.

La decoloración de aguas azules también se realizó con los extractos crudos que era rico en MnP con 5.34 U/mL. En la Figura 44, se observa un máximo de decoloración en la corrida 4 con las condiciones de pH 5.5, Temperatura de 40 y con una concentración de 25 % de extracto enzimático, el porcentaje de decoloración alcanzado fue de 45% en 3 h. Las demás corridas de extractos enzimáticos mostraron porcentajes de decoloración entre 6 % y 46 %. Los resultados obtenidos mejoran los presentados por Xudong y colaboradores en el 2009, donde se obtuvo un porcentaje de degradación del 30% utilizando un extracto semi-purificado trabajando a un temperatura de 30 y un pH de 4.5 como condición optima(81), para azul de metileno.

Para el caso de MnP, no fue posible terminar las corridas de degradación, por lo que no se cuenta con el ANOVA. Sin embargo, con las corridas realizadas, tenemos la mejor condición de decoloración para las aguas azules sintéticas.



**Figura 44.** Cinéticas de decoloración de aguas azules por los extractos crudos ricos en MnP.

En la Tabla 31, se muestra un resumen de los mejores resultados obtenidos para decoloración de aguas azules, con cada uno de los extractos enzimáticos probados. En esta tabla podemos observar, que a pesar de que la lacasa es una de las enzimas que mejor se producen, no tienen la capacidad de oxidar la compleja mezcla de las aguas azules. Sin embargo, el extracto enzimático rico en la enzima MnP, es el mejor para lograr una decoloración del 45%, que si bien no se alcanzó el 50%, es un porcentaje muy alto de decoloración, considerando la

complejidad de la mezcla de compuestos que conforman a las agua azules. Los mejores extractos para decolorar las aguas azules son los ricos en LiP y MnP, ya que lo hacen en mayor porcentaje y en menor tiempo. Sin embargo, como podemos observar, en el caso de los extractos ricos en peroxidadas, también hay lacasas, las cuales no compiten entre ellas por el peróxido, pero si pudieran tener un efecto sinérgico durante la decoloración.

**Tabla 31.** Tabla con las mejores condiciones para la decoloración de aguas azules.

Extracto Rico en:	Condiciones por Litro	Corrida	Enzima	Actividad Enzimática U/mL	Extracto %	Degradación %	Tiempo h
LACASA	4 g de salvado, 1 g de glucosa 1 mM CuSO <sub>4</sub>	pH 4.5, 40 °C	Lacasa	1,500	92 %	32%	51 h
			MnP	0.9			
			LiP	0.078			
MnP	4.47 g de salvado, 0.530 g de glucosa 0.31 mM CuSO <sub>4</sub>	pH 4.5, 40 °C	Lacasa	215	25%	45%	3 h
			Mnp	5.34			
			LiP	0.156			
LiP	3.60 g de salvado de trigo, 1.4 g de glucosa 0.32 mM CuSO <sub>4</sub>	pH 5, 45 °C	Lacasa	234	25%	43%	2 h
			MnP	1.2			
			LiP	0.295			

La mejor forma de evaluar el efecto de una única enzima sería separándolas del extracto y purificándolas para trabajarlas por separado, y determinar si hay un efecto sinérgico entre peroxidadas y oxidasas, o no lo hay.

## 10. CONCLUSIONES

- Casi todos los residuos analizados presentan mayor cantidad de azúcares totales, reductores, compuestos fenólicos y DQO después de esterilizar el medio, debido a la hidrólisis que sufren durante la esterilización. Solo para la tusa de maíz y el bagazo de agave, los compuestos fenólicos permanecieron prácticamente sin cambio durante la esterilización, posiblemente por el alto contenido de lignina, que también explica porque tienen un DQO tan alto.
- La cáscara de plátano es la que presenta mayor cantidad de azúcares totales y reductores, después de la esterilización con 6.1 g/L y 2.3 g/L, respectivamente. Mientras que el salvado de trigo es el cosustrato que presenta menor concentración de azúcares con 2.2 g/L y 0.04 g/L, respectivamente.
- El cosustrato con mayor contenido de compuestos fenólicos después de la esterilización es la cáscara de naranja con 89 mg/L, seguida de la cáscara de plátano con 25.31 mg/L y el cosustrato con menor concentración es el salvado de trigo con 3.61 mg/L. Esto se debe a que los cítricos son una fuente natural de antioxidantes, debido a su contenido alto de polifenoles, flavonoides y terpenos, y que estos están principalmente en la cáscara.
- El residuo con mayor DQO es la tusa de maíz, esto puede deberse a su alto contenido de lignina, además de que después de la esterilización se mantuvo prácticamente constante, lo cual es de esperarse porque es un compuesto altamente recalcitrante y de difícil hidrólisis térmica.
- Los ANOVAS de 1 factor realizados para saber si hay diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de azúcares totales, azúcares reductores, compuestos fenólicos y DQO, de los cosustratos analizados, dieron para todos los casos, que, si hay diferencias significativas entre las concentraciones de los parámetros estudiados, por lo que deberían inducir de forma diferente la producción enzimática.
- Se logró inducir la producción de las enzimas lacasas, MnP y LiP, presentes en los extractos extracelulares del *Trametes versicolor* nativo.
- El diseño central compuesto  $2^3$  exploratorio, indicó que la mejor condición para la producción de lacasas fue usando salvado de trigo como cosustrato y sulfato de cobre como cofactor a una concentración de 1 mM, obteniendo una actividad enzimática de lacasas de 1,337.7 U/mL. En este mismo estudio la mejor condición para MnP fue usando cáscara de naranja como cosustrato, con sulfato de cobre como cofactor, a una concentración de 0.5 mM, alcanzando una actividad enzimática de MnP de 19.32 U/mL. Finalmente, para la LiP la mejor condición fue usando cáscara de plátano

como cosustrato, con sulfato de magnesio como cofactor a una concentración de 0.75 mM, alcanzando una actividad enzimática de LiP de 0.341U/mL. Para las tres enzimas, las actividades alcanzadas superan a otros microorganismos y a trabajos previos.

- Para la combinación de cáscara de naranja, con Sulfato de cobre como cofactor, a una concentración de 0.5 mM, se obtuvieron las tres enzimas con 840 U/mL para lacasa, 0.279 U/mL de LiP y 6.07 U/mL de MnP, al día 9.
- De la optimización para la cáscara de naranja alcanzaron máximos de actividad enzimática para lacasas de 600 U/mL, usando 75% Cáscara de naranja/25% glucosa y 0.25 mM de sulfato de cobre, en el día 11. Para MnP fue de 5.48 U/mL, con 50% cáscara de naranja/50% glucosa y 0.5 mM de  $\text{CuSO}_4$ , en el día 12. Finalmente, para LiP con 0.206 U/mL, usando 100% cáscara de naranja y con 0.5 mM de  $\text{CuSO}_4$ , al día 8.
- De la optimización para la cáscara de plátano alcanzaron máximos de actividad enzimática para lacasas de 525 U/mL, con 50% Cáscara de plátano/50% glucosa y 0 mM de sulfato de cobre, en el día 16, lo que fue menor que con cáscara de naranja. Para MnP fue de 6.94 U/mL, con 25% cáscara de plátano/75% glucosa y 0.25 mM de  $\text{CuSO}_4$ , en el día 9, lo que fue la mejor condición para MnP, pero menor que el diseño preliminar. Finalmente, para LiP de 0.145 U/mL, con 75% cáscara de plátano/25% glucosa y con 0.25 mM de  $\text{CuSO}_4$ , al día 4.
- De la optimización para el salvado de trigo alcanzaron máximos de actividad enzimática para lacasas de 1,819 U/mL, con 50% salvado de trigo/50% glucosa y 1 mM de sulfato de cobre, en el día 9, lo que fue la mejor condición de todas. Para MnP fue de 5.21 U/mL, con 75% salvado de trigo/25% glucosa y 0.25 mM de  $\text{CuSO}_4$ , en el día 9. Finalmente, para LiP de 0.227 U/mL, con 25% salvado de trigo/75% glucosa y con 0.25 mM de  $\text{CuSO}_4$ , al día 4, y otro máximo de 0.248 U/mL, con de 75% salvado de trigo/25% glucosa, y 0.25 mM de  $\text{CuSO}_4$  al día 9. Esta condición es la mejor obtenida durante las optimizaciones, aunque en el estudio preliminar el sulfato de magnesio fue mejor para LiP.
- La producción enzimática se logró con los tres cosustratos y con el cofactor propuesto, y se observa el efecto inductor tanto de los cosustratos, como del cofactor, el cual triplico el valor para las lacasas, que es una enzima que se encuentra en todas las combinaciones en mayor o menor medida. Mientras que las peroxidases, dependen del tipo de cosustrato para expresarse, por lo que prácticamente no se expresan en este *Trametes* sin inductor.

- La primera parte de la hipótesis se acepta, ya que la presencia del cosustrto y del cofactor aumentan más del 50% la actividad enzimática de las enzimas ligninolíticas.
- Las mejores condiciones para la decoloración de las aguas azules con el extracto rico en lacasas, son a T de 40 °C, pH de 4.5 y con 92% del extracto, logrando un 32% de decoloración. Para la LiP, fue a T de 45°C, un pH de 5 y 25% de extracto, logrando decolorar las aguas azules en un 43%. Finalmente, la mejor condición para la decoloración con MnP fue a pH de 4.5, T de 40°C, alcanzando un 45% de decoloración de las aguas azules, y siendo este último el que logró un mayor porcentaje.
- Los tres extractos enzimáticos lograron decolorar las aguas azules, siendo mejores los ricos en LiP y MnP, debido a que alcanzan un 43 y 45%, respectivamente y lo hacen en mucho menos tiempo (2 y 3 horas, respectivamente) en comparación con el extracto rico en lacasas. Sin embargo, la segunda parte de la hipótesis no se cumple, debido a que no se decoloró más del 50 % de las soluciones de las aguas azules.
- Los extractos enzimáticos extracelulares ligninolíticos son capaces de decolorar en un 45%, las soluciones sintéticas de aguas azules, en 3 horas.

## 11. REFERENCIAS

1. Sánchez C. Gestión Sostenible del Agua en el Desarrollo Urbano. Fodeco. 2010;1a ed.(31):1–29.
2. Fonseca T. El agua como medio de vida en el proceso de enseñanza aprendizaje en el área de ciencias naturales en los estudiantes de sexto año de educación general básica de la unidad educativa “edmundo chiriboga”, parroquia veloz, cantón riobamba, provincia de chimb. 2015;
3. Gleick PH. Amarga agua dulce: los conflictos por los recursos hídricos. Ecol Política. 1995;8:85–106.
4. Ramírez H, Jaramillo J. Agentes Naturales como Alternativa para el Tratamiento del Agua. Rev Fac Ciencias Básicas [Internet]. 2016;11(2):136.
5. Moreno-Andrade I, Moreno G, Kumar G, Buitrón G. Biodegradation of toilet wastewaters generated in aircrafts. J Chinese Chem Soc. 2014;61(7):814–8.
6. Xu J, Yang J, Zhao N, Sheng L, Zhao Y, Tang Z. Evaluation of efficiency of aircraft liquid waste treatment and identification of daily inspection indices: A case study in Changchun, China. Environ Monit Assess. 2013;185(7):6063–70.
7. Fernández JA, Henao LM, Pedroza-Rodríguez AM, Quevedo-Hidalgo B. Inmovilización de hongos ligninolíticos para la remoción del colorante negro reactivo 5. Rev Colomb Biotecnol. 2009;11(1):59–72.
8. Cardona M, Osorio J, Quintero J. Degradation of industrial dyes with white rot fungi. Degrad Color Ind con hongos ligninolíticos [Internet]. 2009;(48):27–37.
9. Alejandro A, Montero F. Identificación de la enzima responsable de la degradación de pentaclorofenol (PCF) en *Amylomyces rouxii* y optimización del mecanismo de degradación mediante la expresión heteróloga de peroxidasas. 2011;185.
10. Ferrando-Climent L, Cruz-Morató C, Marco-Urrea E, Vicent T, Sarrà M, Rodríguez-Mozaz S, et al. Non conventional biological treatment based on *Trametes versicolor* for the elimination of recalcitrant anticancer drugs in hospital wastewater.
11. Machado KMG, Matheus DR. Biodegradation of Remazol brilliant blue R by ligninolytic enzymatic complex produced by *Pleurotus ostreatus*. Brazilian J Microbiol. 2006;37(4):468–73.
12. Singh RL, Singh PK, Singh RP. Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes - A review.

13. Rios Del Toro EE, Celis Garcia M de LB, Rangel Méndez JR. Modificación Química de Fibras de Carbón Activado y su Aplicación en procesos de Óxido-Reducción.
14. Greensite FS, Mar D, Examiner P, Kamm WE. United States Patent [ 19 ] Nigeria-dam. 1978. p. 1–6.
15. Salcedo-Martínez SM. Caracterización de la actividad decolorante de cepas de basidiomicetos nativas sobre colorantes sintéticos. Fac Ciencias Biológicas, Univ Autónoma Nuevo León. 2009;
16. Romero-Suárez D. Caracterización inicial de lacasas y peroxidases producidas por biopelículas de hongos decoloradores de tintes azoicos. 2015;84.
17. Ferreira-Leitão VS, de Carvalho MEA, Bon EPS. Lignin peroxidase efficiency for methylene blue decolouration: Comparison to reported methods. *Dye Pigment*. 2006;74(1):230–6.
18. Chairin T, Nitheranont T, Watanabe A, Asada Y, Khanongnuch C, Lumyong S. Biodegradation of bisphenol A and decolorization of synthetic dyes by laccase from white-rot fungus, *trametes polyzona*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2013;169(2):539–45.
19. Linhartová L, Michalíková K, Šrédlová K, Cajthaml T. Biodegradability of dental care antimicrobial agents chlorhexidine and octenidine by ligninolytic fungi. *Molecules*. 2020;25(2):1–15.
20. Claus H, Faber G, König H. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002;59(6):672–8.
21. Koyani RD, Sanghvi G V., Sharma RK, Rajput KS. Contribution of lignin degrading enzymes in decolourisation and degradation of reactive textile dyes.
22. Vargas, A., Romero C. Evaluación del efecto de la aplicación de un residuo vegetal de crisantemo degradado por. 2009;1–42.
23. Preussler CA, Shimizu E, Villalba LL, Zapata PD. Inducción con cobre de la enzima lacasa en el hongo de pudrición blanca *Trametes villosa* ( sw .: Fr.) Kreisel. *Rev Cienc y Tecnol*. 2009;12(12a):9–16.
24. Riaño M, Gutiérrez I, Muñoz J, Rivera C. Bioethanol Production from agroindustrial lignocellulosic byproducts. *Tumbaga*. 2010;15:61–91.
25. Sánchez J. Lignocellulolytic enzymes of *Pleurotus* spp. 2017. 16 p.
26. Brizuela MA, García L, Pérez L, Mansur M. Basidiomycetes: A new source of secondary metabolites.
27. Diego LDE. Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre *kluuveromyces marxianus*. 2014.

28. Moreno CM, González A, José M, Santos B. Biological treatments of contaminated soils : hidrocarbons contamination . Fungal applications. 2004;103–20.
29. Carabajal ML. Degradación de compuestos fenólicos por el hongo causante de pudrición blanca *Trametes versicolor*. 2014;106.
30. Mendoza-zamora C, Rosas-romer M. *Trametes versicolor* pilatcausante de la pudricion blanca del manzano. 1999;49–58.
31. Rojas-franco P, Cano-europa E, Ortiz-butron R, Valenzuela-garza R, Blas-valdivia V, Franco-colin M. Efecto hepatoprotector del micelio de *Trametes versicolor* en un modelo de ratón de la cepa NIH. 2015
32. Leandro V. Enzimas Ligninolíticas en *Fomes sclerodermeus*. 2003;
33. Domine C-S&. Lignin, structure and applications: depolymerization methods for obtaining aromatic derivatives of industrial interest. 2013;4(4):92.
34. Rojas Verde MG. Producción de enzimas lignolíticas por hongos de pudrición blanca aislados en Nuevo León. 2010
35. Montilla J, Londoño M, Monsalve D, Correa G. Pesticides Degradation by White Rot Fungi: A Review. *Rev Fac Nac Agron - Medellín* 2014;67
36. Galhaup C, Wagner H, Hinterstoisser B, Haltrich D. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme Microb Technol*. 2002;30(4):529–36.
37. Mainardi PH, Feitosa VA, Brenelli de Paiva LB, Bonugli-Santos RC, Squina FM, Pessoa A, et al. Laccase production in bioreactor scale under saline condition by the marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp.
38. Luis O, Margarita A, Isabel M, Domínguez-guilarte OL, Ramos-leal M, Sánchez-reyes A, et al. Degradación biológica de contaminantes orgánicos persistentes por hongos de la podredumbre blanca. *Rev CENIC Ciencias Biológicas*. 2011;42(2):51–9.
39. Soto LMC. Producción de lacasa de *Pleurotus ostreatus* utilizando los residuos de *Agave tequilana* Weber como sustrato. 2011;
40. Reyna R, Reyna R, A. MR, Maravilla, Torres O. Producción de enzimas hidrolíticas por fermentación sólida en mesocarpo de coco con *Trametes polyzona*. 2016;1(2):176–81.
41. García A. Estudio de la degradación de residuos lignocelulósicos derivados del procesamiento industrial del cranberry (*vaccinium macrocarpon* ait.). 2006;
42. Cordoba bolaños y CC. Estudio comparativo de la actividad enzimática de lacasa (Lac), lignina peroxidasa (Lip) y manganeso peroxidasa (Mnp) de *Pleurotus ostreatus* cultivado en residuos lignocelulosicos de paquis de palma de aceite, bagazo de fique y pulpa de café. 2015.

43. Gustavo Dávila y Rafael Vázquez-Duhalt. Enzimas Ligninolíticas Fúngicas Para Fines Ambientales. Mensaje Bioquímico
44. Cegarra DD. Tratamiento fisico-químico En efluentes de una tenería provenientes de un tratamiento biológico. 2011;1–73.
45. Romero M. Tratamientos utilizados en potabilización de agua. 2005;1(08):1–12.
46. Proyectos O de. Informe de Evaluación CO-MICI002/2011 Caso Aeropuerto Internacional El Dorado (2477A/OC-CO). 2012;
47. McGinnis BD, Adams VD, Middlebrooks EJ. Evaluation of methylene blue and riboflavin for the photosensitized degradation of ethylene glycol. Environ Int. 1999;25(8):953–9.
48. Salud OM de la. Modulo 3 Vigilancia Sanitaria. 2014;
49. Unidas N. Manual-Guía De Protección Ambiental Para Aeropuertos. 1999; Available from: [https://www.kpesic.com/wp-content/uploads/2015/05/Anexo-1\\_12-MAN\\_Guia\\_Prot\\_Amb\\_Aero.pdf](https://www.kpesic.com/wp-content/uploads/2015/05/Anexo-1_12-MAN_Guia_Prot_Amb_Aero.pdf)
50. Norte GA del C. Reporte de Sustentabilidad 2016. 2016;104.
51. Carvalho IDC, Calijuri ML, Assemany PP, Silva MDFME, Moreira Neto RF, Santiago ADF, et al. Sustainable airport environments: A review of water conservation practices in airports.
52. Özlem Vurmaz M, Boyacioglu H. Airport Water Consumption Footprinting. Environ Ecol Res. 2018;6(6):519–24.
53. Bailey J. Manual de higiene y saneamiento de los transportes aereos. Organ Mund la Salud. 1978;
54. Zuleta-Correa A, Merino-Restrepo A, Hormaza-Anaguano A, Cardona Gallo SA. Use of white rot fungi in the degradation of an azo dye from the textile industry1. Dyna. 2016;83(198):128.
55. Alvarado L. Inmovilización de lacasas en esferas de SiO2 para la degradación de rojo congo. Uanl. 2015;
56. Melgoza-Alemán RM, Buitrón G. Biodegradación del Colorante Azo Azul Disperso 79 en un Reactor Discontinuo Secuencial Bajo Ambientes Anaerobios / Aerobios . 2005;
57. Lopez Kitzia Alimentarias C. Biodegradación De Compuestos Fenólicos Con Diferentes Aceptores De Electrones Por Consorcios Anaerobicos. 2006;
58. Torán J, Blánquez P, Caminal G. Comparison between several reactors with Trametes versicolor immobilized on lignocellulosic support for the continuous treatments of hospital wastewater.
59. Montoya S, Sanchez O, Levin L. Pudrición Blanca Evaluation of

Endoglucanase , Exoglucanase , Laccase , and Lignin Peroxidase Activities on Ten White-Rot Fungi Avaliação De Atividades. Biotecnol en el Sect Agropecu y Agroind

60. Bonugli-santos RC, Regina L, Durães L. Enzyme and Microbial Technology Production of laccase , manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. *Enzyme Microb Technol.* 2010;46:32–7.
61. Maria C. Optimización de un medio de cultivo para la producción de enzimas oxidoreductasas tipo lacasas de pleurotus ostreatus, para su posterior inmovilización enzimática en alginato de calcio. *fac ing y ciencias Agropecu.* 2016;
62. Yasmeen Q, Asgher M, Sheikh MA, Nawaz H. Optimization of ligninolytic enzymes production through response surface methodology. *BioResources.* 2013;8(1):944–68.
63. Moqueem E, Tahir IM. Development of liquid state fermentation process for the production of ligninolytic enzymes by *Coriolus versicolor* ibl-04 using lignin containing substrate. *Med Biol Sci.* 2018;(May).
64. Wen X, Jia Y, Li J. Degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude lignin peroxidase prepared from *Phanerochaete chrysosporium* - A white rot fungus. *Chemosphere [Internet].* 2009;75(8):1003–7.
65. Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem.* 1959;31(3):426–8.
66. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–54.
67. Sevilla L. Evaluación de la capacidad biotransformadora de taninos del Guarango (*Caesalpinia spinosa*) a través de *Trametes versicolor* y *Aspergillus niger*
68. Villa H, Carvalho G, Telis J. Determinación de las mejores condiciones de hidrólisis ácida de la cáscara del plátano. 2012;6.
69. James M, Velastegui E, Cruz M. Evaluación de las condiciones de cultivo de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* a nivel de laboratorio, con inulina como fuente de carbono. *Bionatura.* 2017;2(1):235–40.
70. Mejía Giraldo L, Martínez Correa H, Betancourt Gutiérrez J, Castrillón Castaño C. Aprovechamiento del residuo agroindustrial del mango común (*Mangifera indica* L.) en la obtención de azúcares fermentables. *Ing y Cienc.* 2007;(6):41–62.
71. Sawalha SMS, Arráez-Román D, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Quantification of main phenolic compounds in sweet and bitter orange peel using CE-MS/MS. *Food Chem*
72. Rebello LPG, Ramos AM, Pertusatti PB, Barcia MT, Castillo-Muñoz N,

- Hermosín-Gutiérrez I. Flour of banana (*Musa AAA*) peel as a source of antioxidant phenolic compounds.
73. Rico Campos A. Deslignificación enzimática de materiales lignocelulósicos de interés industrial. Universidad de Sevilla, Sevilla; 2014.
  74. Echavarría CA, Gallón AIM. Induction of laccase activity in *Ganoderma* sp and the antioxidant activity of its biomass. *Rev Cuba Farm.* 2010;44(4):519–32.
  75. Vrsanska M, Voberkova S, Langer V, Palovcikova D, Moullick A, Adam V, et al. Induction of laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase activities in white-rot fungi using copper complexes. *Molecules.* 2016;21(11).
  76. Villa F. Phenolic acids with antioxidant activity in maize bran and wheat bran. *Cielo.* 2016;3(7):43–50.
  77. Teresa A, Araque M, David G, Martínez M, Segundo S, Muñoz G, et al. Fibrolytic activity of enzymes produced by *Trametes* sp. EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 and *Aspergillus niger* AD96.4 in solid fermentation. *Interciencia.* 2007;32:780–5.
  78. Gómez-Dorado, C.; Martínez-Salgado, M.; Nieto-Mosquera, D.; Pedrosa-Rodríguez, A.; RodríguezVázquez, R.; Rosas-Acosta J. Estudio del efecto de dos inductores y un protector enzimático sobre la actividad de las enzimas mn-peroxidasa y laccasa producidas por *Trametes versicolor* y su efecto en la decoloración de efluentes de la industria papelera. *Univ Sci.* 2005;10(2):37–46.
  79. Pérez-Nájera VC, Lugo-Cervantes EC G-LM y D-T-SC. Extraction of phenolic compounds from lime peel (*Citrus limetta* risso) and antioxidant activity determination. *Biocencia.* 2013;18–22.
  80. Jasmina Čilerdžić, Mirjana Stajić,\* Jelena Vukojević, Sonja Duletić-Laušević and AK. Potential of *Trametes hirsuta* to produce ligninolytic enzymes during degradation of agricultural residues. *BioResources.* 2011;6(Croan 2000):2885–95.
  81. Muhammad H, Iqbal N, Asgher M. Decolorization applicability of sol – gel matrix immobilized manganese peroxidase produced from an indigenous white rot fungal strain *Ganoderma lucidum*. 2013;
  82. Perez J, Jeffries TW. Mineralization of 14C-Ring-Labeled Synthetic Lignin Correlates with the Production of Lignin Peroxidase, not of Manganese Peroxidase or Laccase. 1990;56(6):1806–12.
  83. Castañeda-Castillo JG, Hernández-Almanza AY, Sáenz-Galindo1 A, Ascacio-Valdés1 JA. Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de la cáscara de plátano maduro (*Musa Cavendish*) y evaluación de su actividad antioxidante. *Química Prod Nat.* 2011;(26):1–142.
  84. Ellen C. Giese RFHD and AMB. Orange bagasse as substrate for the production rhodina mamb-05 in submerged and solid state. *BioResources.*

2008;3(ABECitrus 2007):335–45.

85. Manjarrés K, Castro A, Sandoval ER. Production of laccase using *Pleurotus ostreatus* on plantain peel and sugar cane bagasse. *Cielo*. 2010;7(2):9–15.
86. Román R, Torres-duarte C, Ayala M, Vázquez-duhalt R. Production of laccase from *Coriolopsis gallica* at pilot plant scale. 2009;
87. Rodríguez S, Fernández M, Bermúdez RC, Morris H. Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus* spp. *Rev Iberoam Micol*. 2003;20(Journal Article):164–8.
88. Ximena MN y O. Evaluación de inductores metálicos y co-sustratos para la remoción de negro reactivo 5 empleando *Pleurotus ostreatus* inmovilizado en fique. 2008.