

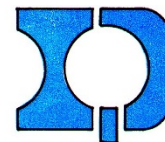


Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

REGIÓN XALAPA



**FACULTAD DE
INGENIERÍA QUÍMICA**

PROGRAMA EDUCATIVO:

MAESTRIA EN INGENIERÍA QUÍMICA

**“Estudio de la degradación de vinazas generadas en la industria
alcoholera por acción de lacasas “**

Tesis

PRESENTA

Juan Luis Hernández Ayala

DIRECTOR:

Dra. Alma Vázquez Luna

CODIRECTOR:

Dr. Rafael Rufino Díaz Sobac

Xalapa Eqz., Ver., febrero 2020

Resumen

La contaminación de agua y suelo por acción de vinazas que se generan como subproducto en la fabricación de etanol, a partir de caña de azúcar, es un problema en todo el mundo y se prevé que aumente en los próximos años. Las vinazas son un residuo de tonalidad café, pH bajo y una alta concentración de compuestos orgánicos e inorgánicos lo cual se refleja en valores altos de DBO>24 g/L y DQO>50g/L. Usualmente, las vinazas son usadas como fertilizante debido a la presencia de nutrientes, sin embargo, se ha observado que la constante aplicación tiene un efecto negativo en el crecimiento de las plantas sin reducir los requerimientos de fertilizante, esto se debe a los compuestos como melanoides, fenoles y polifenoles presentes en las vinazas. A la fecha un gran número de microorganismos han sido estudiados debido a sus sistemas lignolíticos enzimáticos extracelulares, dichos sistemas consisten esencialmente en lacasas y peroxidasas y son capaces de degradar compuestos complejos como melanoides y fenoles. Debido a las propiedades degradantes de las lacasas el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de las lacasas extraídas del compost agotado de champiñón sobre las vinazas para reducir su potencial contaminante. El estudio se dividió en dos fases, durante la primera fase se evaluó la recuperación de la enzima del medio de crecimiento del champiñón (compost) después de ser desechado al cumplir su vida útil, así como sus características, actividad óptima en función de pH y temperatura de reacción y estabilidad enzimática; mientras que en la segunda fase se evaluó la remoción de contaminantes variando las condiciones de operación en la concentración de las vinazas siendo 10, 30, 50 y 100% v/v. Los resultados mostraron que la mejor relación compost:agua para obtener una mayor cantidad de actividad enzimática fue 2:3, con una actividad promedio de 7 U/mL con un pH óptimo de trabajo de 3.6, y una temperatura óptima 34.24 °C. Además, conservo una actividad enzimática después de 125 h y cercano al pH óptimo de 30% de su actividad inicial. Con base a los resultados obtenidos de la estabilidad y el pH inicial de las vinazas (pH 4), se eligió el tratamiento con las enzimas liofilizadas. Las remociones de demanda química de oxígeno fueron 60, 67, 30 y 50% y de fenoles totales fueron 36, 50, 60 y 30% para las diferentes concentraciones respectivamente. Los resultados indicaron que las lacasas provenientes del

compost agotado de champiñón bajo las condiciones propuestas en este estudio favorecen la biodegradación de las vinazas.

Palabras clave: vinazas, compost agotado champiñón, lacasas, oxidación enzimática

Abstract

The contamination of water and soil by the action of vinasses that are generated as a byproduct in the manufacture of ethanol, from sugarcane, is a problem worldwide and it's expected to increase in the coming years. The vinasses are a residue of brown hue, low pH and a high concentration of organic and inorganic compounds which is reflected in high values of BOD>24g/L and COD>50g/L. Usually, the vinasses has been used as fertilizer due to the presence of nutrients, however, it has been observed that the constant application has a negative effect on the plant growth without reducing fertilizer requirements, this is due to compounds such as melanoids, phenols and polyphenols present in the vinasses. To the date, a large number of microorganisms have been studied for their extracellular enzymatic lignolytic systems, these systems consist essentially of laccases and peroxidases and both are capable of degrading complex compounds such as melanoids and phenols. Due to the degrading properties of the laccases, the objective of this study was to evaluate the effect of the laccases extracted from the spent mushroom compost on the vinasses to reduce their potential contaminant. The study was divided into two phases, during the first phase the recovery of the enzymes from the mushroom growth médium (compost) was evaluated after being discarded when it reached its useful life, as well as its characteristics, optimum activity in function of pH and temperature and enzymatic stability; while in the second phase the removal of contaminants was evaluated by varying the operating conditions in the concentration of the vinasses being 10, 30, 50 and 100% w/w. The best compost:water ratio to obtain a greater enzymatic activity in the medium is 2:3 with an average activity of 7 U / mL, with an optimum working pH of 3.6, and a optimum temperature of 34.24 °C. Also, the extract retained the enzymatic activity after 125 h near the optimum pH by keeping 30% of its initial activity. Based on the results obtained from the stability and the initial pH of the vinasses (pH 4), the treatment with lyophilized enzymes was chosen. The chemical oxygen demand removals were 60, 67, 30 and 50% and total phenols were 36, 50, 60 and 30% for the different concentrations respectively. The results indicate that the enzymes of the spent mushroom compost under the conditions of this study favors the biodegradation of the vinasse.

Key words: vinasses, spent mushroom compost, laccases, enzymatic oxidation

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 Antecedentes	10
1.1.1 Tratamientos físicos	10
1.1.2 Tratamientos químicos	11
1.1.3 Tratamientos fisicoquímicos	12
1.1.4 Tratamientos biológicos	12
1.2 Planteamiento del problema	16
1.3 Justificación	17
1.4 Hipótesis	18
1.5 Objetivos	19
1.5.1 Objetivo general	19
1.5.2 Objetivos específicos	19
2. MARCO TEÓRICO	20
2.1 Importancia de la caña de azúcar en México	20
2.2 Producción de etanol	20
2.3 Características de las vinazas	22
2.4 Hongos productores de lacasas	23
2.5 Cultivo de champiñón	25
2.6 Lacasas	27
2.7.1 Propiedades bioquímicas de las lacasas	28
2.7.2 Fuentes de obtención de lacasas	29
2.7.3 Mecanismo de reacción de lacasas	29
2.7 Cinética enzimática	31
2.8.1 Ecuación de Michaelis-Menten	31
2.8.2 Aproximación de estado estacionario	33
2.8 Inhibición enzimática	35
2.9.1 Inhibición reversible	35
2.9.2 Inhibición competitiva	35
2.9.3 Inhibición acompetitiva	36
2.9.4 Inhibición no competitiva	37
2.9.5 Inhibición del sustrato	38
2.9.7 Desactivación enzimática	38
3. MATERIAL Y METODOS	41

3.1 Instituciones	41
3.2 Materias primas.....	41
3.3 Extracción y cuantificación de proteínas de compost agotado.....	41
3.3.1 Limpieza del compost agotado de champiñón	41
3.3.2 Extracción acuosa de enzimas por lixiviación.....	42
3.3.3 Determinación de la concentración y actividad enzimática del extracto purificado.	43
3.3.5 Extracto liofilizado	45
3.4 Caracterización molecular de la enzima	45
3.4.1 Identificación de la enzima lacasa en el extracto purificado y liofilizado	45
3.4.2 Identificación de fracciones proteicas	45
3.4.3 Identificación de la actividad oxidante en las fracciones proteicas	47
3.4.4 Determinación de la actividad optima y estabilidad enzimática	47
3.5 Caracterización vinazas.	48
3.5.1 pH	48
3.5.2 Determinación de fenoles totales.....	49
3.5.3 Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO)	49
3.6 Pruebas de degradación de vinazas	49
4. RESULTADOS	51
4.1 Obtención del extracto enzimático purificado.....	51
4.2 Identificación de la enzima lacasa en el extracto purificado.....	52
4.2.1 Identificación de las fracciones proteicas.....	52
4.3 Determinación de la actividad óptima y estabilidad enzimáticas.....	55
4.3.1 Efecto del pH sobre la estabilidad enzimática.	57
4.3.2 Efecto de la temperatura sobre la estabilidad enzimática.....	58
4.4 Evaluación de la actividad enzimática en la reducción del potencial contaminante.	60
4.4.1 Efecto de la acción de lacasas sobre la reducción de la DQO	60
4.4.2 Efecto de la acción de lacasas sobre la reducción de la concentración de fenoles totales.....	61
5. CONCLUSIONES.....	63
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Proceso de elaboración de etanol a partir de caña de azúcar	22
Figura 2.2 Estructura tridimensional de la lacasa fúngica	27
Figura 2.3 Mecanismo de reacción del sitio activo de las lacasas	30
Figura 2.4 Esquema inhibición competitiva	36
Figura 2.5 Esquema inhibición acompetitiva	37
Figura 2.6 Esquema inhibición no competitiva	38
Figura 2.7 Esquema de desactivación enzimática.	40
Figura 3.1 Paquete de compost agotado de champiñón	42
Figura 3.2 Extracto enzimático a) crudo b) purificado	43
Figura 4.1 Actividad enzimática vs tiempo de extracción.	51
Figura 4.2 Determinación de los pesos moleculares de las proteínas del extracto concentrado.....	53
Figura 4.3 Zimograma actividad enzimática.....	54
Figura 4.4 Superficie de respuesta de la actividad enzimática a diferentes pH y temperaturas a) extracto purificado y b) extracto liofilizado	55
Figura 4.5 Pérdida de la actividad enzimática a diferentes pH después 125 horas de incubación.	57
Figura 4.6 Pérdida de la actividad enzimática a diferentes temperaturas después de 2h de incubación.	59
Figura 4.7 Disminución de DQO en 5 días	60
Figura 4.8 Disminución de fenoles totales en 5 días	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Características físicas y químicas de las vinazas de caña de azúcar. ...	23
Tabla 3.1 Condiciones de preparación de lixiviado de compost agotado de champiñón.....	42
Tabla 3.2 Superficie de respuesta pH, temperatura	47
Tabla 4.1 Coeficiente de desactivación y vida media de los extractos enzimáticos pH óptimo y temperatura de 18 °C	58
Tabla 4.2 Coeficiente de desactivación y vida media de los extractos enzimáticos a diferentes temperaturas y pH de 5.	59

1. INTRODUCCIÓN

Las industria azucarera y alcoholera en México tienen una larga tradición histórica y han llegado a constituirse como una de las agroindustrias más importantes del país. Uno de los principales derivados industriales en la producción de azúcar es la producción de etanol, el cual se obtiene de la transformación de mieles agotadas de la elaboración de azúcar como materia prima. En 2017, se produjeron 14 millones de litros de etanol y esta cantidad tiende a aumentar debido al incremento de la mezcla gasolina-etanol para los vehículos automotores (SENER, 2018).

Usualmente en una planta tradicional alcoholera se generan entre 10 y 15 litros de vinazas por cada litro de etanol producido. Las vinazas son un residuo que se descarga en cuerpos de agua o en suelo, sin embargo, esto ha ocasionado problemas ambientales y al desecharse en grandes cantidades, saturan el suelo y contaminan los cuerpos de agua cercanos y mantos acuíferos subterráneos.

Las vinazas son un residuo con pH ácido 3 a 5, altas concentraciones de compuestos orgánicos (fenoles, melanoidinas, azúcares, entre otros) e inorgánicos (sales de potasio, calcio y magnesio), por lo cual presentan altos valores de demanda química de oxígeno ($DQO > 50$ g/L) y demanda bioquímica de oxígeno ($DBO > 24$ g/L) (Cabrera-Díaz *et al.*, 2016). Debido a lo anterior las vinazas pueden ser altamente contaminantes y su tratamiento aun presenta grandes oportunidades de investigación e innovación ya que, en la actualidad, se han propuesto tratamientos mediante procesos:

Físicos: Reducción de volumen, Recirculación, Sistemas de filtrado, Adsorción

Químicos: Termólisis catalítica, ozonificación.

Fisicoquímicos: Cavitación, floculación y coagulación

Biológico: Digestión anaerobia, fitorremediación.

También se ha reportado el uso de hongos de podredumbre blanca para la degradación de compuestos recalcitrantes y tóxicos (Majeau *et al.*, 2010), colorantes (Moya *et al.*, 2010) y tratamiento de vinazas (Jiménez *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2011; Tapia-Tussel *et al.*, 2015; España-Gamboa *et al.*, 2017) mediante el uso de

algunas enzimas extracelulares que producen como peroxidasa, lignina peroxidasa y lacasas.

Las lacasas son proteínas con pesos moleculares que van desde los 50 kDa a los 130 kDa. Debido a que en su núcleo existen de 3 a 4 átomos de cobre las lacasas tienen acción oxidante de sustratos utilizando el oxígeno molecular disuelto en el medio como receptor de electrones, lo cual le permite degradar una amplia variedad de compuestos como lignina, melanoidinas, aromáticos policíclicos, aromáticos clorados, plaguicidas, colorantes, entre otros (Barr y Aust, 1994).

En el medio de crecimiento comercial y de gran escala para la producción de champiñón, conocido como compost, se ha reportado la presencia de lacasas, por lo cual puede ser considerado a este como fuente de extracción (Mayolo-Deloisa *et al.*, 2009).

En el presente trabajo de investigación se estudió la extracción, identificación y caracterización de la actividad oxidante de las lacasas presentes en el compost utilizado para la producción de champiñón (*Agaricus bisporus*), su actividad oxidativa en la degradación de las vinazas generadas en la producción de etanol.

1.1 Antecedentes

Existen diversos manejos para las vinazas, entre los que encuentran la descarga en los cuerpos de agua y la fertilización de campos de caña de azúcar. La solución más simple para el manejo de este residuo es la descarga en los cuerpos de agua. La fertilización para el cultivo de caña de azúcar mediante la irrigación de campos se debe a su alto contenido de materia orgánica y nutrientes, principalmente potasio, nitrógeno y fósforo. Desde el punto de vista económico, la aplicación como fertilizante representa la segunda solución más simple y barata para la descarga de las vinazas (Fuess *et al.*, 2018).

Sin embargo, estos manejos sumados a la alta cantidad generada constituyen un problema ambiental serio. Esto debido a que se ha demostrado en diversos estudios que las vinazas presentan una alta toxicidad y pueden eutrofizar los cuerpos de agua (Marinho *et al.*, 2009; Christofolletti *et al.*, 2013; Chowdhary *et al.*, 2018).

Además, la generación de vinazas no está estandarizada, por lo que su composición varía dependiendo de la planta de procesamiento. Esto hace que su aplicación no pueda ser realizada de forma uniforme. Por ejemplo, la demanda química de oxígeno (DQO) varía entre 10 y 140 g L⁻¹ (Souza *et al.*, 1992; Wilkie *et al.*, 2000, Fuess *et al.*, 2018). Adicionalmente, la continua disposición de las vinazas por largo tiempo en suelos tiene un potencial de desencadenar una serie de efectos negativos como son la desestabilización del terreno, pérdida de actividad microbiana, acidificación de suelos y recursos hídricos y la disminución de transferencia de oxígeno debido a la obstrucción de poros del suelo (Fuess y García, 2014; Gonzales y Mejía, 2015; Fuess *et al.*, 2017).

Para tratar las problemáticas de los principales manejos de este residuo se han propuesto alternativas de tratamientos físicos, químicos, biológicos y combinaciones de éstos.

1.1.1 Tratamientos físicos

- Reducción de volumen

Este proceso se basa en el secado para concentrar la carga orgánica de las vinazas y utilizar el residuo para alimento de animales, sin embargo, el consumo de energía

para la evaporación del agua es alta y no es viable económicamente (Xiang y Runge, 2014).

- Recirculación

La vinaza generada es utilizada como agua en el proceso, esto permite la reducción del consumo de nutrientes, agua y ácido sulfúrico en el proceso y aumenta la concentración de materia seca en la vinaza, la desventaja que presenta es que es necesario la evaporación o un tratamiento posterior en el último ciclo de la recirculación de las vinazas (Navarro *et al.*, 2000; Bialas *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Szymanowska-Powalowska *et al.*, 2014).

- Sistemas de filtrado

Los sistemas utilizan membranas para concentrar los sólidos suspendidos en las vinazas en una corriente concentrada y libera agua descontaminada en la corriente de permeado. Hay varios tipos de procesos como son la microfiltración, nanofiltración u ósmosis inversa, estos procesos presentan ventajas como son la reducción de energía consumida comparada con los procesos evaporativos y se usan generalmente en varias etapas permitiendo tratar las vinazas directamente. Se demostró que los procesos de nanofiltración son más eficientes en la remoción de color mientras que la ósmosis inversa redujo sólidos totales, demanda química de oxígeno y el contenido de potasio, sin embargo, los sistemas de filtración sufren una obstrucción del filtro lo que limita la concentración de la alimentación y reduce el flujo de permeado, además de no degradar los contaminantes (Rai *et al.*, 2008; Arora *et al.*, 2011).

- Adsorción

Se utilizan materiales porosos para la remoción de contaminantes, se ha reportado el uso de carbón activado logrando la reducción de carbón orgánico total, fenoles, nitrógeno Kjeldahl y demanda química de oxígeno (Satyawali y Balakrishnan, 2007).

1.1.2 Tratamientos químicos

- Termólisis catalítica

Este proceso degrada térmicamente los contaminantes, puede ser mejorado con el uso de oxígeno y catalizadores, denominado oxidación húmeda. Se demostró que usando un catalizador se redujo la demanda química de oxígeno, la concentración de melanoides y la toxicidad de las vinazas, los catalizadores son muy efectivos en periodos de tiempo corto, pero reducen su actividad debido a la formación de una capa de coque en la superficie (Belkacemi *et al.*, 2000; Chaudhari *et al.*, 2008).

- Ozono

Debido a que el ozono es un oxidante fuerte, comúnmente es utilizado para oxidación de fenoles y disminución del color, generalmente, es combinado con un proceso biológico.

1.1.3 Tratamientos fisicoquímicos

- Floculación y coagulación

Estos procesos aglomeran las partículas sólidas de la mezcla por medio de la adición de sustancias químicas o de origen biológico, lo que facilita su separación de la solución, por lo general estos métodos se combinan con los sistemas de filtrado volviéndolos más eficientes. (Prasad, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Menkhaus *et al.*, 2010).

- Cavitación

Se desarrolla mediante la utilización de ultrasonido o por cavitación hidrodinámica donde se generan, crecen y colapsan microburbujas las cuales liberan una gran cantidad de energía. Se demostró que las vinazas tratadas con ultrasonido son menos recalcitrantes a la degradación biológica, esta técnica se ha combinado con ozonificación y tratamientos enzimáticos para reducir la demanda química de oxígeno y aumentar la velocidad de oxidación (Sangave y Pandit, 2004; Sangave y Pandit, 2006; Sangave *et al.*, 2007)

1.1.4 Tratamientos biológicos

La digestión anaerobia de las vinazas reduce la DQO y generando biogás, el cual puede ser usado como combustible en los diferentes procesos (Jiménez *et al.*, 2006; Vlyssides *et al.*, 2010).

Cabrera-Díaz *et al.* (2016) estudiaron un reactor anaerobio de flujo ascendente en operación continua a 29 ± 1 °C para el tratamiento de vinazas. Las condiciones de operación para la estabilidad del proceso se dieron a 10 kgDQO/m³d¹ con una retención hidráulica de 5 días. Además, se dio un post tratamiento utilizando una columna de burbujeo con ozono, siendo las condiciones óptimas de la columna 100 mgO₃/L, pH 7.5 y 3 h en contacto con el efluente del reactor. Los resultados demostraron una reducción de 75.1% en DQO y 0.315 m³CH₄ a la salida del reactor y una reducción en DQO, color y turbidez de 82.4, 93.8 y 99.3% respectivamente.

Sin embargo, la presencia de compuestos recalcitrantes (fenoles, melanoidinas y una variedad de azúcares de descomposición) puede ser tóxico o inhibitorio para los microorganismos anaerobios, reduciendo la velocidad de reacción, la tasa de producción de metano y los coeficientes de rendimiento (España-Gamboa *et al.*, 2017).

Recientemente se han propuesto, tratamientos para la reducción de los compuestos recalcitrantes y tratamiento de vinazas mediante la aplicación de hongos de podredumbre blanca donde las lacasas son la principal enzima participante en la degradación de los contaminantes.

Las lacasas han atraído el interés de los investigadores por sus potenciales aplicaciones en biotecnología ambiental, tienen gran aplicación en el ámbito industrial, su capacidad oxidativa ha sido probada en la industria papelera, industria de alimentos, industria farmacéutica, industria textil (Trejo-Hernandez *et al.*, 2001; Senthivelan *et al.*, 2016).

Un ejemplo de su aplicación es en la industria textil, en esta industria se utilizan 2/3 de los colorantes del mercado global y en los procesos húmedos consume grandes cantidades de agua y químicos. Los efluentes contienen restos de colorantes que contaminan el agua y forman compuestos tóxicos o cancerígenos intermediarios (Zollinger, 2002). Los colorantes son resistentes a la luz, agua y cambios químicos debido a su estabilidad estructural y su naturaleza sintética, por lo cual son un residuo difícil de degradar (Lin *et al.*, 2010). Recientemente se ha propuesto, el uso de lacasas por su capacidad de oxidar un amplio espectro de contaminantes como los colorantes. El uso de mediadores que faciliten la oxidación del sustrato ha

mejorado el desempeño de las lacasas (Moya *et al.*, 2010). Gracias a la especificidad las enzimas solo actúan en las moléculas de los colorantes, mientras que los aditivos y las fibras permanecen intactas para su reutilización.

Otra aplicación de las lacasas en la biorremediación es la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), Li *et al.*, (2010) demostraron que las enzimas provenientes del champiñón (*A. bisporus*) puede degradar los PAHs, además encuentra que las lacasas tienen un papel principal en la degradación de estos.

Ferreira *et al.*, (2011) estudian el uso de estas enzimas provenientes del hongo *P. sajor-caju* para la reducción la coloración, turbiedad, concentración de fenoles y de sólidos totales suspendidos en las vinazas. También se ha demostrado la degradación de fenoles y la reducción de la demanda química de oxígeno en vinazas después de tres días de tratamiento con el uso de *Penicillium decumbens* productor de lacasas (Jiménez *et al.*, 2005).

Tapia-Tussell *et al.*, (2015) estudiaron la decoloración y la remoción de compuestos fenólicos de las vinazas mediante la acción de las lacasas provenientes del hongo *T. hirsuta*, realizaron diluciones de las vinazas en 5% 10% 15% 20% (v/v) logrando una máxima decoloración de 69.2% cuando la vinaza era diluida al 10%, atribuido al aumento de la actividad enzimática hasta 2543 U/mL, indicando además una relación entre la decoloración y el incremento en la actividad enzimática. Para la remoción de fenoles se logró una mayor cantidad en vinazas diluidas en 5% y 10% en 192 h logrando una remoción de 84.8% y 79.2% respectivamente. En diluciones al 5% se obtuvo una baja actividad debido a la baja concentración de compuestos fenólicos y para las diluciones de 15% y 20% se apreció un efecto negativo en la expresión de las enzimas disminuyendo la capacidad de remoción.

Ese mismo año España-Gamboa *et al.*, (2015) realizaron estudios de la degradación de vinazas de azúcar de caña en un reactor con flujo de aire mediante la aplicación de lacasas por medio del crecimiento de *Trametes versicolor*, la fluidización y homogenización de la biomasa se realizó mediante el burbujeo, se utilizaron dos tipos de reactores, uno por lotes y otro continuo, logrando en el reactor por lotes una disminución de fenoles de 71%, DQO de 40% y de color de 18%, la

decoloración se vio afectada por el hecho del incremento del pH atribuido a la degradación de los compuestos fenólicos. En el reactor continuo se logró una eliminación de 80% de compuestos fenólicos, 60% de remoción de DQO después de 6 y 8 días respectivamente, así como una decoloración de 19% en el estado estacionario.

Posteriormente realizaron un experimento en un reactor de lecho fluidizado donde analizaron la degradación de las vinazas en condiciones estériles y no estériles, logrando una remoción de fenol de 64% y 67% en condiciones estériles y no estériles respectivamente, así como una disminución en la DQO de 41% en condiciones estériles y 38% en condiciones no estériles, demostrando que no tiene significancia las condiciones de esterilidad en los niveles de remoción de DQO y fenoles (España-Gamboa *et al.*, 2017).

Recientemente, Tarasi *et al.*, (2018) realizaron diferentes tipos de inmovilización de lacasas provenientes del hongo *Trametes versicolor* y compararon su actividad con respecto a las lacasas libres, observando la degradación de compuestos fenólicos, encontrando que la máxima actividad de las lacasas libres se encuentra en pH de 4.5 y temperatura de 40 °C. Así mismo, encontraron que las lacasas libres remueven en 60% la concentración de fenoles.

Aunque existen modelos para describir el comportamiento general de las lacasas, no existe un modelo específico para las vinazas. Aktas *et al.* (2001) analizaron los efectos de la cantidad inicial de 1-napthol y O₂ disuelto en la velocidad de reacción inicial y desarrollaron un modelo para la polimerización enzimática y calcularon los valores correspondientes de la cinética. El modelo se basa en las ecuaciones de estado cuasi estacionario tipo Michaelis-Menten, Moser, con inhibición competitiva y no competitiva encontrando que la ecuación convencional de segundo orden de Michaelis-Menten ajusta los datos experimentales.

Ese mismo año, Kurniawati y Nicell (2009) describen la oxidación de fenoles mediante un modelo que incorpora la cinética enzimática, la inactivación de la enzima, la relación estequiométrica entre el oxígeno y el sustrato y la transferencia de oxígeno.

1.2 Planteamiento del problema

Se prevé un incremento en la producción de etanol de 14 millones de litros a 480 millones de litros durante 2020, como consecuencia, habrá un incremento en las vinazas cogeneradas de aproximadamente 7000 millones de litros, las cuales son un residuo que puede llegar a ser altamente contaminante debido a sus características físicas y químicas, la constante deposición y su mal manejo.

Debido a lo anterior, es necesario desarrollar procesos biotecnológicos que coadyuven a reducir la alta demanda química de oxígeno y sustancias tóxicas, con la finalidad de tener un residuo manejable y menos contaminante el cual pueda ser devuelto al medio ambiente generando un impacto menor en él.

1.3 Justificación

El tratamiento y manejo de las vinazas en México es inadecuado debido a el uso indiscriminado como fertilizante o la descarga directa en cuerpos de agua, por lo que es necesario la búsqueda de tratamientos efectivos para su degradación. En la actualidad la búsqueda de tratamientos alternativos basados en química verde para la degradación o reutilización de los residuos ha tomado relevancia, debido a que estos procesos son amigables con el medio ambiente y a la vez reducen el consumo energético debido a que operan a temperaturas y presiones menores que los procesos convencionales.

En este sentido es importante el desarrollo de un proceso biotecnológico capaz de degradar por oxidación enzimática a las vinazas y que puede resultar económico debido al aprovechamiento de otro residuo agroalimentario como es el compost de champiñón.

Por lo que, en este trabajo se estudiará el aprovechamiento de los residuos generados en la producción del champiñón para la obtención de lacasas las cuales, por sus características oxidativas, pueden degradar las vinazas mejorando las características para su deposición. Además, se evaluarán los efectos de la concentración de la vinaza para mejorar el proceso y garantizar una adecuada degradación.

1.4 Hipótesis

Las lacasas obtenidas del compost agotado del cultivo de champiñón (*A. bisporus*) reducirán el potencial contaminante de las vinazas cogeneradas de la producción de etanol.

1.5 Objetivos.

1.5.1 Objetivo general.

Evaluar el efecto de las lacasas extraídas del compost agotado de champiñón sobre las vinazas para reducir su potencial contaminante

1.5.2 Objetivos específicos.

- Obtener lacasas a partir de compost agotado de champiñón (*A. bisporus*) para determinar sus características moleculares.
- Obtener las condiciones óptimas de temperatura y pH para la actividad óptima de las lacasas.
- Evaluar el efecto la concentración de las vinazas en la reducción de fenoles y DQO para disminuir el potencial contaminante de las vinazas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Importancia de la caña de azúcar en México

México es el productor número 7 a nivel mundial de caña de azúcar, tiene una larga tradición de producción de caña de azúcar que se remonta a la introducción por los españoles de la caña de azúcar en 1524 traída desde Cuba y en 1536 se estableció el primer molino de azúcar en San Andrés Tuxtla, Veracruz (García *et al.*, 2016). Hoy en día el cultivo de la caña se concentra en seis diferentes regiones de México, las cuales proveen de caña de azúcar a 54 ingenios y 2 destilerías autónomas (SAGARPA, 2017). La industria azucarera mexicana genera 450 empleos directos y 2.2 millones de empleos indirectos, generando el 2.5% del producto interno de manufactura y el 11.5% del sector primario (García *et al.*, 2016). En 2016-2017 se cosecharon 777 078 hectáreas de caña de azúcar y 51.156 millones de toneladas (Mt) fueron procesadas por los molinos resultando en 5.97 Mt de azúcar. En adición se generaron 2.027 Mt de miel final de las cuales 0.057 Mt (2.8%) fueron usadas para la producción de etanol con una generación de 13.8 millones de litros (ML) (SAGARPA, 2017; RFA, 2018).

La azúcar de caña es usada ampliamente para la generación de etanol, en 2017 Brasil aportó 26% de la producción mundial de etanol a partir de la caña de azúcar (RFA, 2018). Se estima que, para producir hasta 16 240 ML de etanol al año en México, cantidad similar a la producción brasileña actual, se necesitan 2.9 millones de hectáreas de cultivo de la caña de azúcar, para esto se consideraron las siguientes condiciones y supuestos: rangos de lluvia adecuados, pendientes de terreno bajas, largos periodos sin heladas, exclusión de áreas protegidas y áreas cultivadas, uso de pastizales naturales o cultivados y rendimientos potenciales medios a altos, con el fin de sostenibilidad y evitar conflictos de combustible contra alimentos (Johnson *et al.*, 2010).

2.2 Producción de etanol

Desde una perspectiva medioambiental, la sustitución de combustibles fósiles con etanol se traduce en una reducción de los gases de efecto invernadero a la atmosfera, así como otros cambios positivos en el impacto ambiental como la reducción de carbono negro que impacta en la salud humana (Galdos *et al.*, 2013).

La producción de etanol mundial en 2017 fue de 27 050 ML (RFA, 2018) y se estima que para 2030 7% de la energía global usada provendrá del etanol (Escobar *et al.*, 2009). En México, la Secretaría de Energía (SENER) estableció como meta para 2020 la producción de 498 ML de etanol anhidro con la finalidad de mezclarlo con gasolina magna en las terminales de almacenamiento y reparto, y esta cantidad podría aumentar para satisfacer los 4370.6 ML necesarios para cubrir el pronóstico de la demanda regular de gasolina si se mezcla al 10%. SENER estima una producción de 462-789 ML de los ingenios azucareros y 370.8 ML de fuentes independientes (SENER, 2018).

La producción de etanol (figura 2.1) inicia con la cosecha de la caña de azúcar, posteriormente pasa por un proceso de molienda, donde se extrae el jugo de la caña donde viene disuelta la sacarosa, después pasa por un proceso de clarificación para eliminar impurezas y regular su acidez, posteriormente pasa el proceso de evaporación donde se extrae aproximadamente 75% del contenido de agua para obtener como producto la meladura, una solución saturada que posteriormente será cristalizada por dos vías, la primera vía consiste en enfriar la meladura para la formación de cristales y la segunda vía consiste en la evaporación asistida por vacío para evitar el fundido de los cristales formados, una vez formados los cristales de azúcar pasan por centrifugas donde se separa el azúcar de las mieles e impurezas, estas mieles contiene pequeñas cantidades de azúcar que pueden ser utilizadas para la elaboración de etanol mediante la fermentación anaerobia de estas.

Las mieles sobrantes son combinadas con jugo para conseguir una concentración de azúcar en la mezcla de 10 a 15%, posteriormente se procede a la fermentación de esta mezcla donde la levadura consume los azúcares y los transforma en etanol, una vez realizada la transformación la mezcla pasa a ser destilada (Hugot, 1986).

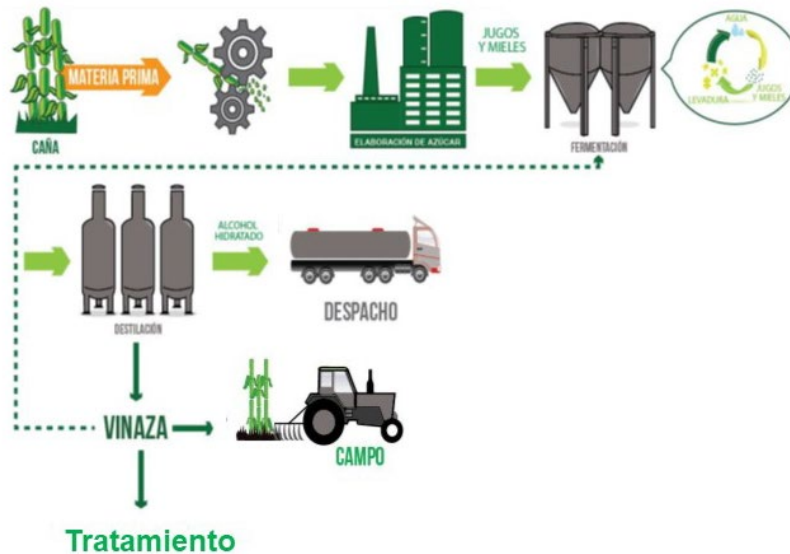


Figura 2.1 Proceso de elaboración de etanol a partir de caña de azúcar
Fuente: modificado de ASOCAÑA (2017).

La producción de etanol genera una gran cantidad de residuos, en particular la vinaza. Este residuo acuoso es cogenerado en la producción de etanol después de la destilación del jugo de caña de azúcar fermentado o de las melazas. Aproximadamente de 10 a 15 litros de vinazas son generadas por cada litro de etanol (Wilkie *et al.*, 2000).

2.3 Características de las vinazas

La vinaza es un residuo ácido debido a que su pH varía entre 3.5 y 5, tiene una alta carga orgánica representado por una alta demanda química y bioquímica de oxígeno (DBO y DQO), de olor desagradable y un color café oscuro debido a la presencia de melanoides, compuestos fenólicos, compuestos furfúricos y caramelo (Tabla 2.1) (Chandra *et al.*, 2008).

Debido al proceso de concentración de jugo de caña por medio de la cristalización y evaporación, el contenido de orgánicos no fermentables incrementa y continua después de la fermentación aumentando la demanda química de oxígeno (Moraes *et al.*, 2015).

Los melanoides son polímeros de alto peso molecular formados al reaccionar en condiciones alcalinas, azúcares y aminoácidos (Reacción de Maillard), la

problemática de las melanoidinas es la toxicidad para organismos acuáticos y, además se consideran compuestos recalcitrantes (Pant y Adholeya, 2007; Siles *et al.*, 2011).

Tabla 2.1 Características físicas y químicas de las vinazas de caña de azúcar.

Rendimiento L de vinazas/ L de etanol	DBO/DQO (g/L)	pH	Compuestos fenólicos	Referencia
No especificado	No especificado /110.065±11.48	4.39±0.006	10.834±1.47	España- Gamboa <i>et al.</i> , 2015
10 a 15	31.5-87.7 /75.8- 109.7	4.0-4.9	0.4-12.4	Moraes <i>et al.</i> , 2015
8 a 20	24.0±0.12/50±1.65	4.67±0.31	No especificado	Cabrera- Díaz <i>et al.</i> , 2016
	No especificado/ 0.150	6.5 a 8	No especificado	Proyecto de modificación NOM-001- SEMARNAT- 1996

2.4 Hongos productores de lacasas

Los hongos son organismos eucariontes, heterótrofos y en su pared celular contienen un polisacárido nitrogenado llamado quitina, además su cuerpo se encuentra conformado por filamentos microscópicos ramificados llamados hifas o láminas, que a su vez se encuentran en conjuntos llamados micelios.

Las hifas se encuentran en la superficie externa del hongo y son estructuras largas y finas, lo que ayuda que los hongos obtengan su alimento absorbiendo materia orgánica desde el exterior a través de sus paredes celulares (Campell *et al.*, 2007). Al ser heterótrofos, los hongos obtienen los nutrientes a partir de materia elaborada por otros organismos, sin embargo, como no son capaces de ingerir la materia

orgánica segregan enzimas al medio, estas enzimas extracelulares son capaces de romper enlaces químicos. (Pazarlıoğlu *et al.*, 2005).

En el reino de los hongos se encuentra la división de los basidiomicetos los cuales se clasifican en 2 categorías: hongos de pudrición blanca y hongos de pudrición café, esta clasificación se basa tanto en el color del micelio del hongo como en el de los residuos que generan. El color café se atribuye a la degradación incompleta de lignina y el blanco a una degradación más completa (Cruz-Colin, 2003).

Los hongos de pudrición blanca secretan enzimas capaces de degradar compuestos xenobióticos y contaminantes orgánicos. De acuerdo con Satyawali y Blakrishnan (2008) algunos se han estudiado para su aplicación en la degradación de melanoidina como lo son el *T. versicolor*, *Coriolus hirsutus*, *Colorius versicolor*, este último también usado para tratar efluentes de destilerías.

Además de la lignina y las melanoidinas, este tipo de hongos pueden degradar muchos compuestos químicos insolubles (Barr y Aust, 1994) tales como:

- Aromáticos policíclicos: Benzopireno, pireno y antraceno.
- Aromáticos clorados: pentaclorofenol, bifenilos policlorados y dioxinas.
- Plaguicidas: DDT, lindano, clordano y toxafeno
- Colorantes: Azul de metileno y cristal violeta
- Explosivos: 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), ciclotrimetilenotrinitroamina (RDX), ciclotetrametilenotetranitroamina (HMX).

Entre los hongos basidiomicetos se encuentra el champiñón (*Agaricus bisporus*), éste es considerado uno de los hongos comestibles económicamente más importantes y se ha reportado que durante el crecimiento de su micelio sobre el compost presenta similitud con el sistema de degradación que utilizan los hongos de podredumbre blanca, esto genera una acumulación de grandes cantidades de enzimas entre ellas las lacasas.

Después de la cosecha del champiñón una cantidad considerable de compost es desechado, este residuo es una fuente potencial de enzimas extracelulares por lo que el aprovechamiento de éstas es posible mediante su recuperación (Wood, 1980; Trejo-Hernandez *et al.*, 2001). Para la recuperación de las enzimas se realizan

lixiviaciones con diferentes soluciones buffers, posteriormente se purifican mediante columnas de intercambio iónico y selección, microfiltración y diálisis, con el fin de aumentar la actividad enzimática recuperada del medio (Trejo-Hernandez *et al.*, 2001; Mayolo-Deloisa *et al.*, 2009).

Entre las enzimas que participan en la degradación de las vinazas las lacasas desarrollan un papel fundamental debido a su baja especificidad lo que provoca que degraden una amplia variedad de compuestos. Sin embargo, no se ha probado la capacidad degradativa de las lacasas obtenidas de compost agotado de champiñón en el tratamiento de vinazas.

2.5 Cultivo de champiñón

El cultivo de producción de champiñón se divide en las siguientes etapas:

- Fermentación al aire libre Fase I o compostaje

En esta etapa el sustrato empleado empieza su proceso de adecuación para las necesidades del desarrollo del micelio de champiñón. Su duración varia entre 19 y 23 días dependiendo de los factores ambientales. Los materiales utilizados pueden variar dependiendo de las zonas de producción de granos y cereales cercanos. Se puede utilizar diferentes tipos de paja: arroz, cebada, sorgo, maíz, trigo entre otros, además de otros suplementos agrícolas como harinas.

Es común la utilización de urea y gallinaza para acelerar el proceso de fermentación y proveer de nitrógeno y proteína el compost. Otro suplemento proporciona un mejoramiento en la estructura y el pH es el sulfato de calcio.

Se le llama composta al compuesto de materias primas mezcladas, humectadas y fermentadas por acción de la oxigenación periódica y constante durante cierto tiempo (Fernández, 2001; Contò *et al.*, 2019).

- Fermentación controlada Fase II o pasteurización

En esta fase, se introduce el compost a un túnel donde se tiene un mejor control de la temperatura, para lograr una degradación de la materia orgánica adecuada. La degradación es producida por microorganismos los cuales debido a la heterogeneidad de la fermentación al aire libre es una composición muy variada, por lo que en esta etapa se nivela la temperatura de 50 a 55 °C durante el llenado

y posteriormente se eleva entre 60 y 65 °C durante 6 a 8 horas para seleccionar los microorganismos adecuados para la transformación selectiva del sustrato para el desarrollo óptimo del champiñón, posteriormente se reduce la temperatura en rangos de 50 a 55 °C y se mantiene de 3 a 4 días donde hay una recolonización del microorganismos seleccionados (Fernández, 2001; Contò *et al.*, 2019).

- Siembra e incubación

La siembra se realiza al terminar la fase II disminuyendo la temperatura hasta los 20 a 24 °C. La dosificación de la semilla se realiza usualmente en relaciones de 100 a 150 g por cada 25 Kg de compost. Una vez realizada la siembra, el cultivo permanece de 12 a 16 días manteniendo la temperatura entre 22 a 26 °C, para la óptima dispersión del micelio en el sustrato o compost (Fernández, 2001; Contò *et al.*, 2019).

- Cobertura

El compost cuando está completamente colonizado por el micelio no genera el champiñón, por lo que es necesario modificar las condiciones de este al agregar una cobertura, esta cobertura varia en materiales y es una fuente de variación en términos de calidad, rendimiento y uniformidad del corte del producto. Además, tiene funciones como ser soporte del champiñón emergente, contribuir al mantenimiento del microclima para la formación del champiñón, retener agua la cual será ocupada para el desarrollo y crecimiento del champiñón (Pardo-Giménez *et al.*, 2017).

- Inducción

Cuando el que el micelio pasa de estado vegetativo a un estado productivo se le denomina inducción, para llevar a cabo este proceso se disminuye la temperatura a 16 °C y el porcentaje de CO₂ a la mínima concentración (Fernández, 2001; Contò *et al.*, 2019).

- Cosecha

La producción del champiñón se da aproximadamente después de 23 a 26 días después de haberse aplicado la cobertura. Una vez alcanzado los valores deseados de madurez, tamaño y calidad se realiza un corte donde se retiran los champiñones y se deja crecer otra vez el champiñón. Usualmente se logra llevar a cabo 3 cortes

de champiñón con una semana entre los cortes (Fernández, 2001; Contò *et al.*, 2019).

2.6 Lacasas

Son proteínas multicobre con actividad fenol oxidasa que catalizan la oxidación de compuestos fenólicos y aminas aromáticas, liberando agua al utilizar el oxígeno molecular como aceptor final de electrones (Thurston, 1994); son enzimas producidas por varios microorganismos como bacterias, pero especialmente por hongos (figura 2.2) (Moharib *et al.*, 2011). Las lacasas (*bencenodiol: oxígeno oxidorreductasa*, EC 1.10.3.2) son miembros de las oxidasas multicobre, denominadas proteínas azules (Mattinen *et al.*, 2006), catalizan una oxidación mono-eléctrica de sustratos a expensas de oxígeno molecular. Son un grupo de enzimas oxidativas cuya explotación como biocatalizadores en síntesis orgánica no se le ha dado importancia, hasta hace apenas unas décadas que empezó a estudiarse con más detalle, esto probablemente porque no están disponibles en el mercado (Riva, 2006). Estas enzimas deben su nombre a que fueron primeramente aisladas del árbol de laca, *Rhus vernicifera*. (Bertrand *et al.*, 2002).

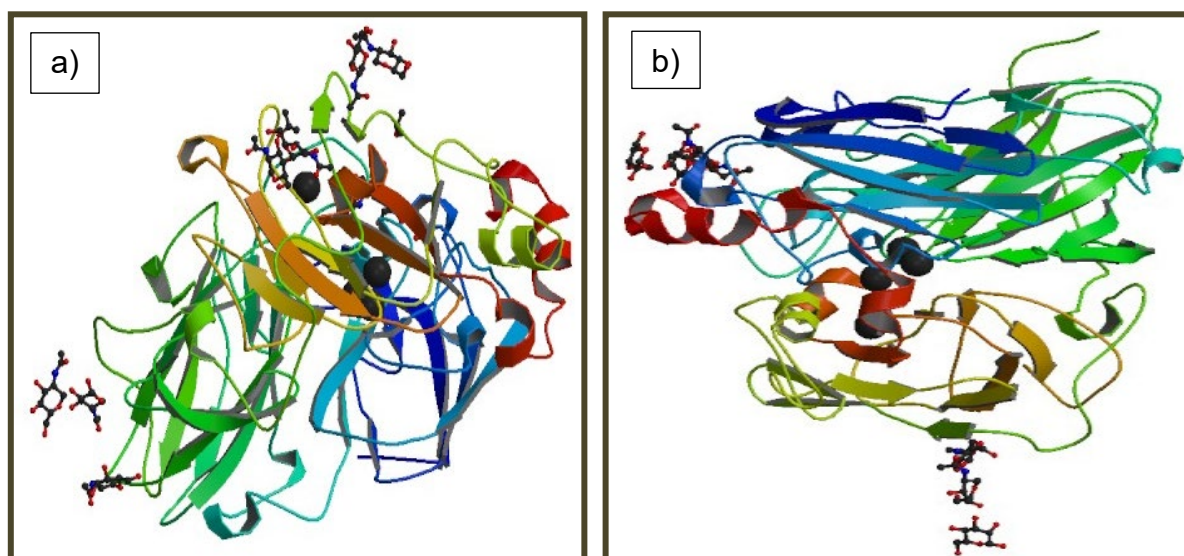


Figura 2.2 Estructura tridimensional de la lacasa fúngica, producida por: a) *Trametes versicolor*, b) *Coridopsis gallica*. (Fuente: <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2VDS>).

Son de las pocas enzimas capaces de catalizar la reducción de cuatro electrones de O_2 a H_2O , con la oxidación concomitante de un sustrato reducido. Los sustratos para lacasas incluyen una amplia gama de compuestos aromáticos (fenólicos y no fenólicos), especies de compuestos orgánicos, incluyendo iones Mn^{+2} , así como biopolímeros aromáticos complejos tales como la lignina (Brown *et al.*, 2002). Catalizan la oxidación de estos compuestos, particularmente sustratos fenólicos, por ejemplo, hidroquinona, 2,6- dimetoxifenol o fenilendiamina (Kellner *et al.*, 2007). Es difícil definir las lacasas por la reducción de un sustrato debido a que su rango de sustratos es muy amplio, así como la variación que hay de una lacasa a otra (Baldrian, 2006).

El centro activo es oxidado por el oxígeno o por un compuesto aromático, generando un intermediario deficiente de un par de electrones. Dicho compuesto será oxidado nuevamente por O_2 o por sustratos fenólicos. El ciclo es completado gracias a cuatro oxidaciones posteriores, provocando que la enzima vuelva a su estado relajado. De los tres átomos de cobre que poseen las lacasas, uno de ellos es responsable de la coloración azul, la enzima que no posee este átomo de cobre se denomina lacasas blancas o amarillas (Brijwani *et al.*, 2010).

2.7.1 Propiedades bioquímicas de las lacasas

En general, las lacasas son proteínas monoméricas con masas moleculares entre los 50 y 100 kDa, aunque se han descrito formas monoméricas como la lacasa de *Agaricus bisporus*, que se presenta como dímeros de unidades iguales (Baldrian, 2006). Son glicoproteínas con un contenido de carbohidratos unidos covalentemente cuya fracción masa asciende entre 10 y 45% de la molécula completa. El contenido de carbohidratos está implicado en la estabilidad estructural de la proteína y en su protección frente a procesos de proteólisis e inactivación por radicales (Thurston, 1994; Claus, 2004).

Las lacasas son proteínas muy estables, con temperaturas óptimas entre los 50 y 70°C (Morozova *et al.*, 2007), aunque se pueden encontrar enzimas muy termoestables como la lacasa de *Pycnoporus sanguineus*, con un tiempo de inactivación de 3 horas a 75 °C. Poseen pl entre 2.6 y 4.5 y presentan actividad en un amplio rango de pH, entre 2,0 y 8,5 aunque el máximo se encuentra entre 3.0 y 5.0 (Thurston, 1994). Su actividad frente a compuestos fenólicos es muy

dependiente del pH, ya que el potencial redox de estos compuestos disminuye a medida que se incrementa el pH. Sin embargo, a pH superior a 6 se produce inhibición de la actividad catalítica (Xu, 1997). La actividad de lacasa también puede ser inhibida por iones inorgánicos como cloruros y fluoruros o por compuestos orgánicos como cisteína, azida o ácido tioglicólico (Morozova *et al.*, 2007).

2.7.2 Fuentes de obtención de lacasas

En la naturaleza, las lacasas se encuentran principalmente en los hongos, pero algunas también se han aislado a partir de bacterias e insectos (Mattinen *et al.*, 2006; Moharib *et al.*, 2011), la presencia de lacasas en plantas es muy escasa. Son secretadas al medio extracelular por el micelio de basidiomicetos, ascomicetos y deuteromicetes, siendo los basidiomicetos de podredumbre blanca de la madera los que más lacasa producen (Ramírez *et al.*, 2003).

Las lacasas se han descrito principalmente en hongos ligninolíticos de podredumbre blanca, por ejemplo, los Basidiomicetos *Trametes versicolor* y *Polyporus streatus*, y los Ascomicetos, por ejemplo, *Podospora anserina* y *Neurospora crassa* (Claus, 2003). También se han aislado algunas cepas de bacterias de las especies *Azospirillum*, *lipoferum* y *Alteromona ssp.* (Durán *et al.*, 2003). En estudios recientes Moharib *et al.*, (2011) reportaron la producción de lacasa por el hongo de pudrición blanca *Pleurotus ostreatus* NRRL0366 (hongo ostra) en la cual encontraron la máxima producción de Lacasa optimizando los parámetros de cultivos en sistemas de cultivo tipo *Batch*.

El hongo comercial *Agaricus Bisporus* (champiñón común) es uno de varios hongos que segregan lacasas extracelular en el medio de cultivo durante el crecimiento del micelio. Las lacasas constituyen el 2% de la proteína del micelio del *Agaricus Bisporus* (Perry *et al.*, 1993).

2.7.3 Mecanismo de reacción de lacasas

La catálisis de las lacasas ocurre con la oxidación del electrón de una amplia gama de compuestos aromáticos, que incluye polifenoles, metoxi-sustituidos y aminas aromáticas. A menudo se producen isoenzimas que oligomerizan para la formación

de compuestos multiméricos. Para la actividad catalítica es necesario mínimo cuatro átomos de cobre por unidad de proteína activa.

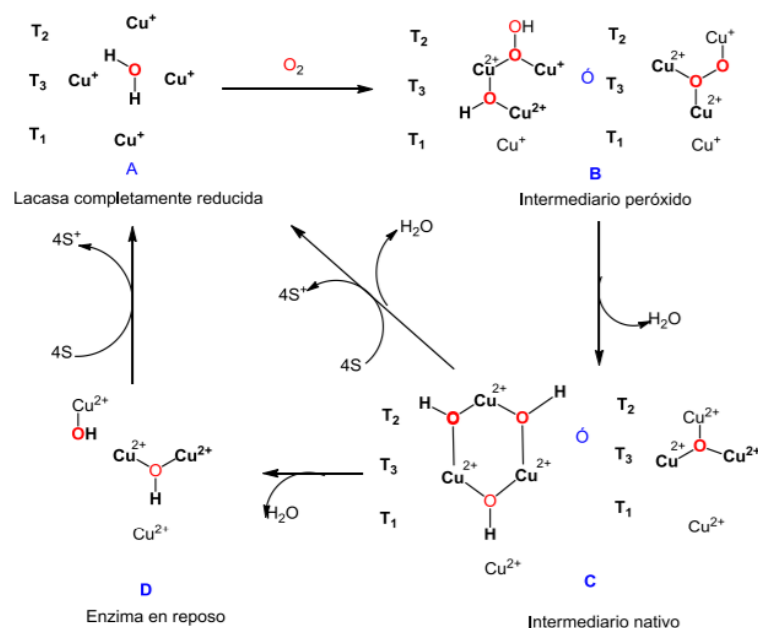


Figura 2.3 Mecanismo de reacción del sitio activo de las lacasas (Tomado de o fuente Shleev et al., 2006).

La enzima lacasa (figura 2.3) oxida las moléculas del sustrato mediante el Cu^{2+} tipo 1 debido a la transferencia de un electrón. Son necesarios 4 electrones para la reducción completa de la lacasa. Los electrones son transferidos en dos pasos a oxígeno por el par Cu^{2+} tipo 3, probablemente a través de un peróxido intermedio. La reoxidación de Cu^{2+} tipo 1 está mediada por Cu^{2+} tipo 2. La oxidación del sustrato crea radicales reactivos que pueden sufrir las siguientes reacciones no enzimáticas:

1. Acoplamiento oxidativo de monómeros, por ejemplo, compuestos fenólicos o anilinas aromáticas: La oxidación enzimática de compuestos fenólicos (por ejemplo, guayacol, pirogalol, p-cresol, 2,6-dimetoxifenol) y las anilinas por lacasa genera radicales que reaccionan entre sí para formar dímeros, oligómeros o polímeros unidos covalentemente por C-C, C-O y C-N. La estructura de los productos finales es determinada por la reactividad de productos intermedios y el pH del medio. En suelos, los compuestos naturales y xenobióticos fenólicos o aminas aromáticas pueden ser oxidativamente acoplados a la matriz orgánica de los ácidos húmicos. En el

caso de compuestos sustituidos, la reacción puede ser acompañada por desmetilaciones parciales y deshalogenación.

2. Degradación de polímeros: Las lacasas están involucradas en la degradación de polímeros naturales complejos, tales como la lignina o ácidos húmicos. Los radicales reactivos generados conducen a la escisión de los enlaces covalentes (especialmente alquil-aril-) y para la liberación de monómeros. Debido al impedimento estérico, las lacasas no podrían entrar directamente en contacto con polímeros. En su lugar, pequeños compuestos orgánicos o metales que también pueden ser oxidados y activados por las lacasas, por ejemplo, alcohol veratrílico, ácido 3-hidroxi-antranílico y Mn^{2+} , median la despolimerización catalizada por radicales.
3. Escisión de anillos de compuestos aromáticos: Esta reacción ha sido raramente descrita para las lacasas. Las lacasas de diversos orígenes difieren en su especificidad de sustrato y varios sustratos deben ser probados para evaluar su actividad (Claus, 2003).

2.7 Cinética enzimática

Las enzimas son usualmente proteínas, las cuales actúan como catalizadores al incrementar la velocidad de reacción en sistemas biológicos sin cambiar su estructura. La mayoría de las enzimas requieren un componente no proteico llamado cofactor para una mejor eficiencia catalítica. Las proteínas sin cofactor son llamadas apoenzimas, y las proteínas con cofactor son llamadas holoenzimas (Ravi *et al.*, 2017).

2.8.1 Ecuación de Michaelis-Menten

Para la mayoría de las enzimas, la velocidad de reacción puede ser descrita por la ecuación de Michaelis-Menten, la cual fue deducida en 1913 por Leonor Michaelis y Maud Menten. Esta ecuación asume que hay un equilibrio entre las enzimas, sustrato y el complejo enzima-sustrato, el cual se instala instantáneamente y la formación de productos a partir del complejo es lento para afectar el equilibrio.

La ecuación más simple general para la reacción catalizada de un sustrato-enzima simple es



Considerando que en el periodo inicial de la reacción la concentración del producto es despreciable y la reacción reversible de la formación del complejo enzima-sustrato puede ser despreciada la ecuación se simplifica a:



Utilizando la suposición de equilibrio:

$$k_1 [E][S] = k_{-1} [ES] \quad (2.3)$$

La disociación de la constante de $[ES]$ es dada por k_s

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_1}{k_{-1}} = k_s \quad (2.4)$$

La concentración total de la enzima $[E_0]$ es equivalente a la suma de la enzima libre $[E]$ y el complejo enzima-sustrato $[ES]$

$$[E] = [E_0] - [ES] \quad (2.5)$$

$$\begin{aligned} \frac{([E_0] - [ES])[S]}{[ES]} &= k_s \\ ([E_0] - [ES])[S] &= k_s [ES] \\ [E_0][S] - [ES][S] &= k_s [ES] \\ [ES]([S] + k_s) &= [E_0][S] \\ [ES] &= \frac{[E_0][S]}{[S] + k_s} \end{aligned} \quad (2.6)$$

$[ES]$ gobierna la velocidad de formación de los productos $R_0 = [ES]k_2$

Sustituyendo el valor de $[ES]$ en la ecuación anterior,

$$R_0 = \frac{[E_0][S]k_2}{[S] + k_s} \quad (2.7)$$

El límite de la velocidad inicial V_{\max} es alcanzado cuando la concentración del sustrato es muy alta y todas las enzimas están presentes como complejo, $V_{\max} = k_2 [E_0]$

$$R_0 = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + k_s} \quad (2.8)$$

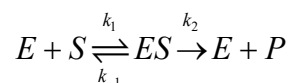
Se supone que la concentración inicial del sustrato $[S_0]$ es más grande que la concentración inicial de la enzima $[E_0]$, la formación de la concentración enzima-sustrato resultará en un cambio insignificante en la concentración libre del sustrato. Por lo anterior, R_0 puede ser reescrita como:

$$R_0 = \frac{V_{\max} [S_0]}{[S_0] + k_s} \quad (2.9)$$

La suposición de equilibrio no es aplicable para todas las reacciones catalizadas por enzimas debido a que la reacción ocurre a una velocidad alta y perturba el equilibrio (Dutta, 2008).

2.8.2 Aproximación de estado estacionario

Considerando la reacción más simple entre la enzima y el sustrato, se asume que la descomposición del complejo enzima-sustrato es irreversible, mientras que la formación del complejo enzima-sustrato es reversible. La descomposición del complejo se asume como limitante de la velocidad. Las constantes de formación y descomposición del complejo (ES) está dado por:



La suposición del estado estacionario es válida cuando la concentración ES es constante y cuando la concentración total de la enzima E_0 es pequeña comparada con el sustrato.

Debido a que la concentración del complejo enzima-sustrato es constante, su tasa de cambio es constante

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad (2.10)$$

La formación de $[ES]$ en cualquier tiempo es $t = k_1[E][S]$

La descomposición de $[ES]$ en cualquier tiempo es $t = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$

Usando la suposición de estado estacionario

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] = [ES](k_{-1} + k_2)$$

Separado las constantes y las variables:

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_m \quad (2.11)$$

El término $\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ en la ecuación anterior es la constante de Michaelis K_m . La

cantidad total de enzima está dada por:

$$[E] = [E_0] - [ES] \quad (2.12)$$

Sustituyendo ec. 2.11 en ec. 2.12 obtenemos

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{[S] + K_m} \quad (2.13)$$

Y $R_0 = k_2[ES]$ en ec. 2.13

$$R_0 = \frac{k_2[E_0][S]}{[S] + K_m} \quad (2.14)$$

Donde $k_2[E_0] = V_{\max}$ la máxima velocidad de reacción, entonces:

$$R_0 = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_m} \quad (2.15)$$

El radio k_{cat} / K_m es una relación importante entre las enzimas y la catálisis. La constante k_{cat} es llamada el número de recambio, la cual es obtenida de la siguiente expresión:

$$V_{\max} = k_{cat}[E_0] \quad (2.16)$$

El número de recambio denota la máxima cantidad de moléculas de sustrato que puede ser convertida en productos por unidad de enzima, para reacciones sencillas $k_2 = k_{cat}$, para reacciones complejas k_{cat} involucrará una cantidad de constantes de velocidades individuales. El término k_{cat} / K_m es llamado la eficiencia catalítica de la enzima. Este término puede ser usado para entender la especificidad de la enzima (Dutta, 2008).

2.8 Inhibición enzimática

Los inhibidores son sustancias las cuales tienden a reducir la velocidad de una reacción catalítica por enzimas. Existen 2 tipos de inhibidores. Inhibidores reversibles los cuales se unen a la enzima en una manera reversible y pueden ser removidas por diálisis o dilución para restaurar totalmente la actividad enzimática. Por otro lado, los inhibidores irreversibles son aquellos no pueden ser removidos por diálisis y desactivan o desnaturalizan las enzimas

2.9.1 Inhibición reversible

La inhibición reversible ocurre rápidamente en un sistema cuando está cerca del punto de equilibrio, y es independiente de la concentración de enzima, inhibidor y sustrato. Se mantienen constante durante el periodo cuando los estudios de la velocidad de reacción inicial son realizados. En contraste, la inhibición irreversible incrementa con el tiempo. Para una reacción de un sustrato-enzima catalizada existen tres tipos de patrones de inhibición para reacción que siguen la forma de la ecuación de Michaelis Menten: competitiva, acompetitiva y no competitiva (Ravi *et al.*, 2017).

2.9.2 Inhibición competitiva

Los inhibidores competitivos a menudo tienen una similitud estructural con el sustrato por lo que compiten por el mismo sitio activo. El complejo enzima inhibidor carece de los grupos reactivos apropiados o se mantiene en una posición inadecuada con respecto al sitio catalítico de la enzima, lo que resulta en un complejo que no reacciona. El inhibidor debe primero dissociarse antes de que el sustrato verdadero pueda entrar en la enzima y la reacción pueda tener lugar.

El efecto de un inhibidor competitivo dependerá no solo del inhibidor sino también de la concentración del sustrato y las afinidades relativas del sustrato y el inhibidor de la enzima. Por lo tanto, si se considera la situación en la que la concentración de sustrato es baja, entonces el inhibidor competirá con éxito, pero a medida que aumenta la concentración de sustrato, el inhibidor tendrá menos éxito en competir con el sustrato hasta que, a concentraciones muy altas, se esperaría una baja o ninguna inhibición. Por lo tanto, en esta situación, V_{\max} permanece sin cambios, pero K_m para el sustrato aumenta, como se ilustra en la figura 2.5, y el valor del nuevo K_m se designa como K'_m .

La cinética en estado estacionario de una reacción enzimática con inhibición competitiva es mostrada en la figura 2.5.

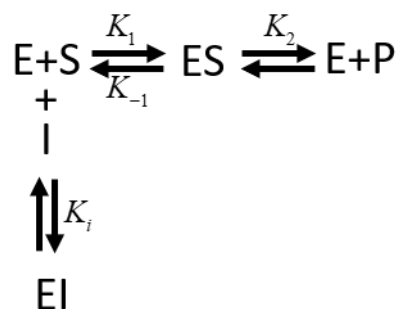


Figura 2.4 Esquema inhibición competitiva

$$\begin{aligned}
 R_0 &= \frac{V_{\max} [S_0]}{[S_0] + K_m \left(\frac{1 + [I]}{K_i} \right)} \\
 K'_m &= K_m \left(\frac{1 + [I]}{K_i} \right) \\
 R_0 &= \frac{V_{\max} [S_0]}{[S_0] + K'_m}
 \end{aligned}$$

2.9.3 Inhibición acompetitiva

Los inhibidores acompetitivos solo se unen al complejo enzima sustrato y no a la enzima libre. La inhibición no se puede superar por el aumento del sustrato. La figura 2.6 ilustra este comportamiento no competitivo.

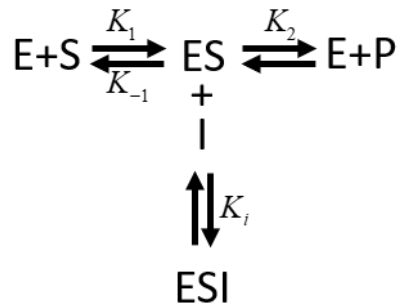


Figura 2.5 Esquema inhibición acompetitiva

$$R_0 = \frac{\frac{V_{\max} [S_0]}{\left(1 + \frac{[I_0]}{K_i}\right)}}{[S_0] + \frac{K_m}{\left(1 + \frac{[I_0]}{K_i}\right)}}$$

$$V'_{\max} = \frac{V_{\max} [S_0]}{\left(1 + \frac{[I_0]}{K_i}\right)} \text{ y } K'_m = \frac{K_m}{\left(1 + \frac{[I_0]}{K_i}\right)}$$

$$R_0 = \frac{V'_{\max} [S_0]}{[S_0] + K'_m}$$

2.9.4 Inhibición no competitiva

Un inhibidor no competitivo puede combinarse con una molécula de enzima para producir un complejo sin salida, independientemente de si una molécula de sustrato está unida o no. El inhibidor debe unirse en un sitio diferente del sustrato. El inhibidor reduce la actividad catalítica de la enzima, ya sea que se une al sitio catalítico o como resultado de un cambio conformacional que afecta al sitio catalítico sin afectar el sitio de unión del sustrato (figura 2.7).

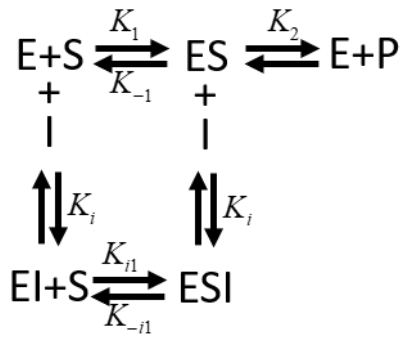


Figura 2.6 Esquema inhibición no competitiva

$$R_0 = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[I_0]}{K_i}\right)} \frac{[S_0]}{([S_0] + K_m)}$$

$$V'_{\max} = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[I_0]}{K_i}\right)}$$

$$R_0 = \frac{V'_{\max} [S_0]}{([S_0] + K_m)}$$

2.9.5 Inhibición del sustrato

A concentraciones de sustrato muy altas, se observan desviaciones de la ley de velocidad clásica de Michaelis Menten. En esta situación, la velocidad inicial de una reacción incrementa al aumentar la concentración del sustrato hasta que se alcanza un límite, después de lo cual la velocidad disminuye al aumentar la concentración. La inhibición del sustrato puede causar tales desviaciones cuando dos moléculas de sustrato se unen inmediatamente, formando un complejo catalíticamente inactivo (Dutta, 2008).

$$R_0 = \frac{V_{\max} [S_0]}{K_m + [S_0] + \frac{[S_0]^2}{K_i}}$$

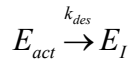
2.9.7 Desactivación enzimática

En muchas aplicaciones y procesos es importante determinar la velocidad a la que la actividad enzimática disminuye. Esto es fundamental cuando se considera el uso

de reactores continuos por periodos de tiempo grandes. En estas situaciones la viabilidad económica de los procesos puede depender de la vida útil de la enzima.

Desnaturalización de la proteína.

La estructura de la proteína está estabilizada por fuerzas débiles, las cuales tienen importancia funcionalmente. Debido a lo anterior, los sitios activos son vulnerables a perturbaciones que den como resultado configuraciones con menor actividad. Es por esta razón que una gran cantidad de parámetros físicos y químicos perturben la geometría nativa y estructura de la proteína. En la mayoría de los casos la desactivación de la enzima sigue un proceso de decaimiento de primer orden (Ravi et al., 2017):



Integrando entre el $t = 0$ y $t = t$,

$$\int_{E_{act}=0}^{E_{act}=t} \frac{dE_{act}}{E_{act}} = \int_{t=0}^{t=t} -k_{de} dt$$

Simplificando

$$\ln \frac{E_{act}(t)}{E_{act}(0)} = -k_{des}(t)$$

$$E_{act}(t) = E_{act}(0)e^{-k_{des}t} \quad (2.17)$$

Con esta forma de la ecuación de la reacción, la vida media de la enzima puede ser determinada estableciendo la actividad enzimática en la mitad del valor inicial. Esto es:

$$E_{act}(t) = \frac{E_{act}(0)}{2}$$

$$\frac{E_{act}(0)}{2} = E_{act}(0)e^{-k_{des}t_{1/2}}$$

$$1/2 = e^{-k_{des}t_{1/2}}$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{des}}$$

Generalmente, la velocidad de desactivación se determina en ausencia del sustrato, pero la presencia de sustratos y otros materiales puede modificarla. El efecto de combinar el efecto de desactivación con el modelo de Michaelis-Menten se muestra en la figura 2.8 (Ravi et al., 2017).

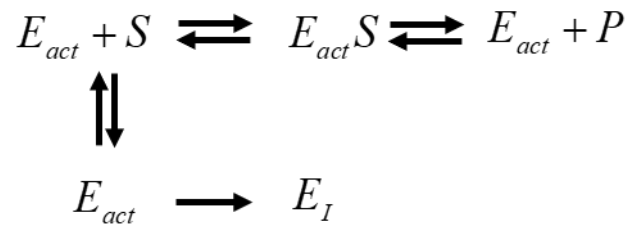


Figura 2.7 Esquema de desactivación enzimática (Ravi *et al.*, 2017).

Asumiendo que la desactivación es más lenta que la reacción del esquema la enzima E se desactivara más rápido que en el complejo ES la ecuación puede ser descrita como la ecuación 2.18

$$\begin{aligned}
 \frac{dE_{act}}{dt} &= -Ek_{des} \\
 [ES] &= [E_0] - [E] \\
 \frac{dE_{act}}{dt} &= (E_{act} - ES)k_{des} \\
 \frac{dE_{act}}{dt} &= -\frac{k_{des}E_{act}}{1 + S / K_m}
 \end{aligned} \tag{2.18}$$

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 Instituciones

Las instituciones donde se realizó el trabajo de investigación fueron las siguientes:

- Laboratorio de química biología molecular de alimentos, Instituto Ciencias Básicas, Universidad Veracruzana, Campus Xalapa.
- Laboratorio 1, Posgrado en ciencias genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Campus colonia Del Valle.
- Laboratorio de reactores anaerobios, Tecnológico de Ecatepec.

3.2 Materias primas

La investigación se realizó utilizando vinazas de alcohol de caña provenientes de la planta alcoholera del ingenio de La Gloria, La Gloria, Úrsulo Galván, Ver. y el compost agotado de champiñón se obtuvo de la empresa Riojal S.A. de C.V.

3.3 Extracción y cuantificación de proteínas de compost agotado

3.3.1 Limpieza del compost agotado de champiñón

La etapa de extracción se realizó en el Instituto de Ciencias Básicas. El compost agotado que se utilizó es residuo de una agroindustria productora de champiñones compuesto de paja de trigo (65%), pollinaza (25%), bagazo de caña de azúcar (9%), urea (1%) y con una cobertura de turba y piedra caliza de 4 cm de espesor envueltos en paquetes de plástico. Este residuo fue sometido a un proceso de limpieza-selección para obtener la paja de trigo, lugar donde crece el micelio, que es la materia prima utilizada en la extracción acuosa de lacasas. A un paquete de compost se le retiró el plástico con el que es cubierto en la parte superior del paquete, de igual manera se separó la tierra de cobertura, e impurezas tales como pequeñas piedras, seleccionando únicamente la *paja* del compost denominándolo “*compost acondicionado*” (Figura 3.1).



Figura 3.1 a) Paquete de compost agotado de champiñón (CAC), b) CAC acondicionado. (Imagen propia)

3.3.2 Extracción acuosa de enzimas por lixiviación.

Una vez acondicionado el compost se tomaron muestras de 20 g por triplicado para realizar la extracción acuosa por lixiviación de acuerdo a lo descrito por Mayolo-Deloisa *et al.* (2009), con algunas modificaciones en la relación compost:agua y tiempo de extracción como se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Condiciones de preparación de lixiviado de compost agotado de champiñón.

Temperatura	Relación Compost: Agua	Tiempo
4 °C	1:4	24 h
4 °C	1:4	48 h
4 °C	1:4	72 h
4 °C	1:4	96 h
4 °C	1:4	120 h
4 °C	2:3	24 h
4 °C	2:3	48 h
4 °C	2:3	72 h
4 °C	2:3	96 h
4 °C	2:3	120 h

Una vez que se realizó la extracción, se hizo una separación mecánica de la mezcla para asegurar la remoción de residuos de lodo y partículas del compost. El extracto se sometió a 2 decantaciones estáticas en un vaso de precipitados donde permaneció 20 minutos, a continuación, se realizó el vaciado de la capa superior del líquido a otro vaso de precipitado hasta un nivel por encima de los lodos depositados en el fondo del recipiente y finalmente se filtró, mediante un colador de aluminio cubierto con triple capa de una malla de tela (gasa). Este material se centrifugó a 6000 rpm a 4°C durante 15 min en una centrifuga MIKRO 220R, marca Hettich, este líquido resultante es el extracto purificado (figura 3.3).

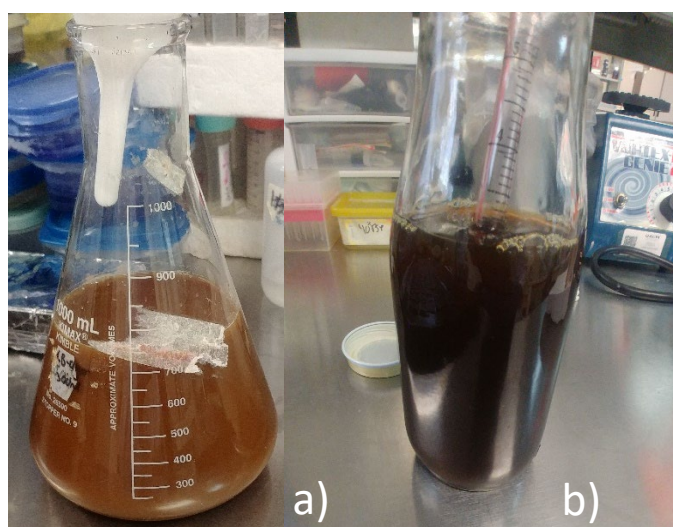


Figura 3.2 Extracto enzimático a) crudo b) purificado

3.3.3 Determinación de la concentración y actividad enzimática del extracto purificado.

Después del proceso de purificación se determinó la actividad enzimática para establecer cuáles eran las mejores condiciones de extracción, mediante la oxidación de 2,2'-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) (ABTS) de acuerdo con Othman *et al.*, (2018) con algunas modificaciones. Se midió el cambio de absorbancia en un espectrofotómetro Genova MK3 de la marca Jenway a 420 nm durante 3 minutos. Se preparó buffer de acetatos a pH 4.5, a partir de la adición de

una solución de ácido acético 0.1M y acetato de sodio 0.1M, y se ajustó la solución con NaOH 1 M. Posteriormente, se preparó directamente en la cubeta del espectrofotómetro, la reacción y se midió el cambio de absorbancia. Para cada experimento se agregó 1.8 mL de buffer de acetatos, 0.1 mL de la solución de ABTS 20 mM y 0.1 mL de extracto purificado diluido 1:50 o 1:100 con agua. Para determinar la actividad enzimática se dedujo la siguiente expresión a partir de la ley de Beer:

$$\Delta A = \varepsilon l \frac{\Delta C}{t} \quad (3.1)$$

Reacomodando y suponiendo que la $l = 1\text{cm}$ debido al tamaño de la cubeta se obtiene

$$\Delta C = \frac{1}{\varepsilon} \frac{\Delta A}{t} \quad (3.2)$$

Donde ε es el coeficiente de extinción ($\varepsilon = 36000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para ABTS), t es el tiempo, ΔA es el cambio en la absorbancia y ΔC el cambio en la concentración. Una unidad de actividad 1U fue definida como la cantidad de enzima requerida para la oxidación de 1 μmol de ABTS por minuto, se seleccionó el mejor método de extracción con los resultados obtenidos de la concentración y actividad enzimática de los extractos.

Una vez determinada las mejores condiciones, se realizó una nueva extracción para obtener más extracto purificado para los análisis posteriores. Una parte del extracto se almacenó a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un congelador horizontal con puerta sólida de capacidad de 120 L, marca *Torrey modelo CH5*, hasta su utilización y la otra parte fue liofilizada.

Una vez obtenido el nuevo extracto se determinó la concentración mediante el método de Bradford utilizando albumina de suero bovino (BSA) como estándar. (Bradford, 1976). Se pesaron 0.01 g de albúmina de suero bovino y se disolvió en 1 mL de agua destilada. Se realizaron diluciones para obtener una curva estándar con concentración de 2, 1.75, 1.5, 1.25, 1 y 0.75 mg/mL. Para cada dilución se realizó una nueva dilución 1:10 con agua destilada, se tomaron 10 μL de cada dilución y de la muestra, y se colocaron en un pozo por triplicado en una placa de 96 pozos, se agregaron 250 μL de reactivo de Bradford y se leyó la placa a 595 nm en un espectrofotómetro de placas modelo Elx800 marca BioTek.

Una vez realizada la lectura, a partir de la curva estándar se calculó la concentración de proteínas en el extracto purificado.

3.3.5 Extracto liofilizado

Alícuotas de 35 mL del extracto purificado, fueron colocadas en tubos cónicos para centrifuga de 50 mL y se congelaron durante 24 h a -80°C , posteriormente se destaparon los tubos y colocaron en frascos especiales para la liofilización. Posteriormente los frascos fueron conectados al equipo de secado en frío FreeZone 6 liter de Labconco durante 48 h. Finalmente, se recolectó el polvo y se almacenó a -4°C hasta su utilización.

3.4 Caracterización molecular de la enzima

La caracterización molecular se llevó a cabo en el laboratorio 1 de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

3.4.1 Identificación de la enzima lacasa en el extracto purificado y liofilizado

Para poder identificar la enzima lacasa se realizaron 2 pruebas en las cuales se determinó los diferentes pesos moleculares de las proteínas contenidas en el extracto purificado mediante un gel de poliacrilamida desnaturalizante y se determinó su actividad oxidante mediante un zimograma a partir de un gel de poliacrilamida no desnaturalizante o nativo; posteriormente se analizaron los geles mediante el software ImageLab 6.0.1 de BioRad.

3.4.2 Identificación de fracciones proteicas

Para determinar los diferentes pesos moleculares de las proteínas contenidas en el extracto purificado se procedió a concentrar las muestras mediante 2 técnicas diferentes, precipitación por sulfato de amonio y precipitación por ácido tricloroacético (TCA).

Para la concentración por sulfato de amonio se realizó el siguiente procedimiento: Se tomaron 3 alícuotas del extracto purificado de 1 mL en tubos eppendorf, posteriormente se agregaron la cantidad necesaria de sulfato de amonio para llevar a la saturación del medio al 60% posteriormente, se dejó reaccionar por 30 min, y

se centrifugó a 14000 rpm y 4 °C durante 15 min en una centrífuga MIKRO 220R, marca Hettich, una vez obtenida una pastilla en el fondo del tubo eppendorf se recuperó el sobrenadante en otro tubo y se lavó dos veces la pastilla obtenida con acetona fría para eliminar el exceso de sulfato de amonio, cada lavado se centrifugó a la misma velocidad, temperatura y tiempo antes mencionados. El sobrenadante obtenido de la primera centrifugación se llevó al 75% de saturación y se repitió el proceso de recuperación de la pastilla y sobrenadante, finalmente el sobrenadante de la segunda centrifugación se saturó al 90% con sulfato de amonio y se repitió el proceso de recuperación de pastilla, el sobrenadante final fue desechado. Al finalizar los lavados se retiró la mayor cantidad de acetona posible y se dejó secando la pastilla formada, después de 15 min se resuspendió en agua (Koontz, 2014).

Para la precipitación con TCA se tomaron 3 alícuotas del extracto purificado de 1 mL en tubos eppendorf, posteriormente se agregaron 100, 200, 300 μ L de ácido TCA al 10%, se dejó reaccionar por 30 min, y se centrifugó a 14000 rpm y 4 °C durante 15 min, una vez obtenida una pastilla en el fondo del tubo eppendorf se desechó el sobrenadante y se lavó dos veces con acetona fría para eliminar el exceso de TCA, cada lavado se centrifugó a la misma velocidad, temperatura y tiempo antes mencionados. Al finalizar los lavados se retiró la mayor cantidad de acetona posible y se dejó secando la pastilla formada, después de 15 min se resuspendió en agua (Koontz, 2014).

Posteriormente, se cargaron 45.88 μ g de enzimas de los extractos concentrados en un gel poliacrilamida-SDS desnaturalizante y se realizó una electroforesis de acuerdo con Perry *et al.* (1993) con algunas modificaciones, se desnaturalizaron las proteínas por calentamiento a 100 °C en un baño de agua por 5 min. Se utilizó un gel de poliacrilamida-SDS al 12%, posteriormente se corrió en una cámara de electroforesis Mini Trans-Blot cell module de Bio-Rad a 120V durante 1 hora y 30 min, se tiñó con azul de Coomassie durante 2h. Posteriormente, se destiñó con una solución de ácido acético y metanol para la identificación del perfil electroforético de los extractos concentrados.

3.4.3 Identificación de la actividad oxidante en las fracciones proteicas

Una vez determinado el perfil electroforético del extracto concentrados se determinó la actividad oxidante mediante una electroforesis de acuerdo con Nieto-López *et al.* (2016) con algunas modificaciones, se prepararon 2 geles al 10% y 12% de poliacrilamida, los cuales se cargaron con extracto liofilizado rehidratado en concentración 10 mg/mL, se corrió la electroforesis a 4°C 125 V y se tiño con una solución buffer de acetatos 0.1M (pH 4.5) 5mM 2,2'-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) (ABTS).

3.4.4 Determinación de la actividad optima y estabilidad enzimática

Para determinar el pH y temperatura óptimo de los extractos purificado y liofilizado se utilizó la metodología de superficie de respuesta, en la cual se realizan una serie de experimentos en combinación diferentes condiciones de temperatura y pH con los cuales se genera una superficie de acuerdo a la actividad alcanzada en esa combinación, la actividad de la lacasa fue calculada utilizando 1.8 ml buffer de acetatos con los valores indicados de pH y temperaturas, 0.1 ml de ABTS 20 mM y .01 ml del extracto enzimático en dilución 1:10 o 1:20 posteriormente se analizó el cambio de absorbancia durante 3 min. Las condiciones de prueba se muestran en la tabla 3.2, para la determinación de los valores óptimos se analizó los resultados obtenidos de la actividad enzimática mediante el software Design Expert 11.

Tabla 3.2 Superficie de respuesta pH, temperatura

Factor	Nombre	Unidades	Mínimo	Máximo	Codificado bajo	Codificado alto	Promedio
A	pH		3.02	6.98	-1 ↔ 3.6	+1 ↔ 6.4	5.00
B	Temperatura	°C	9.92	70.08	-1 ↔ 18.7	+1 ↔ 61.2	40.00

Se ajustó el pH de los buffers con una solución 1M de hidróxido de sodio (NaOH) y con ácido clorhídrico (HCl) diluido 1:10. La actividad relativa de las lacasas fue calculada con la actividad máxima de la enzima representando el 100% de la actividad relativa. El efecto del pH en la estabilidad del extracto enzimático fue calculado mediante la verificación de la actividad enzimática remanente después de incubar el extracto en los buffers mencionados con anterioridad a una temperatura de 25 °C por 125 h se tomaron alícuotas y se repitió el procedimiento anteriormente descrito para la determinación de la actividad enzimática. La termoestabilidad de la enzima fue determinada midiendo la actividad residual de la enzima después de exponerla a diferentes temperaturas por 2h. Posteriormente, se tomaron alícuotas de las muestras en intervalos regulares de 30 min. En orden para medir la actividad relativa (%) con respecto al control bajo condiciones estándar (pH 4.5 y 25°C). Además, se calculó el coeficiente de desactivación y la vida media de la enzima en las diferentes condiciones mediante la función de desactivación siguiente:

$$E_{act}(t) = E_{act}(0)e^{-k_{des}t} \quad (3.3)$$

El ajuste se realizó con el software MATLAB R2018a y la función lsqcurvefit la cual ajusta los datos experimentales mediante la metodología de mínimos cuadrados.

Con base en los resultados obtenidos en la superficie de respuesta y su estabilidad enzimática, se pudo determinar el mejor extracto a utilizar y determinar los parámetros de operación en la degradación de las vinazas

3.5 Caracterización vinazas.

Las vinazas fueron filtradas y esterilizadas en autoclave a 121 °C por 20 min y conservado a 4 °C hasta su uso.

3.5.1 pH

El pH se determinó por triplicado en muestras de 50 mL, colocadas en vasos de precipitado, utilizando un potenciómetro modelo HI4521, marca Hanna Instruments con un electrodo de pH combinado de vidrio HI1131P.

3.5.2 Determinación de fenoles totales.

Se utilizó la metodología descrita por Bobo-García *et al.* (2015), con algunas modificaciones. En una placa de 96 pozos se colocaron 20 μL de muestra diluida adecuadamente (1:20), se agregaron 100 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido en relación 1:5 con agua bidestilada, se agitó 3 min y posteriormente se adicionaron 80 μL carbonato de sodio al 10%. Se dejó reaccionar por 120 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de la reacción se midió la absorbancia a una longitud de onda de 690nm en un espectrofotómetro de placas modelo Elx800 marca BioTek. Se utilizó ácido gálico para la curva de calibración.

3.5.3 Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO)

Se utilizó la metodología descrita por American Public Health Association (1998). Se tomaron 3 alícuotas de 2 mL de muestra previamente diluidas 1:100 con agua destilada, se agregó 1 mL de la solución digestora y 2 mL de la solución catalítica. Posteriormente, se homogenizó la mezcla y se colocó en un reactor para la digestión a 150°C durante 2 h. Una vez enfriados los tubos se calibró el espectrofotómetro previamente ajustado a 620 nm y se realizó las mediciones de absorbancia (APHA, 1998).

3.6 Pruebas de degradación de vinazas

Se esterilizaron 14 frascos en autoclave a 121°C por 20 min. Se prepararon 200 mL de vinazas en concentraciones de 10%, 30% y 50%. Posteriormente, se agregaron 50 mL de vinazas diluidas por triplicado a los frascos estériles y 200 mg de lacasas liofilizadas. Se incubó a temperatura ambiente y con una agitación de 150 rpm. Se midió pH inicial, DQO inicial, fenoles totales iniciales y se tomó alícuotas cada día durante 5 días. Una vez obtenidas las alícuotas se llevaron a las diluciones adecuadas para la medición de DQO y fenoles totales. Además, se agregó 50 mL de vinazas sin diluir y 200 mg de lacasas liofilizadas y se repitió el procedimiento anteriormente descrito.

Posteriormente se analizó el porcentaje de remoción considerando los valores iniciales de la DQO y fenoles totales mediante la siguiente ecuación para DQO:

$$\frac{DQO_{inicial} - DQO_{final}}{DQO_{inicial}} \times 100 \quad (3.4)$$

Y para fenoles totales :

$$\frac{Fenoles_{inicial} - Fenoles_{final}}{Fenoles_{inicial}} \times 100 \quad (3.5)$$

con el fin de identificar el mejor rendimiento en la degradación de los contaminantes y observar posibles efectos de inhibición.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Obtención del extracto enzimático purificado

En la figura 4.1 se muestran los promedios de los resultados obtenidos de la actividad enzimática con respecto al tiempo de extracción. La relación 2:3 compost:agua favoreció una mayor actividad enzimática debido al incremento de la cantidad de compost en el mismo volumen de dilución y por consiguiente la cantidad de proteínas en el extracto enzimático. La desviación estándar en la actividad enzimática de las diferentes condiciones de extracción es generada por la heterogeneidad del compost debido a un crecimiento no uniforme del micelio de champiñón en el compost, además se debe considerar que el compost es una mezcla de turba, caliza y fibras de paja, lo que genera un limitante técnica para estandarizar la concentración de proteínas y la actividad enzimática de los diferentes extractos. La relación 2:3 por 72 h fue utilizada en los estudios posteriores.

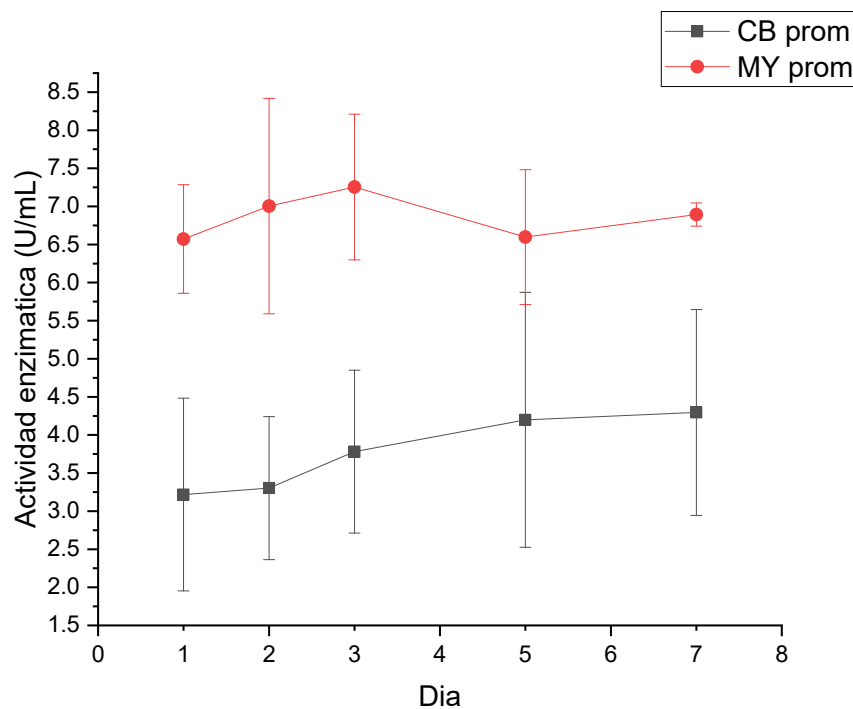


Figura 4.1 Actividad enzimática vs tiempo de extracción.(■) relación 1:4 (compost: agua) y (●) relación 2:3 (compost: agua)

Una vez que se seleccionó la mejor condición de extracción, se realizó una nueva extracción y se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford. La concentración de proteína presente en el extracto purificado de este trabajo es 1.16 g/L, el cual está dentro del rango obtenido por Wood (1980) pero es menor a lo obtenido por Matcham y Wood (1992), 1.88 g/L y 17.28 g/L respectivamente. Ambos investigadores trabajaron con cepas de champiñón (*Agaricus bisporus*), Wood (1980) realizó un cultivo líquido del champiñón para posteriormente extraer las proteínas del sobrenadante después de 14 días de haber inoculado, por su parte Matcham y Wood (1992) inocularon el champiñón en un medio de cultivo sólido (compost) para extraer las proteínas después de 2 semanas de haber iniciado el proceso mediante la adición de 6 litros de agua destilada a 3 Kg de compost (relación compost:agua 1:2). La diferencia entre las concentraciones de proteínas entre los 3 trabajos es atribuida a los diferentes medios de crecimiento, condiciones de extracción de las proteínas y al corto tiempo de inoculación del champiñón en el medio, debido a que en la etapa de colonización del micelio en el compost y los medios de crecimiento líquido hay una mayor secreción de enzimas y por lo tanto una mayor actividad enzimática, a diferencia, el compost utilizado en este trabajo ya cumplió su ciclo de vida después de 3 etapas o ciclos de corte (55 a 65 días después de la inoculación), además, se ha reportado que durante la etapa de frutación, previa a la etapa de corte, hay una pérdida de la actividad enzimática la cual disminuye hasta en 80% (Vos *et al.*, 2017; Bonnen *et al.*, 1994).

4.2 Identificación de la enzima lacasa en el extracto purificado

4.2.1 Identificación de las fracciones proteicas

En la figura 4.2 se aprecian las diferentes concentraciones utilizadas, en los carriles 2, 3 y 4 se aprecia el extracto concentrado con sulfato de amonio al 60%, 75% y 90% respectivamente y en los carriles 7, 8 y 9 se aprecia el extracto concentrado mediante TCA en diferentes concentraciones 10%, 15% y 20% respectivamente. Los carriles 2, 3 y 4 presentan distintas bandas a diferencia de los carriles 7, 8, y 9, esto se debe a que la concentración con sulfato de amonio es una precipitación parcial, cada porcentaje de saturación del medio con sulfato precipitará diferentes

proteínas, mientras que la concentración por TCA es una precipitación total por lo que el patrón de bandas se repite en los carriles 7, 8 y 9. En los carriles 3, 7, 8 y 9 se puede apreciar una banda bien definida que corresponde al peso molecular de 58 kDa y en los carriles 4, 7, 8 y 9 se identifica una banda correspondiente al peso molecular de 50 kDa. Además, se identificaron otras fracciones proteicas sin embargo están fuera del rango de las lacasas(>50kDa) (Senthivelan *et al.*, 2016). Perry *et al.* (1993) estudiaron las diferentes proteínas del champiñón encontrando dos lacasas (*lcc1* y *lcc2*) y dependiendo del medio de recuperación de las proteínas analizado había una mayor concentración de una en relación a la otra, en el compost la enzima *lcc2* está en mayor cantidad. La lacasa *lcc2* es una proteína con un peso molecular de 58 kDa, el cual es un peso similar al encontrado en este trabajo, por lo cual podría indicar que la banda de 58 kDa de este trabajo corresponde a la lacasa *lcc2*.

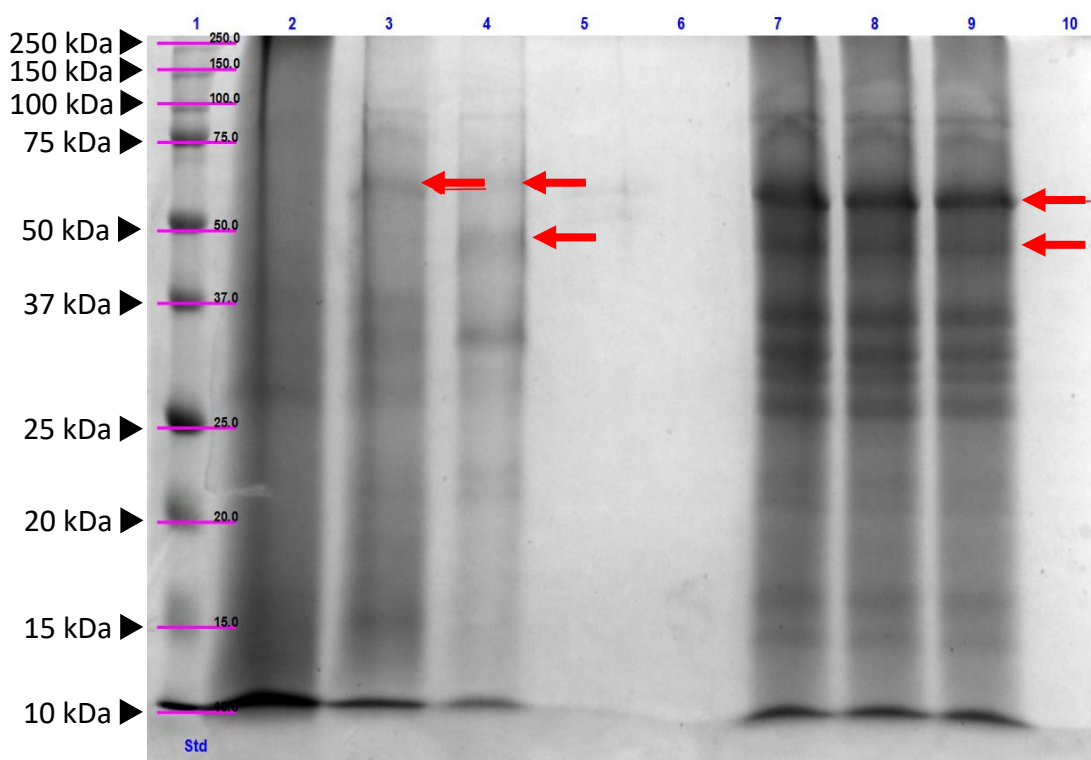


Figura 4.2 Determinación de los pesos moleculares de las proteínas del extracto concentrado por precipitaciones mediante sulfato de amonio (Carril 2, 3 y 4) y ácido tricloroacético (TCA) (Carril 7, 8 y 9) del compost agotado de champiñón a través SDS-PAGE.

Para identificar los efectos oxidativos de las proteínas anteriores se realizó un zimograma. En la figura 4.3, se muestra el zimograma a partir de una electroforesis con un gel de poliacrilamida al 10 (a) y 12% (b) nativo no desnaturalizante para conservar la actividad enzimática.

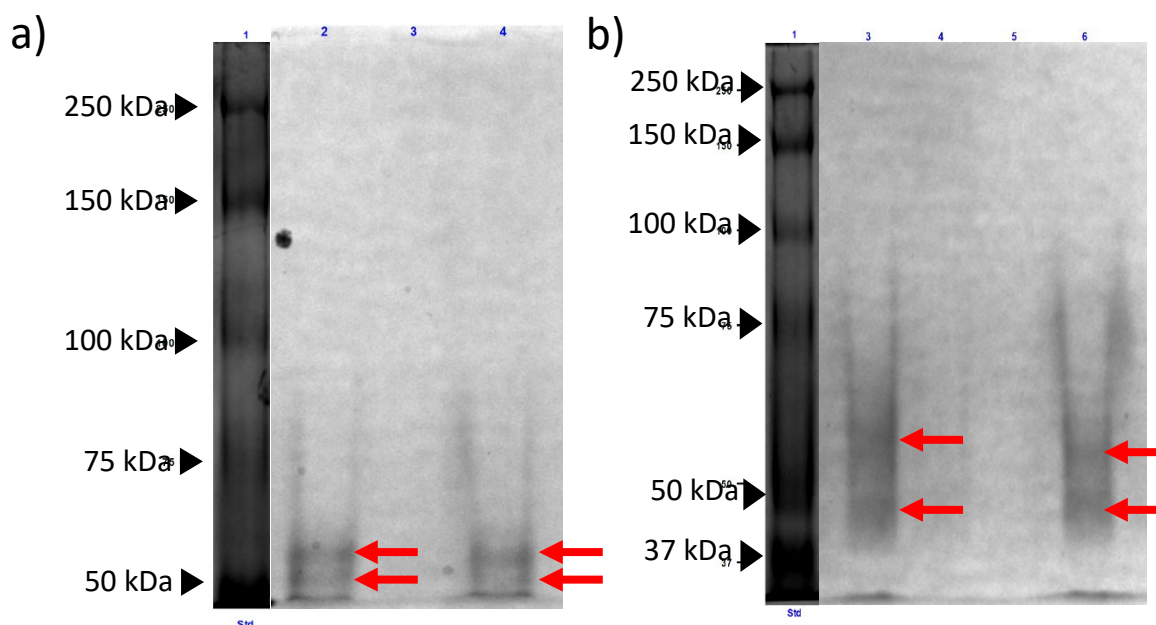


Figura 4.3 Zimograma actividad enzimática, a) Gel PAGE nativo 10%, b) Gel PAGE nativo 12%.

En la figura 4.3a, se aprecian el marcador molecular en el carril 1, y en el carril 2 y 4 del gel 2 bandas en los diferentes carriles con coloración indicando una oxidación del reactivo utilizado para determinar la actividad enzimática, la banda correspondiente al peso de 58 kDa y la cual fue identificada como lacasa *lcc2*. Además, se encuentra una enzima con actividad enzimática con un peso de 50 kDa, esta banda puede ser la misma enzima con un avance en la degradación de esta debido a la pérdida de péptidos que se refleja en el tamaño menor o una enzima diferente con la capacidad de oxidar. En la figura 4.3b se aprecia de igual manera las diferentes proteínas del marcador de peso molecular en el carril 1 y en el carril 2 y 5 nuevamente se aprecian las bandas de 58 kDa y 50 kDa con actividad oxidante las cuales corresponden a la lacasa *lcc2* encontrada en la figura 4.2. y el gel de poliacrilamida al 10% nativo.

4.3 Determinación de la actividad óptima y estabilidad enzimáticas

Con el fin de identificar y optimizar las mejores condiciones de temperatura y pH para las enzimas oxidativas (*lcc2* y enzima nueva) se realizó una superficie de respuesta. En la figura 4.4 se muestran las mejores condiciones de temperatura y pH para obtener una mayor cantidad de actividad enzimática oxidativa. Se seleccionaron los puntos de tal manera que el pH se analizara desde 3 hasta 7 debido a que las lacasas tiene una mayor actividad oxidativa en medios ácidos, así mismo se seleccionaron los puntos para analizar la temperatura desde 10 hasta 70°C.

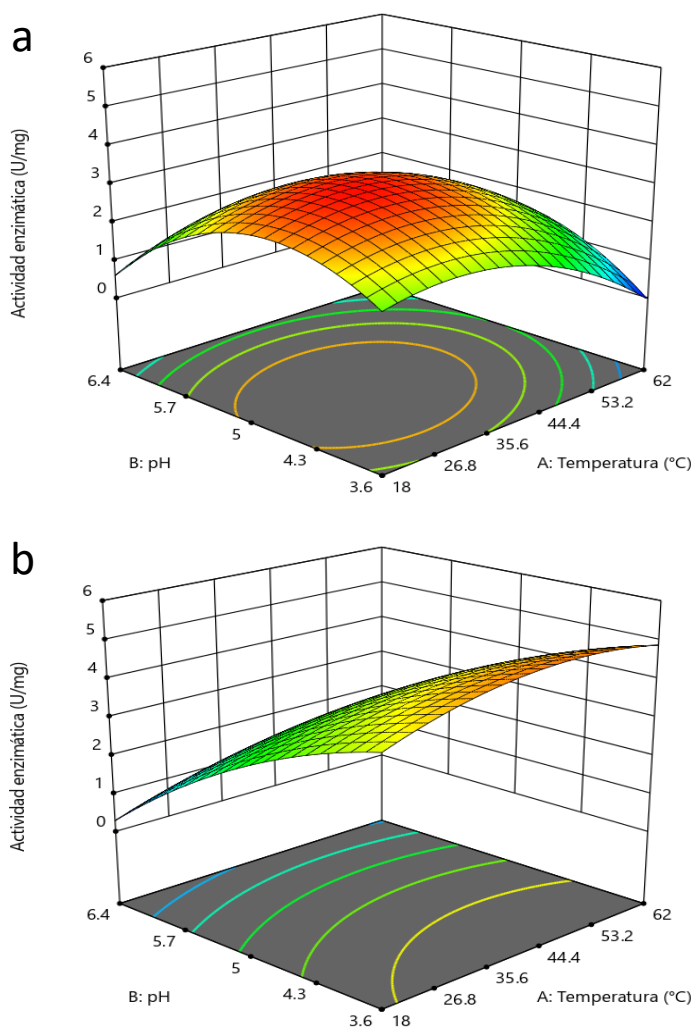


Figura 4.4 Superficie de respuesta de la actividad enzimática a diferentes pH y temperaturas a) extracto purificado y b) extracto liofilizado.

Los resultados en la figura 4.4a muestran que el extracto enzimático purificado tiene mayor actividad en el rango de pH de 4-5.5, y el pH óptimo es 4.8 y el extracto liofilizado (figura 4.4b) en el rango de pH de 3-4, con pH óptimo de 3.6. Indicando que la enzima tiene actividad preponderante en medio ácido. Además, por encima de pH 5.7 la actividad decrece rápidamente, volviéndose completamente inactiva a pH de 7 en ambos extractos. Lacasas de hongos basidiomicetos han demostrado una actividad oxidante más alta en el rango de pH de 3.5 a 5.0 cuando los sustratos utilizados son donadores orgánicos de átomos de hidrogeno (ej. ABTS) (Kwang-Soo y Chang-Jin, 1998; Baldrian, 2005). Dicho comportamiento puede ser explicado por 2 efectos. El primero es que la ionización del sustrato en la solución decrece rápidamente con el incremento de pH dificultando el intercambio de iones necesarios para la oxidación. El segundo es que el incremento de pH reduce la cantidad de iones hidroxilo que se unen al sitio activo de las lacasas como cosustrato, disminuyendo la velocidad de la reacción enzimática catalizada. En general la temperatura óptima para una mayor actividad de las lacasas puede diferir de hongo a hongo, con un rango para la mayoría de las lacasas comenzando en 50-70 °C (El-Batal et al., 2015). El rango de temperatura encontrado en este trabajo donde se tiene una mayor actividad enzimática oxidativa es de 18 a 40 °C para el extracto purificado (figura 4.4a) mientras que para el extracto liofilizado (figura 4.4b) tiene un rango más amplio que va desde los 30°C hasta los 53.2°C, sin embargo, las temperaturas optimas no varían siendo 33.11°C y 34.238 °C del extracto purificado y liofilizado respectivamente, esto se debe posiblemente a que las condiciones estándar para el crecimiento del champiñón oscilan entre 16-19°C, por lo que la temperatura de trabajo de las enzimas secretadas deben estar cercanas a la temperatura crecimiento del champiñón (Largeteau *et al.*, 2011). El rango de la temperatura óptima es adecuado para procesos llevados a temperatura ambiente con el fin de minimizar la energía requerida para el tratamiento de las vinazas. Además, el efecto de la temperatura en la actividad enzimática es menor en comparación con el pH en la enzima liofilizada.

4.3.1 Efecto del pH sobre la estabilidad enzimática.

En la figura 4.5 se muestra la pérdida de la actividad enzimática de los extractos purificado (4.5a) y liofilizado (4.5b) durante 125 h de incubación frente a diferentes pH con el fin de establecer el coeficiente de desactivación de la enzima.

Como se puede observar la mayor estabilidad enzimática se presenta en valores cercanos a los pH óptimos de cada uno de los extractos (4.8 y 3.6) al conservar más del 20 y 30% de su actividad inicial para los extractos purificados y enzimáticos respectivamente después de 125 h. En ambos casos al incrementa o disminuir el pH óptimo hay un decremento en la actividad enzimática y una aceleración en la perdida de esta. Este comportamiento es asociado a la desnaturalización estructural de la enzima debido al intercambio de los enlaces disulfuro que unen los péptidos que conforman la enzima además de la pérdida del sitio catalítico (Baldrian, 2005).

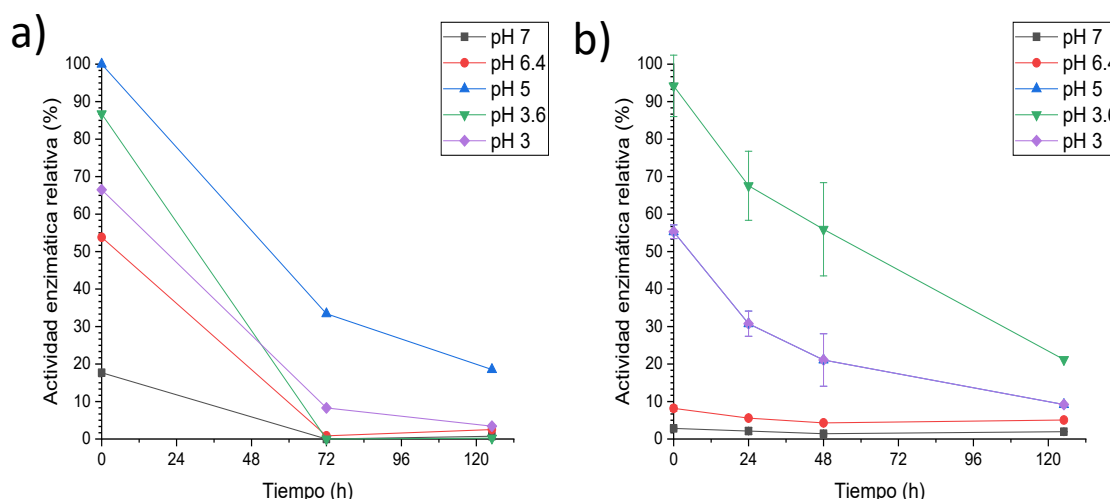


Figura 4.5 Pérdida de la actividad enzimática a diferentes pH después 125 horas de incubación a) extracto enzimático purificado b) extracto enzimático liofilizado.

Como se aprecia en la tabla 4 el extracto liofilizado tiene una mayor vida media comparado con el extracto purificado y esto se refleja en el coeficiente de desactivación (k_{des}) más pequeño, esto nos indica una mayor estabilidad enzimática del extracto purificado.

Tabla 4.1 Coeficiente de desactivación y vida media de los extractos enzimáticos pH óptimo y temperatura de 18 °C

Coeficiente de desactivación (k_{des})		Vida media $t_{1/2}$
Extracto purificado	0.0118 h ⁻¹	58.8 h
Extracto liofilizado	0.0141 h ⁻¹	49.15 h

4.3.2 Efecto de la temperatura sobre la estabilidad enzimática

En la figura 4.6 se muestra la pérdida de la actividad enzimática de los extractos purificado (4.5a) y liofilizado (4.5b) durante 2 h de incubación a diferentes temperaturas con el fin de establecer el coeficiente de desactivación de la enzima. Como se puede observar la mayor estabilidad se da a temperaturas ambientales para ambos extractos enzimáticos debido a la conservación de más del 70% de la actividad enzimática y a temperaturas de 40 °C solo en el extracto liofilizado. Sin embargo, cualquier aumento en la temperatura en el periodo de incubación redujo rápidamente la actividad hasta perder completamente su capacidad oxidativa a temperaturas superiores de 60°C. Los resultados del extracto liofilizado son parecidos al encontrados por Zheng *et al.*, (2017) donde la lacasa de *T. orientalis* perdió el 40% de su actividad original después de un periodo de incubación de 120 min a 50 °C. Fuera de la temperatura de crecimiento del champiñón (>19°C) hay una pérdida rápida de la actividad enzimática de los extractos y se atribuye a la destrucción de los enlaces disulfuro de los péptidos en el interior de la enzima generando la pérdida del sitio catalítico (Largeteau *et al.*, 2011).

En la tabla 4.2 se puede apreciar los valores calculados del coeficiente de desactivación y la vida media calculados para las diferentes temperaturas de los extractos enzimáticos. Se puede apreciar una rápida disminución de la vida media de los extractos al aumentar la temperatura y es más termoestable el extracto enzimático purificado al tener un valor mayor de vida media a temperatura ambiente.

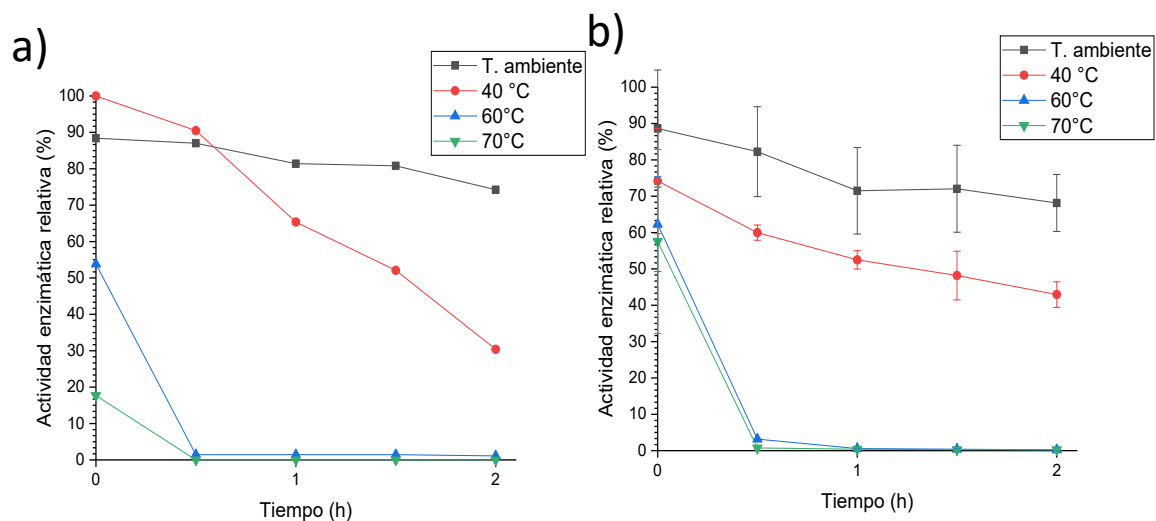


Figura 4.6 Perdida de la actividad enzimática a diferentes temperaturas después de 2h de incubación a) extracto enzimático purificado b) extracto enzimático liofilizado.

Tabla 4.2 Coeficiente de desactivación y vida media de los extractos enzimáticos a diferentes temperaturas y pH de 5.

	Temperatura °C	Coeficiente de desactivación (k_{des})	Vida media $t_{1/2}$
Extracto liofilizado	Ambiental	0.1613 h^{-1}	4.29 h
	40	0.301 h^{-1}	2.3 h
	60	5.92 h^{-1}	0.116 h
	70	8.68 h^{-1}	0.079 h
Extracto purificado	Ambiental	0.0757 h^{-1}	9.156 h
	40	0.4616 h^{-1}	1.5 h
	60	12.76 h^{-1}	0.054 h
	70	12.4 h^{-1}	0.055 h

La diferencia de estabilidad y actividad enzimática entre los diferentes extractos no se puede atribuir a los tratamientos recibidos dado que en este trabajo la enzima liofilizada presenta una mayor actividad y estabilidad enzimática y contradice a lo descrito por Kasrper *et al.* (2013), los cuales hacen una recopilación acerca de la

disminución de la actividad y estabilidad enzimática por el efecto de la liofilización debido a los cambios físicos en el medio durante el proceso de congelación, secado y rehidratación.

Por lo que el incremento puede ser atribuido a el tiempo transcurrido entre la cosecha del champiñón y la extracción de las enzimas o a las enzimas y su concentración en los diferentes extractos.

Se utilizo el extracto enzimático liofilizado debido a una mayor actividad y estabilidad enzimática del extracto liofilizado en las condiciones naturales de las vinazas.

4.4 Evaluación de la actividad enzimática en la reducción del potencial contaminante.

4.4.1 Efecto de la acción de lacasas sobre la reducción de la DQO

La figura 4.7a muestra el efecto de la actividad enzimática oxidativa en la disminución de la demanda química de oxígeno (DQO) por efecto de las lacasas del extracto liofilizado.

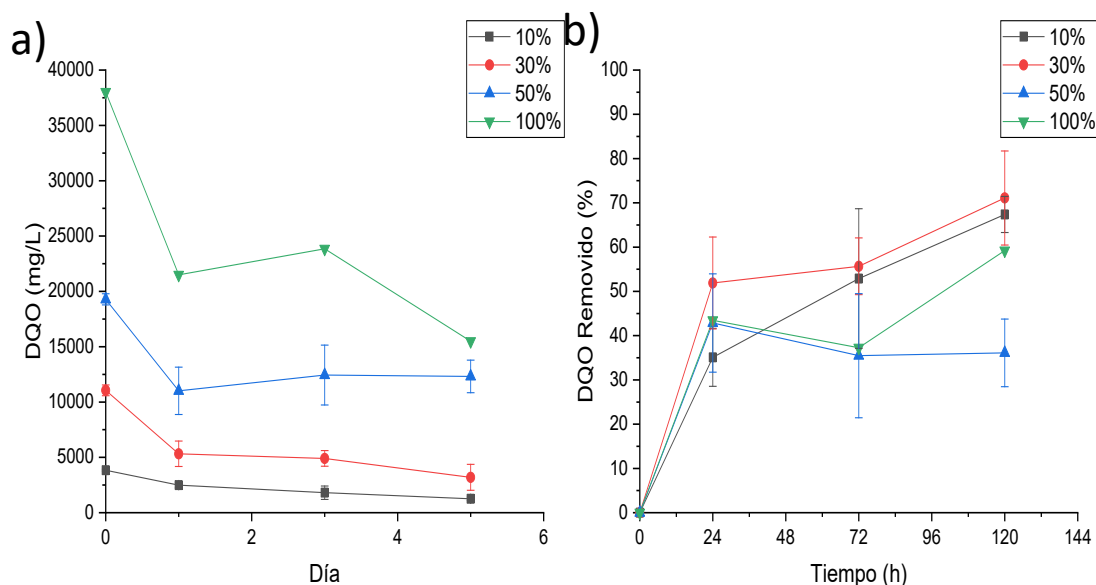


Figura 4.7 Disminución de DQO en 5 días a) DQO inicial, día 1, 3 y 5 b) Porcentaje de remoción.

La concentración inicial de DQO fue 37, 18.5, 11.1, 3.7 g/L para las vinazas al 100, 50, 30 y 10% respectivamente, el mayor porcentaje de disminución se dio en las vinazas diluidas al 30% en el día 5, logrando una disminución en DQO de 67%, seguido por la dilución de 10% con una disminución de 60%. La dilución de 50% y la vinaza pura alcanzaron una disminución de 32% y 56% respectivamente. Estas tendencias indica una posible inhibición de sustrato debido a que la velocidad de la reacción incrementa al aumentar la concentración del sustrato, pero una vez alcanzado cierto límite, decrece la velocidad de reacción al seguir aumentando la concentración.

Los resultados en este trabajo están dentro de los rangos de disminución de la DQO, Vilar *et al.* (2018) alcanzan una disminución de DQO de 50% con una DQO inicial de 11.07 g/L mediante la inoculación del hongo *P. sajor-caju*, el cual libera enzimas entre ellas las lacasas, en un tratamiento combinado con oxidación electroquímica. Por otra parte, España-Gamboa *et al.* (2015) logran una disminución de 40% de DQO con un tratamiento de lacasas por medio de la inoculación del hongo *Trametes versicolor* en un reactor aireado con una concentración inicial de DQO de 110 g/L.

Aunque existe una diferencia en los tratamientos reportados en la literatura debido a la inoculación directa del hongo para una constante generación de enzimas y la variación de las concentraciones iniciales de DQO, el presente trabajo alcanza valores de remoción similares, debido a que las enzimas encargadas de la oxidación son las lacasas las cuales son recuperadas de un desecho industrial. Sin embargo, los resultados obtenidos en la disminución de la DQO quedan fuera de lo establecido en la actualización de la NOM-001-SEMARNAT-1996 en la cual se especifica los límites máximos para la deposición de residuos en suelo para infiltración y otros riegos de 0.210 g/L.

4.4.2 Efecto de la acción de lacasas sobre la reducción de la concentración de fenoles totales

En la figura 4.8 se muestra el comportamiento que tuvo la concentración de fenoles totales frente a la acción de las lacasas extraídas del compost agotado de champiñón liofilizado. La concentración inicial de fenoles fue 2300, 1200, 700, 300 mg/L en las diluciones de 100, 50, 30 y 10% de las vinazas respectivamente. La

mayor disminución se logró con la dilución de las vinazas al 50% el día 3 con una disminución del 62%, seguido por la dilución al 30% el día 3 con una disminución del 56%. La dilución de 10% y la vinaza pura lograron la mayor degradación en el día 5 con una disminución de 62% y 33% respectivamente.

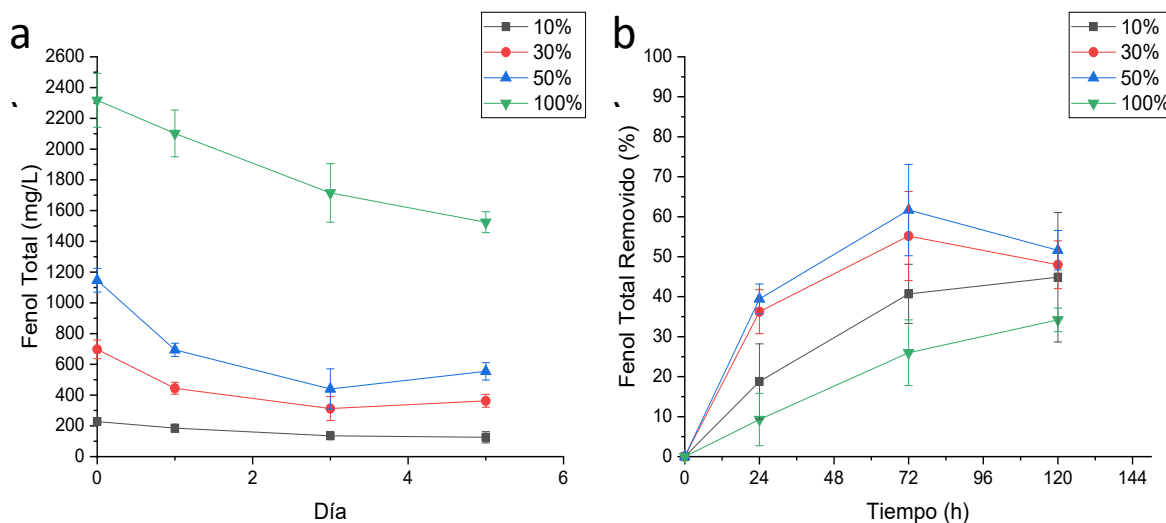


Figura 4.8 Disminución de fenoles totales en 5 días a) fenoles totales iniciales, día 1, 3 y 5 b) Porcentaje de remoción.

Los resultados de este trabajo están dentro de los rangos citados en la literatura, España-Gamboa *et al.* (2015) logran una disminución de 71% en fenoles totales con una concentración inicial de 10834 mg/L , con un tratamiento de lacasas por medio de la inoculación del hongo *Trametes versicolor*. Tapia-Tussel *et al.* (2015) alcanzan una disminución de fenoles totales en vinazas tratadas, con la inoculación del hongo *T. hirsuta*, de 85, 80, 54 y 58% en diluciones de 5,10, 15 y 20% respectivamente en 192h. Sin embargo, atribuye la disminución de los compuestos fenólicos a la sobreproducción de enzimas como la lacasas a concentraciones bajas ya que tienen un efecto inhibitorio en el crecimiento del hongo y por lo tanto en la generación de enzimas.

5. CONCLUSIONES

- A partir del lixiviado del compost agotado de champiñón sin liofilizar y liofilizado fue posible identificar dos enzimas tipo lacasas las cuales tienen una actividad enzimática oxidante.
- La metodología de superficie de respuesta permitió encontrar los valores óptimos de operación pH 3.7 y temperatura cercana a la ambiental, para ser utilizados en la degradación de las vinazas así como el extracto enzimático adecuado.
- Mediante la estabilidad enzimática se logró determinar el tiempo de operación del proceso y temperatura, los cuales fueron 5 días y temperatura ambiente con el fin de garantizar un 30% de actividad oxidante enzimática.
- Se alcanzó una disminución de hasta 62% en fenoles totales y 67% de la demanda química de oxígeno, sin producir un cambio significativo en el color.
- También se observó un efecto de inhibición por sustrato donde al incrementar la concentración del sustrato se afectó la velocidad de la reacción enzimática tanto para los fenoles totales como para la DQO.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aktaş, N., Çiçek, H., Ünal, A. T., Kibarar, G., Kolankaya, N., & Tanyolaç, A. (2001). Reaction kinetics for laccase-catalyzed polymerization of 1-naphthol. *Bioresource Technology*, 80(1), 29-36.
- APHA. (1983). *Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes*. United States Environmental Protection Agency. Cincinnati, USA.
- Arora, A., Seth, A., Dien, B. S., Belyea, R. L., Singh, V., Tumbleson, M. E., & Rausch, K. D. (2011). Microfiltration of thin stillage: Process simulation and economic analyses. *biomass and bioenergy*, 35(1), 113-120.
- ASOCAÑA. (2017). Las cifras del sector agroindustrial de la caña de azúcar colombiano y la producción de BioEtanol a base de caña de azúcar. Recuperado de <https://www.asocana.org/>.
- Baldrian, P. (2006). Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(2), 215-242.
- Barr, D. P., & Aust, S. D. (1994). Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environmental Science & Technology*, 28(2), 78A-87A.
- Belkacemi, K., Larachi, F., Hamoudi, S., & Sayari, A. (2000). Catalytic wet oxidation of high-strength alcohol-distillery liquors. *Applied Catalysis A: General*, 199(2), 199-209.
- Bertrand, B., Martínez-Morales, F., Tinoco-Valencia, R., Rojas, S., Acosta-Urdapilleta, L., & Trejo-Hernández, M. R. (2015). Biochemical and molecular characterization of laccase isoforms produced by the white-rot fungus *Trametes versicolor* under submerged culture conditions. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, 122, 339-347.
- Białas, W., Szymanowska, D., & Grajek, W. (2010). Fuel ethanol production from granular corn starch using *Saccharomyces cerevisiae* in a long term repeated SSF process with full stillage recycling. *Bioresource technology*, 101(9), 3126-3131.
- Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Vírveda, P., Marín-Arroyo, M. R., & Navarro, M. (2015). Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 204-209.

- Bonnen, A. M., Anton, L. H., & Orth, A. B. (1994). Lignin-degrading enzymes of the commercial button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(3), 960-965.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brijwani, K., Rigdon, A. & Vadlani, V.P. (2010). Fungal Laccases: Production, function, and applications in food processing. *Enzyme Research*, (2010), 1-10.
- Brown, A.M., Zhao, Z. & Grant, M.A. (2002). Expression and characterization of a recombinant multi-copper oxidase: laccase IV from *Trametes versicolor*. *Inorganica Chimica Acta*, 331(2002), 232-238.
- Cabrera-Díaz, A., Pereda-Reyes, I., Dueñas-Moreno, J., Véliz-Lorenzo, E., Díaz-Marrero, M. A., Menéndez-Gutiérrez, C. L., ... & Zaiat, M. (2016). Combined treatment of vinasse by an upflow anaerobic filter-reactor and ozonation process. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 33(4), 753-762.
- Campell, N., Reece J., Molles M., Urry L., Heyden Ro. (2007). *Biología*. Editorial Médica Panamericana. Séptima edición
- Chandra, R., Bharagava, R. N., & Rai, V. (2008). Melanoidins as major colourant in sugarcane molasses based distillery effluent and its degradation. *Bioresource Technology*, 99(11), 4648-4660.
- Chaudhari, P. K., Mishra, I. M., & Chand, S. (2008). Effluent treatment for alcohol distillery: Catalytic thermal pretreatment (catalytic thermolysis) with energy recovery. *Chemical Engineering Journal*, 136(1), 14-24.
- Chowdhary, P., Raj, A., & Bharagava, R. N. (2018). Environmental pollution and health hazards from distillery wastewater and treatment approaches to combat the environmental threats: a review. *Chemosphere*, 194, 229-246
- Christofolletti, C. A., Escher, J. P., Correia, J. E., Marinho, J. F. U., & Fontanetti, C. S. (2013). Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. *Waste Management*, 33(12), 2752-2761.
- Claus, H. (2003). Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch Microbiol*, 179, 145–150.
- Cruz Colín, M. D. R. (2003). Biodegradación del DDT,(1, 1, 1-tricloro-2, 2-bis (4-clorofenil) etano), en suelos agrícolas por el hongo de pudrición blanca *phanerochaete chrysosporium*.

- Durán, N., Rosa, M.A., D' Annibale, A. & Gianfreda, L. (2002). Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(2002), 907-931.
- Dutta, R. (2008). Fundamentals of biochemical engineering (No. 660.63 D8F8)
- Eggen, T. (1999). Application of fungal substrate from commercial mushroom production—*Pleurotus ostreatus*—for bioremediation of creosote contaminated soil. *International biodeterioration & biodegradation*, 44(2-3), 117-126.
- El-Batal, A. I., ElKenawy, N. M., Yassin, A. S., & Amin, M. A. (2015). Laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its application in synthesis of gold nanoparticles. *Biotechnology Reports*, 5, 31-39
- Escobar, J. C., Lora, E. S., Venturini, O. J., Yáñez, E. E., Castillo, E. F., & Almazan, O. (2009). Biofuels: environment, technology and food security. *Renewable and sustainable energy reviews*, 13(6-7), 1275-1287.
- España-Gamboa, E., Vicent, T., Font, X., Dominguez-Maldonado, J., Canto-Canché, B., & Alzate-Gaviria, L. (2017). Pretreatment of vinasse from the sugar refinery industry under non-sterile conditions by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor and its effect when coupled to an UASB reactor. *Journal of biological engineering*, 11(1), 6.
- España-Gamboa, E., Vicent, T., Font, X., Mijangos-Cortés, J., Canto-Canché, B., & Alzate, L. (2015). Phenol and color removal in hydrous ethanol vinasse in an air-pulsed bioreactor using *Trametes versicolor*. *Journal of Biochemical Technology*, 6(3), 982-986.
- Ferreira, L. F. R., Aguiar, M. M., Messias, T. G., Pompeu, G. B., Lopez, A. M. Q., Silva, D. P., & Monteiro, R. T. (2011). Evaluation of sugar-cane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(1), 132-137.
- Fuess, L. T., & Garcia, M. L. (2014). Implications of stillage land disposal: a critical review on the impacts of fertigation. *Journal of Environmental Management*, 145, 210-229
- Fuess, L. T., Garcia, M. L., & Zaiat, M. (2018). Seasonal characterization of sugarcane vinasse: Assessing environmental impacts from fertirrigation and the bioenergy recovery potential through biodigestion. *Science of The Total Environment*, 634, 29-40.
- Fuess, L. T., Rodrigues, I. J., & Garcia, M. L. (2017). Fertirrigation with sugarcane vinasse: Foreseeing potential impacts on soil and water resources through

vinasse characterization. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 52(11), 1063-1072

Galdos, M., Cavalett, O., Seabra, J. E., Nogueira, L. A. H., & Bonomi, A. (2013). Trends in global warming and human health impacts related to Brazilian sugarcane ethanol production considering black carbon emissions. *Applied Energy*, 104, 576-582.

García, C. A., García-Treviño, E. S., Aguilar-Rivera, N., & Armendáriz, C. (2016). Carbon footprint of sugar production in Mexico. *Journal of cleaner production*, 112, 2632-2641.

González, L., & Mejía, M. (2015). Impact of Ferti-Irrigation with Vinasse on Groundwater Quality. *Irrigation and Drainage*, 64(3), 400-407

Hugot, E. *Hanbook of Cane Sugar Engineering/by T. Hugot* (No. 664.1 H83 1986.)

Jimenez, A. M., Borja, R., Martin, A., & Raposo, F. (2005). Mathematical modelling of aerobic degradation of vinasses with *Penicillium decumbens*. *Process Biochemistry*, 40(8), 2805-2811.

Johnson, T. M., Alatorre, C., Romo, Z., & Liu, F. (2010). Mexico-Estudio sobre la disminucion de emisiones de carbono. The World Bank

Kasper, J. C., Winter, G., & Friess, W. (2013). Recent advances and further challenges in lyophilization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85(2), 162-169.

Kellner, H., Jehmlich, N., Benndorf, D., Hoffmann, R., Rühl, M., Hoegger, J.P., Majcherczyk, A., Kües, U., von Bergen, M. & Buscot, F. (2007). Detection, quantification and identification of fungal extracellular laccases using polyclonal antibody and mass spectrometry. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(6-7), 694-701.

Koontz, L. (2014). TCA precipitation. In *Methods in enzymology* (Vol. 541, pp. 3-10). Academic Press.

Kurniawati, S., & Nicell, J. A. (2009). A comprehensive kinetic model of laccase-catalyzed oxidation of aqueous phenol. *Biotechnology progress*, 25(3), 763-773.

Kwang-Soo, S., & Chang-Jin, K. (1998). Properties of laccase purified from nitrogen limited culture of white-rot fungus *Coriolus hirsutus*. *Biotechnology techniques*, 12(2), 101-104

- Largeteau, M. L., Callac, P., Navarro-Rodriguez, A. M., & Savoie, J. M. (2011). Diversity in the ability of *Agaricus bisporus* wild isolates to fruit at high temperature (25 C). *Fungal biology*, 115(11), 1186-1195.
- Li, X., Lin, X., Zhang, J., Wu, Y., Yin, R., Feng, Y., & Wang, Y. (2010). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by crude extracts from spent mushroom substrate and its possible mechanisms. *Current microbiology*, 60(5), 336-342.
- Lin J, Zhang X, Li Z, Lei L (2010) Biodegradation of reactive blue 13 in a two-stage anaerobic/aerobic fluidized beds system with a *Pseudomonas* sp. isolate. *Bioresour Technol* 101:34–40
- Majeau, J. A., Brar, S. K., & Tyagi, R. D. (2010). Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource technology*, 101(7), 2331-2350
- Marinho, J. F. U., Correia, J. E., de Castro Marcato, A. C., Pedro-Escher, J., & Fontanetti, C. S. (2014). Sugar cane vinasse in water bodies: impact assessed by liver histopathology in tilapia. *Ecotoxicology and environmental safety*, 110, 239-245
- Matcham, S. E., & Wood, D. A. (1992). Purification of *Agaricus bisporus* extracellular laccase from mushroom compost. *Biotechnology letters*, 14(4), 297-300.
- Mattinen, M.I., Hellman, M., Permi, P., Autio, K., Kalkkinen, N. & Buchert, J. (2006). Effect of Protein Structure on Laccase-Catalyzed Protein Oligomerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8883-8890.
- Mayolo-Deloisa, K., del Refugio Trejo-Hernandez, M., & Rito-Palomares, M. (2009). Recovery of laccase from the residual compost of *Agaricus bisporus* in aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*, 44(4), 435-439.
- Medina-Moreno, S. A., Pérez-Cadena, R., Jiménez-González, A., Téllez-Jurado, A., & Lucho-Constantino, C. A. (2012). Modeling wastewater biodecolorization with reactive blue 4 in fixed bed bioreactor by *Trametes subeitypus*: Biokinetic, biosorption and transport. *Bioresource technology*, 123, 452-462.
- Menkhaus, T. J., Anderson, J., Lane, S., & Waddell, E. (2010). Polyelectrolyte flocculation of grain stillage for improved clarification and water recovery within bioethanol production facilities. *Bioresource technology*, 101(7), 2280-2286.
- Mexicana, N. O. (1997). NOM-001-SEMARNAT-1996. Establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Diario Oficial de la Federación. México, DF.

- Moharib, S., Abdel-Rahman, T., Abdel-Maugod, M.T. & Yehia, R. (2011). Effect of media composition on Laccase production by *Pleurotus Ostreatus* in batch cultura. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 14(3), 03.
- Moraes, B. S., Zaiat, M., & Bonomi, A. (2015). Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: challenges and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 44, 888-903.
- Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Gorbacheva, M.A., Shleev, S.V. & Yaropolov, A.I. (2007). "Blue" Laccases. *Biochemistry (Moscow)*, 72(10), 1136-1150. DOI: 10.1134/S0006297907100112
- Moya R, Hernandez M, Garcia-Martin AB, Ball AS, Arias ME (2010) Contributions to a better comprehension of redox-mediated decolouration and detoxification of azo dyes by a laccase produced by *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Bioresour Technol* 3(7):2224–2229
- Navarro, A. R., Sepúlveda, M. D. C., & Rubio, M. C. (2000). Bio-concentration of vinasse from the alcoholic fermentation of sugar cane molasses. *Waste management*, 20(7), 581-585.
- Nieto-López, C., Márquez-Rocha, F. J., & Sánchez-Vazquez, J. E. (2016). Box Wilson factorial design methodology for the optimization of laccase production by *Pleurotus djamor* in liquid Culture. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, 4(2), 835-841.
- Othman, A. M., Elsayed, M. A., Elshafei, A. M., & Hassan, M. M. (2018). Purification and biochemical characterization of two isolated laccase isoforms from *Agaricus bisporus* CU13 and their potency in dye decolorization. *International journal of biological macromolecules*, 113, 1142-1148.
- Pant, D., & Adholeya, A. (2007). Biological approaches for treatment of distillery wastewater: a review. *Bioresource technology*, 98(12), 2321-2334
- Pazarlıoğlu, N. K., Sarişik, M., & Telefoncu, A. (2005). Laccase: production by *Trametes versicolor* and application to denim washing. *Process biochemistry*, 40(5), 1673-1678.
- Perry, R.C., Matcham, E.S., Wood, A.D. & Thurston, F.C. (1993). The structure of laccase protein and its synthesis by the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Journal of General Microbiology*, 139, 171-178.
- Prasad, R. K. (2009). Color removal from distillery spent wash through coagulation using *Moringa oleifera* seeds: Use of optimum response surface methodology. *Journal of hazardous materials*, 165(1-3), 804-811

- Raghukumar, C., Mohandass, C., Kamat, S., & Shailaja, M. S. (2004). Simultaneous detoxification and decolorization of molasses spent wash by the immobilized white-rot fungus *Flavodon flavus* isolated from a marine habitat. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2-3), 197-202.
- Rai, U. K., Muthukrishnan, M., & Guha, B. K. (2008). Tertiary treatment of distillery wastewater by nanofiltration. *Desalination*, 230(1-3), 70-78.
- Ramírez, N.E., Vargas, M.C., Ariza, J.C. & Martínez, C. (2003). Caracterización de la lacasa obtenida por dos métodos de producción con *Pleurotus ostreatus*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5(2), 64-72.
- Ravi, R., Vinu, R., & Gummadi, S. N. (Eds.). (2017). Coulson and Richardson's Chemical Engineering: Volume 3A: Chemical and Biochemical Reactors and Reaction Engineering. Butterworth-Heinemann
- RFA análisis de fuentes de información públicas y privadas. (2018) Recuperado de: <https://ethanolrfa.org/resources/industry/statistics>
- Riva, S. (2006). Laccases: blue enzymes for green chemistry. *TRENDS in Biotechnology*, 24(5), 219-226.
- SAGARPA Comité Nacional para el desarrollo sustentable de la caña de azúcar. (2017). 4to. Informe estadístico del sector agroindustrial de la caña de azúcar en México. Zafras 2007-2008/2016-2017. Recuperado de: https://www.gob.mx/cms/uploads/.../Informe_Estadistico_2017_Entidad_Federativa.pdf
- Sangave, P. C., & Pandit, A. B. (2004). Ultrasound pre-treatment for enhanced biodegradability of the distillery wastewater. *Ultrasonics sonochemistry*, 11(3-4), 197-203
- Sangave, P. C., & Pandit, A. B. (2006). Enhancement in biodegradability of distillery wastewater using enzymatic pretreatment. *Journal of Environmental Management*, 78(1), 77-85.
- Sangave, P. C., Gogate, P. R., & Pandit, A. B. (2007). Ultrasound and ozone assisted biological degradation of thermally pretreated and anaerobically pretreated distillery wastewater. *Chemosphere*, 68(1), 42-50.
- Satyawali, Y., & Balakrishnan, M. (2007). Removal of color from biomethanated distillery spentwash by treatment with activated carbons. *Bioresource Technology*, 98(14), 2629-2635
- Satyawali, Y., & Balakrishnan, M. (2008). Wastewater treatment in molasses-based alcohol distilleries for COD and color removal: A review. *Journal of*

- SEMARNAT. (1996). Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Diario oficial de la Federación.
- SENER Reporte de inteligencia tecnológica “Bioetanol” (2018). Recuperado de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/296708/IT_Bioetanol_0102_2018.pdf
- Senthivelan, T., Kanagaraj, J., & Panda, R. C. (2016). Recent trends in fungal laccase for various industrial applications: an-eco-friendly approach-a review. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 21(1), 19-38.
- Siles J., García-García A., Martín M. (2011). Integrated ozonation and biomethanization treatments of vinasse derived from ethanol manufacturing. *Journal of Hazardous Materials* 188: 247-253.
- Souza, M. E., Fuzaro, G., & Polegato, A. R. (1992). Thermophilic anaerobic digestion of vinasse in pilot plant UASB reactor. *Water Science and Technology*, 25(7), 213-222
- Szymanowska-Powalowska, D., Lewandowicz, G., Kubiak, P., & Błaszczak, W. (2014). Stability of the process of simultaneous saccharification and fermentation of corn flour. The effect of structural changes of starch by stillage recycling and scaling up of the process. *Fuel*, 119, 328-334.
- Tapia-Tussell, R., Pérez-Brito, D., Torres-Calzada, C., Cortés-Velázquez, A., Alzate-Gaviria, L., Chablé-Villacís, R., & Solís-Pereira, S. (2015). Laccase gene expression and vinasse biodegradation by *Trametes hirsuta* strain Bm-2. *Molecules*, 20(8), 15147-15157
- Tarasi, R., Alipour, M., Gorgannezhad, L., Imanparast, S., Yousefi-Ahmadipour, A., Ramezani, A., ... & Khoobi, M. (2018). Laccase Immobilization onto Magnetic β -Cyclodextrin-Modified Chitosan: Improved Enzyme Stability and Efficient Performance for Phenolic Compounds Elimination. *Macromolecular Research*, 1-8.
- Tavares, A. P., Cristóvão, R. O., Gamelas, J. A., Loureiro, J. M., Boaventura, R. A., & Macedo, E. A. (2009). Sequential decolourization of reactive textile dyes by laccase mediator system. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 84(3), 442-446.

- Thurston, F.C. (1994). The structure and function of fungal Laccases. *Microbiology*, 140, 19-26.
- Trejo-Hernandez, M. R., Lopez-Munguia, A., & Ramirez, R. Q. (2001). Residual compost of *Agaricus bisporus* as a source of crude laccase for enzymic oxidation of phenolic compounds. *Process Biochemistry*, 36(7), 635-639
- Vilar, D. S., Carvalho, G. O., Pupo, M. M., Aguiar, M. M., Torres, N. H., Américo, J. H., ... & Ferreira, L. F. (2018). Vinasse degradation using *Pleurotus sajor-caju* in a combined biological–Electrochemical oxidation treatment. *Separation and Purification Technology*, 192, 287-296.
- Vlyssides, A., Barampouti, E. M., Mai, S., Stamatoglou, A., & Tsimas, E. (2010). Alternative biological systems for the treatment of vinasse from wine. *Water Science and Technology*, 62(12), 2899-2904.
- Vos, A. M., Jurak, E., Pelkmans, J. F., Herman, K., Pels, G., Baars, J. J., ... & Wösten, H. A. (2017). H₂O₂ as a candidate bottleneck for MnP activity during cultivation of *Agaricus bisporus* in compost. *AMB Express*, 7(1), 124.
- Wilkie, A. C., Riedesel, K. J., & Owens, J. M. (2000). Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. *Biomass and Bioenergy*, 19(2), 63-102.
- Wood, D. A. (1980). Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*. *Microbiology*, 117(2), 327-338
- Xiang, Z., & Runge, T. (2014). Co-production of feed and furfural from dried distillers' grains to improve corn ethanol profitability. *Industrial Crops and Products*, 55, 207-216
- Xu, F. (2005). Applications of oxidoreductases: Recent progress. *Industrial Biotechnology*, 1(1), 38-50.
- Zhang, Q. H., Lu, X., Tang, L., Mao, Z. G., Zhang, J. H., Zhang, H. J., & Sun, F. B. (2010). A novel full recycling process through two-stage anaerobic treatment of distillery wastewater for bioethanol production from cassava. *Journal of hazardous materials*, 179(1-3), 635-641.
- Zhang, W., Xiong, R., & Wei, G. (2009). Biological flocculation treatment on distillery wastewater and recirculation of wastewater. *Journal of hazardous materials*, 172(2-3), 1252-1257.
- Zheng, F., An, Q., Meng, G., Wu, X. J., Dai, Y. C., Si, J., & Cui, B. K. (2017). A novel laccase from white rot fungus *Trametes orientalis*: Purification,

characterization, and application. International journal of biological macromolecules, 102, 758-770.

Zollinger H (2002) Synthesis, properties and applications of organic dyes and pigments. Colour chemistry. Wiley-VCH, New York