

Ing. Amb. Estefanía
Campero Romero

DEGRADACIÓN DE COLORANTES AZO EN AGUA MEDIANTE
AGREGADOS MULTIENTZIMÁTICOS INMOVILIZADOS EN UN
SOPORTE DE QUITOSANO

2020



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental

**DEGRADACIÓN DE COLORANTES AZO EN AGUA MEDIANTE
AGREGADOS MULTIENTZIMÁTICOS INMOVILIZADOS EN UN
SOPORTE DE QUITOSANO**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestra en Ciencia y Tecnología Ambiental

Presenta:

Ing. Amb. Estefanía Campero Romero

Dirigido por:

Dr. Aldo Amaro Reyes

Co-Director:

Dr. Octavio Loera Corral

Querétaro, Qro. Noviembre de 2020.



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental

Degradación de colorantes azo en agua mediante agregados multienzimáticos inmovilizados en un soporte de quitosano

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental

Presenta:

Ing. Amb. Estefanía Campero Romero

Dirigido por:

Dr. Aldo Amaro Reyes

Co-Dirigido por:

Dr. Octavio Loera Corral

Dr. Aldo Amaro Reyes
Presidente

Dr. Octavio Loera Corral
Secretario

Dr. Jorge Noel Gracida Rodríguez
Vocal

Dr. Víctor Pérez Moreno
Suplente

Dr. Rufino Nava Mendoza
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Noviembre 2020
México

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de maestría otorgada para la realización de este proyecto.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y al Posgrado en Ciencia y Tecnología Ambiental de la Facultad de Química, por otorgarme la oportunidad de realizar este proyecto.

A mi asesor el Dr. Aldo Amaro por aceptarme en su grupo de trabajo, por su guía y orientación académica. Por la disposición y el interés por el proyecto.

A mi co-asesor el Dr. Octavio Loera por recibirme en su laboratorio en la UAM-I, por su guía y motivación, sus ideas y aportaciones para el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Jazmín de la UAM-I por proveernos de la cepa con la cual se pudieron realizar los ensayos y siempre estar en la mejor disposición de ayudarnos.

A mis sinodales, el Dr. Jorge Gracida, el Dr. Víctor Pérez, así como el Dr. Rufino Nava, por sus importantes aportaciones en la revisión de este trabajo.

A la Dra. Cristina Acosta del Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido UAM-I, por su colaboración en la visualización de las muestras.

A la M. en C. Luz Ma. Reyna Avilés del Laboratorio de Propiedades Superficiales Cinvestav Unidad Querétaro.

A la Dra. Saraí Favela del Instituto de Ingeniería y Tecnología de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez por su apoyo.

A la Q. Areli Rodríguez del Centro de Estudios Académicos sobre Contaminación Ambiental (CEACA-UAQ).

A la Dra. Monserrat Escamilla por su apoyo con las imágenes del microscopio de fuerza atómica.

A María Fernanda de la Universidad Autónoma del Estado de México por su disposición y ayuda al inicio de este proyecto.

A las alumnas de servicio social Paulina y Larissa de la licenciatura en biotecnología por su gran apoyo en el laboratorio, por siempre hacer que las horas fueran más ligeras.

A mis compañeros de generación por su amistad.

A mi familia, por su paciencia y apoyo incondicional.

Dirección General de Bibliotecas UAO

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	I
ÍNDICE GENERAL	III
ÍNDICE DE CUADROS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
RESUMEN.....	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 La contaminación del agua.....	2
2.2 La industria textil y los colorantes	4
2.3 Colorantes tipo azo.....	7
2.4 Métodos para la remoción de colorantes	8
2.4.1 Métodos físicos.....	9
2.4.2 Métodos de oxidación	10
2.4.3 Métodos biológicos	11
2.4.4 Métodos enzimáticos	12
2.5 Lacasas	14
2.5.1 Producción de lacasa.....	18
2.6 Inmovilización enzimática	20
2.6.1 El quitosano como soporte enzimático.....	22
2.6.2 Genipino como agente reticulante.....	24
2.7 Nanopartículas magnéticas.....	27
3. HIPÓTESIS	30
4. OBJETIVOS	31

4.1. Objetivo general.....	31
4.2. Objetivos particulares	31
5. METODOLOGÍA.....	32
5.1 Reactivos.....	32
5.1.2. Extracto crudo enzimático.....	33
5.2. Síntesis del soporte magnético	34
5.3. Inmovilización de la enzima en el soporte.....	35
5.3.2. Efecto del pH y temperatura sobre la actividad de lacasa	36
5.4. Caracterización térmica, estructural y química.....	36
5.4.1. Determinación de los parámetros cinéticos.....	38
5.5. Eficiencia de la decoloración	38
5.6. Capacidad de reutilización del sistema	39
5.7. Análisis estadístico	39
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
6.1 Propagación del hongo <i>Fomes</i> sp. EUM1 y FES	40
6.2 Medición de la actividad de lacasa con respecto al tiempo	43
6.3 Síntesis del soporte	45
6.4.1 Efecto del pH sobre la actividad de lacasa comercial.....	47
6.4.2 Efecto del pH sobre la actividad de lacasa en el extracto enzimático	49
6.4.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad de lacasa	50
6.5. Caracterización magnética, térmica y estructural del sistema.....	52
6.5.1. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)	52
6.5.2. Análisis Termogravimétrico (ATG)	53

6.5.3 Difracción de rayos-X.....	55
6.5.4. Microscopía Electrónica de Barrido.....	57
6.6 Parámetros cinéticos K_M y V_{max}	60
6.7 Degradación de colorantes	61
6.8 Capacidad de reúso.....	64
7. CONCLUSIONES.....	66
8. REFERENCIAS.....	67

Dirección General de Bibliotecas UAO

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Límites máximos permisibles.....	5
Cuadro 2. Ejemplos de colorantes azo	8
Cuadro 3. Enzimas involucradas en la biorremediación y sus funciones.....	13
Cuadro 4. Degradación de colorantes azo mediante lacasa fúngica.....	18
Cuadro 5. Producción de lacasa mediante FES.....	19
Cuadro 6. Lacasa inmovilizada en distintos nanosportes.....	27
Cuadro 7. Crecimiento de <i>Fomes</i> sp. EUM1 en distintos sustratos.....	40
Cuadro 8. Parámetros cinéticos de la lacasa comercial y extracto crudo enzimático libre e inmovilizados	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Inversión extranjera directa en la industria textil en México en 2017.....	5
Figura 2. Colorantes para distintas telas.....	6
Figura 3. Métodos de tratamiento para la degradación de colorantes en aguas residuales textiles.....	9
Figura 4. Diagrama de cintas esquemático de lacasa.....	14
Figura 5. Centros de cobre de lacasa.....	15
Figura 6. Representación gráfica de dos reacciones catalizadas por lacasa.....	17
Figura 7. Diferentes métodos usados para la inmovilización de enzimas.....	20
Figura 8. Estructura de la quitina y quitosano.....	24
Figura 9. Planta <i>Gardenia jasminoide</i> y estructura química del genipino.....	25
Figura 10. Mecanismo de reacción del quitosano y el genipino.....	26
Figura 11. Mecanismo de reacción del quitosano, genipino y lacasa.....	27
Figura 12. Sólidos de la síntesis del soporte después de sequedad.....	35
Figura 13. Muestras ya montadas antes del recubrimiento con oro.....	38
Figura 14. Caja Petri después de 7 días de incubación.....	40
Figura 15. Crecimiento del hongo <i>Fomes</i> sp EUM1 sobre cáscara de café y rastrojo de maíz a los 3, 6 y 9 días de incubación a 30 °C.....	43
Figura 16. Actividad de lacasa de <i>Fomes</i> sp EUM1 en FES cáscara de café con rastrojo de maíz.....	44
Figura 17. Nanopartículas magnéticas recubiertas con quitosano.....	45
Figura 18. Porcentaje de proteína inmovilizada en el soporte.....	46

Figura 19. Efecto del pH sobre la actividad de lacasa de $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@lacasa.....	48
Figura 20. Efecto del pH sobre la actividad de lacasa de la enzima libre.....	48
Figura 21. Efecto del pH sobre la actividad de lacasa del extracto crudo enzimático inmovilizado.....	49
Figura 22. Efecto de la temperatura sobre la actividad de lacasa comercial libre en rojo sobre $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Lacasa en azul.....	51
Figura 23. Efecto de la temperatura sobre la actividad de lacasa en el ECE en rojo sobre $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@ECE en azul.....	52
Figura 24. Espectro de FT-IR de Fe_3O_4 (negro), $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano (rojo), $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Lacasa (azul) y $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@ECE (rosa).....	53
Figura 25. Perfiles de ATG de Fe_3O_4 (negro), $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano (rojo), $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Lacasa (azul) y $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@ECE (rosa).....	54
Figura 26. DRX patrones de Fe_3O_4 (negro), $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano (rojo), $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Lacasa (azul) y $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@ECE (rosa).....	56
Figura 27. Micrografías panorámica de las partículas antes y después de la inmovilización enzimática	57
Figura 28. Micrografías mediante SEM de Fe_3O_4 A) 2,500x, B) 10,000x, C) 50,000x.....	58
Figura 29. Micrografías mediante SEM de $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano A) 2,500x, B) 10,000x, C) 50,000x	59
Figura 30. Micrografías mediante SEM de $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Lacasa A) 2,500x, B) 10,000x, C)50,000x.....	59
Figura 31. Micrografías mediante SEM de $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@ECE	

A) 2,500x, B) 10,000x, C) 50,000x.....	60
Figura 32. Porcentaje de degradación de colorante Sudan 2	62
Figura 33. Degradación de colorante Sudan II a 24 h.....	63
Figura 34. Reúso en ciclos continuos de Fe ₃ O ₄ @Quitosano@Lacasa.....	64
Figura 35. Reúso en ciclos continuos de Fe ₃ O ₄ @Quitosano@ECE.....	65

Dirección General de Bibliotecas UAQ

RESUMEN

La industria textil es el mayor consumidor de colorantes azo recalcitrantes que muestran propiedades mutagénicas y cancerígenas. En esta investigación, el extracto crudo de lacasa de *Fomes* sp. EUM1 y lacasa comercial de *Trametes versicolor* se inmovilizaron covalentemente sobre nanopartículas de magenetita (Fe_3O_4) revestida con quitosano y se evaluó su aplicación para el tratamiento de agua con colorante textil. La inmovilización a pH 5 muestra el porcentaje máximo de proteína unida con una relación de 1.3 mg por 1 g de soporte. La actividad máxima de lacasa se obtuvo a pH 3 para el extracto crudo inmovilizado y pH 6 para lacasa comercial inmovilizada, para ambos la máxima actividad de lacasa se observó a 50 °C. Al cabo de 30 min se degradaron 180, 312 y 312 ppm del colorante Sudan II por lacasa enzimática cruda libre, inmovilizada y lacasa comercial inmovilizada, respectivamente. Las enzimas mostraron mayor estabilidad térmica al estar inmovilizadas, de hecho, la actividad media de la enzima se mantiene durante cuatro ciclos para la lacasa del extracto crudo enzimático inmovilizado, siete ciclos para lacasa comercial inmovilizada. El sistema mostró que su capacidad magnética permite una rápida recuperación de una solución acuosa mediante un imán después de la degradación de los colorantes textiles. La capacidad oxidante del extracto enzimático producido por *Fomes* sp. EUM1 mediante fermentación en estado sólido fue similar al de enzima comercial. La utilización de extracto crudos enzimáticos inmovilizados, facilitando su recuperación gracias a las partículas magnéticas, es una opción viable a las enzimas comerciales en la degradación de colorantes tipo azo.

Palabras clave: Lacasa, inmovilización, colorantes, nanopartículas magnéticas, extracto crudo enzimático

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DEL ESTUDIANTE

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

ABSTRACT

The textile industry is the largest consumer of recalcitrant azo dyes that show mutagenic and carcinogenic properties. In this investigation, the crude extract of laccase from *Fomes* sp. EUM1 and commercial laccase from *Trametes versicolor* were covalently immobilized on nanoparticles of magnetite (Fe_3O_4) coated with chitosan and their application for the treatment of water with textile dye was evaluated. Immobilization at pH 5 showed the maximum percentage of bound protein with a ratio of 1.3 mg per 1 g of support. The maximum laccase activity was obtained at pH 3 for the immobilized crude extract and pH 6 for immobilized commercial laccase, for both the maximum laccase activity was achieved at 50 ° C. After 30 min, 180, 312 and 312 ppm of the Sudan II dye were degraded by free, immobilized crude enzymatic laccase and immobilized commercial laccase, respectively. The enzymes retain greater thermal stability when immobilized, in fact the average activity of the enzyme is maintained for four cycles for the immobilized enzyme crude extract laccase and seven for immobilized commercial laccase. The system showed that its magnetic capacity allows rapid recovery from an aqueous solution by a magnet after degradation by textile dyes. The oxidative capacity of the enzyme extract produced by *Fomes* sp. EUM1 by solid state fermentation was similar to the commercial enzyme. The use of immobilized enzyme crude extracts facilitating their recovery thanks to the magnetic particles, is a viable option to commercial enzymes in the degradation of azo-type dyes.

Key words: Laccase, immobilization, dyes, magnetic nanoparticles, crude enzymatic extract

1. INTRODUCCIÓN

La degradación del ambiente trae consigo efectos negativos que atentan directamente al desarrollo de la humanidad y de las futuras generaciones (UNDP, 2018). El tratamiento de aguas residuales ha evolucionado desde una perspectiva opcional y voluntaria a sistemas imprescindibles de múltiples etapas, que se aplica para mejorar sustancialmente la calidad del agua (CONAGUA, 2018). El conjunto de procesos de tratamiento está bien definido y se aplican ampliamente en el mundo.

Una alternativa a los tratamientos convencionales es el uso de enzimas. Estas son agentes catalíticos útiles para la aplicación industrial y la reducción de la contaminación (Senthivelan *et al.*, 2016). Las lacasas fúngicas han sido tema de investigación debido a sus diversas aplicaciones industriales, su amplia especificidad de sustrato y alto rendimiento de actividad enzimática (Arora *et al.*, 2013).

Para utilizar a las enzimas en procesos biotecnológicos se pueden aplicar estrategias para reducir los costos, como lo es la producción de enzimas mediante fermentación en estado sólido sobre residuos agroindustriales. De igual forma el proceso de inmovilización generalmente ayuda a estabilizar la estructura de las enzimas y a mantener su actividad de forma continua (Homaei *et al.*, 2013). Los sistemas heterogéneos de enzimas inmovilizadas permiten la fácil recuperación de estas y de los productos, su reutilización, así como su aplicación en procesos continuos y un mayor control de la reacción (Sharma *et al.*, 2018).

El tratamiento de aguas residuales textiles contaminadas con colorantes utilizando lacasa inmovilizada en un soporte de partículas magnéticas recubiertas con quitosano puede ser una alternativa de tratamiento terciario más amigable con el medioambiente.

2. ANTECEDENTES

2.1 La contaminación del agua

El agua es empleada de diversas formas en todas las actividades humanas y es necesaria para mantener el equilibrio ecológico del planeta. Estas actividades ejercen una presión de forma directa e indirecta sobre el ciclo del agua, lo que ha provocado consecuencias negativas para el medioambiente (CONAGUA, 2018).

La producción, así como el consumo de bienes y servicios ha traído una mayor demanda de agua dulce generando una gran cantidad de aguas residuales, las cuales se vierten sin previo tratamiento a los cuerpos de agua superficiales. Muchos ecosistemas de agua dulce muestran signos evidentes de degradación, en algunos de manera irreversible lo cual reduce su disponibilidad y la biodiversidad del sistema al ser contaminados (CONAGUA, 2018).

La Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (LGEEPA) define como contaminante a toda materia o energía en cualesquiera de sus estados físicos y formas, que al incorporarse o actuar en la atmósfera, agua, suelo, flora, fauna o cualquier elemento natural, altere o modifique su composición y condición natural (DOF, 2012).

La calidad de agua en México se calcula tomando en cuenta tres indicadores: la Demanda Bioquímica de Oxígeno a cinco días (DBO_5), la Demanda Química de Oxígeno (DQO) y los Sólidos Suspendidos Totales (SST). La DBO_5 y la DQO son indicativas de la cantidad de materia orgánica presente en los cuerpos de agua provenientes principalmente de las descargas de aguas residuales que pueden ser de origen municipal o no municipal (CONAGUA, 2017).

La DBO_5 es proporcional a la cantidad de materia orgánica biodegradable mientras que la DQO lo es de la cantidad total de materia orgánica. El incremento en la concentración de estos parámetros disminuye el contenido de oxígeno disuelto en los cuerpos de agua, con la consecuente afectación de los ecosistemas

acuáticos. Por otro lado, el aumento de los valores de la DQO indica la presencia de sustancias provenientes de descargas no municipales conteniendo materia orgánica no biodegradable (CONAGUA, 2017).

Las descargas de aguas residuales se clasifican en municipales y no municipales. Las municipales son generadas en los núcleos de población y colectadas en los sistemas de alcantarillado urbano y rural. Las descargas no municipales son aquellas generadas por otros usos, como puede ser la industria autoabastecida y que se descargan directamente a cuerpos de agua nacionales sin ser colectadas por sistemas de alcantarillado (CONAGUA, 2017).

El tratamiento de aguas residuales se ha convertido en una prioridad dentro de las agendas políticas en México. De acuerdo con las estadísticas del agua en México, el caudal de aguas tratadas llegó a un 63 % para el 2017 de los 215.2 m³ s⁻¹ recolectadas. Con el propósito de tratar las aguas residuales a diciembre de 2018 se tienen 2,547 plantas de tratamiento en operación que permiten tratar las aguas residuales colectadas en los sistemas formales de alcantarillado. En cuanto al tratamiento de aguas residuales no municipales, incluyendo las industriales, la evolución ha sido más lenta con respecto a la municipal donde la industria trató 83.7 m³ s⁻¹ en 2017 lo que corresponde al 38 % del caudal total de aguas residuales tratadas (CONAGUA, 2018).

Los países miembros de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) están disminuyendo gradualmente su extracción de agua dulce. La tendencia que siguen estos países es la de sustituir el agua dulce por la reutilización de aguas residuales, especialmente en el sector industrial. Por otro lado, las economías en crecimiento, como lo son China y Brasil, están explotando cada vez más sus reservas de aguas dulces (Gitis y Hankins 2018). Es importante mencionar que la extracción de los recursos hídricos a largo plazo se debe dar de manera sostenible, evitando la escasez del líquido y de igual forma avocar al tratamiento de las mismas.

2.2 La industria textil y los colorantes

La industria textil es una de las principales generadoras de aguas residuales, estas aguas presentan altos contenidos de sustancias químicas como: ácidos, colorantes, peróxido de hidrógeno, almidón, surfactantes y agentes dispersantes (en su mayoría surfactantes) (Paul *et al.*, 2012).

Incluso a bajas concentraciones, estos contaminantes reducen la penetración de la luz solar en el agua, afectando el proceso de fotosíntesis alterando la cadena alimenticia y la vida acuática del ecosistema. La salud humana también se encuentra amenazada donde las moléculas aromáticas que están abundantemente presentes en los residuos industriales textiles se han relacionado con una mayor incidencia de cáncer en los trabajadores de la industria textil (Alneyadi *et al.*, 2018).

El consumo diario de agua de una fábrica textil de tamaño promedio, con una producción de aproximadamente 8,000 kg de tela es de aproximadamente 1.6 millones de litros de agua. Donde específicamente el consumo de agua para teñir varía entre 30 a 50 L Kg⁻¹ de tela dependiendo del colorante utilizado. La sección de teñido contribuye del 15 al 20 % del flujo total de aguas (Kant *et al.*, 2012).

Según datos del INEGI (2019) México contaba con 932 empresas textiles y es el sexto proveedor de Estados Unidos y el decimotercer exportador mundial de prendas de vestir, siendo una de las diez más importantes industrias para la economía nacional. Asimismo, recibió una inversión extranjera directa total acumulada de 885 millones de dólares de 2013 a 2017. En la Figura 1 se muestran las principales actividades de la industria textil que registraron una ganancia en 2017.

El proceso de teñido tiene bajos rendimientos, generalmente menos del 50 % y se estima que aproximadamente 280,000 ton de colorantes se vierten en los efluentes por año en el mundo (Amin *et al.*, 2018).

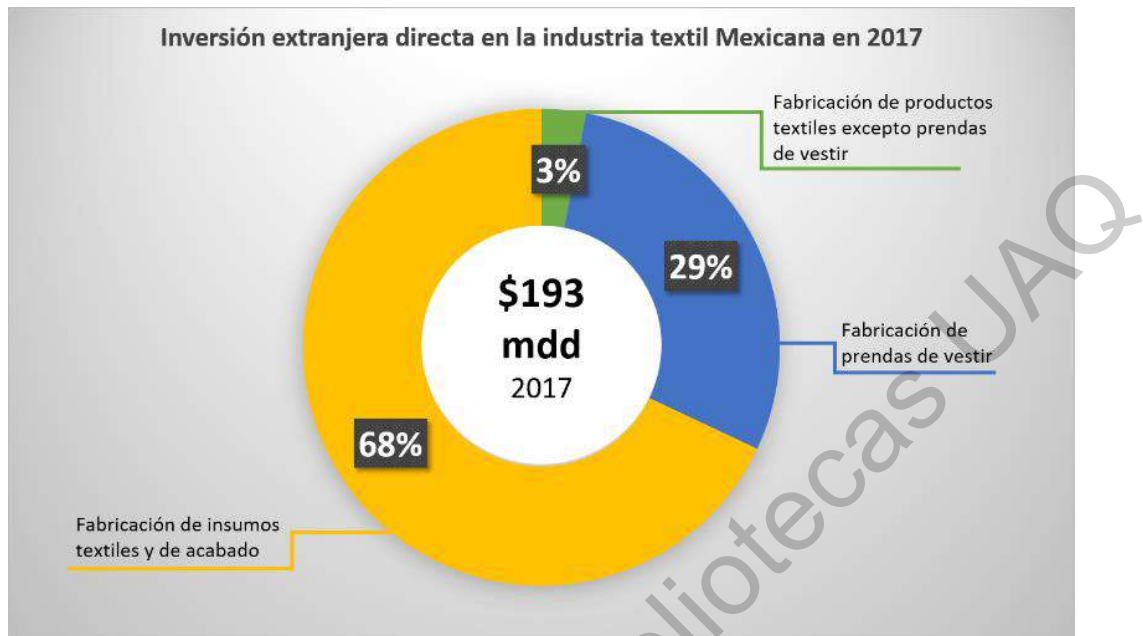


Figura 1. Inversión extranjera directa en la industria textil en México en 2017 (INEGI, 2019).

Debido a los bajos rendimientos mencionados México cuenta con la NOM-CCA-014-ECOL/1993, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes (Cuadro 1) en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de la industria textil. Estos parámetros son considerados como indicadores de la calidad del agua y las industrias están obligadas a cumplirlas, utilizando diversos métodos para su tratamiento de aguas residuales.

Cuadro 1. Límites máximos permisibles de contaminantes en aguas residuales (NOM-CCA-014-ECOL/1993).

Parámetros	Promedio diario	Instantáneo
pH	6 - 9	6 - 9
DBO ₅ (mg L ⁻¹)	100	120
DQO (mg L ⁻¹)	200	240
Sólidos sedimentables (mg L ⁻¹)	1.0	1.2
SST (mg L ⁻¹)	100	120
Cromo total (mg L ⁻¹)	1.0	1.2

Sulfuros (mg L ⁻¹)	0.2	0.4
Fenoles (mg L ⁻¹)	0.1	0.2

Debido a su naturaleza química algunos contaminantes son más difíciles de remover que otros. Los tintes son recalcitrantes, muchos de ellos son tóxicos para la biota acuática, algunos de ellos se ha informado que son agentes carcinogénicos y mutagénicos (Mathur *et al.*, 2006).

La concentración de colorantes en los efluentes es extremadamente variable, depende del tipo de tinte y el proceso de teñido. En las industrias textiles, los colorantes se aplican en concentraciones de 0.01 a 0.25 g L⁻¹ (Ghaly *et al.*, 2014). Estos compuestos se desechan en las aguas residuales y se consideran como contaminantes persistentes que no pueden removerse con los métodos convencionales de tratamiento de aguas, debido a las estructuras complejas que presentan (Singh *et al.*, 2015).

Existen distintos tipos de colorantes textiles y su aplicación depende del tipo de tela utilizada en el proceso. En la Figura 2 se muestran los más usados en la industria textil.

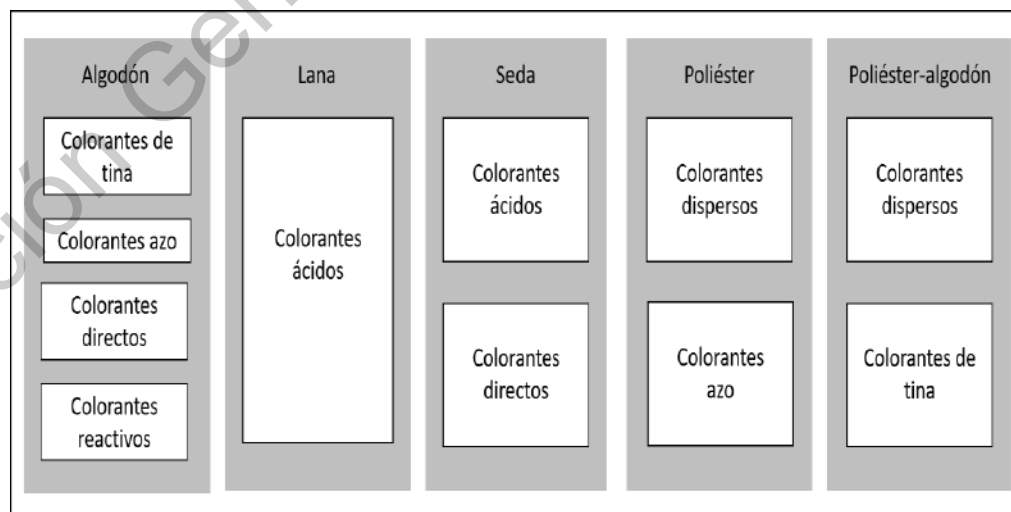


Figura 2. Colorantes para distintas telas (Holkar, 2016).

2.3 Colorantes tipo azo

Los colorantes azo constituyen aproximadamente la mitad de todos los colorantes sintetizados y su uso predomina la industria textil, alimentos, papel, de impresión, cuero y cosmética (Senthivelan *et al.*, 2016).

Estos colorantes pertenecen a la categoría de sintéticos y aunque se ha comprobado su toxicidad siguen siendo ampliamente usados en la industria textil (Legerská *et al.*, 2018). Se caracterizan por su grupo funcional cromóforo que está representado por $-N=N-$. Donde destacan tres familias: monoazo, diazo y triazo; cada una de ellas existe con diferentes propiedades. Así encontramos los colorantes azo: ácidos, básicos, reactivos, directos, dispersos y pigmentos, siendo los colorantes monoazo dispersos los que mayor consumo tienen debido a que se usan para teñir fibras e hilos de poliéster, acetato, nylon y acrílico (Ghaly *et al.*, 2014). La estructura de algunos colorantes azo se muestran en el Cuadro 2 donde se aprecia la similitud entre ellos.

Se cree que los colorantes azoicos son compuestos xenobióticos deficientes de electrones en la molécula (colorantes) que los hacen resistentes a la degradación. Por esto mismo son ampliamente utilizados en muchas industrias debido a su alta estabilidad química y que el proceso de su producción es relativamente fácil (Singh *et al.*, 2015).

La liberación de estos colorantes en los ecosistemas es perjudicial, no solo por su color, sino también por el hecho de que muchos colorantes azoicos como sus productos de descomposición (aminas incoloras) son tóxicas y mutagénicas para organismos vivos. Son el indicador más evidente de la contaminación del agua, ya que algunos colorantes son visibles a concentraciones tan bajas como 0.005 mg L^{-1} y representan un problema al ser recalcitrantes (Aguedal, 2019).

Cuadro 2. Estructura química de algunos colorantes azo.

Colorante Azo	Estructura química
Sudán IV	
Sudán II	
Azorubina	
Naranja Mordante	

2.4 Métodos para la remoción de colorantes

A lo largo de los años se han buscado alternativas para la decoloración de las aguas por los problemas mencionados anteriormente. Existen diferentes métodos para lograr la remoción de decolorantes en aguas, los más comunes se agrupan en la Figura 3.

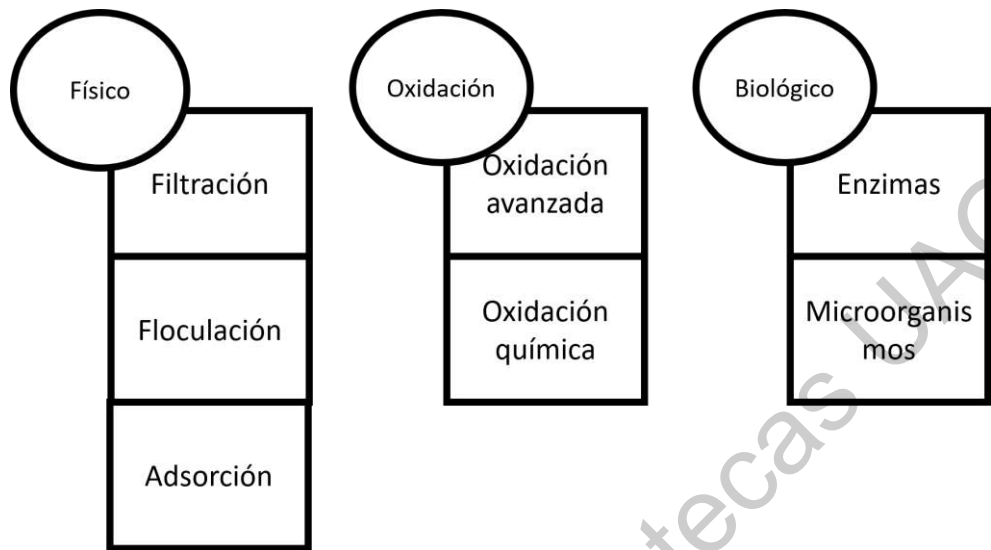


Figura 3. Métodos de tratamiento para la degradación de colorantes en aguas residuales textiles (Holkar *et al*, 2016).

2.4.1 Métodos físicos

La eliminación de colorantes en los efluentes se logra por medios fisicoquímicos, incluyendo la adsorción, precipitación, coagulación-floculación, oxidación, filtración y fotodegradación (Singh *et al.*, 2015). Los métodos físicos basados en floculación y coagulación son de los más comunes siendo útiles para la decoloración de aguas residuales que contienen tintes dispersos. Pero tienen una baja eficiencia de decoloración para las aguas residuales que tienen colorantes reactivos y de tinte en tina. Estas técnicas también limitan su uso debido a la baja eficiencia de decoloración y a la gran generación de lodos residuales (Liang *et al.*, 2014; Yeap *et al.*, 2014).

Otro método empleado es la adsorción ya que tiene altas eficiencias de decoloración en aguas que contienen distintos colorantes. El carbón activado es un adsorbente eficaz para una amplia gama de colorantes, pero su alto precio y la dificultad de regeneración limitan su aplicación (Galán *et al.*, 2013).

Los métodos mencionados cuentan con algunas desventajas económicas, técnicas, de altos costos operativos/energéticos, la generación de grandes

cantidades de lodos residuales de difícil disposición y la producción de subproductos dañinos (Singh *et al.*, 2015).

Otra técnica utilizada para la decoloración en agua es la de filtración, como la ultrafiltración, la nanofiltración y la ósmosis inversa. En la industria textil el uso de este tipo de membranas ofrece la potencial recuperación de colorantes reactivos que ayudaría a disminuir la DBO, DQO y el color de las aguas. Pero las membranas también cuentan con desventajas significativas como lo son su alto costo, la posible obstrucción o contaminación de la membrana y la generación de otros productos indeseables que necesitan un posterior tratamiento (Holkar *et al.*, 2016).

2.4.2 Métodos de oxidación

Estos métodos se categorizan en Procesos de Oxidación Avanzada (POA) y oxidación química. Tienen la capacidad de degradar productos tóxicos tales como colorantes, plaguicidas, entre otros, ya sea parcial o totalmente bajo condiciones del ambiente. Estas tecnologías de oxidación se pueden usar individualmente o de manera sinérgica, conocidos como procesos híbridos de oxidación avanzada (Holkar *et al.*, 2016).

En los POA se producen una gran cantidad los radicales libres; estos radicales son capaces de oxidar la mayoría de los compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en los efluentes de la industria textil (Asghar *et al.*, 2015). Estos métodos también contemplan la oxidación fotocatalítica (uso de la luz del sol para la activación catalítica de materiales semiconductores) y la química de Fenton (reacción entre iones Fe^{3+} y H_2O_2), utilizando una sal de hierro la cual promueve la oxidación de los complejos orgánicos mediante la descomposición de H_2O_2 . Un inconveniente principal del método Fenton es la generación de lodos de difícil manejo (Babuponnusami y Muthukumar, 2014).

Los métodos de oxidación química utilizan agentes oxidantes como O_3 y H_2O_2 . El ozono y el H_2O_2 forman radicales hidroxilo no selectivos a pH altos. Debido a su alto potencial de oxidación pueden romper los dobles enlaces de los colorantes

cromóforos, así como otros grupos funcionales como los complejos anillos aromáticos de los colorantes (Tehrani *et al.*, 2010). Estos métodos tienen menor rendimiento de degradación comparado con los POA debido a la menor producción de radicales. Un gran beneficio del ozono es que no aumenta el volumen del efluente ya que se encuentra en estado gaseoso, siendo su mayor desventaja la posible generación de subproductos tóxicos y su alto costo (Miralles *et al.*, 2016).

La degradación de los colorantes en agua también se puede lograr mediante el tratamiento combinado de la luz UV y el H₂O₂. Utilizando la luz para activar la descomposición del H₂O₂ en radicales hidroxilo, estos causan la oxidación química del colorante o material orgánico mineralizándolo a CO₂ y H₂O (Yen, 2015).

2.4.3 Métodos biológicos

Los procesos biológicos remueven la materia disuelta en las aguas contaminadas con colorantes textiles utilizando organismos para lograrlo. La eficiencia de estos tratamientos dependerá en la relación carga orgánica/colorante, la temperatura y la concentración de oxígeno del sistema. Con base al requerimiento de oxígeno del sistema los métodos biológicos se pueden clasificar en aerobios, anaerobios, anóxicos y facultativos o una combinación de estos (Holkar, 2016).

La remediación de colorantes textiles se puede lograr usando microorganismos o biocatálisis, cada uno teniendo sus pros y contras en términos de eficiencia de decoloración, idoneidad y condiciones de trabajo (pH, temperatura, concentración del colorante, entre otros) (Vikrant *et al.*, 2018). Los diferentes grupos taxonómicos de microorganismos tales como bacterias, hongos, levaduras y algas son capaces de degradar colorantes azo bajo condiciones aerobias y anaerobias (Singh *et al.*, 2015).

La decoloración de colorantes textiles se logra químicamente al romper la cadena de electrones dentro de los grupos cromóforos. Las bacterias o una combinación de bacterias con hongos y algas han sido empleadas extensivamente para un proceso de decoloración efectiva, (Ghosh *et al.*, 2017). Los sistemas

biológicos aplicados a la degradación de colorantes se consideran como una alternativa menos costosa y agresiva con el ambiente (Robinson *et al.*, 2001).

Uno de los métodos más estudiados en la biorremediación de colorantes es la remoción mediante hongos. Donde se inicia con la absorción de estos en la hifa, que procede rompiendo la conjugación de los enlaces químicos del colorante mediante las enzimas extracelulares del hongo. Mahmoud *et al.* (2017) reportaron la remoción del colorante rojo azo en solución acuosa (1 g L^{-1}), usando solo *Aspergillus niger* en un pH de 9. De acuerdo con el autor la eficiencia de decoloración depende fuertemente en los parámetros externos como lo son el tiempo de contacto, pH y la cantidad de biomasa presente. Asimismo, la eficiencia de estos métodos biológicos para la degradación dependerá de la adaptabilidad de los microorganismos y de la actividad enzimática.

2.4.4 Métodos enzimáticos

Las enzimas son proteínas que sirven como catalizadores naturales en reacciones bioquímicas y se encuentran en los seres vivos donde catalizan procesos esenciales. La creciente investigación sobre las técnicas de obtención y producción de enzimas conducen a una mayor aplicación en una gran variedad de procesos (Homaei *et al.*, 2013). Uno de los principales usos es en la aplicación en el tratamiento de residuos, especialmente de residuos sólidos, así como en el tratamiento y la biorremediación tanto del agua como del suelo (Holkar *et al.*, 2016).

La mayor parte de la biorremediación de la mayoría de los contaminantes se debe a la presencia de enzimas oxidorreductasas promiscuas que pueden degradar varios tipos de sustratos, esto debido a que en condiciones de presión selectivas estas actividades les pueden servir de ventaja adaptativa a algunos microorganismos (Alneyadi *et al.*, 2018). Una amplia variedad de enzimas ha sido probada en la biorremediación, destacando las lacasas pertenecientes al grupo de las oxidoreductasas entre otras que se muestran en el Cuadro 3 (Singh *et al.*, 2015).

Cuadro 3. Enzimas involucradas en la biorremediación y sus funciones
(Sharma *et al.*, 2018).

Clasificación de las enzimas	Ejemplos	Funciones
Oxidorreductasas	Oxigenasa	Cataliza la oxidación de compuestos aromáticos tales como bifenilos clorados, olefinas alifáticas, incorporando una o dos moléculas de oxígeno, haciéndolas propensas a una mayor transformación y mineralización.
	Lacasa	Rompe el anillo presente en compuestos aromáticos reduciendo una molécula de oxígeno en agua, produce radicales libres.
	Peroxidasas	Cataliza la reacción de reducción en presencia de peróxidos, como el peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) y genera radicales libres reactivos después de la oxidación de compuestos orgánicos.
Hidrolasas	Lipasas	Hidroliza el triglicérol en glicerol y ácidos grasos. Se use ampliamente en el tratamiento de aguas residuales, degradación de hidrocarburos poliaromáticos, etc.
	Celulasas	Descompone los materiales celulósicos complejos en azúcares simples y se usa comúnmente en el tratamiento de residuos agrícolas.

Algunas de las ventajas de usar enzimas en el tratamiento de aguas son las concentraciones relativamente bajas de reactivos necesarios para la implementación en las condiciones de uso, así como su capacidad para degradar una amplia gama de sustratos. La principal desventaja potencial con el uso de enzimas es su costo comercial relativamente alto al estar purificadas y la necesidad de seguir adicionando enzimas con el tiempo (Alneyadi *et al.*, 2018).

2.5 Lacasas

Las lacasas (oxígeno oxidoreductasa EC. 1.10.3.2) son cuproproteínas que pertenecen a las oxidasas que contienen cobre, las cuales catalizan la reducción de moléculas de oxígeno a agua (Figura 4) (Morozova *et al.*, 2007).

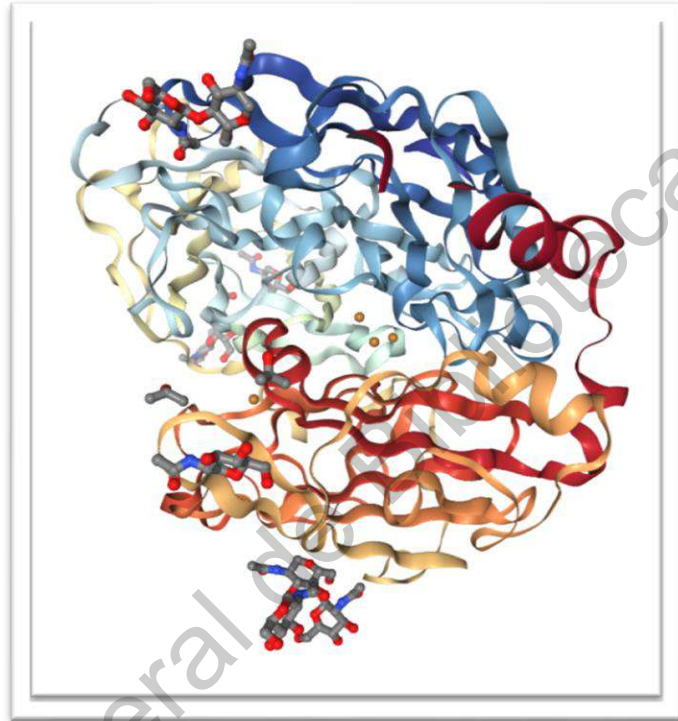


Figura 4. Diagrama de cintas esquemático de lacasa de *Trametes versicolor* (PDB ID: 1GYC).

Fueron descubiertas por primera vez en la savia del árbol de laca japonesa *Rhus vernicifera* por Yoshida en 1883. Se encuentran altamente distribuidas en la naturaleza en plantas, hongos, insectos y bacterias donde cumplen varias funciones fisiológicas importantes como la lignificación, pigmentación, así como de patogénesis (Hattori *et al.*, 2005). Siendo las lacasas fúngicas las más utilizadas al tener un alto potencial redox en comparación con las provenientes de bacterias (Songulashvili *et al.*, 2016).

Las lacasas se encuentran en una variedad de formas, pueden ser monoméricas, homotetaméricas, heteroméricas y multiméricas. Su peso molecular

varia de 50 a 130 kDa dependiendo el organismo de donde proceda (Jaiswal *et al.*, 2015). Asimismo, existen en cuatro formas catalíticas distintas de Cu por unidad de proteína. Estos 4 iones de cobre se dividen en tres tipos de estructuras como se muestran en la Figura 5.

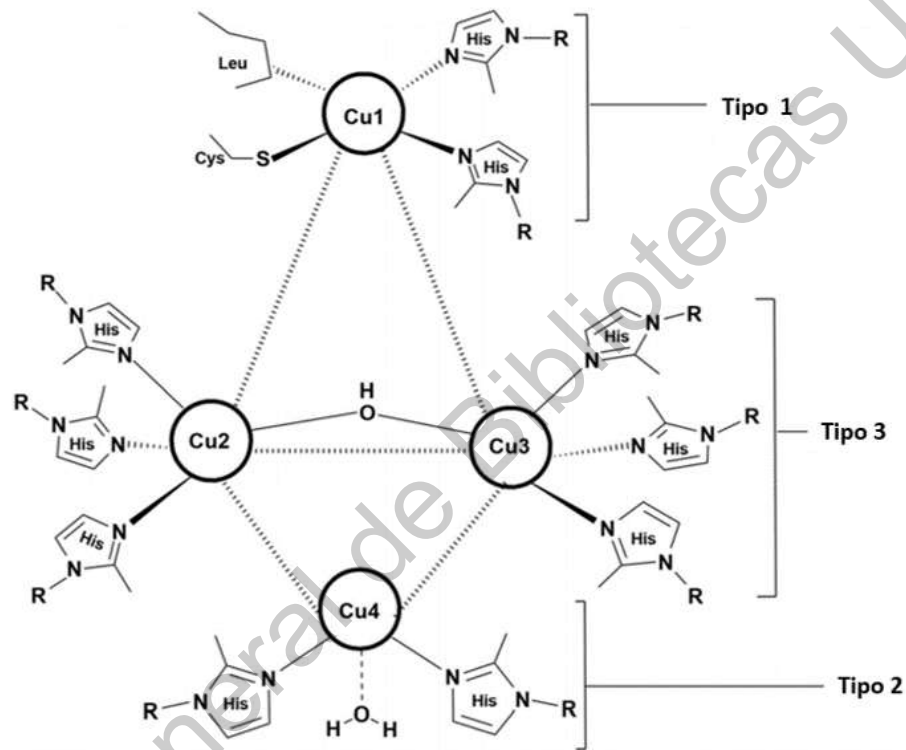


Figura 5. Centros de cobre de lacasa fúngicas (Garavaglia *et al.*, 2004).

El cobre tipo 1 confiere el color azul a las proteínas multi-cobre, lo que se debe a la intensa absorción electrónica causado por el enlace covalente cobre-cisteína. Debido a su alto potencial redox de + 790 mV, la oxidación del sustrato tiene lugar en este sitio y tiene una absorbancia a 610 nm (Agrawal *et al.*, 2018).

El cobre tipo 2 se caracteriza por la falta de fuertes potenciales de absorción en la región visible, está coordinado por dos residuos de histidina y se encuentra colocado cerca del cobre de tipo 3.

El cobre de tipo 3 es un centro binuclear regulado por seis histidinas y caracterizada espectroscópicamente por una adsorción de electrones a 330 nm en su forma oxidada (Agrawal *et al.*, 2018). El cobre tipo 2 y el cobre tipo 3 forman un grupo trinuclear donde se reduce el oxígeno molecular y se libera agua. Un ejemplo de oxidación de un electrón de grupos hidroxilo fenólicos se representan a continuación en la ecuación 1, mientras se reduce el oxígeno y se forman radicales fenoxi junto con agua (Agrawal *et al.* 2004):



Las lacasas oxidan sustratos mediante la remoción de un electrón, generando a su vez radicales libres. Las enzimas retienen un total de cuatro electrones en su estado totalmente reducido, de esta manera la enzima puede transferir estos electrones a una molécula de oxígeno para formar dos moléculas de agua (Loera *et al.*, 2006).

Existen dos reacciones básicas que catalizan las lacasas: la oxidación directa e indirecta. La oxidación directa involucra la oxidación del sustrato a su correspondiente radical, como resultado de una interacción directa que ocurre en el *cluster* del cobre tipo 2 y 3 como se mencionó anteriormente (Matera *et al.*, 2008) (Figura 6a). Sin embargo, en algunas reacciones la oxidación directa no es posible ya que la lacasa solo puede oxidar aquellos compuestos cuyo potencial de ionización no exceda el potencial redox del cobre tipo 1 (Morozova *et al.*, 2007). Esta limitación se puede superar mediante el uso de un mediador, en un proceso de dos pasos: en el primero la enzima cataliza la oxidación del mediador y posteriormente el mediador oxidado oxida al sustrato (Figura 6b) (Agrawal *et al.*, 2018).

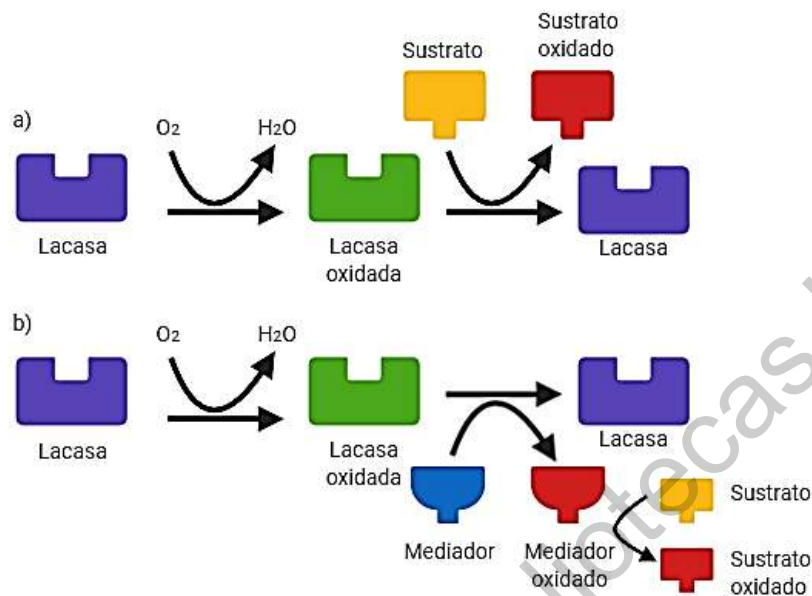


Figura 6. Representación gráfica de dos reacciones catalizadas por lacasa; a) oxidación directa y b) oxidación indirecta

Debido a que las laccasas son enzimas inespecíficas, pueden actuar sobre una gran variedad de compuestos recalcitrantes que son estructuralmente similares a la lignina, en este caso los colorantes textiles tipo azo. Estas propiedades de oxidorreducción de las laccasas además de ser usadas como decolorantes también han sido explotadas en varios campos. Las lacasa se han empleado en la industria de procesamiento de alimentos, la industria del papel y en la remediación de compuestos más complejos como lo son algunos contaminantes orgánicos como el bisfenol A y el triclosán (Xu *et al.*, 2014). Incluso se han publicado estudios sobre la eficacia de las laccasas para eliminar hormonas como la estrona, el 17 β -estradiol y estriol, así como varias clases de colorantes aromáticos (Alneyadi *et al.*, 2018). En el Cuadro 4 se muestran algunos ejemplos de colorantes degradados por laccasas. En el tratamiento de aguas residuales el uso de procesos enzimáticos es relativamente nuevo y tiene la ventaja de disminuir el consumo de reactivos y la generación de subproductos.

Cuadro 4. Degradación de colorantes azo mediante lacasa fúngica
(Senthivelan *et al.*, 2015)

Hongo	Colorante	Tiempo	Decoloración (%)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Remazol azul brillante 49	10 d	72
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Synazol rojo HF6BN	24 d	96
<i>Trametes versicolor</i>	Negro Dycem	48 h	90
<i>Trametes hirsuta</i>	Azul directo 71	-	>90
<i>Pleurotus flabellatus</i>	Azul reactivo 4	-	>90
<i>Ganoderma lucidum</i>	Negro reactivo 5	-	>90

2.5.1 Producción de lacasa

La producción de lacasas fúngicas mediante Fermentación en Estado Sólido (FES), basada en el uso de residuos agrícolas es una excelente opción de bajo costo para la producción de enzimas. Este tipo de cultivo presenta un menor consumo de agua, un mayor rendimiento del producto, una menor represión catabólica y una menor demanda de esterilidad (Chen *et al.*, 2013). Debido a su abundancia natural y a menudo bajo costo la biomasa proveniente de desechos agroindustriales es una alternativa potencial en la producción de enzimas (Satinder *et al.*, 2014). En el Cuadro 5 se muestran algunos ejemplos donde utilizan hongos como organismo fermentador.

La producción y la actividad de lacasas están influenciadas directamente por algunos parámetros como lo es el sustrato que se utilizará, la técnica de fermentación, la agitación, la aireación y el tiempo de cultivo, entre otros. Una gran variedad de hongos tiene la capacidad de adaptar su metabolismo a condiciones ambientes cambiantes (Holkar, 2016). Existen más de 100 lacasas caracterizadas y purificadas que son producidas por hongos. Las lacasas fúngicas, por lo general, tienen un pH óptimo en el rango ácido, y los perfiles de temperatura para la actividad de estas enzimas normalmente no difieren de los de otras enzimas ligninolíticas

extracelulares, la mayoría con temperaturas óptimas que varían de 50 a 70 °C. Sin embargo, cada especie de microorganismo tiene sus condiciones fisiológicas óptimas particulares para crecer y producir esta enzima (Zandoná *et al.*, 2016).

Cuadro 5. Producción de lacasas mediante fermentación en estado sólido.

Hongo	Sustrato	Actividad de lacasa (U/mL)	Referencia
<i>Pleurotus flabellatus</i>	Cáscara de café	4.08	Parani y Eyini 2012
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Papa	6.71	Ergun y Urek 2017
<i>Trametes versicolor</i>	Salvado de trigo	4.97	Boran y Yesilada 2011
<i>Trichoderma harzianum</i>	Polvo de salvado de trigo	5.24	Huiju <i>et al.</i> , 2013
<i>Fomes</i> sp. EUM1	Rastrojo de maíz	4.2	Méndez <i>et al.</i> , 2018

Los productores de lacasa más comunes y eficientes son los hongos de podredumbre blanca (Fernández *et al.*, 2013). Estos microorganismos son los principales responsables de la descomposición de la lignina. Las lacasas fúngicas son secretadas al medio por el micelio, en múltiples isoformas dependiendo de las especies de hongos y las condiciones ambientales (Couto y Herrera, 2016). La diversidad bioquímica de las isoenzimas de lacasa se produce por la multiplicidad de genes de lacasa, sin embargo, la regulación de su expresión puede diferir sustancialmente entre las especies de hongos (Zandoná *et al.*, 2016).

Por otro lado, todas estas características deseables de las enzimas y sus aplicaciones industriales a menudo se ven obstaculizadas por su falta de estabilidad operativa a largo plazo, su corta vida útil de almacenamiento, así como por la dificultad de recuperación y reutilización. Estos inconvenientes generalmente se

superan mediante la inmovilización de enzimas. De hecho, un desafío importante en la biocatálisis industrial es el desarrollo de biocatalizadores estables, robustos e insolubles (Homaei *et al.*, 2013).

2.6 Inmovilización enzimática

Se le llama inmovilización enzimática a la unión de una enzima con un soporte insoluble. Esta se puede dividir en métodos físicos y químicos o en cuatro métodos según Homaei *et al.* (2013) (Figura 7): 1. Adsorción, 2. Atrapamiento, 3. Enlace Covalente y 4. Entrecruzamiento. El enlace de soporte puede ser físico o químico, involucrando enlaces débiles o covalentes. En general, el enlace físico es comparativamente débil y apenas puede mantener la enzima fijada al portador en condiciones industriales. El soporte puede ser una resina sintética, un polímero inorgánico, sílice, o un biopolímero. El atrapamiento implica la inclusión de una enzima en una red de polímero (red de gel) como un polímero orgánico o un sol-gel de sílice, o un dispositivo de membrana como una fibra hueca o una microcápsula. El atrapamiento requiere la síntesis de la red polimérica en la presencia de la enzima. La última categoría involucra la reticulación de agregados de enzimas o cristales, usando un reactivo bifuncional, para preparar macropartículas sin portador (Cao *et al.*, 2003).

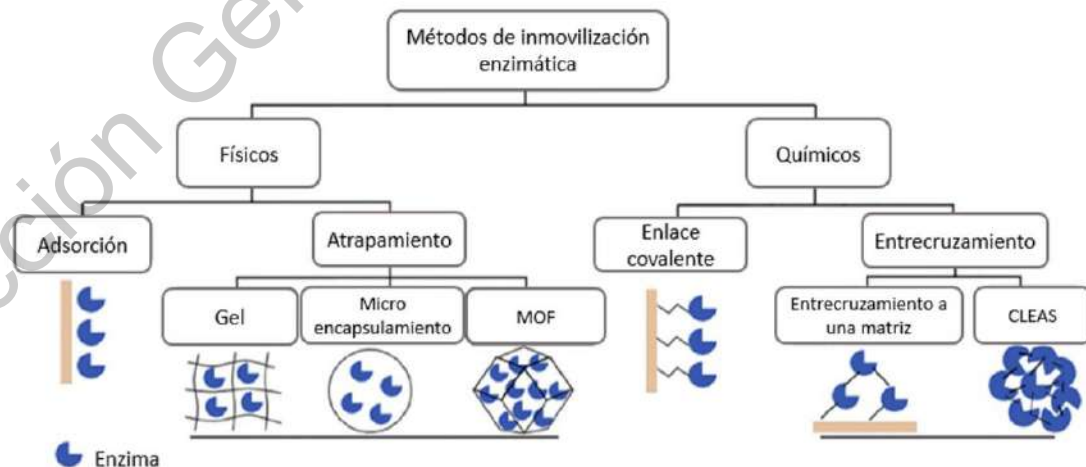


Figura 7. Diferentes métodos usados para la inmovilización de enzimas (Homaei, 2013). Marcos organometálicos (MOF) y agregados de enzimas reticuladas (CLEAS), por sus siglas en inglés.

Aunque se han desarrollado y aplicado muchas técnicas de inmovilización a numerosas enzimas, se reconoce que no existe un método universal válido para todas las enzimas en todos los casos. En general, los métodos de preparación difícil y de mayor costo proporcionan biocatalizadores más estables y duraderos. En cambio, aquellos métodos más sencillos como el atrapamiento o la adsorción, donde la unión de la enzima con el soporte es débil, originan derivados inmovilizados que presentan pérdidas de actividad y que deben ser repuestos continuamente (Arroyo, 1998).

De los métodos mencionados usados para la inmovilización de enzimas destaca la unión covalente. La cual se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas (enzimas). De entre los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de las enzimas, los más empleados para la formación de enlaces con el soporte son principalmente la lisina, cisteína, tirosina e histidina. En menor medida la metionina, el triptófano, la arginina, así como el ácido aspártico y el glutámico. El resto de los aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica por lo que no pueden intervenir en la unión covalente (Arroyo, 1998).

Este método presenta las siguientes ventajas: la manipulación de los derivados inmovilizados es sencilla, la carga de enzima permanece constante después de la inmovilización, los derivados pueden utilizarse en reactores en continuo, empaquetados, de lecho fluidizado o tanque agitado. Una mayor resistencia a la desactivación por el efecto de la temperatura, de los disolventes orgánicos o del pH, al tener estabilizada su estructura terciaria.

La inmovilización por enlace covalente puede presentar algunos inconvenientes, ya que se condiciona el número de uniones enzima-soporte, también se puede llegar a modificar la geometría de la enzima lo que puede conducir a la desactivación de esta o el difícil acceso al sustrato. Asimismo, el proceso de inmovilización en ocasiones altera la estructura del centro activo. Para evitar esta posible alteración, la inmovilización se realiza en presencia de un inhibidor que bloquee el centro activo. La inmovilización covalente no es aconsejable en aquellas enzimas muy sensibles a cambios de pH, fuerza iónica, etc. (Arroyo, 1998).

La unión covalente de lacasas a diferentes soportes se ha investigado ampliamente con soportes que van desde los nanomateriales de carbono, los basados en celulosa, poliméricos, materiales mesoporosos, entre otros (Zdarta *et al.*, 2018). Sin embargo, algunos de estos soportes no poseen grupos reactivos para llevar a cabo la inmovilización de las enzimas. Por lo cual existen métodos para la funcionalización de los materiales utilizando reactivos que funcionan como activadores de estos soportes que contienen grupos carboxilo o amino (Knezevic *et al.*, 2004). La estructura física y la composición química del soporte lo que puede influir en el microambiente de las lacasas inmovilizadas y en consecuencia en su actividad.

La inmovilización de las enzimas puede superar algunas de las mencionadas limitaciones y proveer de ciertas mejoras en sus propiedades bioquímicas (Kunamneni *et al.*, 2008). Las principales ventajas de la inmovilización de enzimas son el aumento de la estabilidad térmica, mayor resistencia a diferentes condiciones y a su interacción con distintas sustancias. Además, las lacasas inmovilizadas pueden separarse fácilmente de los productos de reacción, permitiendo que las enzimas se empleen en operaciones continuas (Arroyo, 1998; Georgieva *et al.*, 2010).

2.6.1 El quitosano como soporte enzimático

Se han investigado diferentes soportes para la inmovilización enzimática y su selección depende del tipo de aplicación y del costo que genera su uso. Los

nanosistemas de polímeros biodegradables son una alternativa atractiva en la inmovilización enzimática. Estos han sido estudiados intensivamente como soportes de proteínas.

Una alternativa al uso de polímeros sintéticos como matrices para enzimas es el uso de biopolímeros: polímeros de origen natural. Materiales como el colágeno, la celulosa, las queratinas, la carragenina, así como la quitina, el quitosano y el alginato, son ejemplos de biopolímeros utilizados para la inmovilización (Zdarta *et al.*, 2018). Los biopolímeros poseen un conjunto único de propiedades, desde biodegradabilidad, biocompatibilidad y no toxicidad, hasta una afinidad sobresaliente por las moléculas que los conforman, lo que los convierte en soportes adecuados para las enzimas (Krajewska *et al.*, 2004).

Su origen natural y biocompatibilidad minimiza su impacto negativo en la estructura y en las propiedades de las enzimas, por lo tanto, las proteínas inmovilizadas retienen altas actividades catalíticas. Además, la disponibilidad de grupos funcionales reactivos en su estructura, principalmente restos hidroxilo, pero también amina y carbonilo, permite la reacción directa entre la enzima y el soporte lo que facilita la modificación de su superficie (Zdarta *et al.*, 2018).

El quitosano puede considerarse el biopolímero más utilizado para la inmovilización enzimática, este se puede utilizar en varias formas. Se obtiene de la desacetilación alcalina de la quitina, el cual es un polisacárido no ramificado y está ampliamente distribuido en la naturaleza (Figura 8). Es el principal componente de exoesqueletos de los crustáceos e insectos, así como de las paredes celulares de algunas bacterias y hongos (Senel y McClure, 2004).

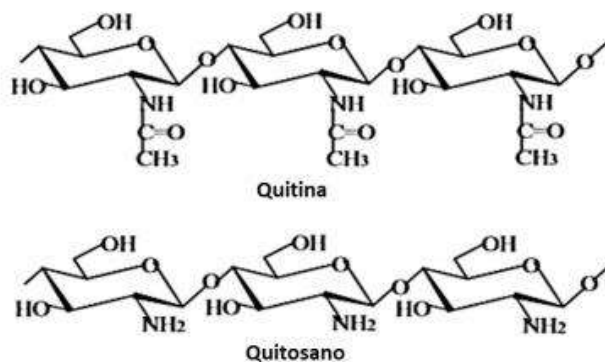


Figura 8. Estructura de la quitina y quitosano.

Los grupos amino en la estructura polimérica lo han convertido como un portador biológico de alta capacidad para la inmovilización de enzimas (Ghadi *et al.*, 2014). El quitosano tiene buena propiedad para formar microesferas, es un adsorbente económico y al utilizarlo con la propiedad magnética se puede separar fácilmente con un campo magnético externo en lugar de filtración o centrifugación. Lo anterior le confiere potencial en la inmovilización de enzimas, así como otros compuestos biológicamente activos (Pospiskova y Safarik, 2013).

2.6.2 Genipino como agente reticulante

Una de las partes importantes es la reticulación química de biopolímeros y proteínas estructurales, mediante el diseño de biomateriales que no sean tóxicos y sean biocompatibles. Se ha descrito el uso de compuestos naturales aislados de plantas como lo es el genipino. El genipino ha ganado popularidad como entrecruzante de proteínas, se aisló por primera vez como compuesto puro de la planta *Genipa americana* y actualmente, la principal fuente natural de genipino es el fruto de la planta de Gardenia (*Gardenia jasminoides*) (Figura 9), que contienen genipino en forma de su glucósido (Sung *et al.*, 2000).

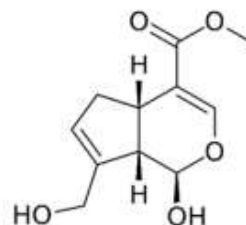


Figura 9. Planta *Gardenia jasminoides* de donde se extrae el genipino y estructura química del genipino.

Su característica más importante es la baja toxicidad en comparación con los reactivos utilizados para la reticulación tradicionales. Por ejemplo, la citotoxicidad del genipino es aproximadamente diez mil veces menor que la del glutaraldehído. Dado que se han encontrado numerosos síntomas en personas con menos de 0.05 ppm de exposición a glutaraldehído, el límite máximo de exposición recomendado en muchos países (Takigawa y Endo, 2006). Los productos formados por la adición de genipino a proteínas y polisacáridos también tienen baja toxicidad (Sung *et al.*, 2000).

En la actualidad se han realizado estudios con genipino en donde se ha usado como agente entrecruzante con polímeros que presentan grupos amino en su estructura. Es ampliamente utilizado para la reticulación covalente de polisacáridos con unidades de glucosamina, como quitosano y ácido hialurónico desacetilado (Tokareva *et al.*, 2017).

En la Figura 10 se ilustra el mecanismo de entrecruzamiento de quitosano con genipino. Se forman enlaces covalentes entre los grupos amino y el carbono del grupo carbonilo, provocando la formación de un intermediario tetraédrico, en donde el grupo metoxilo se convierte en el mejor grupo saliente debido a que es más básico que la amina que está reaccionando. Al mismo tiempo, sucede una adición de Michael, la cual se inicia con un ataque nucleofílico de los grupos amino en el carbono β del compuesto carbonilo de la genipina. Posteriormente, el carbono del aldehído formado es atacado nucleofílicamente por la amina, esta reacción

intramolecular permite que el ciclo se cierre nuevamente y se pierda agua como producto de la reacción. El mecanismo de reacción entre el genipino y los grupos amino dependerá en gran manera del pH de la reacción (Tokareva *et al.*, 2017).

Ma *et al.*, en 2018 propusieron un mecanismo de reacción para la inmovilización de lacasa de *Trametes pubescens* en esferas de quitosano utilizando genipino como agente reticulante (Figura 11). Donde el genipino y el quitosano se unen como se mencionó anteriormente y durante la inmovilización de lacasa los radicales amino de la superficie del quitosano reaccionan con los grupos carboxilo de la molécula de lacasa formando un enlace peptídico. Un enlace peptídico es un tipo de enlace químico covalente de tipo amida, lo que proporciona estabilidad a la enzima inmovilizada.

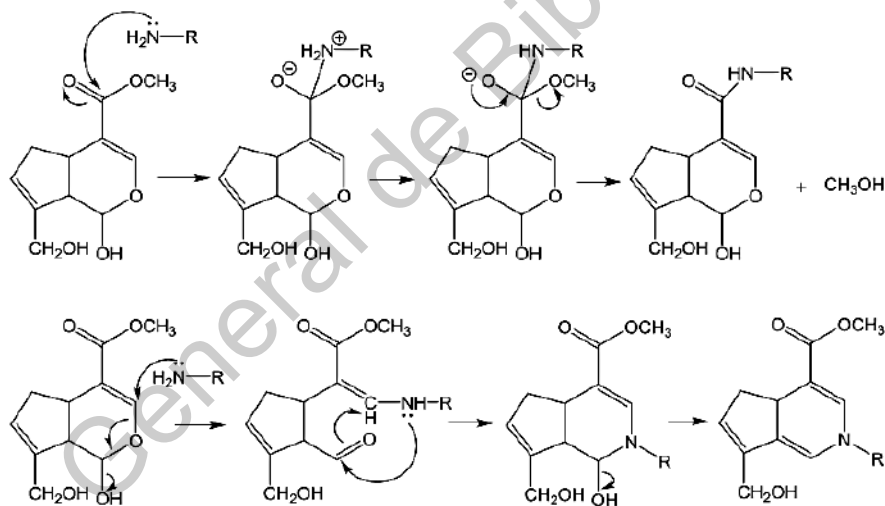


Figura 10. Mecanismo de reacción del quitosano y el genipino (Tokareva *et al.*, 2017).

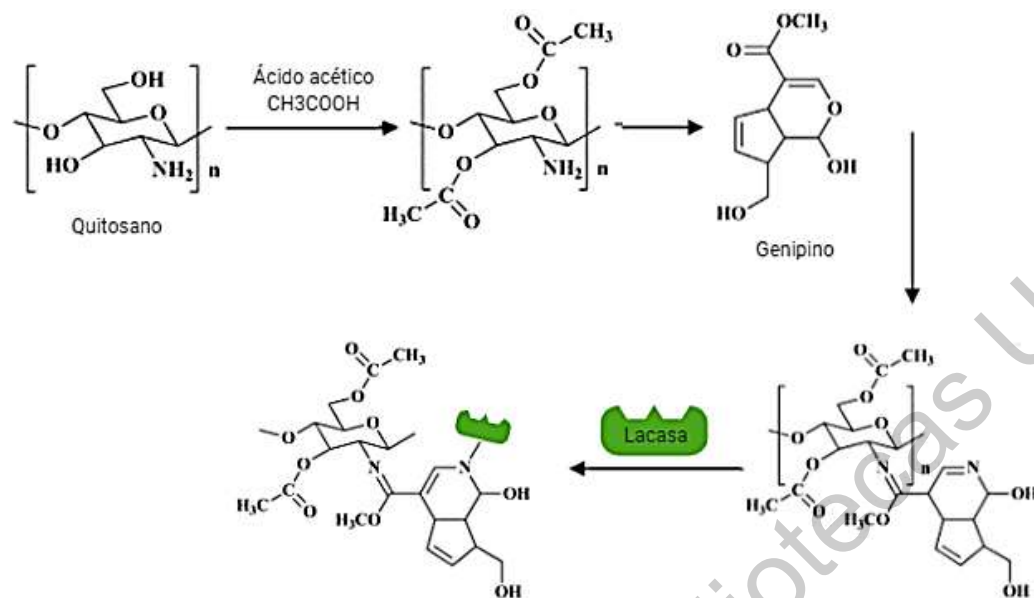


Figura 11. Mecanismo de reacción del quitosano, genipino y lacasa (Ma *et al.*, en 2018).

2.7 Nanopartículas magnéticas

En años recientes el uso de nanomateriales para la inmovilización enzimática se ha popularizado lo que podría hacer que el tratamiento de aguas residuales sea más factible económicamente (Mukherjee *et al.*, 2013). Numerosos autores han inmovilizado lacasas exitosamente en nanosportes como se muestran en el Cuadro 6 con el objetivo de degradar contaminantes.

Cuadro 6. Lacasa inmovilizada en distintos nanosportes (Alshabib y Onaizi, 2019.)

Enzima	Soporte	Método de inmovilización	Contaminante	Remoción (%)	Tiempo (h)
Lacasa	Perlas de sílice nanoporosa	Covalente	2,4-DNP	91	12
Lacasa	Nanopartículas de titanio	Covalente	BPA	~100	24
Lacasa	Membrana de nanofibras de Polyacrylonitrilo	Covalente	2,4,6-TCP	87	4

Lacasa	Microesferas de quitosano-halloysita	Fisorción	2,4-DCP	95	10
Lacasa	Nanopartículas magnéticas de sílica mesoporosa	Fisorción	Fenol	>90	40
Lacasa	Microesferas magnéticas queladas con iones metálicos	Fisorción	Fenol	78	12

Dinitrofenol (DNP), Bisfenol A (BPA), Triclorofenol (TCP), Diclorofenol (DCP).

En general las nanopartículas se definen como partículas coloidales sólidas que incluyen esferas y cápsulas. Una de sus características fundamentales es su tamaño, generalmente toman un tamaño en el intervalo de 5 a 10 nm con un límite de tamaño superior de hasta $\sim 1 \mu\text{m}$ (Quintanar *et al.*, 1998).

Uno de los enfoques nanotecnológicos interesantes para la inmovilización de enzimas es el uso de soportes magnéticos, que facilitan la recuperación de los materiales bio catalíticos insolubles del medio de reacción simplemente aplicando un campo magnético (Alshabib y Onaizi, 2019).

Las nanopartículas magnéticas pueden ser una mejor opción en la inmovilización de enzimas debido a la separación magnética más fácil y lo que generalmente evita la pérdida de partículas. Las principales ventajas de las nanopartículas magnéticas son alta resistencia mecánica, buena estabilidad térmica, resistencia contra degradación química y microbiana (Ghadi *et al.*, 2015).

Las nanoestructuras son muy atractivas para los procesos de inmovilización enzimática puesto que poseen características ideales para equilibrar los factores principales que determinan la eficiencia de biocatalizadores. También se incluye el área de superficie específica, resistencia a la transferencia de masa y carga de la enzima efectiva (Cipolatti *et al.*, 2014). Asimismo, la caracterización de un

catalizador es un aspecto muy importante. El área superficial, la elucidación de la estructura, composición y propiedades químicas, son de vital importancia para entender la relación entre las propiedades del catalizador y la actividad catalítica (Vargas *et al.*, 2013). Estas caracterizaciones son útiles para controlar la eficacia de un proceso de inmovilización y proporcionan información vital sobre los efectos de la enzima sobre su estabilidad y de la actividad una vez inmovilizada (Bolívar *et al.*, 2015).

Por lo tanto, el inmovilizar lacasas en nano soportes ha mejorado tanto la estabilidad química como la reutilización de la enzima, que son factores clave para la aplicación en procesos enzimáticos heterogéneos a gran escala (Alshabib y Onaizi, 2019).

3. HIPÓTESIS

- La inmovilización de agregados multienzimáticos con actividad de lacasa en un soporte magnético de quitosano permitirá la degradación de colorantes azo en agua, así como la reutilización del sistema multienzimático.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

- Determinar la degradación de colorantes azo presentes en agua mediante el uso de agregados multienzimáticos inmovilizados en un soporte magnético de quitosano, así como la caracterización del sistema.

4.2. Objetivos particulares

- Evaluar la producción de extractos crudos enzimáticos con actividad de lacasa mediante fermentación en estado sólido a partir de desechos agroindustriales.
- Determinar el efecto de las condiciones de entrecruzamiento de tiempo y pH en la inmovilización de los agregados multienzimáticos en un soporte de quitosano ($\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano) sobre la actividad de lacasa.
- Caracterizar parcialmente física, química y bioquímica de los agregados multienzimáticos con actividad de lacasa.

5. METODOLOGÍA

5.1 Reactivos

La enzima comercial Lacasa de *Trametes versicolor*, el quitosano de bajo peso molecular (50,000–190,000 Da, 75–85 % desacetilado), el genipino (90 % p/p de pureza), colorantes Sudan II y todos los demás reactivos grado analítico se obtuvieron de manera comercial de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EU), excepto donde se indique lo contrario. El rastrojo de maíz y la cepa fúngica *Fomes* sp. EUM1 previamente identificada por Ordaz (2012) fue proporcionada por la Colección de Cultivos de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Ciudad de México, México.

5.2 Métodos

5.2.1 Fermentación en estado sólido

La cepa fúngica *Fomes* sp. EUM1 se propagó y mantuvo en agar con extracto de malta y levadura (extracto de malta 40 g L⁻¹, extracto de levadura 3 g L⁻¹, agar 15 g L⁻¹) de acuerdo con Méndez *et al.* (2018). Se probaron los siguientes residuos como sustratos:

- Jamaica
- Cáscara de manzana
- Cáscara de manzana adicionado con glucosa
- Cáscara de uva
- Cáscara de uva con rastrojo de maíz
- Cáscara de café
- Cáscara de café con rastrojo de maíz

Estos se lavaron con agua destilada, se colocaron hasta sequedad en un horno de convección forzada Air Performance (Froilabo, Meyzieu, Francia) a 60 °C y se molieron en un molino convencional.

La FES se realizó en matraces Erlenmeyer que contenían 3 g de sustrato y 6 mL de agua destilada. Los residuos agroindustriales fueron esterilizados (121 °C, 25 min) y posteriormente se inocularon con cinco rectángulos de 1 x 1 cm de agar con micelio de *Fomes* sp. EUM1 previamente propagado como se mencionó anteriormente. Estos cultivos se incubaron a 30 °C en una cámara húmeda según lo reportado por Méndez *et al.* (2018).

5.1.2. Extracto crudo enzimático

Para la producción del Extracto Crudo Enzimático (ECE) cada matraz se agitó mecánicamente en una incubadora orbital (modelo 650-V, Prendo, México) a 150 rpm durante 4 horas con 20 mL de amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 5. Posteriormente la fase acuosa se filtró (papel Whatman No. 4) y se centrifugó (Modelo 5702 Eppendorf, Alemania) a 4,400 rpm por 15 min para separar los sólidos. El ECE clarificado se congeló a -25 °C (CHTS-25, Polar, México) hasta su uso y análisis. La actividad de lacasa se determinó mediante espectrofotometría por la generación de radicales 2,2-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico ABTS) a partir de la oxidación de ABTS. La mezcla de ensayo contenía 500 µL de ABTS (0.5 mM en tampón citrato 50 mM, pH 5.0) y 500 µL de muestra. La absorbancia se registró cada 10 s, durante 2 minutos en una celda de 1 cm a 420 nm (Méndez *et al.*, 2018).

La cuantificación de proteína soluble se realizó siguiendo la metodología de Bradford (1976) utilizando albumina de suero bovino como estándar. Se determinó el contenido de proteína soluble de lacasa comercial y el ECE. Se prepararon 3 muestras de lacasa comercial con una concentración de 1 mg mL⁻¹ disueltas en amortiguador citrato-fosfato pH 5 50 mM y se agitaron en un mezclador vórtex (Corning LSE, EU) posteriormente se tomaron 100 µL de la solución preparada y se colocaron en tubos Eppendorf. Para el ECE se tomaron directamente los 100 µL respectivamente. Se les agregó 1 mL de solución azul de Coomassie a cada uno de los tubos de muestra, blancos y curva estándar de BSA. Se agitaron en un mezclador vórtex (Corning LSE, EU) y se dejaron 2 min a temperatura ambiente, se

leyó la absorbancia a 595 nm y se determinaron las concentraciones de proteína a partir de la curva estándar.

5.2. Síntesis del soporte magnético

El soporte magnético consistió en partículas de magnetita revestidas con quitosano que se prepararon mediante coprecipitación *in situ* de sales de hierro de acuerdo con lo descrito por Díaz-Hernández *et al.*, (2018). Se mezcló una cantidad de 3.6×10^{-3} moles de hierro a partir de una mezcla en relación molar 2:1 ($\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}$) de cloruro férrico (FeCl_3) y cloruro ferroso (FeCl_2) con quitosano a 100 rpm en ácido acético al 3 % (v/v) a 70 °C hasta su disolución. La disolución de quitosano-hierro se dispersó mediante un procesador ultrasónico con una amplitud del 70 % durante 10 min (Sonics VCX 750, MA EU). A continuación, la emulsión generada se precipitó añadiendo una solución de NH_4OH (28 % v/v) con etanol (96 % v/v) en una proporción en volumen de 1:1. Posteriormente, la mezcla alcalina se homogenizó usando un mezclador vórtex (Corning) durante 30 s y después se mantuvo bajo agitación suave en una incubadora orbital (modelo 650-V, Prendo, México) a 60 rpm durante 18 h. El precipitado se recuperó por centrifugación durante 15 min a 4,400 rpm y se lavó con una mezcla de tampón de fosfatos 50 mM pH 7.0 y etanol (96 % v/v) en una proporción en volumen de 1:1 hasta su neutralización. Los sólidos neutralizados se secaron en horno de convección forzada Air Performance (Froilabo) a 70 °C durante 5 h (Figura 12) y se trituraron en mortero hasta obtener un polvo fino. El rendimiento de sólidos en la reacción de síntesis se determinó multiplicando por 100 el peso de los sólidos finales menos los iniciales (%p/p).



Figura 12. Sólidos de la síntesis del soporte después de sequedad.

5.3. Inmovilización de la enzima en el soporte

La reacción de inmovilización se llevó a cabo suspendiendo 300 mg de Fe_3O_4 @Quitosano en una solución de 300 μL de ECE, 600 μL de amortiguador citrato-fosfato para valores de pH de 3 a 9. Se retículo con genipino al 0.1 % p/v en tampón de fosfato 50 mM pH 4.5. La mezcla de reacción se agitó mediante un vórtex cada 10 minutos durante una hora a temperatura ambiente (20 ± 3 °C). A continuación, el Fe_3O_4 @Quitosano reticulado con las enzimas (Fe_3O_4 @Quitosano@Enzimas) se separó de la mezcla de reacción mediante magnetismo utilizando un imán de neodimio permanente (1.2 T). Los sólidos se lavaron con una mezcla en volumen de etanol al 35 % v/v en tres ocasiones y se secaron en un desecador a temperatura ambiente. Para lacasa comercial se siguió la misma metodología que para el ECE con excepción de que la lacasa comercial fue disuelta en una concentración de 1 mg mL⁻¹ en amortiguador citrato-fosfato para valores de pH de 3 a 9 y se tomaron 900 μL de solución de enzima y 100 μL de genipino 0.01 % (p/v) en dimetilsulfóxido.

La actividad recuperada de enzima inmovilizada en el compuesto de magnetita se determinó restando la concentración final a la inicial de la actividad enzimática en el medio de inmovilización (Sheldon y Pelt, 2013).

5.3.2. Efecto del pH y temperatura sobre la actividad de lacasa

El efecto del pH sobre la actividad de lacasa del $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qitosano@ECE y $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qitosano@Lacasa (comercial) se realizó pesando 20 mg del sistema y agregando 500 μL de amortiguador citrato-fosfato para valores de pH de 3 a 9 a temperatura ambiente para posteriormente ser medida. Para la lacasa comercial libre se tomaron 500 μL de la lacasa al 0.1 mg mL^{-1} en soluciones de pH de 3 a 9 y se adicionó 500 μL de sustrato ABTS, para el ECE se tomaron directamente los 500 μL y de igual forma se le adición el sustrato ABTS, el producto de la reacción fue medido y la actividad enzimática se determinó por el método descrito anteriormente.

De igual forma el efecto de la temperatura en la actividad de lacasa sobre el ECE y la enzima comercial inmovilizada se realizó ensayando la actividad enzimática después de incubarla en un rango de 30 a 90 °C (en intervalos de 10 °C) a un pH constante durante 10 min. El pH de la reacción será el determinado en la etapa anterior en el cual se observó una mayor actividad de lacasa. El ensayo se realizó pesando 20 mg de $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qitosano@ECE y $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qitosano@Lacasa respectivamente, se agregó 500 μL de la solución amortiguadora y 500 μL del reactivo ABTS, se incubó por 10 min y se procedió a medir la actividad por el método descrito anteriormente.

5.4. Caracterización térmica, estructural y química

Todas las caracterizaciones físicas, químicas, y bioquímicas se realizaron para el tratamiento optimizado de la inmovilización de los agregados multienzimáticos del ECE y lacasa comercial, así como para el soporte sin los agregados y las enzimas libres.

La identificación de los grupos funcionales en la superficie de los compuestos $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qitosano, $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qitosano@Lacasa y $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qitosano@ECE fueron investigadas por espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) usando un espectrofotómetro Perkin-Elmer (Shelton, CT, EU). Las muestras se escanearon 20 veces en un intervalo de 4000 a 600 cm^{-1} .

El entrecruzamiento de los agregados multienzimáticos con el soporte se determinó mediante Análisis Termo Gravimétrico (ATG). El ATG para Fe_3O_4 @Qitosano, Fe_3O_4 @Qitosano@Enzimas y las enzimas libres se realizaron mediante un analizador simultáneo TGA NETZSCH–STA 449 F1 Júpiter (Burlington, MA, EU). La degradación térmica se realizó a una velocidad de calentamiento de $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ de 25 a $900\text{ }^\circ\text{C}$ en atmosfera de argón con un flujo de 50 mL min^{-1} , trabajando a presión atmosférica.

Para la caracterización estructural, los patrones de difracción de rayos X (DRX) del compuesto Fe_3O_4 @Qitosano antes y después de la inmovilización enzimática se realizaron en un difractómetro de polvo de rayos–X de ánodo rotatorio a 40 kV, 30 mA (Rotaflex modelo RU–200B de Rigaku, Tokio, Japón) con una fuente de radiación $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.54\text{ \AA}$). Las muestras se escanearon de 3 a 90° (2θ) con una velocidad de escaneo de $3^\circ 90^\circ\text{ min}^{-1}$. Además, estos resultados se indexaron mediante los archivos de difracción de polvo PDF (*power diffraction files*) No. 190–191 para identificar los planos cristalinos correspondientes a la estructura cubica de la magnetita; esto mediante una orientación preferencial para este material.

Se determinó la distribución del tamaño de partícula de quitosano antes y después de la inmovilización enzimática dispersas en etanol absoluto usando un Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments (Worcestershire, Reino Unido). Para la morfología superficial del compuesto Fe_3O_4 @Qitosano antes y después de la inmovilización enzimática se obtuvo mediante microscopia electrónica de barrido. Se utilizó el microscopio electrónico modelo JEOL JSM-5900 (Tokio, Japón) en modo alto vacío. Las muestras analizadas fueron montadas en el porta muestras de aluminio y aseguradas con cinta doble cara conductora y grafito conductor adherente (Figura 13). Una vez montadas fueron recubiertas con oro (4 tiempos de 60 s) y observadas al microscopio.



Figura 13. Muestras de los compuestos magnéticos montadas antes del recubrimiento con oro.

5.4.1. Determinación de los parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos de $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@ECE y $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Lacasa fueron determinados midiendo las velocidades iniciales de reacción de cada una de las enzimas con diferente concentración de sustrato ABTS en las condiciones de temperatura y pH que mostraron mayor actividad. Las concentraciones preparadas de ABTS fueron de 0.1, 0.25, 0.4, 0.5, 0.7 y 0.9 mM, tanto para las enzimas libres como para las enzimas inmovilizadas. Para la enzima comercial libre a 0.1 mg mL^{-1} y el ECE se tomaron $500 \mu\text{L}$ respectivamente para el ensayo, para $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@ECE y $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Lacasa se pesaron 20 mg. A todos los tratamientos se les agregó $500 \mu\text{L}$ del sustrato y se midió la absorbancia a 420 nm.

5.5. Eficiencia de la decoloración

La eficiencia en la decoloración del agua se determinó utilizando el colorante Sudán II como sustrato. Se preparó una solución a 600 ppm en solución amortiguadora de citrato-fosfatos de pH 3, 4, 5 y 6 para cada uno de los tratamientos a 50 mM, las soluciones se prepararon el día que fueron utilizadas y se almacenaron en frascos ámbar. Se mezclaron 20 mg de $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@ECE y

Fe₃O₄@Quitosano@Lacasa cada uno con 1 mL de la solución de colorante, se incubaron a 50 °C durante 5 min y se procedió a cuantificar la degradación del color. La determinación de la degradación del colorante se realizó mediante espectrometría UV-VIS a 490 nm (Thermo Fisher Scientific, EU) al comparar la concentración inicial del colorante antes y después del tratamiento donde el porcentaje de degradación se expresa de acuerdo con la ecuación 2.

$$\% \text{ de degradación} = \frac{(A_i - A_f)}{A_i} \times 100 \quad (2)$$

Donde:

A_i = Absorbancia inicial

A_f = Absorbancia final

5.6. Capacidad de reutilización del sistema

La capacidad de reutilización de la enzima inmovilizada se evaluó ensayando la actividad catalítica en ciclos continuos. Cada ciclo consistió en la determinación de la actividad de lacasa en Fe₃O₄@Quitosano@Lacasa y Fe₃O₄@Quitosano@ECE y la inmediata recuperación de estas mediante un imán de neodimio de 1.2 T. Posteriormente fueron lavadas con amortiguador citrato-fosfatos 50 mM pH 5 y se utilizaron el sistema en un siguiente ciclo. Después de cada ciclo el sistema se volvió a poner en contacto con el sustrato y así sucesivamente. Se determinó el porcentaje de degradación del color como se describe en la sección 5.5. El proceso se repitió n veces hasta que la actividad enzimática disminuyera un 30 % respecto a la actividad inicial.

5.7. Análisis estadístico

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y fueron reportados como la media de los datos ± la desviación estándar. Los datos se analizaron mediante el análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y la prueba de diferencia menos significativa de Tukey (con p < 0.05 como el nivel mínimo de significancia) utilizando el software Minitab 17 (PA, EU).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Propagación del hongo *Fomes* sp. EUM1 y FES

El hongo *Fomes* sp EUM1 se inoculó en cajas Petri con medio de cultivo de extracto de malta y levadura colocando un rectángulo de 1 por 1 cm aproximadamente con micelio en el centro de la misma e incubando a 30 °C. A los 7 días de incubación se observó el desarrollo miceliar de forma radial como se muestra en la Figura 14.



Figura 14. *Fomes* sp. EUM1 a los 7 días de incubación.

Se utilizaron distintos sustratos (Cuadro 7) los cuales fueron inoculados con 4 rectángulos de agar con micelio tomado de los cultivos de caja Petri que se mencionaron anteriormente. De las fermentaciones hechas, las mezclas de cáscara de café y cáscara de café con rastrojo de maíz fueron los que presentaron mayor desarrollo de micelio (crecimiento) aparente del hongo a en menor tiempo, a los 4 y 3 días respectivamente de haber sido inoculado como se muestra en el Cuadro 7. Normalmente, un alto grado de ramificación de hifas se ha asociado con una mejor colonización del medio de crecimiento en temperaturas cercanas a las óptimas (Harris, 2008). Del mismo modo, la formación de hifas largas mejora el suministro de nutrientes para el crecimiento de hongos en FES, ya que las hifas penetran en

regiones más profundas de sustratos sólidos para liberar enzimas hidrolíticas que degradan el alto contenido de hemicelulosa y celulosa (Anusha *et al.* 2012).

Debido a esto se consideró como mejor opción el utilizar la combinación rastrojo de maíz y cáscara de café para las posteriores fermentaciones. Mencionando que tanto la cáscara de manzana, cáscara de manzana adicionado con glucosa y cáscara de café también presentaron crecimiento. A diferencia de la jamaica, la cáscara de uva y la cáscara de uva con rastrojo que no presentaron crecimiento después de 10 días de incubación.

Cuadro 7. Crecimiento de *Fomes* sp. EUM1 en distintos residuos agroindustriales.

Sustrato	Resultado	Imagen
Jamaica	No presentó crecimiento	
Cáscara de manzana	Presentó crecimiento a los 5 días	

<p>Cáscara de manzana adicionado con glucosa</p>	<p>Presentó crecimiento a los 5 días</p> 
<p>Cáscara de uva</p>	<p>No presentó crecimiento</p> 
<p>Cáscara de uva, rastrojo de maíz</p>	<p>No presentó crecimiento</p> 
<p>Cáscara de café</p>	<p>Presentó crecimiento a los 4 días</p> 



6.2 Producción de actividad de lacasa en FES

Tomando en cuenta que en los cultivos microbianos al final de la fase de crecimiento primario inician la síntesis de metabolitos secundarios, se determinó el tiempo de máxima producción de enzimas lignolíticas (lacasa). En la Figura 15 se muestra el crecimiento del hongo *Fomes* sp. EUM1 sobre cáscara de café y rastrojo de maíz en FES a los 3, 6 y 9 días de crecimiento micelial. Existen reportes de actividad de lacasa con *Fomes* sp. EUM1 desde el día 3 de cultivo (Méndez *et al.*, 2018). Lo cual indica que la producción de lacasa en algunos hongos ocurre durante el crecimiento micelial, por lo que el tiempo de la fermentación es un factor importante considerado.



Figura 15. Crecimiento del hongo *Fomes* sp EUM1 sobre cáscara de café y rastrojo de maíz a los 3, 6 y 9 días de incubación a 30 °C (de izquierda a derecha).

Se analizó la producción de actividad de lacasa del extracto crudo enzimático de la FES durante 10 días. En la Figura 16 se representan los perfiles de producción de lacasa en FES sobre cáscara de café y rastrojo de maíz con respecto al tiempo. La producción de lacasa inició el primer día (0.282 U/g) y comenzó a aumentar hasta alcanzar su máximo el día 7 (5.9 U/g), esta actividad disminuyó los días siguientes hasta el día 10. Lo anterior concuerda con lo reportado por Méndez *et al.* (2018) quienes obtuvieron una máxima producción de lacasa el día 7 con una actividad de 4.2 U/g utilizando rastrojo de maíz como sustrato. Debido a esto se tomó el día 7 como el óptimo para realizar el ECE y los siguientes ensayos de producción de lacasa.

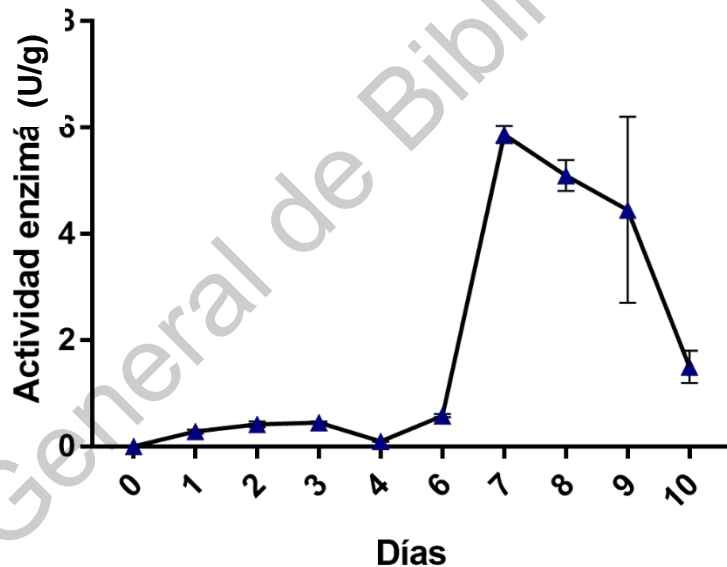


Figura 16. Actividad de lacasa de *Fomes sp* EUM1 en FES cáscara de café con rastrojo de maíz.

Distintos autores han reportado una gran variedad de actividad de lacasa con respecto al tiempo en distintos sustratos como por ejemplo Jaber *et al.* (2017) con una actividad de lacasa de 5.8 U mL⁻¹ utilizando virutas de madera con *Trichoderma murioiana*. La producción de lacasa en cortos tiempos de fermentación son una

característica deseable ya que se reduce el riesgo por contaminación de otros hongos de lento crecimiento (Castro *et al.*, 2015).

6.3 Síntesis del soporte

Las nanopartículas recubiertas con quitosano se prepararon mediante coprecipitación de solución de sales de $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ en condiciones alcalinas añadiendo un tratamiento de sonicación de acuerdo con lo reportado por Díaz-Hernández *et al.* (2018). Como resultado se obtuvieron las nanopartículas y su capacidad magnética fue comprobada mediante un imán de neodimio de 1.2 T como se muestra en la Figura 17. Donde se puede observar en el primer tubo las partículas en suspensión (Figura 17A) y en el segundo la atracción de estas al aproximarlas al campo magnético del imán (Figura 17B). El rendimiento de los sólidos de la reacción de síntesis se determinó multiplicando por cien la relación en peso de sólidos finales con los iniciales (% p/p). Obteniendo un valor promedio de 39.76 % en comparación con 57.4 % que fue lo obtenido por Díaz-Hernández *et al.* (2018) utilizando la misma metodología de síntesis y donde se observa una reducción en el rendimiento del 30.74 %.

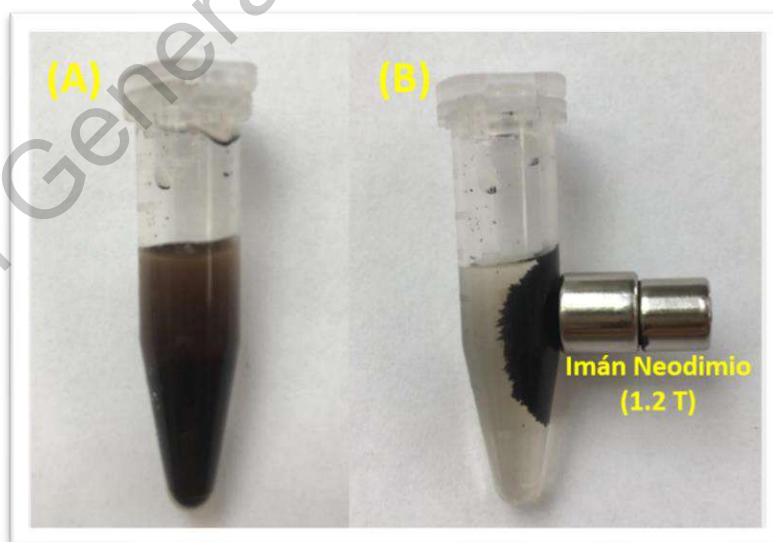


Figura 17. Nanopartículas magnéticas recubiertas con quitosano A) en suspensión B) siendo atraídas por un imán de neodimio de 1.2 T.

6.4 Inmovilización de lacasa comercial y extracto enzimático

La cantidad de proteína soluble inmovilizada en el compuesto de magnetita ($\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitano@Enzimas) se determinó restando la concentración final de proteínas a la inicial de las enzimas en el medio de inmovilización. Se consideró el 100 % de proteína a la concentración inicial de lacasa en la solución antes de la inmovilización. El contenido de proteína se midió usando el ensayo de proteína de Bradford con albumina de suero bovino como estándar.

En la Figura 18 se observan los porcentajes de inmovilización en distintos pH siendo 7 y 8 los que presentaron mayor porcentaje de inmovilización con 79.7 % y 80.1 % respectivamente. En lo reportado por Díaz-Hernández *et al.*, en 2018 bajo la misma metodología de inmovilización enzimática se lograron porcentajes de 67 % para una xilanasas y celulasa, lo cual es similar a lo que se obtuvo en este trabajo inmovilizando lacasa. El mecanismo de reacción entre el genipino y los grupos aminos depende en gran manera del pH, teniendo un amplio rango (4.0 a 10.5) donde la reacción se puede llevar a cabo, proporcionando rendimientos altos a valores óptimos de 7.4 a 8.5 (Sung *et al.*, 2000).

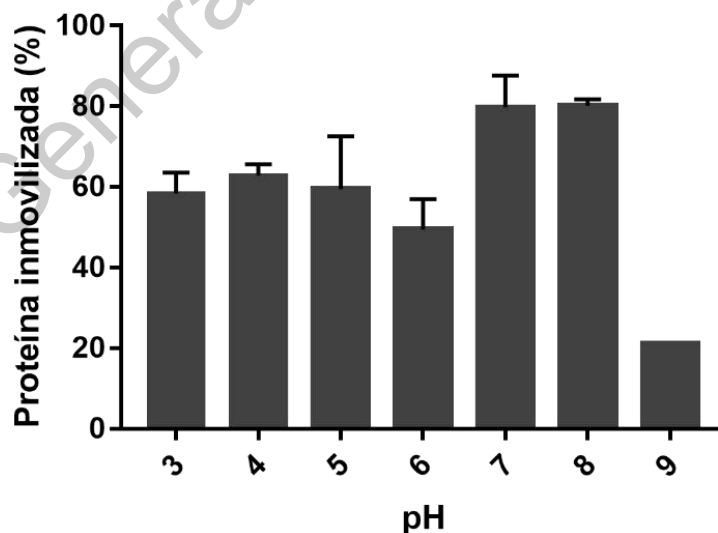


Figura 18. Porcentaje de proteína inmovilizada en el soporte después de la reacción de entrecruzamiento a diferentes valores de pH.

El genipino exhibe una alta reactividad hacia los grupos amino, puede usarse incluso cuando haya pocos grupos a lo largo de la cadena del polímero, lo que permite realizar el acoplamiento de los grupos amino que pueden estar unidas covalentemente o no covalentemente a la cadena de polisacáridos (Tokareva *et al.*, 2017).

La elección de pH permite controlar la estructura de los productos reticulados donde a valores bajos de pH da como resultado la formación de moléculas más pequeñas de genipino unido, mientras que a condiciones más básicas se puede lograr la oligomerización. La alta reactividad del genipino con los grupos amino se ha utilizado como agente espaciador y como reticulante, donde los rendimientos de ambos procesos han alcanzado porcentajes de 54 y 80 % respectivamente (Tokareva *et al.*, 2017). Las condiciones de pH donde se obtuvo la máxima retención de proteína soluble por el soporte fueron las utilizadas en los posteriores ensayos de inmovilización enzimática.

6.4.1 Efecto del pH sobre la actividad de lacasa comercial

El efecto del pH sobre la actividad enzimática de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quitosano}@lacasa$ se estudió mediante la incubación en amortiguador de citrato–fosfato 50mM y glicina–NaOH 50mM para valores de pH de 3 – 9, respectivamente. Los resultados de los ensayos de actividad catalítica de las enzimas libres e inmovilizadas en diferentes valores de pH se muestran en la Figura 19 y 20. La lacasa comercial inmovilizada tuvo un valor máximo de actividad a pH 6 de 11. 57 U mg^{-1} y no se registró actividad para valores por encima de este. Se ha reportado anteriormente que una de las desventajas de la inmovilización mediante enlace covalente es la posibilidad de la desactivación de las enzimas o lo que ha sido llamado “dilución de actividad”, debido a la introducción de grupos no catalíticos conformados por los enlaces formados al momento de la inmovilización. Esto no se mejora mediante el uso de mayores cargas de enzimas, ya que esto puede conducir a la pérdida de

actividad debido a la difícil accesibilidad de algunas de las moléculas de enzimas, en especial cuando hay múltiples capas en la superficie del soporte o están situadas profundamente dentro de los poros del mismo, siendo inaccesibles para el sustrato (Sheldon y Pelt, 2013).

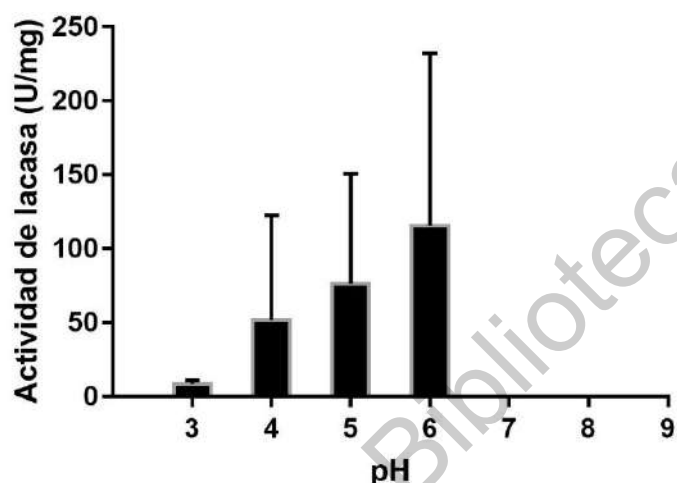


Figura 19. Efecto del pH sobre la actividad de lacasa de Fe_3O_4 @Quitosano@lacasa.

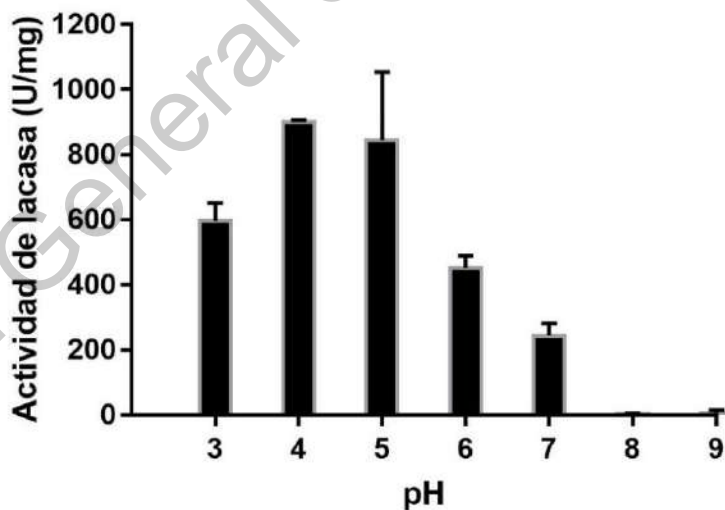


Figura 20. Efecto del pH sobre la actividad de lacasa de la enzima libre.

En este caso la lacasa inmovilizada presentó actividad a valores más ácidos de pH, en contraste con la lacasa libre en la que se observó actividad catalítica en un rango más amplio de valores de pH. Como se discutió en el apartado anterior, la

actividad enzimática disminuye por efecto del entrecruzamiento con el soporte, sin embargo, tiene la ventaja de que la enzima inmovilizada puede ser reutilizada. Además, la probabilidad de que la enzima se pueda lixiviar del soporte en un medio acuoso o en presencia de sustratos y productos con propiedades tensoactivas son menores al estar inmovilizada de forma covalente (Sheldon y Pelt, 2013).

6.4.2 Efecto del pH sobre la actividad de lacasa en el extracto enzimático

La actividad catalítica del extracto enzimático inmovilizado con respecto al pH también fue analizada y los resultados obtenidos muestran una actividad hacia valores ácidos de pH. En la Figura 21 se observa que la mayor actividad de lacasa se da en un valor de pH 3 con 1.83 U/g y muestra una reducción de su actividad en valores más cercanos al neutro con una pérdida del 50.82 % en un pH de 4 y del 95 % a pH 5. En valores básicos de pH muestra una pérdida total de la actividad, similar a lo ocurrido con la lacasa comercial libre e inmovilizada. Las desventajas mencionadas anteriormente en cuanto a la inmovilización covalente aplican de igual forma en este caso. La actividad catalítica de la mayoría de las lacasas fúngicas es máxima en condiciones ácidas de pH como ha sido reportado anteriormente (Amin *et al.*, 2018).

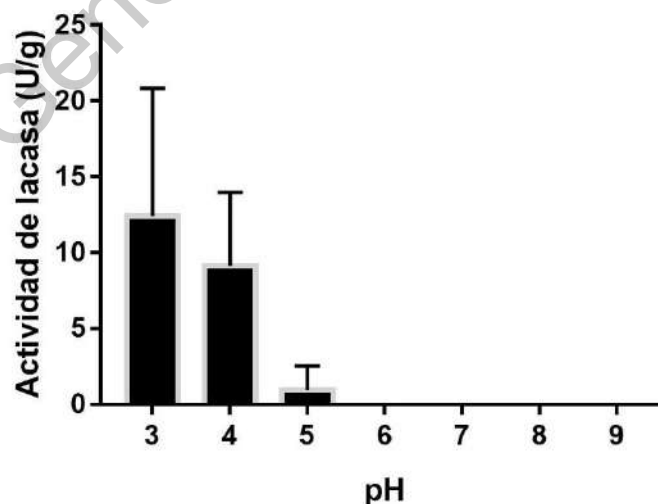


Figura 21. Efecto del pH sobre la actividad de lacasa del extracto crudo enzimático inmovilizado.

Estos resultados concuerdan con lo reportado anteriormente en cuanto a inmovilización de lacasa donde a valores más ácidos de pH se encuentran mayor actividad. De acuerdo con Amin *et al.* (2018) quienes inmovilizaron lacasa de *Trametes Versicolor* en $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Kit-6-NH}_2$ reportaron valores óptimos de actividad a pH de 4.5 para la enzima libre e inmovilizada y la pérdida de la misma hacia valores alrededor de 7.

Sin embargo, es importante mencionar que la mayor parte en la inmovilización covalente mencionada, en algunos casos pueden alterar negativamente la conformación de la enzima, lo que lleva a una disminución de su actividad (Alshabib y Onaizi, 2019).

6.4.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad de lacasa

El efecto de la temperatura en $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quitano}@lacasa$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quitano}@ECE$ fue determinado ensayando la actividad enzimática luego de incubarla en un rango de 30 a 90 °C (en intervalos de 10 °C) durante 10 minutos utilizando un baño seco y posteriormente midiendo la actividad utilizando ABTS como sustrato.

En la Figura 22 se muestra que la temperatura tiene una influencia en la oxidación del ABTS ya que la actividad de lacasa aumentó gradualmente con la temperatura, obteniendo una actividad máxima de 76.48 y 365.84 U/g a 50 °C para lacasa libre e inmovilizada, respectivamente. En $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quitano}@lacasa$ muestra un menor efecto negativo en su actividad a comparación con la enzima libre. La temperatura óptima de catálisis para lacasa no se modifica por la inmovilización ya que en ambos casos es de 50 °C, pero sí mejora su actividad al estar inmovilizada, reteniendo su actividad a temperaturas de 30 a 70 °C.

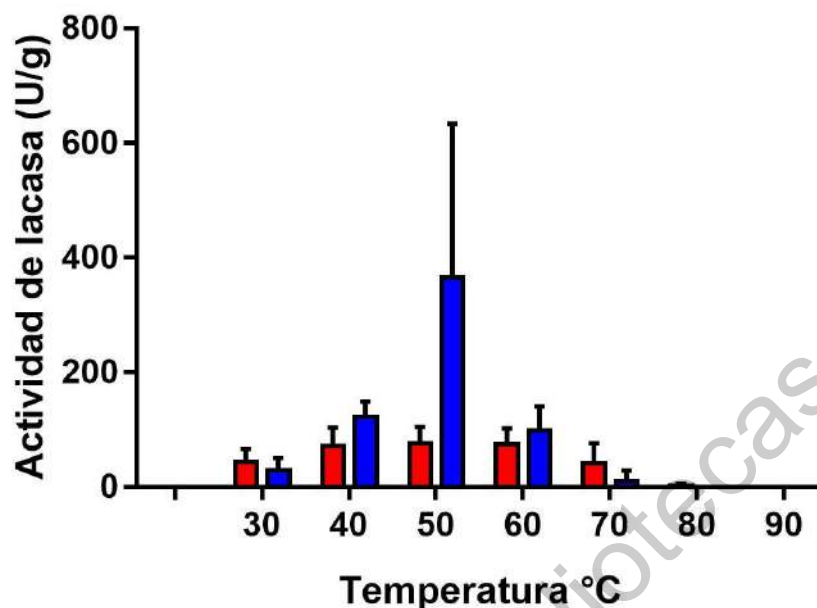


Figura 22. Efecto de la temperatura sobre la actividad de lacasa comercial libre (barras rojas) y sobre Fe₃O₄@Quitosano@Lacasa (barras azules).

La Figura 23 muestra el efecto de la temperatura en la actividad de lacasa sobre el ECE libre y Fe₃O₄@Quitosano@ECE. La temperatura donde se observó la máxima actividad de lacasa en el ECE libre e inmovilizado fue de 60 y 50 °C, respectivamente, coincidiendo con la temperatura de máxima actividad de lacasa en la enzima comercial inmovilizada que fue de 50 °C. La enzima libre muestra una menor actividad catalítica comparada con la enzima inmovilizada, que exhibe un menor efecto negativo en su actividad con respecto a la temperatura. La inmovilización no tuvo un efecto significativo sobre la temperatura de máxima actividad de lacasa.

Estos resultados muestran que la inmovilización de lacasa tanto comercial como proveniente de extracto enzimático en un soporte de Fe₃O₄@Quitosano brinda un efecto protector y estabilizador sobre la desnaturalización por calor e indujo una actividad mejorada dentro del rango de temperatura probados. Sin embargo, temperaturas superiores a 70 °C dieron una clara reducción de la actividad debido a la desnaturalización enzimática. La mejora de la estabilidad

térmica de la enzima puede explicarse por su movilidad conformacional reducida al estar unida covalentemente (Amin *et al.*, 2018). Lo que resulta en una mayor estabilidad hacia la desnaturalización térmica.

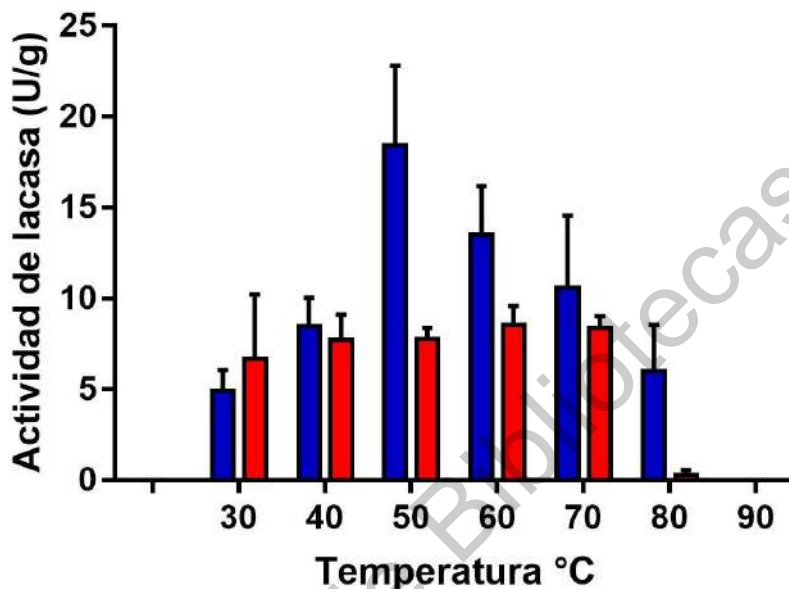


Figura 23. Efecto de la temperatura sobre la actividad de lacasa en el ECE (barras rojas) sobre Fe₃O₄@Quitosano@ECE (barras azules).

6.5. Caracterización magnética, térmica y estructural del sistema

6.5.1. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

Con la finalidad de determinar la presencia de los grupos funcionales en las nanopartículas magnéticas recubiertas con quitosano (Fe₃O₄@Quitosano) y la interacción de las enzimas con el soporte sintetizado (Fe₃O₄@Quitosano@Lacasa y Fe₃O₄@Quitosano@ECE), se realizaron pruebas de espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR). Los espectros FT-IR de quitosano y Fe₃O₄ se encuentran previamente documentados (Garnica-Palafox y Sánchez-Arévalo, 2016; Soares *et al.*, 2016). La Figura 24 muestra los espectros FT-IR obtenidos tanto para Fe₃O₄, Fe₃O₄@Quitosano, Fe₃O₄@Quitosano@Lacasa y Fe₃O₄@Quitosano@ECE.

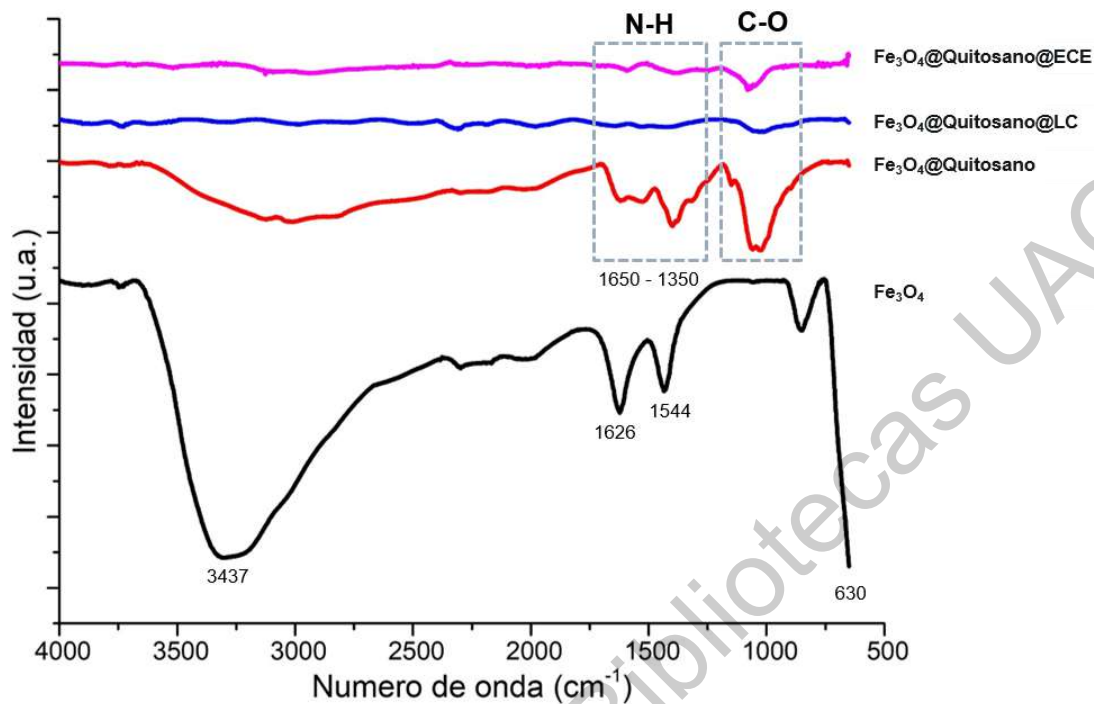


Figura 24. Espectro de FT-IR de Fe_3O_4 (negro), Fe_3O_4 @Quitosano (rojo), Fe_3O_4 @Quitosano@Lacasa (azul) y Fe_3O_4 @Quitosano@ECE (rosa).

Las bandas entre aproximadamente 1650 cm^{-1} y 1350 cm^{-1} , se encuentran relacionadas con grupos aminos (NH_2) presentes tanto en el quitosano como en las enzimas. Las señales entre 1900 cm^{-1} y 1200 cm^{-1} que corresponden a enlaces C–O en las enzimas disminuyeron después de la reticulación con Fe_3O_4 @Quitosano. La unión covalente de la enzima a la superficie de las nanopartículas se confirmó mediante bandas cercanas a 1547 cm^{-1} para proteínas representativas y bandas a 1293 y 1396 cm^{-1} típicas para lacasa de *T. versicolor*. Algunas de las señales que se identificaron por debajo de 1000 cm^{-1} pueden asignarse a enlaces C–C. Se observaron bandas típicas inferiores a 700 cm^{-1} identificadas como enlaces Fe–O, características de la magnetita (Díaz *et al.*, 2018).

6.5.2. Análisis Termogravimétrico (ATG)

El análisis TG de las muestras Fe_3O_4 , Fe_3O_4 @Quitosano, Fe_3O_4 @Quitosano@Lacasa y Fe_3O_4 @Quitosano@ECE se realizó en un intervalo de temperatura de $30 - 800\text{ }^\circ\text{C}$ con una velocidad de $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$.

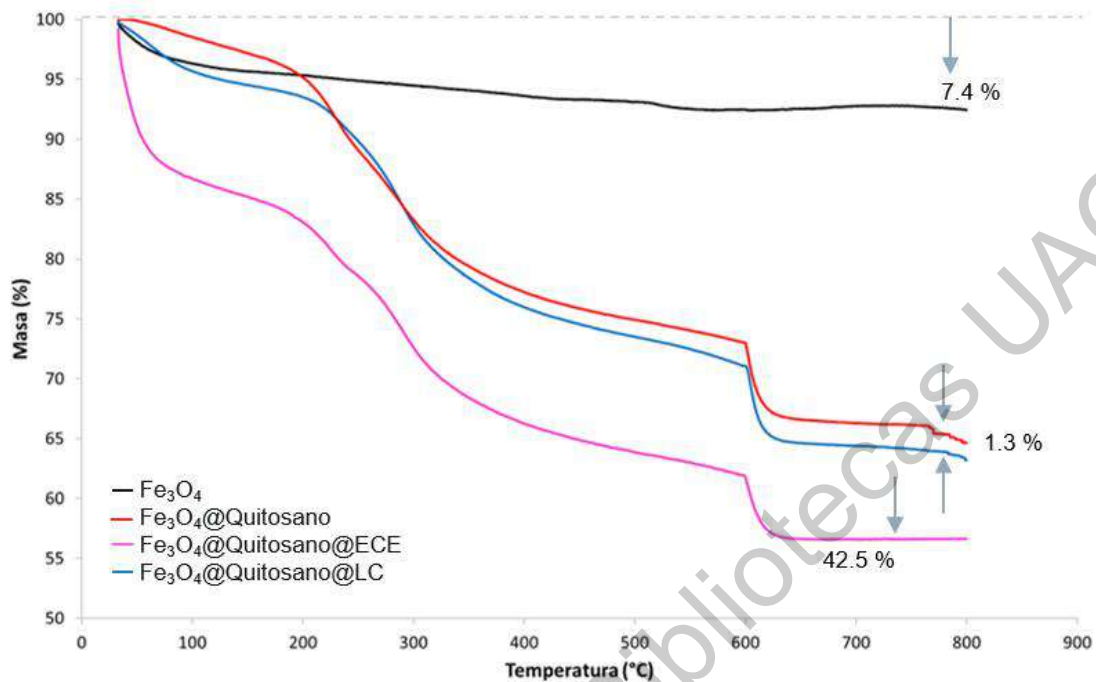


Figura 25. Pérdidas de masa respecto a la temperatura Fe₃O₄ (negro), Fe₃O₄@Quitosano (rojo), Fe₃O₄@Quitosano@Lacasa (azul) y Fe₃O₄@Quitosano@ECE (rosa).

Los perfiles expuestos en la Figura 25 muestran la pérdida de peso de las nano partículas magnéticas, el compuesto de quitosano y el compuesto inmovilizado con lacasa comercial y el ECE. El perfil del termograma de Fe₃O₄ muestra una pérdida de masa total del 7.4 % que se le atribuye principalmente a la pérdida de agua absorbida físicamente en el material. Para el Fe₃O₄@Quitosano la pérdida de masa fue de 35.3 % resultado de la descomposición del recubrimiento de quitosano en la superficie del material, en comparación con Fe₃O₄@Quitosano@Lacasa y Fe₃O₄@Quitosano@ECE que tuvieron una pérdida de masa del 36.6 y 42.50 % respectivamente a temperaturas que varían desde 62 a 180 °C. Es importante notar la diferencia de peso entre el Fe₃O₄@Quitosano y Fe₃O₄@Quitosano@Lacasa del 1.3 % lo que indica que hay 1.3 mg de proteína soluble por 1 g de soporte. De igual forma entre Fe₃O₄@Quitosano y Fe₃O₄@Quitosano@ECE hay una pérdida del 42.5 % del cual podemos asumir que 1.3 mg pertenecen a la proteína soluble por 1 g de

soporte y lo restante que no pertenece al soporte quitosano corresponde a la mezcla compleja de biomoléculas del ECE.

En comparación de las curvas pertenecientes a las enzimas inmovilizadas en el soporte en $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qitosano@ECE se observa una mayor pérdida de peso que en la enzima comercial inmovilizada. Esto se puede deber a que el ECE contiene un mayor porcentaje de agua, así como diversas biomoléculas como carbohidratos, lípidos y otras proteínas. De igual forma el quitosano por su naturaleza de cargas en los grupos amino y carboxilo tiende a formar puentes de hidrógeno por lo que es capaz de adsorber muchas biomoléculas. Por eso se observa una pérdida de masa mayor en el ECE inmovilizado entre los 100 y 200 °C.

De acuerdo con lo reportado por Tarasi *et al.* (2018) ellos tuvieron una pérdida del 7.5 % de peso en nanopartículas magnéticas sin funcionalizar similar a los resultados obtenidos en el análisis mostrado en esta investigación. Asimismo, Díaz-Hernández *et al.* (2018) presentó una pérdida de peso total de Fe_3O_4 del 12.9 % y del 40.5 %, 39.6 % para $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qitosano y $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qitosano@Enzimas respectivamente, valores muy similares a los obtenidos debido a que se siguió la misma metodología de síntesis del material y la funcionalización para la posterior inmovilización.

De los perfiles de TGA también se puede observar la degradación de la matriz del quitosano en temperaturas mayores a los 200 °C lo que proporciona cierta estabilidad térmica a la enzima inmovilizada por sobre la enzima en estado libre siendo esta una ventaja en la implementación a gran escala.

6.5.3 Difracción de rayos-X

Los perfiles de los patrones de DRX se analizaron con el objetivo de conocer la estructura cristalina del material compuesto antes y después de la inmovilización. Los patrones de difracción del material se muestran en la Figura 26. Donde se identificaron señales pertenecientes al Fe_3O_4 , lo que nos indica que la estructura

crystalina de las partículas magnéticas permanece sin cambios durante el recubrimiento con quitosano y la posterior inmovilización de las enzimas.

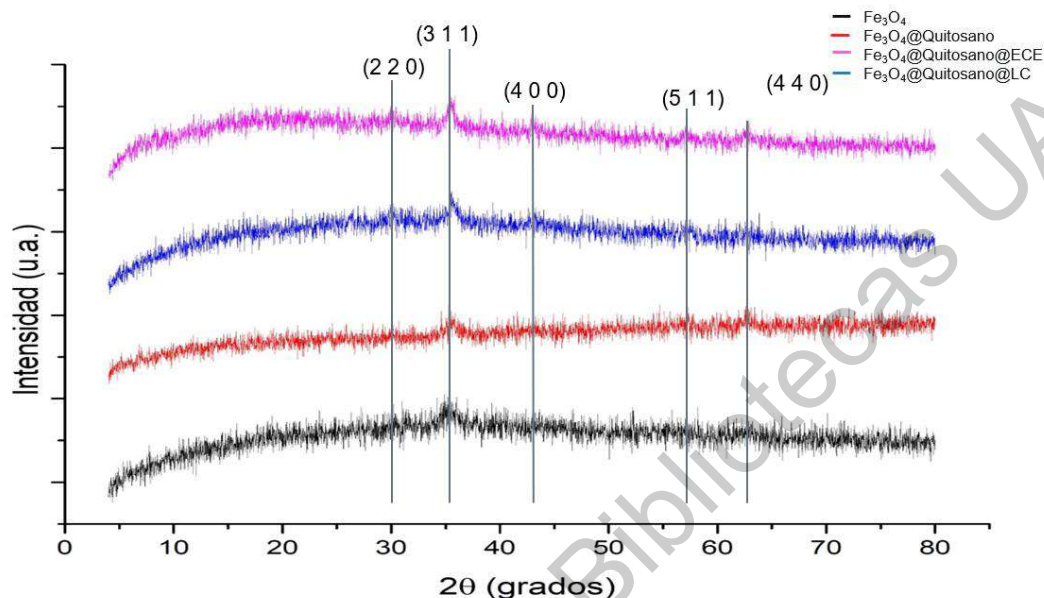


Figura 26. DRX patrones de Fe₃O₄ (negro), Fe₃O₄@Quitosano (rojo), Fe₃O₄@Quitosano@Lacasa (azul) y Fe₃O₄@Quitosano@ECE (rosa).

Las señales representadas en los espectros de DRX de los compuestos en un ángulo $2\theta = 30.1^\circ, 35.3^\circ, 43.1^\circ, 53.5^\circ, 56.9^\circ$ y 62.7° corresponden a los planos (2 2 0), (3 1 1), (4 0 0), (4 2 2), (5 1 1) y (4 4 0) respectivamente (Kenefi *et al.*, 2017), estos ángulos son característicos de Fe₃O₄ (Farjadian *et al.*, 2017). En este caso en una mezcla de compuestos como lo es el material en el que se inmovilizó cada fase cristalina va a contribuir al patrón de DRX global, siendo la magnetita el material que se observa en los perfiles de Fe₃O₄@Quitosano, Fe₃O₄@Quitosano@Lacasa y Fe₃O₄@Quitosano@ECE lo que concuerda con previos estudios reportados anteriormente de nanopartículas magnéticas (Díaz-Hernández *et al.*, 2018; Tarasi *et al.*, 2018). Estos resultados indican que la funcionalización del compuesto Fe₃O₄@quitosano con genipino no tuvo influencia en la fase cristalina del compuesto magnético.

6.5.4. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

La morfología superficial de las partículas antes y después de la inmovilización se realizó mediante el análisis por microscopía electrónica de barrido. Las micrografías obtenidas muestran las diferencias superficiales, donde Fe_3O_4 se observa una superficie más lisa y uniforme (Figura 27A) a diferencia de las partículas recubiertas con quitosano $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano (Figura 27B) y con las enzimas inmovilizadas $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Lacasa (Figura 27C) y $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@ECE (Figura 27D) donde se observa rugosidad y superficies granuladas.

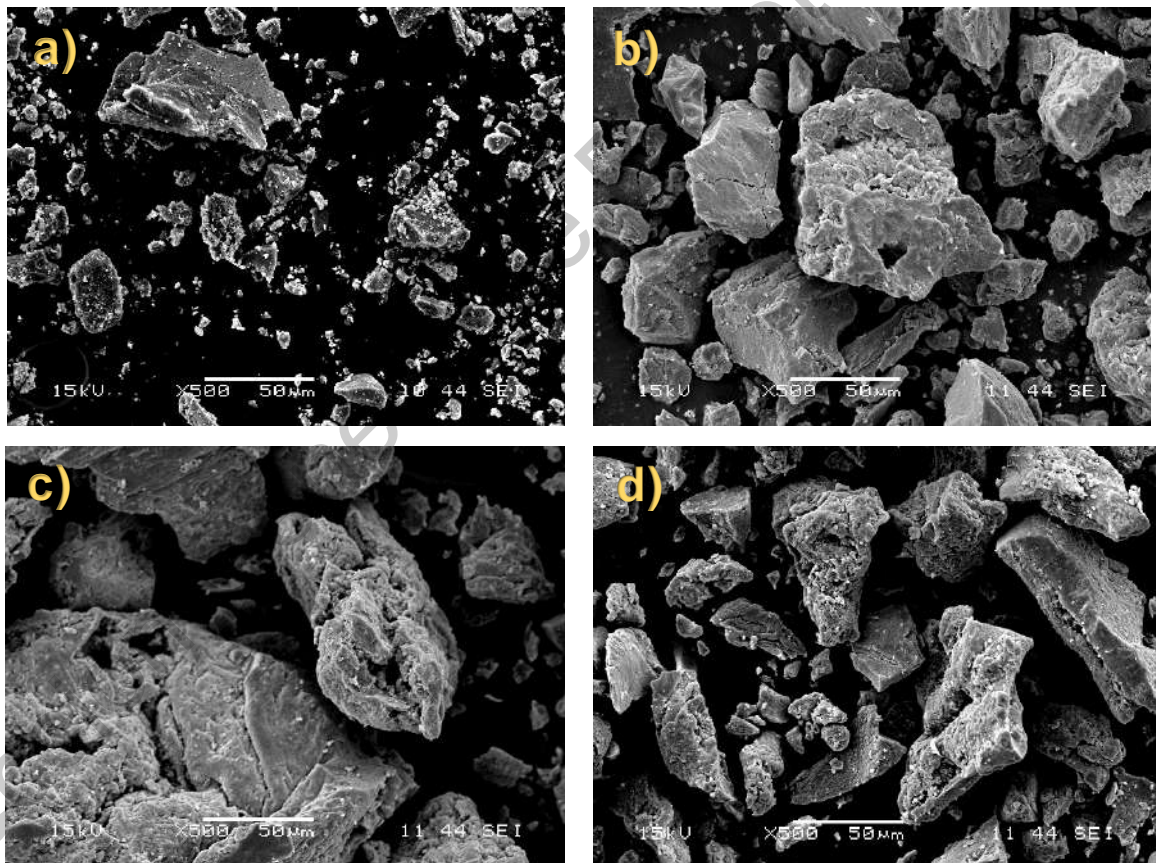


Figura 27. Micrografías de las partículas antes y después de la inmovilización enzimática a X500 de amplificación (barra=50 μm). En a) se muestra el soporte de Fe_3O_4 , en b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano, c) $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Lacasa y d) $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@ECE.

Se puede notar la morfología típica de colinas y valles consistente con lo reportado por Kadam *et al.* (2018) que de igual forma observaron un aumento en el tamaño aparente de las partículas posterior a la inmovilización enzimática. Las partículas con quitosano exhiben una clara carga de material en la superficie lo que posiblemente mejora la inmovilización enzimática debido al aumento de la superficie disponible para la unión.

Sin embargo, la topografía de la superficie del Fe_3O_4 @Quitosano modificado con lacasa comercial y ECE fue ligeramente diferente con el soporte sin enzimas. La Figura 27C y 27D. mostró que las enzimas parecen llenar los valles y causan un aspecto más rugoso de la superficie modificada en comparación con el soporte solo. Las imágenes (Figuras 28-31) muestran lo mencionado anteriormente.

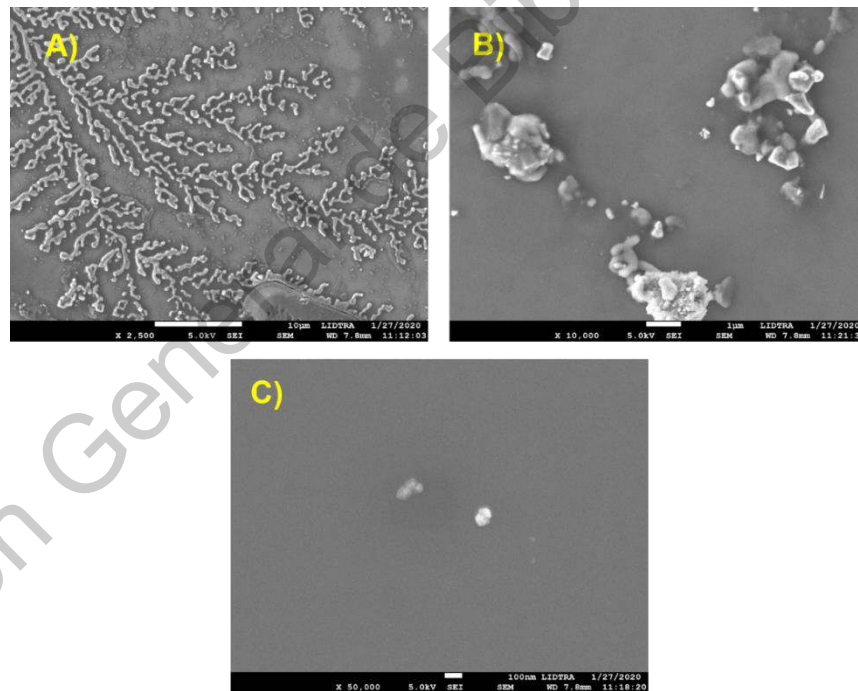


Figura 28. Micrografías mediante MEB de Fe_3O_4 A) 2,500x, B) 10,000x, C) 50,000x

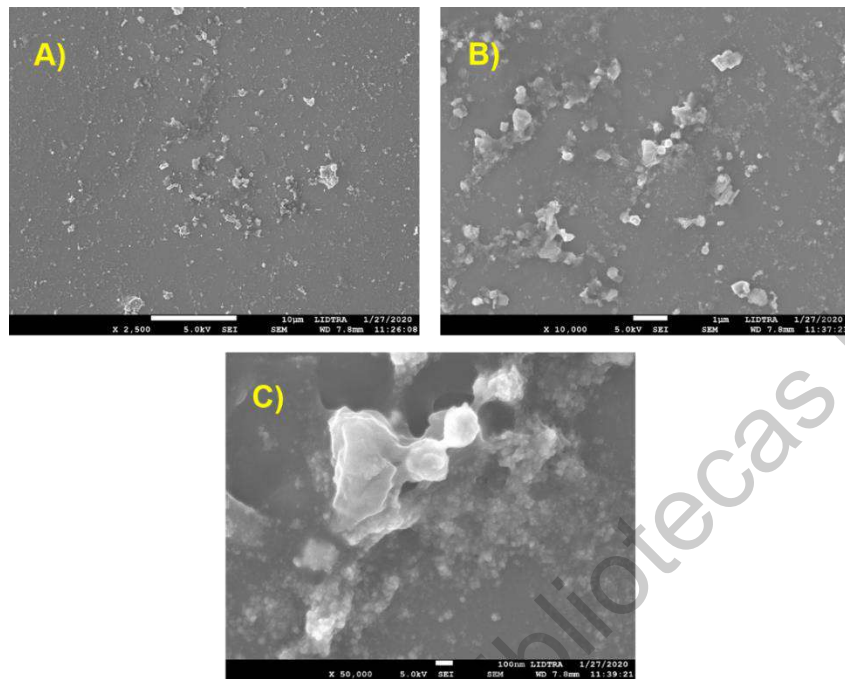


Figura 29. Micrografías mediante MEB de Fe_3O_4 @Quitosano A) 2,500x, B) 10,000x, C) 50,000x

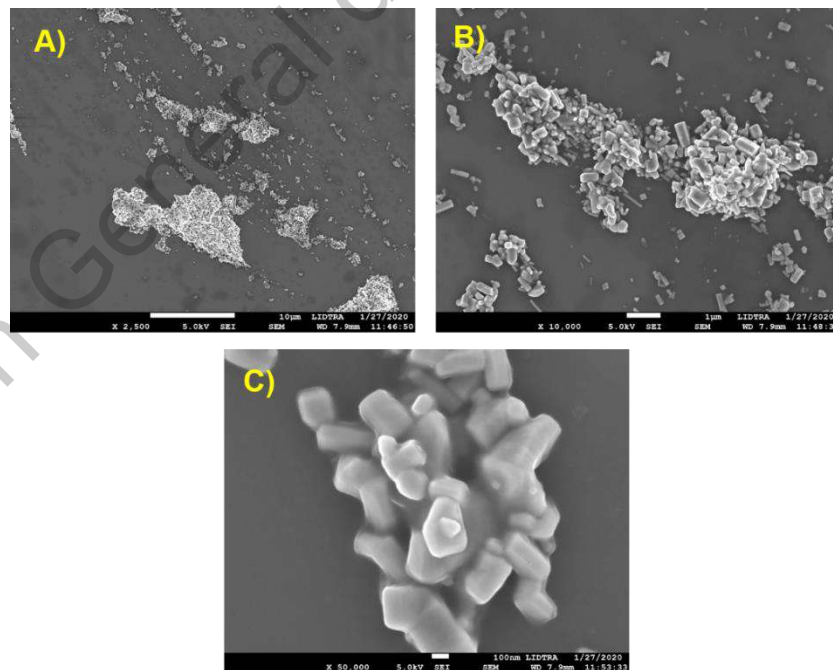


Figura 30. Micrografías mediante MEB de Fe_3O_4 @Quitosano@Lacasa A) 2,500x, B) 10,000x, C) 50,000x

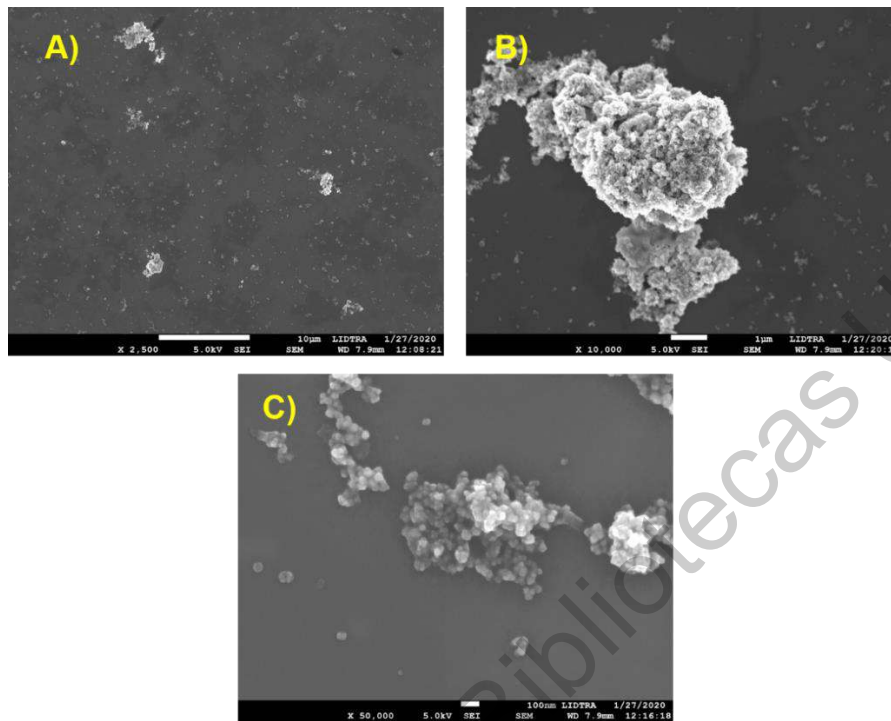


Figura 31. Micrográficas mediante MEB de $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@ECE
 A) 2,500x, B) 10,000x, C) 50,000x

6.6 Parámetros cinéticos K_M y V_{\max}

La determinación de los parámetros cinéticos de K_M y V_{\max} de las enzimas libres e inmovilizadas se determinó mediante la representación doble recíproca de Lineweaver-Burk y se describen en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Parámetros cinéticos de la lacasa comercial y extracto crudo enzimático libre e inmovilizados.

Parámetro	Lacasa comercial libre	Lacasa comercial inmovilizada	Extracto crudo enzimático	Extracto crudo enzimático inmovilizado
V_{\max} ($\mu\text{M min}^{-1}$)	4.3878	0.0069	0.0003	0.0012
K_M (μM)	0.5882	0.0025	0.1666	0.0043

El K_M de lacasa comercial libre fue de $0.5882 \mu\text{M}$ y de la inmovilizada de $0.0025 \mu\text{M}$, para los valores de V_{max} se obtuvo $4.3878 \mu\text{M min}^{-1}$ y de 0.0069 respectivamente. Lo que nos permite observar que la enzima al estar inmovilizada aparentemente tiene una mayor afinidad por el sustrato. En cuanto a la velocidad máxima de reacción (V_{max}), la cinética de lacasa inmovilizada presentó una disminución del 99 % en comparación con la V_{max} de la lacasa libre. Fernandes *et al.* (2018) presentaron una disminución de 6 veces en comparación con la lacasa libre. Durante la inmovilización podrían inducirse cambios conformacionales en la estructura tridimensional de la lacasa. Con estos cambios puede ser difícil acceder a los sitios activos de la enzima, adicionalmente el pH óptimo para su actividad es distinto para la lacasa libre e inmovilizada, lo cual puede tener un efecto negativo en la conversión del sustrato.

En el caso de lo que se observa con el ECE libre e inmovilizado donde su K_M fue de $0.1666 \mu\text{M}$ y $0.0043 \mu\text{M}$, respectivamente. La disminución de K_M del ECE inmovilizado indica que al estar inmovilizada tiene una mayor afinidad por el sustrato. Los valores de V_{max} fueron de $0.0003 \mu\text{M min}^{-1}$ y de $0.0012 \mu\text{M min}^{-1}$ libre e inmovilizada, respectivamente. La inmovilización aumentó cuatro veces la velocidad de degradación de los compuestos. Los cambios en los parámetros cinéticos pueden ser debido a que en el ECE se encuentran una variedad de enzimas las cuales al ser inmovilizadas no todas corresponden a la lacasa. El modelo utilizado para obtener los parámetros cinéticos se ajusta a las enzimas puras y no a los extractos enzimáticos, aunque nos puede dar una aproximación en cuanto a la afinidad de los sistemas.

6.7 Degradación de colorantes

El potencial de degradación de colorantes azo de la lacasa comercial antes y después de la inmovilización igual que del ECE fue evaluado usando el colorante Sudan II a 600 ppm en modo por lote. Se tomaron las condiciones de máxima unión

de proteína al soporte y de actividad para cada uno de los tratamientos y se midió la reducción de la absorbancia con respecto al tiempo. Se observó (Figura 32) un 30 y 52 % de degradación en el colorante Sudán II (600 ppm) usando ECE libre e inmovilizado, respectivamente. En cuanto a la lacasa comercial se observó un porcentaje de degradación del 47 % para la lacasa libre y de 52 % para la inmovilizada. En ambos casos tanto para la enzima comercial como para el ECE los porcentajes de degradación son mayores al estar inmovilizadas. Esto se puede deber a que los enlaces covalentes formados por la reticulación de enzimas con el soporte de $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qitosano restringen la movilidad de la enzima protegiéndola de la desnaturalización. Fernandes *et al.* (2018) obtuvo porcentajes de degradación de 44 y 35 % para lacasa inmovilizada en nanopartículas magnéticas y lacasa libre respectivamente, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo.

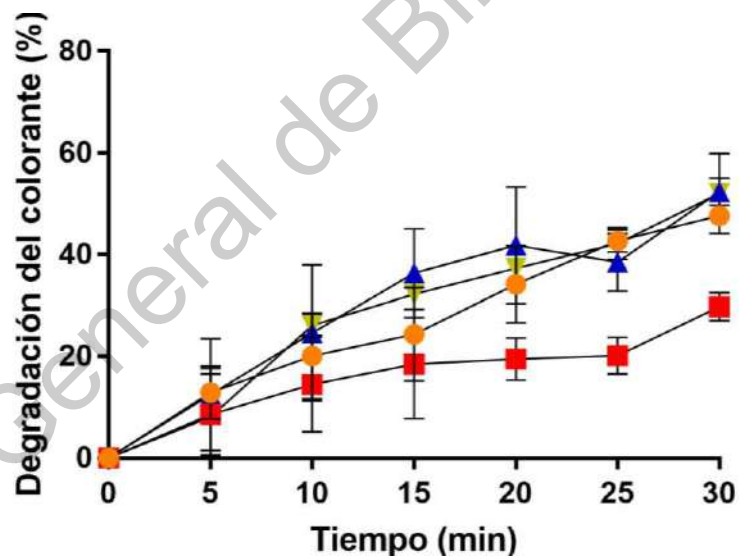


Figura 32. Porcentaje de degradación de colorante Sudán II (600 ppm) usando ECE (cuadro rojo), $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qitosano@ECE (triángulo invertido verde), lacasa comercial libre (círculo naranja) $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qitosano@Lacasa (triángulo azul).

Asimismo, se midió la degradación de los colorantes a las 24 h de incubación (Figura 33). Las enzimas inmovilizadas mostraron un 20 % más de degradación del colorante Sudán II a 600 ppm a comparación de las enzimas libres. El ECE

inmovilizado ($\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qitosano@ECE) tuvo un porcentaje de degradación del 70 % y la lacasa comercial inmovilizada ($\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qitosano@Lacasa) de 67 %. De igual forma Ma *et al.*, en 2018 inmovilizó lacasa en esferas de quitosano reticuladas con genipino y obtuvo porcentajes de degradación del 77 % para el colorante Negro ácido 172 a las 96 horas de incubación. Sharma *et al.* (2018) mencionan que la diversidad en las estructuras químicas de los colorantes podría resultar en la diferencia de las eficiencias de degradación hacia ellos.

Se observó que el ECE y la lacasa comercial inmovilizadas lograron un porcentaje de degradación del 52 % a los 30 min de reacción y de aproximadamente 70 % a las 24 h para las enzimas inmovilizadas. Lo anterior demuestra la efectividad de la producción de enzimas lignolíticas mediante la FES usando residuos agroindustriales como sustrato y su potencial de degradación es comparable al de lacasa comercial.

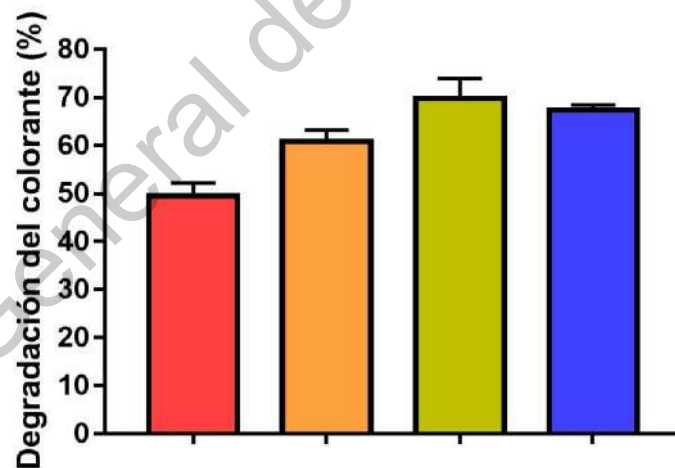


Figura 33. Degradación de colorante Sudan II a las 24 h usando ECE (rojo), lacasa comercial libre (naranja), $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qitosano@ECE (verde), $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qitosano@Lacasa (azul).

6.8 Capacidad de reuso

La actividad de lacasa de los composites catalíticos se determinó en ciclos de reuso usando ABTS como sustrato. Como se observa en la Figura 34, la actividad enzimática relativa disminuye gradualmente al aumentar los ciclos. La lacasa comercial inmovilizada pierde un 57 % de su actividad relativa en el segundo ciclo, para posteriormente perder una actividad del 40 % con respecto al ciclo anterior. Sin embargo, mantiene una actividad relativa del 7 % hasta el ciclo 7. A diferencia de lo reportado por Lassouane *et al.* (2019) que inmovilizó lacasa en nanopartículas magnéticas y utilizaron ABTS como sustrato, ellos obtuvieron porcentajes de actividad relativa mayores al 70 % después del quinto ciclo de reuso utilizando glutaraldehído como agente reticulante. El glutaraldehído tiene mayores porcentajes en cuanto a inmovilización enzimática pero su naturaleza tóxica lo hace un material peligroso al ambiente. Aunque la pérdida de la actividad sea significativa entre el primer y segundo ciclo, la reutilización es ventajosa para su uso continuo de esta enzima en aplicaciones biotecnológicas.

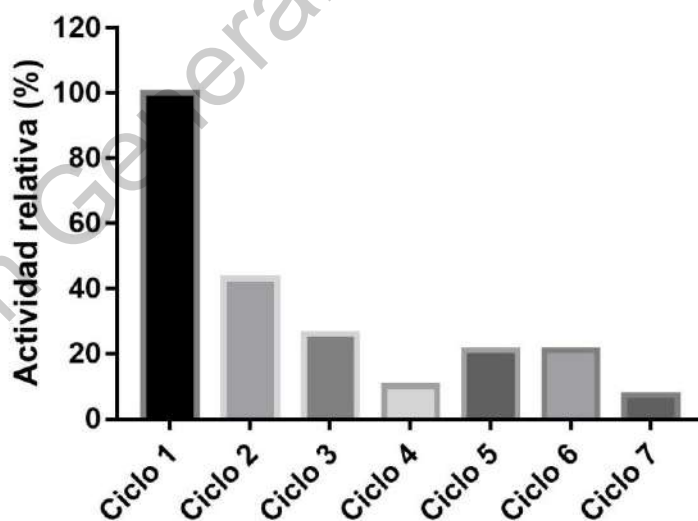


Figura 34. Reuso en ciclos continuos de $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosano@Lacasa usando ABTS como sustrato.

El extracto enzimático inmovilizado mantuvo mayores porcentajes de actividad relativa en los primeros ciclos comparado con la lacasa comercial como se observa en la Figura 35. Donde se muestra que el ciclo 2 mantuvo una actividad del 100 %, para el ciclo 3 y 4 su actividad disminuyó en un 30 % y en un 60 % respectivamente. Sin embargo, después del ciclo 4 perdió por completo su actividad.

Se puede apreciar una mayor estabilidad en la actividad relativa en los ciclos de la lacasa comercial inmovilizada ($\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qitosano@Lacasa) en comparación con el ECE. Donde la reducción de la actividad se puede deber a la inhibición por el producto final, daño mecánico, o desactivación de la enzima durante el ensayo de reciclado (Sojitra *et al.*, 2016) esto debido también a la pérdida de la enzima durante el proceso de lavado. Otro factor que pudo afectar es el tiempo de incubación de 10 min en cada ciclo a diferencia de lo reportado por otros autores (Bagewadi *et al.*, 2017; Fernandes *et al.*, 2017) donde el tiempo de incubación llega a ser de hasta 24 h obteniendo mayores porcentajes de actividad relativa.

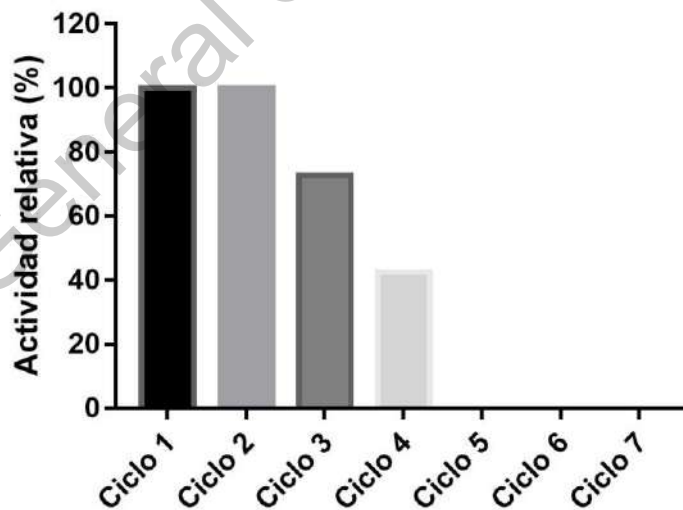


Figura 35. Reúso en ciclos continuos de $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Qitosano@ECE

7. CONCLUSIONES

Se inmovilizó de forma covalente lacasa comercial de *Trametes versicolor* y extracto crudo de lacasa de *Fomes* sp. EUM1, respectivamente, utilizando genipino como agente reticulante en magnetita (Fe_3O_4) revestida con quitosano. La actividad del extracto crudo de lacasa de *Fomes* sp. EUM1 una vez inmovilizado demostró actividades equiparables a la lacasa comercial lo que proporciona un biocatalizador estable con potencial para la degradación de colorantes textiles en agua. Proporcionando como ventaja el bajo costo de la producción del extracto.

Las enzimas mostraron tener una mayor estabilidad térmica al estar inmovilizadas en comparación con las enzimas libres y mostraron su capacidad de reúso en múltiples ciclos continuos. De igual forma se observó su fácil recuperación gracias al soporte con características magnéticas.

Este sistema podría ser aplicado a futuro como una etapa terciaria en un tren de tratamiento en la industria textil, siendo necesario evaluar el sistema en diferentes conformaciones de reactores ya sea en un lecho fluidizado y por lotes. Desde el punto de vista de una aplicación industrial, la inmovilización de extractos enzimáticos, es una opción viable a las enzimas comerciales en la degradación de colorantes tipo azo.

8. REFERENCIAS

- Aguedal, H., Iddou, A., Aziz, A., Shishkin, A., Ločs, J., & Juhna, T. 2019. Effect of thermal regeneration of diatomite adsorbent on its efficacy for removal of dye from water. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 1-12.
- Alshabib, M., Onaizi, S. A. 2019. A review on phenolic wastewater remediation using homogeneous and heterogeneous enzymatic processes: Current status and potential challenges. *Sep Purif Technol*, 219, 186-207
- Alneyadi, A. H., Rauf, M. A., & Ashraf, S. S. 2018. Oxidoreductases for the remediation of organic pollutants in water a critical review. *CRIT REV BIOTECHNOL*, 38(7), 971-988.
- Amin, R., Khorshidi, A., Shojaei, A. F., Rezaei, S., & Faramarzi, M. A. 2018. Immobilization of laccase on modified $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Kit-6}$ magnetite nanoparticles for enhanced delignification of olive pomace bio-waste. *Int J Biol Macromol*, 114, 106-113.
- Anusha NC, Umikalsom MS, Ling TC et al. 2012. Relationship between fungal growth morphologies and ability to secrete lipase in solid state fermentation. *Asian J Biotechnol*. 4: 15–29.
- Arora D.S., Sharma R.K., 2013. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 160, 1760–1788.
- Arroyo M. 1998. Immobilized enzymes: theory, methods of study and applications. *ARS Pharm.*, 39(2), 23-39.
- Asghar A., Raman A.A.A., Daud W.M.A.W., 2015. Advanced oxidation processes for in-situ production of hydrogen peroxide/hydroxyl radical for textile wastewater treatment: a review. *J. Clean. Prod*. 87, 826e838.
- Agrawal K., Chaturvedi V., Verma P. 2018. Fungal laccase discovered but yet undiscovered. *Bioresour Bioprocess*, 5(1), 1-12.

- Babuponnusami A., Muthukumar K. 2014. A review on Fenton and improvements to the Fenton process for wastewater treatment. *J. Environ. Chem. Eng.*, 2(1), 557-572.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 (1-2), 248-254.
- Bagewadi Z. K., Mulla S. I., Ninnekar H. Z. 2017. Purification and immobilization of laccase from *Trichoderma harzianum* strain HZN10 and its application in dye decolorization. *J Genet Eng Biotechnol.* 15(1), 139-150.
- Cao L., van Langen L., Sheldon R.A. 2003. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? *Curr Opin Biotechnol* 14:387–394.
- Castro A. M., Castilho L. R., Freire D. M. 2015. Performance of a fixed-bed solid-state fermentation bioreactor with forced aeration for the production of hydrolases by *Aspergillus awamori*. *Biochem Eng J*, 93, 303-308.
- Chen H. 2013. Modern solid state fermentation. Netherlands: Springer.
- Cipolatti E. P., Silva, M. J. A., Klein M., Feddern V., Feltes M. M. C., Oliveira, J. V. y de Oliveira, D. 2014. Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 99, 56-67.
- Couto S. R., Herrera J. L. T. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnol. Adv.*, 24(5), 500-513.
- Díaz-Hernández, A., Gracida, J., García-Almendárez, B. E., Regalado, C., Núñez, R., Amaro-Reyes, A. 2018. Characterization of magnetic nanoparticles coated with chitosan: A potential approach for enzyme immobilization. *J. Nanomater.*
- Diario Oficial de la Federación. 2012. Artículo 3º sección VII de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente. Consultado de

<https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/images/cibiogem/protocolo/LGEEPA.pdf>

Comisión Nacional del Agua. Estadísticas del Agua en México. 2017. Consultado de http://sina.conagua.gob.mx/publicaciones/EAM_2017.pdf

Comisión Nacional del Agua. Estadísticas del Agua en México. 2018. Consultado de http://sina.conagua.gob.mx/publicaciones/EAM_2018.pdf

Farjadian, F., Moradi, S., Hosseini, M. 2017. Thin chitosan films containing superparamagnetic nanoparticles with contrasting capability in magnetic resonance imaging. *J. Mater. Sci. Mater Med.* 28 (3), 47.

Fernandes, R. A., Daniel-da-Silva, A. L., Tavares, A. P., Xavier, A. M. 2017. EDTA-Cu (II) chelating magnetic nanoparticles as a support for laccase immobilization. *Chem Eng Sci*, 158, 599-605.

Fernández-Fernández, M. F., Sanromán, M. Á, D. M. 2013. Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnol. Adv.* 31(8), 1808-1825.

Garavaglia S, Cambria MT, Miglio M, Ragusa S, Iacobazzi V, Palmieri F, D'Ambrosio C, Scaloni A, Rizzi M. 2004. The structure of *Rigidoporus lignosus* laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair. *J Mol Biol.* 342(5):1519–1531

Garnica-Palafox, I. M. Sánchez-Arévalo, F. M. 2016. Influence of natural and synthetic crosslinking reagents on the structural and mechanical properties of chitosan-based hybrid hydrogels. *Carbohydr. Polym.* 151, 1073-1081.

Georgieva, T. Godjevargova, D. G. Mita, N. Diano, C. Menale, C. Nicolucci, C. R. Carratelli, L. Mita, and E. Golovinsky. 2010. "Non-isothermal bioremediation of waters polluted by phenol and some of its derivatives by laccase covalently immobilized on polypropylene membranes". *J. Mol. Catal. B. Enzym.*, vol. 66, pp. 210-218.

- Ghadi, A., Tabandeh, F., Mahjoub, S., Mohsenifar, A., Roshan, F. T., Alavije, R. S. 2014. Fabrication and characterization of core-shell magnetic chitosan nanoparticles as a novel carrier for immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase. J. Oleo. Sci. 64(4), 423-430.
- Ghaly, A., Ananthashankar, R., Alhattab, M., Ramakrishnan, V., 2014. Production, characterization and treatment of textile effluents: a critical review. J. Chem. Eng. Process. Technol. 5, 1–18.
- Ghosh, A., Dastidar, M.G., Sreekrishnan, T.R. 2017. Bioremediation of chromium complex dyes and treatment of sludge generated during the process. Int. Biodeterior. Biodegrad. 119 (Supplement C), 448–460.
- Gitis, V., & Hankins, N. 2018. Water treatment chemicals: Trends and challenges. J. Wat. Proc. Eng., 25, 34-38.
- Harris SD. 2008. Branching of fungal hyphae: regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. Mycologia 6:823–32.
- Hattori M, Konishi H, Tamura Y, Konno K, Sogawa K. 2005. Laccase-type phenoloxidase in salivary glands and watery saliva of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*. J Insect Physiol 51(12):1359–1365
- Holkar, C. R., Jadhav, A. J., Pinjari, D. V., Mahamuni, N. M., & Pandit, A. B. 2016. A critical review on textile wastewater treatments: possible approaches. J Environ Manage., 182, 351-366.
- Homaei A., Sariri, R., Vianello F., Stevanato, R. 2013. Enzyme immobilization: an update. J. Chem. Biol., 6(4), 185-205.
- INEGI. 2019. Conociendo la industria textil y de la confección. Colección de estudios sectoriales y regionales. Consultado de https://www.inegi.org.mx/contenido/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva_estruc/702825195649.pdf

- Jaber S. M., Shah U. K. M., Asa'ari A. Z. M., & Ariff, A. B. 2017. Optimization of laccase production by locally isolated *Trichoderma muroiana* IS1037 using rubber wood dust as substrate. *BioRes.* 12(2), 3834-3849.
- Jaiswal N., Pandey VP., Dwivedi UN. 2015. Purification of a thermostable alkaline laccase from papaya (*Carica papaya*) using affinity chromatography. *Int J Biol Macromol* 72:326–332
- Kadam, A. A., Jang, J., Jee, S. C., Sung, J. S., & Lee, D. S. 2018. Chitosan-functionalized supermagnetic halloysite nanotubes for covalent laccase immobilization. *Carbohydrate polymers*, 194, 208-216.
- Kant, R. 2012. Textile dyeing industry an environmental hazard. *Natural science*, 4(1), 22-26.
- Kefeni, K. K., Msagati, T. A., y Mamba, B. B. 2017. Ferrite nanoparticles: Synthesis, characterisation and applications in electronic device. *Mater. Sci. Eng., B*, 215, 37-55.
- Krajewska, B. 2004. Application of chitin and chitosan based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme. Microb. Technol.* 35, 126–139.
- Knežević, Z. D., Šiler-Marinković, S. S., & Mojović, L. V. 2004. Immobilized lipases as practical catalysts. *Acta Period. Technol.*, (35), 151-164.
- Kunamneni, A., Plou, F.J., Ballesteros, A., M. Alcalde. 2008. Laccases and their applications: a patent review. *Recent. Pat. Biotechnol.* 2, 10–24.
- Legerská, D. Chmelová, M. Ondrejovič. 2018. Decolourization and detoxification of monoazo dyes by laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*, *J. Biotechnol.* 285 (2018) 84–90.
- Lassouane, F., Aït-Amar, H., Amrani, S., & Rodriguez-Couto, S. 2019. A promising laccase immobilization approach for Bisphenol A removal from aqueous solutions. *Bioresour. Technol.*, 271, 360-367.

- Liang, C.Z., Sun, S.P., Li, F.Y. 2014. Treatment of highly concentrated wastewater containing multiple synthetic dyes by a combined process of coagulation/flocculation and nanofiltration. *J. Membr. Sci.* 469, 306e315.
- Loera Corral, O., Pérez Pérez, M.C.I., Barbosa Rodríguez, J.R., Villaseñor Ortega, Torres-Pacheco, Guevara-González, F. 2006. Laccases (Ed.) *Advances in agricultural and food biotechnology*. Research Sign post, Kerala, India, pp. 323–340.
- Ma, H. F., Meng, G., Cui, B. K., Si, J., & Dai, Y. C. 2018. Chitosan crosslinked with genipin as supporting matrix for biodegradation of synthetic dyes: Laccase immobilization and characterization. *Chem. Eng. Res. Des.* 132, 664-676.
- Mahmoud, M. S., Mostafa, M. K., Mohamed, S. A., Sobhy, N. A., & Nasr, M. 2017. Bioremediation of red azo dye from aqueous solutions by *Aspergillus niger* strain isolated from textile wastewater. *J. Environ. Chem. Eng.*, 5(1), 547-554.
- Mathur, N., Bhatnagar, P., P Bakre. 2006. Assessing mutagenicity of textile dyes from Pali (Rajasthan) using Ames bioassay. *Appl. Ecol. Environ. Res.* 4, 111–118.
- Méndez-Hernández, J. E., Loera, O., Méndez-Hernández, E. M., Herrera, E., Arce-Cervantes, O., Soto-Cruz, N. Ó. 2018. Fungal pretreatment of corn stover by *Fomes* sp. EUM1: Simultaneous production of readily hydrolysable biomass and useful biocatalysts. *WASTE BIOMASS VALORI.* 10(9), 2637-2650.
- Morozova, G. P. Shumakovich, M. A. Gorbacheva, S. V. Shleev, and A. I. Yaropolov. 2007. “Blue” laccases,” *Biochemistry*, vol. 72, no. 10, pp. 1136–1150.
- Mukherjee, B. Basak, B. Bhunia, A. Dey, B. Mondal. 2013. Potential use of polyphenol oxidases (PPO) in the bioremediation of phenolic contaminants containing industrial wastewater, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 12. 61–73, [https://doi.](https://doi.org/)

Norma Oficial Mexicana NOM-CCA-014-ECOL/1993 1993. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de la industria textil. Diario Oficial de la federación. Consultado de http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4794015&fecha=18/10/1993

Paul, S.A., Chavan, S.K., Khambe, S.D. 2012. Studies on characterization of textile industrial wastewater in solapur city. *Int. J. Chem. Sci.* 10, 635e642.

Pospiskova, K., y Safarik, I. 2013. Low-cost, easy to prepare magnetic chitosan microparticles for enzymes immobilization. *Carbohydr. Polym.* 96(2), 545-548.

Quintanar G., D., Allémann, E., Fessi, H., y Doelker, E. 1998. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 24(12), 1113-1128.

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

Satinder. K., Dhillon, G. S., Soccol, C. R. 2014. Biotransformation of waste biomass into high value biochemicals. Springer Science & Business Media.

Sharma, B., Dangi, A. K., & Shukla, P. 2018. Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: a review. *J. Environ. Manage*, 210, 10-22.

Senel, S. McClure, S.J. 2004. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 1467– 1480.

Senthivelan, T., Kanagaraj, J., & Panda, R. C. 2016. Recent trends in fungal laccase for various industrial applications: an eco-friendly approach a review. *Biotechnol Bioproc E*, 21(1), 19-38.

- Sheldon R. A., Pelt S. 2013. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem. Soc. Rev.*, 42(15), 6223-6235.
- Singh, P. Singh, P. Singh, 2015. Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes - A review. *Int. Biodeter. biodegr.* 104, 21-31.
- Soares, P. I. P., Sousa, A. I., Ferreira, I. M. M., Novo, C. M. M. y Borges, J. P. 2016. Towards the development of multifunctional chitosan-based iron oxide nanoparticles: Optimization and modelling of doxorubicin release. *Carbohydr. Polym.* 153, 212-221.
- Sojitra, U. V., Nadar, S. S., y Rathod, V. K. 2016. A magnetic tri-enzyme nanobiocatalyst for fruit juice clarification. *Food Chem.* 213, 296-305.
- Songulashvili G., Flahaut S., Demarez M., Tricot C., Bauvois C., Debaste F., Peninckx. 2016. High yield production in seven days of *Coriolopsis gallica* 1184 laccase at 50 L scale; enzyme purification and molecular characterization. *Fungal Biol* 120(4):481–488
- Sung H. W., Chang, Y., Liang, I. L., Chang, W. H., Chen, Y. C. J. 2000. *Biomed. Mater. Res.* 52, 77.
- 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. *Macromol Res*, 26(8), 755-762.
- Takigawa T., Endo Y. 2006. Effects of glutaraldehyde exposure on human health. *J. Occup. Health.* 48(2), 75-87.
- Tehrani-Bagha, A. R., Mahmoodi, N. M., & Menger, F. M. 2010. Degradation of a persistent organic dye from colored textile wastewater by ozonation. *Desalination*, 260(1-3), 34-38.

- Tokareva M. I., Ivantsova M. N., Mironov M. A. 2017. Heterocycles of natural origin as non-toxic reagents for cross-linking of proteins and polysaccharides. *Chem Heterocycl Compd.* 53(1), 21-35.
- United Nations Development Program. 2018. United Nations. Consultado de http://hdr.undp.org/sites/default/files/2018_human_development_statistical_update.pdf
- Vikrant, K., Giri, B.S., Raza, N., Roy, K., Kim, K.-H., Rai, B.N., Singh, R.S. 2018. Recent advancements in bioremediation of dye: current status and challenges. *Bioresour. Technol.* 253, 355–367.
- Xu R, Si Y, Wu X, 2014. Triclosan removal by laccase immobilized on mesoporous nanofibers: strong adsorption and efficient degradation. *Chem Eng J.* 2014;255:63–70.
- Yeap, K. L., Teng, T. T., Poh, B. T., Morad, N., Lee, K. E. 2014. Preparation and characterization of coagulation/flocculation behavior of a novel inorganic–organic hybrid polymer for reactive and disperse dyes removal. *Chem Eng J.* 243, 305-314.
- Yen H. Y. 2016. Energy consumption of treating textile wastewater for in-factory reuse by H₂O₂/UV process. *Desalination Water Treat.* 57(23), 10537-10545.
- Zandoná Filho, A. Soccol, C. R., LRC Guimarães, AL Woiciechowski, S.G. Karp, J.D. Coral. 2016. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products, 199.
- Zdarta, J., Meyer, A. S., Jesionowski, T., & Pinelo, M. 2018. A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility. *Catalysts*, 8(2), 92.