



Instituto Politécnico Nacional

**Centro de Investigación en
Biotecnología Aplicada –
Tlaxcala**



**Comparación de la cinética de decoloración de índigo
carmín utilizando diferentes sistemas de inmovilización de
enzimas extracelulares de *Trametes versicolor*.**

**Tesis para obtener el grado de:
Maestra en Biotecnología Aplicada**

Presenta:

I. B. I. Edith Bustamante Peralta

Directora de Tesis:

Dra. María Myrna Solís Oba

Comité tutorial:

Dra. Silvia Luna Suárez

Dr. Víctor Eric López y López

Dra. María del Rosario Ruíz Guerrero

Dra. Aída Solís Oba

Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala, abril 2012.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetitla siendo las 10:00 horas del día 10 del mes de abril del 2012 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA para examinar la tesis titulada:

Comparación de la cinética de decoloración de indigo carmín utilizando diferentes sistemas de inmovilización de enzimas extracelulares de *Trametes versicolor*

Presentada por el alumno:

Bustamante

Apellido paterno

Peralta

Apellido materno

Edith

Nombre(s)

Con registro:

A	1	0	0	1	3	1
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Biotecnología Aplicada

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director(a) de tesis

María Myrna Solís Oba

Silvia Luna Suárez
Víctor Eric López y López
Aida Solís Oba

Centro de Investigación
en Biotecnología
Aplicada

María del Rosario Ruiz Guerrero

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Alma Leticia Martínez Ayala



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Tepetitla, Tlaxcala el día 10 del mes de Abril del año 2012, el (la) que suscribe Edith Bustamante Peralta alumno (a) del Programa de Maestría en Biotecnología Aplicada con número de registro A100131, adscrito al Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA-IPN), manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. María Myrna Solís Oba y cede los derechos del trabajo intitulado “Comparación de la cinética de decoloración de índigo carmín utilizando diferentes sistemas de inmovilización de enzimas extracelulares de Trametes versicolor”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección edibuple@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

EDITH BUSTAMANTE PERALTA
Nombre y firma

ABSTRACT

In this work was evaluated the kinetics of discoloration of the indigo carmine dye using extracellular enzymes of *Trametes versicolor* immobilized on different supports. It was tried different culture media for the growth of *Trametes versicolor*, the best culture medium was the 12 (concentration of protein 2.54 mg/L, Lac specific activity of 12.89 kU/mg protein and Per specific activity of 5.48 kU/mg protein), it was concentrated by ultrafiltration with a membrane of 1 kDa. Ligninolytic enzymes present in the enzyme concentrate were immobilized on 5 different systems: 1 (Silica commercial amorphous, covalent bonding), 2 (Silica from TEOS, covalent bonding), 3 (Silica from TEOS, thiols via covalent bonding), 4 (chitosan, crosslinking) and 5 (alginate, chitosan, encapsulation). The discoloration of IC (100 ppm) with the systems 1A, 1B, 1C, 2, 3, 4, 5 and the free enzyme was carried out at 7, 24, 6.3, 84, 97, 6.7, 34 and 5.7 h respectively; also were quantified the cycles of use of biocatalysts, being the 1C system which had more (45 cycles in 4 months). Also examined the biochemical properties of the set of enzymes present in the *Tv.*'s enzyme concentrate like the effect of pH and temperature, in the systems 1A and 1C was an increase in the pH range in which the discoloration carried out from 2-12, all systems tested were less susceptible to temperature changes than pH changes, the system 1A showed higher thermal stability. Immobilization systems affected the affinity of the substrate to the active site, resulting K_G values higher than for the EC, but it was retained sufficient affinity to be carried out the discoloration. Discoloration products of indigo carmine with the immobilized enzymes were not phytotoxic, these systems could be used to remove indigo carmine from the industrial textiles effluents and take advantage of the waste water. The most promising system was the system 1C, it retained the highest amount of laccase activity, decolorized in a pH range of 2-12, increased optimum temperature and increased the range of temperature (50 - 80 °C), degrading IC accounting 45 cycles of use in 4 months; remained 98.2% of its Lac specific activity after 16 weeks of storage at 4 ° C. This system decolorized up to 1600 ppm of IC in 5 days.

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la cinética de decoloración del colorante índigo carmín utilizando enzimas extracelulares de *Trametes versicolor* inmovilizadas en diferentes soportes. Se probaron diferentes medios de cultivo para el crecimiento de *Trametes versicolor*, el mejor medio de cultivo fue el 12 (Concentración de proteína de 2.54 mg/L, AEEL de 12.89 kU/mg proteína y AEEP de 5.48 kU/mg proteína), concentrado por ultrafiltración con una membrana de 1 kDa. Las enzimas ligninolíticas presentes en el concentrado enzimático fueron inmovilizadas en 5 sistemas diferentes: 1 (Sílica amorfa comercial, enlace covalente), 2 (Sílica a partir de TEOS, enlace covalente), 3 (mismo soporte que 2, enlace covalente vía tioles), 4 (quitosano, reticulación) y 5 (Alginato-quitosano, encapsulación). La decoloración del IC (100 ppm) con los sistemas 1A, 1B, 1C, 2, 3, 4, 5 y la enzima libre, se llevó a cabo en 7, 24, 6.3, 84, 97, 6.7, 34 y 5.7 h respectivamente; además se cuantificaron los ciclos de uso, de los biocatalizadores, siendo el sistema 1C el que presentó mas (45 ciclos en 4 meses). También se analizaron las propiedades bioquímicas del conjunto de enzimas presentes en el concentrado enzimático de *Tv*. como el efecto de pH y temperatura, observándose en los sistemas 1A y 1C hubo un incremento en el rango de pH en el cual se lleva a cabo la decoloración, de 2-12, los diferentes sistemas probados fueron menos vulnerables a los cambios de temperatura que a los cambios de pH, el sistema 1A mostró mayor estabilidad térmica. Con los sistemas de inmovilización se afectó la afinidad del sustrato al sitio activo, obteniéndose valores de K_G superiores a los del CE, pero se conservó la afinidad suficiente para llevarse a cabo la decoloración. Los productos de decoloración del índigo carmín con las enzimas inmovilizadas no fueron fitotóxicos por lo que este tipo de sistemas podría utilizarse para remover índigo carmín de los efluentes textiles industriales y aprovecharse el agua residual. El sistema más prometedor fue el sistema 1C, tuvo la mayor cantidad de actividad lacasa retenida, decoloró en un rango de pH de 2-12, aumentó su temperatura óptima y amplió el rango de temperatura (50 – 80 °C), degradando IC en 45 ciclos de uso en 4 meses; mantuvo 98.2% de su AEEL después de 16 semanas de almacenamiento a 4 °C. Este sistema decoloró hasta 1600 ppm de IC en 5 días.

ÍNDICE

ABSTRACT	IV
RESUMEN	V
ÍNDICE DE FIGURAS	- 1 -
ÍNDICE DE TABLAS.....	- 3 -
ABREVIATURAS.....	- 4 -
1. INTRODUCCIÓN	- 5 -
2. ANTECEDENTES	- 8 -
2.1.1.1. Factores que afectan la actividad enzimática	- 11 -
2.1.2. Enzimas ligninolíticas.....	- 14 -
2.1.2.1. Lacasa	- 14 -
2.1.2.2. Peroxidasas	- 17 -
2.1.2.3. Manganeso peroxidasa	- 17 -
2.2. Inmovilización de enzimas	- 18 -
2.2.1. Inmovilización por retención física.	- 19 -
2.2.2. Inmovilización por unión química.	- 21 -
2.2.3. Ventajas y desventajas del uso de enzimas inmovilizadas	- 23 -
2.2.4. Soportes para inmovilización	- 24 -
2.2.5. Enzimas ligninolíticas inmovilizadas	- 25 -
2.3. Colorantes textiles	- 33 -
2.3.1. Índigo.....	- 34 -
2.3.2. Índigo carmín.....	- 35 -
3. JUSTIFICACIÓN	- 38 -
4. HIPÓTESIS.....	- 40 -
5. OBJETIVOS.....	- 40 -
6. MATERIAL Y MÉTODOS	42
6.1. Evaluación de medios de cultivo para producción de enzimas ligninolíticas.	43
6.1.1. Concentración y semi-purificación de enzimas extracelulares.	44
6.2. Determinaciones analíticas.....	45
6.2.1. Determinación de la actividad enzimática Lacasa con ABTS	45
6.2.2. Determinación de la actividad enzimática lacasa con siringaldazina (4-Hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído azino)	45
6.2.3. Determinación de la actividad enzimática peroxidasa con guayacol.	46

6.2.4.	Determinación de la actividad enzimática MnP con rojo fenol.....	46
6.2.5.	Cuantificación de proteína por el método de Bradford.	46
6.3.	Inmovilización de enzimas extracelulares de <i>Trametes versicolor</i>	47
6.3.1.	Sistema de inmovilización 1.....	47
6.3.2.	Formación de cristales por el método Sol-Gel.....	48
6.3.3.	Sistema de inmovilización enzimática 2.....	49
6.3.4.	Sistema de inmovilización 3.....	49
6.3.5.	Sistema de inmovilización 4.....	50
6.3.6.	Sistema de inmovilización 5.....	50
6.4.	Pruebas de decoloración y cuantificación de ciclos de uso.....	51
6.5.	Efecto del pH en la decoloración del IC usando los sistemas de inmovilización.....	53
6.6.	Efecto de la temperatura en la decoloración de IC usando los sistemas de inmovilización.....	54
6.7.	Determinación de parámetros cinéticos.....	54
6.8.	Estabilidad de almacenamiento.....	55
6.9.	Cromatografía en capa fina de productos de decoloración.....	55
6.10.	Análisis de fitotoxicidad de los productos de decoloración.....	55
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
7.1.	Evaluación de medios de cultivo para producción de enzimas ligninolíticas.....	57
7.1.1.	Concentración y semi-purificación de enzimas extracelulares.....	59
7.2.	Inmovilización de enzimas extracelulares de <i>Trametes versicolor</i>	60
7.2.1.	Sistema de inmovilización 1.....	61
7.2.2.	Comparación de sistemas de inmovilización.....	62
7.3.	Pruebas de decoloración.....	68
7.5.	Efecto del pH en la decoloración del IC usando los sistemas de inmovilización.....	77
7.6.	Efecto de la temperatura en la decoloración de IC usando los sistemas de inmovilización.....	82
7.7.	Determinación de parámetros cinéticos.....	86
7.8.	Estabilidad de almacenamiento.....	88
7.9.	Cromatografía en capa fina.....	91
7.10.	Análisis de fitotoxicidad de los productos de decoloración.....	92
8.	CONCLUSIONES.....	95
	Referencias bibliográficas.....	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática	12 -
Figura 2. Efecto del pH sobre la actividad enzimática.....	14 -
Figura 3. Estructura de la lacasa de <i>T. versicolor</i> , modelada con el programa PyMOL a partir del archivo 1GYC del <i>Protein Data Bank</i> (Piontek, y otros, 2002).	16 -
Figura 4. Principales métodos de inmovilización usados en la actualidad	19 -
Figura 5. Principal clasificación de inmovilización por unión química.....	21 -
Figura 6. Información de la estructura de alginato (Domínguez, y otros, 2005): A. los monómeros en alginato; B. la cadena de alginato.	26 -
Figura 7. Modelo caja de huevo	27 -
Figura 8. Gelificación con ion calcio	27 -
Figura 9. Silanización del soporte en este caso cristales de sílica	29 -
Figura 10. Activación con glutaraldehído, del soporte previamente silanizado.....	29 -
Figura 11. Inmovilización covalente de la enzima a través del grupo $-NH_2$ terminal.....	30 -
Figura 12. Estructura de quitosano.....	30 -
Figura 13. Entrecruzamiento de las cadenas de quitosano con un dialdehído.....	31 -
Figura 14. Molécula a) índigo; b) índigo carmín	35 -
Figura 15. Metodología general seguida en el desarrollo de la tesis.....	42
Figura 16. Comparación de medios de cultivo residual con mayor actividad enzimática lacasa al día 20 de incubación.....	58
Figura 17. Evaluación del día óptimo de concentración de proteína	58
Figura 18. Actividad enzimática Lacasa (AEL) y Mn Peroxidasa (AEP) presentes en el MCR antes y después de ultrafiltración. 12 (medio 12), C.12 (Concentrado enzimático medio 12) y P. 12 (Permeado)	59
Figura 19. Sustitución electrófila de organosilanos por alcoholes.	61
Figura 20. Comparación % proteína inmovilizada (PI), % Actividad enzimática lacasa retenida (AEELR) y % actividad enzimática Mn peroxidasa retenida (AEEPR) presente en las variantes del sistema 1.....	62
Figura 21. Comparación de sistemas de inmovilización 2 al 5.	65
Figura 22. Porcentaje de IC adsorbido por los soportes utilizados en los diferentes sistemas de inmovilización enzimática.	69
Figura 23. Productos de decoloración de IC 100 ppm con los diferentes sistemas de inmovilización y para el CE.	70
Figura 24. Cinética de decoloración de IC 100 ppm	72

Figura 25. Cinética de decoloración de sistemas de inmovilización 1 y 4 comparados con el CE.....	73
Figura 26. Ciclos de uso de decoloración de IC 100 ppm en el lapso de 4 meses.....	75
Figura 27. Velocidad promedio de decoloración de IC 100 ppm, en los diferentes ciclos de uso evaluados en 4 meses.....	76
Figura 28. Efecto del pH sobre la velocidad de decoloración de IC con el sistema 1 y la enzima libre (CE).....	78
Figura 29. Efecto del pH sobre la velocidad de decoloración de IC con los sistemas 2, 3, 4 y 5.....	79
Figura 30. Efecto del pH sobre la velocidad relativa de decoloración de IC con el sistema 1.	80
Figura 31. Efecto del pH sobre la velocidad relativa de decoloración de IC con los sistemas 2-5.....	81
Figura 32. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de decoloración de IC con los sistemas 1, 4 y CE.	82
Figura 33. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de decoloración de IC con sistemas 2, 3 y 5.	84
Figura 34. Efecto de la temperatura sobre la velocidad relativa de decoloración de IC con los sistemas de inmovilización 1 y 4.	85
Figura 35. Efecto de la temperatura sobre la velocidad relativa de decoloración de IC con los sistemas de inmovilización 2, 3 y 5.....	85
Figura 36. Cinética de Michaelis-Menten con enzimas inmovilizadas del sistema 1.	86
Figura 37. Parámetros cinéticos de decoloración con las enzimas inmovilizadas.....	87
Figura 38. Estabilidad de almacenamiento, actividad enzimática lacasa a) para el sistema 1 y 4 almacenados a 4 °C, b) sistema 1 almacenado a temperatura ambiente.	89
Figura 39. Estabilidad de almacenamiento, actividad enzimática peroxidasa a) para el sistema 1 y 4 almacenados a 4 °C, b) sistema 1 almacenado a temperatura ambiente.	90
Figura 40. Cromatografía en capa fina de los productos de decoloración.....	91
Figura 41. % IG de los productos de decoloración de IC.	93
Figura 42. Prueba de fitotoxicidad de los productos de decoloración del índigo carmín con los diferentes sistemas de inmovilización.....	94

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Métodos para tratar el agua residual textil (Quintero, y otros, 2010)	- 6 -
Tabla 2. Hongos productores de enzimas ligninolíticas.	- 14 -
Tabla 3. Soportes utilizados para inmovilizar por unión covalente	- 21 -
Tabla 4. Clasificación de soportes usados para inmovilización.....	- 24 -
Tabla 5. Enzimas ligninolíticas inmovilizadas utilizadas para decoloración de colorantes. -	32 -
Tabla 6. Clasificación de colorantes textiles sintéticos.....	- 33 -
Tabla 7. Composición de medios preseleccionados para el crecimiento de <i>Trametes versicolor</i>	43
Tabla 8. Cantidad de soporte inmovilizado usado para la decoloración.....	52
Tabla 9. Buffers utilizados para la evaluación del efecto del pH en la decoloración de IC	53
Tabla 10. Concentraciones y condiciones de evaluación de parámetros cinéticos.	54
Tabla 11. Muestras aplicadas en la sílica	55
Tabla 12. Comparación de medios de cultivo para el crecimiento de <i>Trametes versicolor</i>	57
Tabla 14. Sistemas de inmovilización con sus principales características.	60
Tabla 14. Características que mostraron los sistemas de inmovilización.....	63
Tabla 15. Reportes de inmovilización de lacasa en varios soportes	64
Tabla 16. Velocidades iniciales (v_0) y tiempo de decoloración de índigo carmín (100 ppm) que presentaron los sistemas de inmovilización y el CE a 30 °C y pH 6.34.....	71
Tabla 17. pH y temperatura óptimos encontrados para la decoloración de IC con los diferentes sistemas y el CE	78

ABREVIATURAS

v_0	Velocidad inicial
[E]	Concentración de enzima
[S]	Concentración de sustrato
ABTS	Ácido 2,2'-azino-di-[3-etil-benzo-tiazolin-sulfonato]
AEEL	Actividad enzimática específica lacasa
AEELR	Actividad enzimática específica lacasa retenida
AEEP	Actividad enzimática específica peroxidasa
AEEP R	Actividad enzimática específica peroxidasa retenida
AEL	Actividad enzimática lacasa
AEP	Actividad enzimática Peroxidasa
APTES	Amino propil trietoxisilano
CE	Concentrado enzimático
DNTB	Ácido 5,5'ditiobis(2-nitrobenzoico)
DTP	2,2'ditiopiridina
IC	Índigo carmín
IG	Índice de germinación
K_G	Constante de Michaelis-Menten para un conjunto de enzimas
Lac	Lacasa
m/v	masa/volumen
mc	medio de cultivo
MCR	Medio de cultivo residual
MnP	Manganeso Peroxidasa
rpm	Revoluciones por minuto
TEOS	Tetraetil <i>orto</i> -silicato
<i>Tv</i>	<i>Trametes versicolor</i>
v/v	volumen/volumen
$V_{m\acute{a}x}$	Velocidad máxima
Per	Peroxidasa
SIE	Sistema de inmovilización enzimática
kDa	KiloDaltons

1. INTRODUCCIÓN

Los efluentes de la industria textil son difíciles de tratar debido a la gran variedad de compuestos utilizados en sus procesos de fabricación, generando grandes cantidades de agua residual, donde los contaminantes son extremadamente diversos de acuerdo con el tipo de fibra, hilo y/o tela y proceso (Chiacchierini, y otros, 2004). Estos efluentes contienen una amplia variedad de colorantes, impurezas naturales extraídas de las fibras y de otros productos tales como dispersantes, agentes suavizantes, ácidos, álcalis, sales y algunas veces metales pesados (Rodríguez, y otros, 2006).

Durante el proceso textil se desechan grandes cantidades de colorantes debido a ineficiencias en los procesos de teñido y estampado. Las cantidades de colorantes que no se fijan varían del 2% cuando se utilizan colorantes básicos, y hasta el 50% cuando se utilizan colorantes reactivos (McMullan, y otros, 2001). Los procesos húmedos como carbonizado, desmenuzado, blanqueado, mercerizado y teñido son los que mayor potencial tienen para producir efluentes con compuestos químicos resistentes a la degradación biológica, principalmente los colorantes (Chiacchierini, y otros, 2004). En México estos efluentes contaminados con colorantes son descargados al drenaje municipal o a cuerpos de agua. Entre 10-20% de los colorantes empleados en el proceso de teñido en la industria textil son vertidos en los efluentes, muchos de estos presentan capacidad mutagénica y/o carcinogénica (Rodríguez, y otros, 2007).

El desarrollo de la tecnología adecuada para el tratamiento de efluentes textiles es objeto de gran interés. Las principales técnicas disponibles para la decoloración de este tipo de aguas se pueden clasificar en tres grandes grupos: tratamientos químicos, físicos y biológicos (López, 2005); los métodos físicos y químicos como adsorción, coagulación-floculación, oxidación, filtración y métodos electroquímicos, éstos son costosos y presentan desventajas (Rodríguez, y otros, 2007) como las mencionadas en la tabla 1.

Tabla 1. Métodos para tratar el agua residual textil (Quintero, y otros, 2010)

Método	Descripción método	Ventajas	Desventajas
Reacción Fenton	Reacción oxidación usando $H_2O_2 - Fe(II)$	Decoloración efectiva de tintes solubles e insolubles	Generación de lodo
Ozonación	Reacción oxidación usando gas ozono	Aplicación estado gaseoso: no altera el volumen	El ozono tiene vida media de 20 min. Aumentando el costo.
Fotoquímica	Reacción oxidación $H_2O_2 - UV$	No produce lodo	Formación de subproductos tóxicos.
Electroquímica	Reacción oxidación usando electricidad	Descompone en compuestos no peligrosos	Alto costo de la electricidad
Adsorción en Carbón activado	Remoción de tinte por adsorción	Buena remoción de una variedad de tintes	Muy costoso
Coagulación electrocinética	Adición de sulfato ferroso y cloruro férrico	Económicamente viable	Alta producción de lodo
Bacterias	Uso de bacterias capaces de degradar colorantes	Buena remoción de colorante a nivel laboratorio, llegando a la mineralización.	La efectividad de estos tratamientos depende de la supervivencia y la adaptabilidad de los microorganismos durante el proceso de tratamiento.
Hongos	Hongos de la podredumbre blanca		
Enzimas	Lacasa, Lignino peroxidasa y Mn peroxidasa		Elevado costo, inestabilidad enzimática

En los últimos años, hay una tendencia hacia el estudio y aplicación de los tratamientos biológicos por sus bajos costos de capital y de operación comparados con los tratamientos químicos. Además, debido a la variabilidad en la carga y a la concentración de color de las industrias textiles, los tratamientos empleados en la recuperación de las aguas presentan resultados deficientes. La efectividad de los tratamientos biológicos utilizando células depende de la supervivencia y adaptabilidad de los microorganismos durante el tratamiento, y en algunas ocasiones los productos de decoloración suelen ser más tóxicos que el colorante (Quintero, y otros, 2010), esto ha impulsado la búsqueda de otros métodos biológicos basados en el uso de enzimas.

Diversos estudios han demostrado que el complejo enzimático secretado por los basidiomicetos actúa naturalmente en la degradación de lignina. Debido a la similitud entre los grupos químicos presentes en la lignina y en los colorantes textiles, estas enzimas también son capaces de degradarlos, principalmente debido a la acción de lacasas y peroxidasa (Quintero, y otros, 2010).

El empleo de enzimas *in vitro* a nivel industrial es una práctica que presenta una serie de ventajas con respecto al empleo de microorganismos vivos, tales como menores requerimientos energéticos, fácil control, operación en un amplio rango de condiciones y mínimo impacto ambiental (López, 2005). En estos procesos, la catálisis enzimática se realiza generalmente mediante el empleo de la enzima libre, lo que implica la posible desnaturalización debido a los cambios bruscos de pH y temperatura que ocurren en el procesado de textiles. La enzima es sólo soluble en medio acuoso y se requiere una recarga de enzima nueva en cada ciclo catalítico. En consecuencia, la estabilidad y la actividad de la enzima libre disminuyen notablemente, y la suma de estos factores limita la aplicación de enzimas debido al incremento en los costos de los procesos donde participan (Durán, y otros, 2002).

El uso de enzimas inmovilizadas proporciona biocatalizadores estables con vidas prolongadas. Existen varios tipos de inmovilización de enzimas ya sea por retención física (interacciones entre las moléculas) o unión química, la segunda es más estable por los enlaces que se forman, ésta se divide en unión covalente y entrecruzamiento y este último puede ser enzima – soporte o enzima – enzima – soporte, también llamada reticulación (Cao, y otros, 2006).

En el presente trabajo se evaluaron diferentes sistemas de inmovilización enzimática con el objeto de seleccionar el complejo enzima-soporte y el sistema de inmovilización que cumpla con: mayor porcentaje de afinidad enzima-soporte, mayor estabilidad a los cambios de temperatura y pH, menor pérdida de actividad enzimática, que presente más ciclos de uso para decoloración y sobre todo que se obtenga alta actividad de decoloración del índigo carmín dando como resultados deseablemente productos no fitotóxicos. Ello como preámbulo para tener los elementos necesarios para que en una etapa posterior se pueda diseñar un reactor empacado con la enzima inmovilizada que pueda ser utilizado en el tratamiento de efluentes textiles.

2. ANTECEDENTES

2.1. Enzimas

Las enzimas son catalizadores proteicos, responsables de catalizar las transformaciones metabólicas (Illanes, 2008). Pueden aumentar las velocidades de reacción por factores de 10^6 ó aún mayores. Muchas enzimas son específicas tanto en la naturaleza del sustrato que utilizan, como en la reacción que catalizan. Esto es debido a la interacción precisa del sustrato con la enzima, la cual es el resultado de la compleja estructura tridimensional de la proteína (Berg, y otros, 2008). Algunas enzimas presentan una baja especificidad, común en enzimas degradativas como la lacasa. La actividad catalítica puede ser regulada por pequeños iones u otras moléculas, llamados cofactores.

Nomenclatura y clasificación

Muchas enzimas han sido designadas añadiendo el sufijo -asa al nombre del sustrato, es decir, la molécula sobre la cuál ejerce su actividad catalítica; por ejemplo la ureasa cataliza la hidrólisis de la urea, y la arginasa cataliza la hidrólisis de la arginina. Otras enzimas han recibido su nombre en función del tipo de reacción que catalizan; así la Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa cataliza la deshidrogenación (oxidación) del Gliceraldehído-3-fosfato a 3-fosfoglicerato. Incluso algunas se conocen de hace mucho tiempo y mantienen su nombre, sin dar información alguna del sustrato o la reacción que catalizan como la tripsina o la lacasa (Moss, 2012).

Existe una clasificación sistemática de las enzimas, establecida en 1964 por la Unión Internacional de Bioquímica (IUB) que las divide en 6 grandes grupos, cada uno de los cuales se divide a su vez en subclases (Moss, 2012):

- 1: Oxido-reductasas (reacciones de óxido-reducción)
- 2: Transferasas (transfieren grupos funcionales)
- 3: Hidrolasas (reacciones de hidrólisis),
- 4: Liasas (reacciones de adición a los dobles enlaces)

5: Isomerasas (reacciones de isomerización)

6: Ligasas (formación de enlaces con consumo de ATP).

A cada enzima se le asigna un número con cuatro dígitos. Los tres primeros indican la clase, subclase y sub-subclase, respectivamente, y el último es un número de orden (Moss, 2012).

Isoenzimas

Las proteínas que catalizan la misma reacción pero tienen diferente estructura y/o diferente ubicación dentro de la célula, se llaman isoenzimas, esto puede deberse a una diferencia en la secuencia de aminoácidos de la enzima, o algunas modificaciones covalentes o cambios conformacionales. El término de isoenzima se restringe a aquellas formas de enzima que se alcanzan por diferencias genéticamente determinadas en la secuencia de aminoácidos (Berg, y otros, 2008).

2.1.1. Cinética enzimática

Cuando se habla de cinética enzimática se refiere a la velocidad con que una enzima cataliza una reacción. Las reacciones catalíticas pueden escribirse como (Vaz, 2009):



Cuando la concentración de sustrato es mayor que la concentración de enzima, y en condiciones de estado estacionario (la concentración del complejo enzima-sustrato es constante), la velocidad de reacción (v) se puede describir con la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{V_{\text{máx}} * C}{K_M + C} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

$V_{\text{máx}}$ es la velocidad máxima que se puede alcanzar a saturación de sustrato

C es la concentración de sustrato en el medio de reacción

K_M , definida como el cociente $(k_{-1} + k_2)/k_1$, es la concentración de sustrato con la que la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima.

$V_{m\acute{a}x}$ da una idea de la capacidad de la enzima para convertir el sustrato en producto (etapa limitante), mientras que K_M indica la afinidad de la enzima por el sustrato, una mayor K_M indica una menor afinidad por el sustrato y viceversa. Conviene tener en cuenta que $V_{m\acute{a}x}$ de la reacción depende de la concentración de enzima, mientras que K_M es independiente. Por ese motivo, en lugar del valor de $V_{m\acute{a}x}$ suele ser más interesante el valor de la constante catalítica (k_{cat}), también conocida como número de recambio, cuyo valor, calculado a partir de la $V_{m\acute{a}x}$, es independiente de la concentración de enzima, esto sólo cuando se trabaja con enzimas ultra-puras (Copeland, 2000).

Significado de $V_{m\acute{a}x}$

Es la máxima actividad que puede alcanzar una enzima, teóricamente se logra en condiciones de $[S] \gg [E]$, porque entonces la enzima se satura y trabaja tan rápido como es posible. En la práctica es imposible que la enzima alcance el valor de $V_{m\acute{a}x}$, debido a limitaciones de difusión de productos y sustratos, desde y hacia el sitio activo (Vaz, 2009).

Significado y propiedades de K_M

K_M es la constante de disociación de ES a E + S, igual a k_{-1}/k_1 , cuando k_2 tiende a 0. Por lo tanto, es una medida de la afinidad de la enzima por su sustrato. Si K_M es grande significa que k_{-1} es grande o que k_1 es pequeña por lo que la reacción inversa es más favorecida que la reacción directa y con ello la afinidad de la enzima por su sustrato, es baja. Por el contrario, si K_M es pequeño, la afinidad de la enzima por el sustrato es grande (Vaz, 2009).

Por otro lado, K_M representa el cociente $(k_{-1} + k_2)/k_1$, este cociente sigue siendo la constante de disociación de ES, pero ahora tanto hacia S como hacia P, porque k_2 contribuye en forma significativa a la desaparición de ES (Bisswanger, 2008).

Puesto que no siempre es posible medir experimentalmente la $v_{m\acute{a}x}$ de una reacción, se suelen medir las velocidades de reacción a diferentes concentraciones

de sustrato. Para calcular de forma sencilla los parámetros K_m y $V_{m\acute{a}x}$, existen diferentes tratamientos de los datos que, partiendo de la ecuación de Michaelis-Menten, ofrecen una representación lineal de la relación entre la concentración de sustrato y la velocidad de reacción (Copeland, 2000).

2.1.1.1. Factores que afectan la actividad enzimática

Varios factores afectan la velocidad a la que las reacciones enzimáticas proceden, temperatura, pH, concentración de la enzima, concentración del sustrato, y la presencia de inhibidores o activadores (Copeland, 2000)..

Concentración de enzima

El efecto del incremento de la concentración de la enzima en la velocidad de reacción, es la más importante, el sustrato puede estar presente en una cantidad en exceso, es decir la reacción debe ser independiente de la concentración de sustrato. Algún cambio en la cantidad de producto formado sobre un periodo específico de tiempo sería dependiente del nivel de enzima presente (Copeland, 2000).

Concentración de Sustrato

La concentración del sustrato tiene un efecto importante en la velocidad de las reacciones enzimáticas. El análisis del efecto del cambio de concentración de sustrato, proporciona información respecto del mecanismo de reacción, especificidad y propiedades cinéticas de las enzimas. En el caso de enzimas que siguen el modelo de Michaelis-Menten, la velocidad inicial es muy rápida, hasta que se consume el 10% de sustrato y posteriormente se va volviendo más lenta (Rogers, y otros, 2009).

Efecto de la Temperatura

Igual que ocurre en las reacciones químicas, al aumentar la temperatura aumenta la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas. Esto se debe a que un mayor número de moléculas alcanzan la energía cinética necesaria para superar la energía de activación de la reacción. Sin embargo, el aumento de temperatura también disminuye la estabilidad de la estructura de las proteínas y las enzimas comienzan a desnaturalizarse, de modo que a medida que aumente la temperatura la actividad enzimática tiende a bajar. Como consecuencia de estos efectos opuestos

del aumento de temperatura, existe una temperatura óptima en la cual la actividad enzimática tiene un máximo (figura 1). Es de suponer que a la temperatura normal de los organismos las enzimas sean estables, y por lo tanto estén por debajo de su temperatura óptima (Copeland, 2000).

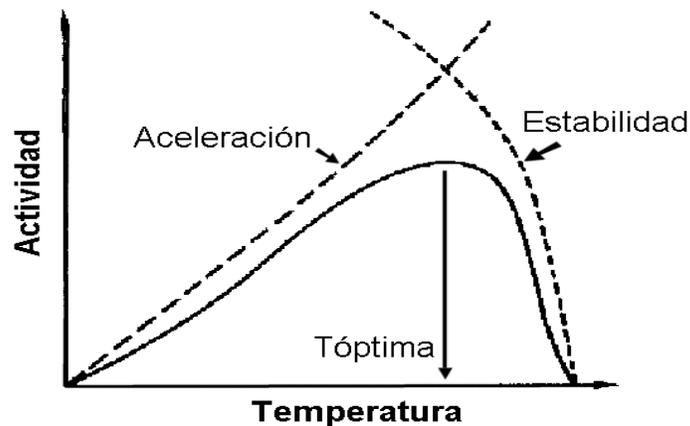


Figura 1. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática

La mayoría de enzimas se desnaturalizan rápidamente a 100 °C y pierden mucha de su actividad al ser expuestas a temperaturas superiores a 60 °C, aún por periodos de tiempo cortos. Para fines prácticos, una expresión conveniente de la relación entre la velocidad de reacción y la temperatura es el llamado Q_{10} , que corresponde al valor del cociente entre la velocidad de la reacción a dos temperaturas separada por 10 °C.

$$Q_{10} = \frac{v_{(T+10)^\circ C}}{v_{T^\circ C}}$$

Los Q_{10} de las reacciones catalizadas por enzimas están comprendidos dentro de un margen estrecho, entre 1.5 y 2.5, mientras que los de las reacciones no enzimáticas están entre 2.0 y 4.0. El valor de Q_{10} de una reacción enzimática es importante cuando la actividad de la enzima se mide a temperaturas diferentes de la fisiológica (Copeland, 2000).

Efecto del pH

El pH del medio afecta la actividad de las enzimas, porque muchos de los aminoácidos pueden tener carga, aniones o cationes. Los cambios de pH modifican

el grado de ionización de todos o alguno de estos grupos, lo que repercute en la ionización total de la molécula de enzima modificando la actividad de la enzima al menos por tres mecanismos (Copeland, 2000).

1. Los pH extremos, por debajo de 4.0, o por arriba de 10.0, cambian el grado de ionización de casi todos los restos de aminoácidos de la enzima, de forma que puede alterarse su estructura tridimensional. Si este cambio es suficientemente grande, se desnaturaliza la enzima y se pierde su actividad de forma irreversible. Incluso, la disminución del pH, que se presenta en las muestras de fluidos corporales o de tejidos por daño o muerte celular, puede ocasionar la desnaturalización de las enzimas.
2. Las variaciones de pH más pequeñas, entre 4 y 10, afectan a un número menor de grupos ionizables, pero si éstos están presentes en el sitio activo, la actividad enzimática cambia en forma importante, sin embargo, este cambio normalmente es reversible.
3. La variación del pH también puede alterar la ionización del sustrato, y modificar la unión enzima sustrato.

Para muchas enzimas, el efecto del pH tiene forma de campana con un valor de pH óptimo bien definido, pero para otras, la forma de la curva es muy diferente; por ejemplo, cuando en la interacción enzima sustrato participan muchos grupos ionizables. Los puntos de inflexión de la curva pH/actividad corresponderían a los pK de los grupos responsables de la dependencia frente al pH (figura 2). Este tipo de información se ha utilizado para identificar los aminoácidos del sitio activo (Cho, y otros, 2008).

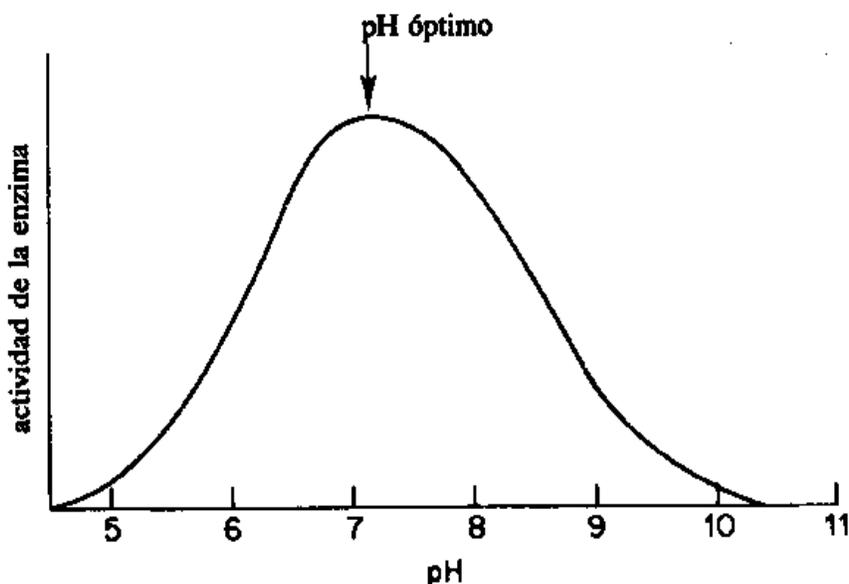


Figura 2. Efecto del pH sobre la actividad enzimática

2.1.2. Enzimas ligninolíticas

Varias especies de basidiomicetos han sido estudiadas en los últimos años debido a su capacidad de degradar la lignina, su sistema enzimático está comprendido por las enzimas lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa (Lac), las cuales tienen un potencial uso industrial, además de su habilidad para decolorar efluentes provenientes de industrias productoras de textiles y papel. Estas enzimas ligninolíticas pueden actuar separadas o en cooperación, dependiendo de si el hongo es capaz de producir una o más. En la tabla 2 se enlistan algunos hongos ligninolíticos y las enzimas que producen (Dávila, y otros, 2006).

Tabla 2. Hongos productores de enzimas ligninolíticas.

Organismo	Enzimas ligninolíticas
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	MnP, LiP
<i>Trametes versicolor</i>	MnP, Lacasa
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	MnP, Lacasa
<i>Cyanthus stercoreus</i>	MnP, Lacasa
<i>Phlebia radiata</i>	MnP, LiP, Lacasa
<i>Nematoloma frowardii</i>	MnP, LiP, lacasa
<i>Pleurotus eryngii</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Pleurotus pulmonarius</i>	MnP, lacasa

2.1.2.1. Lacasa

La lacasa (bencenediol: oxígeno-oxidoreductasa, E.C.1.10.3.2) es una glicoproteína conocida como multicobre-oxidasa, porque reduce el oxígeno molecular a agua y simultáneamente realiza la oxidación de una gran variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos, incluyendo mono, di y polifenoles; aminofenoles, metoxifenoles y amino aromáticos (Lorenzo, y otros, 2005).

Las enzimas lacasas son producidas por un gran número de hongos de la podredumbre blanca como *Trametes versicolor*, *Phlebia radiata*, *Polyporus pinisitus* y *Penicillium chrysogenum*. Los hongos como *T. versicolor*, producen lacasa como isoenzimas múltiples. La síntesis de lacasa en un número importante de hongos es inducida por factores fisiológicos, se puede aumentar la formación de ésta por la adición de compuestos orgánicos e iones metálicos, constituyendo el uso del cobre como inductor para la formación de la lacasa.

La lacasa es utilizada en la oxidación del índigo (colorante de tipo fenólico) en la preparación de telas para jeans y en la biorremediación de algunos colorantes presentes en las aguas residuales de la industria textil. Esta enzima es extraída de hongos como *Trametes hirsuta*, *Trametes versicolor* y *Sclerotium rolfsii* (Campos, y otros, 2001). Además, en procesos de oxidación de muchos compuestos (principalmente de compuestos fenólicos) la lacasa presenta habilidad para oxidar un gran número de compuestos no biodegradables, por lo cual se empezó a utilizar en tratamientos de efluentes industriales (Baldrian, 2004).

La mayoría de lacasas son monoméricas, tienen tres dominios globulares conectados consecutivamente, y contienen 4 iones cobre, repartidos en tres diferentes centros (figura 3a). El centro T1 se localiza en el tercer dominio, éste oxida el sustrato y transfiere electrones a los sitios T2 y T3, éstos se encuentran entre el primer y el tercer dominio formando el "cluster" o agrupamiento T2/T3 (Bukh, y otros, 2006) en este centro el O_2 es reducido, produciéndose agua (Campos, y otros, 2001). La lacasa de *Trametes versicolor* es una proteína globular, cuyo centro T1 se conecta a través de un tripéptido histidina-cistamina-histidina al centro T2/T3 (Bukh, y otros, 2006). En *T. versicolor* también se ha observado que el sustrato se une a una

pequeña cavidad negativamente cargada cercana al centro T1 (Bukh, y otros, 2006), (Piontek, y otros, 2002).

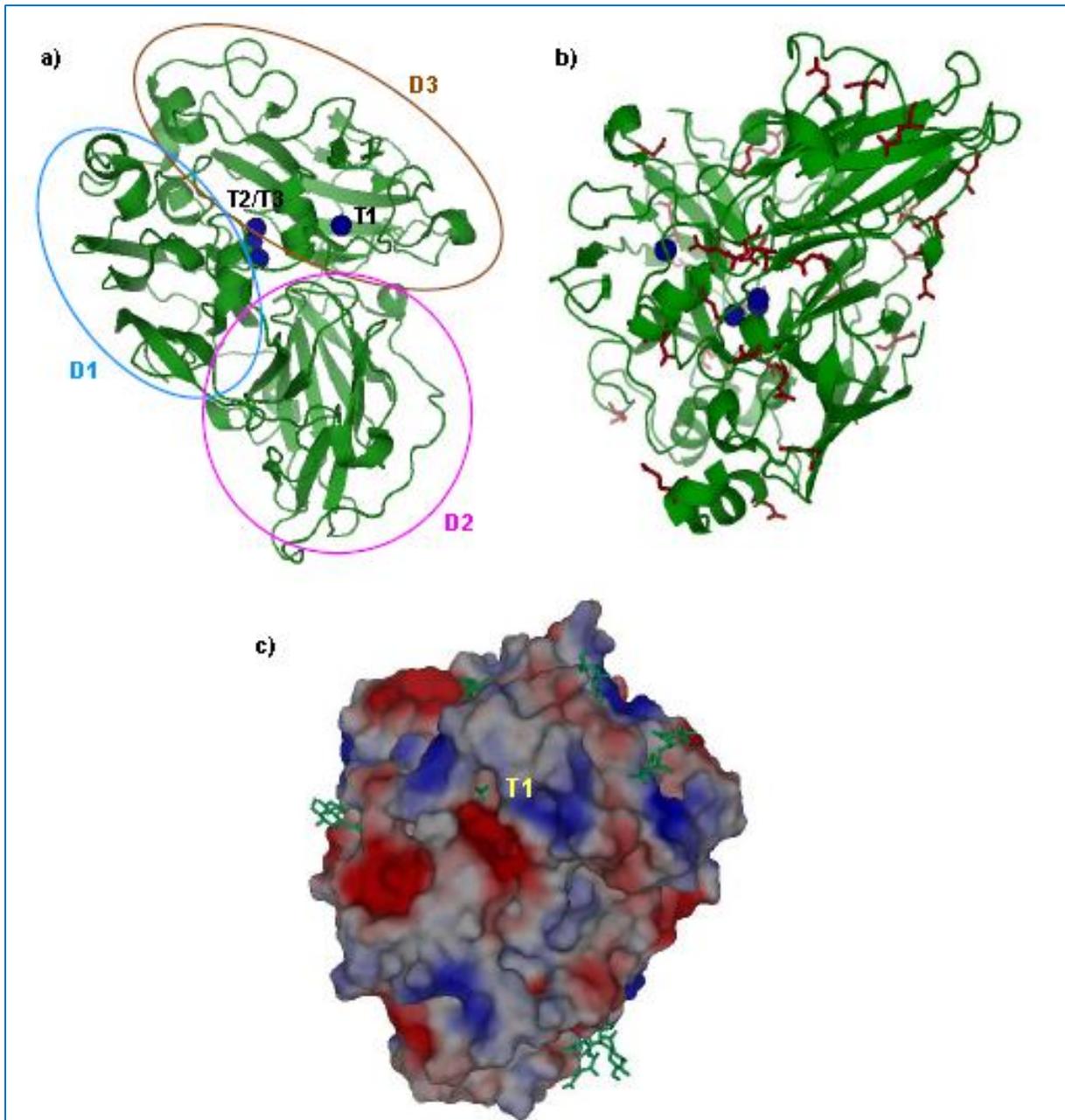


Figura 3. Estructura de la lacasa de *T. versicolor*, modelada con el programa PyMOL a partir del archivo 1GYC del *Protein Data Bank* (Piontek, y otros, 2002).

Resaltados en azul los centros cobre. a) Marcados los tres dominios de la lacasa (D1, D2 y D3), b) Marcados en rojo los grupos aspárticos y glutámicos, c) Distribución de cargas (azul carga positiva, rojo carga negativa) y de azúcares (marcados en verde). Perspectiva desde el centro T1.

En la figura 3b puede apreciarse la distribución de los residuos aspártico y glutámico en la estructura de la lacasa de *Trametes versicolor*. Los grupos carboxílicos de estos residuos pueden formar enlace amida con residuos amino, pudiendo de esta forma unir covalentemente la enzima a superficies convenientemente funcionalizadas, dichos residuos son abundantes en la cercanía del centro T1, lo que permitirá unir la enzima a través de ellos en un soporte (Vaz, 2009).

En la figura 3c se distinguen la distribución de azúcares en la superficie de la lacasa. Esta distribución será de especial interés cuando la inmovilización se lleva a cabo mediante formación de base de Schiff entre los residuos de azúcares oxidados de la lacasa y grupos aminos del soporte en cual se inmoviliza (Piontek, y otros, 2002).

2.1.2.2. Peroxidasas

Las peroxidasas son hemo proteínas, tienen un peso molecular en el rango de 30 a 150 kDa. Éstas son un grupo de oxidoreductasas que catalizan la reducción de peróxidos, como el peróxido de hidrógeno, y la oxidación de una variedad de compuestos orgánicos, estas enzimas son producidas por bacterias, hongos, insectos y plantas (Hamid, y otros, 2009). Las peroxidasas producidas por los hongos ligninolíticos comprenden enzimas como la lignina peroxidasa (LiP) y la manganeso peroxidasa o peroxidasa dependiente de Mn^{2+} (MnP). Tienen dos iones calcio de gran importancia en el mantenimiento de la estructura y están glicosiladas con un contenido medio en carbohidratos del 5%; además, en su secuencia no aparece ningún residuo de tirosina (Kim, y otros, 2005).

2.1.2.3. Manganeso peroxidasa

La principal reacción catalizada por la MnP es la oxidación del Mn^{2+} a Mn^{3+} por el H_2O_2 . El Mn^{3+} es un oxidante con una vida media muy corta en medios acuosos. Sin embargo, los hongos de podredumbre blanca secretan metabolitos aromáticos (como el alcohol veratrílico y el anisaldehído) y alifáticos al mismo tiempo que las enzimas ligninolíticas, incluyendo ácidos dicarboxílicos que actúan eficientemente

como quelantes de iones metálicos como el Mn^{3+} . Estos quelantes, entre los que se encuentran el oxalato, no compiten con la enzima por el Mn^{2+} debido a que presentan una constante de unión muy baja por él, sin embargo, unen el Mn^{3+} facilitando su disociación de la enzima y lo estabilizan en solución acuosa con un potencial redox elevado, 0.9-1.2 mV (Hofrichter, 2002).

Tras la estabilización del Mn^{3+} producido por la MnP, éste puede difundir en el medio de reacción llegando a zonas donde la enzima no puede acceder. La desventaja que presenta el Mn^{3+} quelado como agente ligninolítico con respecto a la LiP es su bajo poder oxidante en condiciones fisiológicas. La pareja MnP/Mn oxida solamente las unidades fenólicas de la lignina que son minoritarias en la composición global de este polímero, y es incapaz de oxidar las unidades no fenólicas (Kamitsuji, y otros, 2004).

El mecanismo de acción del Mn^{3+} sobre modelos fenólicos es vía formación de un radical fenóxido que posteriormente se degrada dando lugar a una serie de productos de reacción parecidos a los obtenidos tras la oxidación por la LiP (Haas).

Algunos autores han propuesto que además de poder oxidar compuestos fenólicos a través de la acción del Mn^{3+} , la MnP también puede oxidar compuestos aromáticos no fenólicos a través de ciertos intermediarios, entre los que se encuentran radicales derivados de tioles y lípidos insaturados. En presencia de agentes reductores, como los tioles, el Mn^{3+} puede conducir a la oxidación de compuestos aromáticos no fenólicos (Hofrichter, 2002).

2.2. Inmovilización de enzimas

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente (Batista, y otros, 2006).

En general, los métodos de inmovilización (Cao, y otros, 2006), se suelen clasificar en dos grandes categorías: retención física y unión química. En la figura 4 se muestra un esquema de los métodos físicos y químicos para inmovilización.

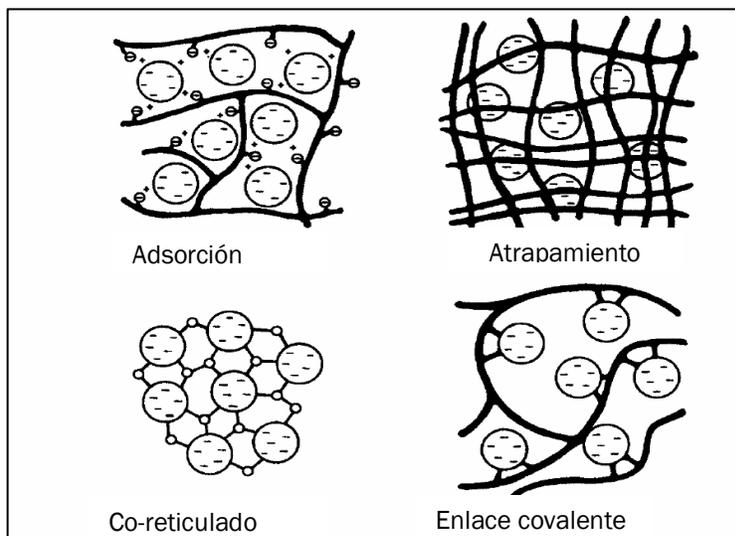


Figura 4. Principales métodos de inmovilización usados en la actualidad

2.2.1. Inmovilización por retención física.

2.2.1.1. Por atrapamiento

Éste tipo de inmovilización consiste en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por prepolímeros fotoentrecruzados o polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano.

El atrapamiento puede ser en geles o en fibras, estas últimas suelen ser más resistentes que los geles. En el primer caso, la enzima queda atrapada en el interior de un gel, mientras que en el segundo caso la enzima se encuentra ocluida dentro de las microcavidades de una fibra sintética.

El atrapamiento es de gran sencillez desde el punto de vista experimental, requiere poca cantidad de enzima para obtener derivados activos, la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura pero requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización (Elnashar, 2010).

2.2.1.2. Inclusión en membranas:

1) Micro encapsulación o encapsulación:

Las enzimas están rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no de enzima. Estas membranas semipermeables pueden ser permanentes (originadas por polimerización interfacial) o no permanentes (generadas por surfactantes, también llamadas “micelas reversas”) (Chang, y otros, 2001).

2) Reactores de membrana.

Estos reactores emplean membranas permeables al producto final, permeables o no al sustrato inicial y obviamente impermeables a la enzima. Mediante una bomba se establece un flujo líquido de sustrato que atraviesa el reactor (Katuri, y otros, 2009).

2.2.1.3. Inmovilización por adsorción

En la adsorción, la enzima se une a un soporte sin funcionalizar mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y por puentes de hidrógeno. Los principales factores que influyen en la adsorción (Cao, y otros, 2006) son:

- El pH del medio: controla el número y la naturaleza de las cargas que presenta la superficie de la proteína y del sólido;
- La fuerza iónica: al aumentar la fuerza iónica se produce la desorción de la enzima, ya que los iones inorgánicos se unen con más fuerza al soporte que la proteína;
- El diámetro de poro: debe ser aproximadamente dos veces el tamaño del eje mayor de la enzima;
- La presencia de iones que actúen como cofactores de la enzima, ya que pueden incrementar la carga enzimática del derivado.

La adsorción es muy sencilla de realizar, tiene bajo costo y no se presentan cambios en la especificidad enzimática, los derivados son estables en medios de trabajo con bajo contenido en agua. Sin embargo sus principales inconvenientes son: los derivados obtenidos son poco estables desde el punto de vista mecánico, la

unión al soporte es débil y la dificultad para optimizar las variables que controlan la adsorción.

Una variante dentro de la técnica de la adsorción consiste en emplear resinas de intercambio iónico, las cuales tienen grupos funcionales y contraiones móviles. Estos contraiones se pueden intercambiar reversiblemente por otros iones de la misma carga, sin que se produzcan cambios en la matriz insoluble.

2.2.2. Inmovilización por unión química.

Ocurre cuando se le hace una modificación a la estructura química de la enzima o se aprovecha la composición de ésta para unirla a un soporte por medio de reacciones químicas. En la figura 5 se muestran los tipos de unión química (Elnashar, 2010).

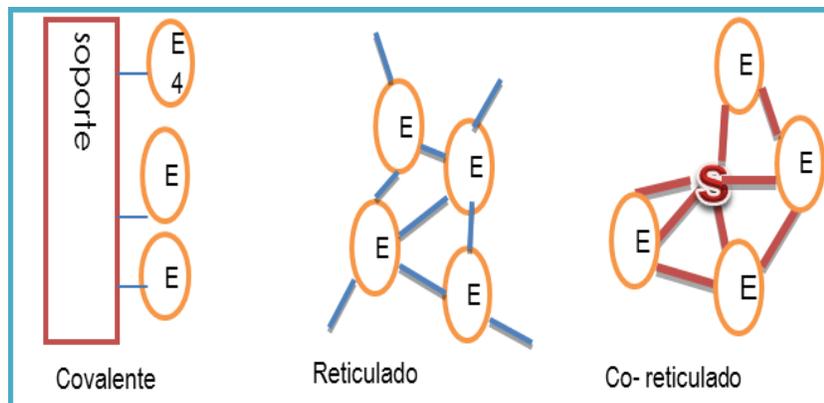


Figura 5. Principal clasificación de inmovilización por unión química.

2.2.2.1. Inmovilización por unión covalente.

Formación de enlaces covalentes entre la enzima y el soporte. El tipo de soporte determina la química de la inmovilización y depende si se mantiene la actividad enzimática y el grado de pérdida de ésta. Los principales soportes usados se indican en la tabla 3 (Batista, y otros, 2006).

Tabla 3. Soportes utilizados para inmovilizar por unión covalente

Grupo Funcional	Soporte
-CONH ₂	Poliacrilamida
COOH	Carboximetilcelulosa
NH ₂	Poliestireno, nylon

OH	Celulosa, agarosa, sefadex
Si(OH) ₃	Vidrio poroso

Se debe asegurar que el centro activo de la enzima no se vea afectado por los reactivos empleados en el proceso de inmovilización. Se puede proteger el centro activo con un análogo del sustrato o un inhibidor competitivo durante el proceso de inmovilización, o para el caso de la enzima lacasa agregando albúmina de suero bovino.

2.2.2.2. Inmovilización por reticulación

El uso de los soportes sólidos para inmovilización de enzimas puede reducir la especificidad y la actividad volumétrica del biocatalizador por un factor de 10 ó más veces. En este tipo de inmovilización se llevan a cabo enlaces covalente entre una molécula de enzima y otra molécula, no se necesita un soporte como tal, sino un agente que una a las dos moléculas de enzimas usando compuestos bifuncionales (“cross-linkers”), los usados más ampliamente son el glutaraldehído (Brady, y otros, 2008) y la etilendiamina (Brady, y otros, 2009).

Co-reticulación. Es una variante de la reticulación, sin embargo aquí los enlaces covalentes son entre las moléculas de enzima y de éstas con el soporte, se tejen redes intermoleculares, dando así una mayor estabilidad al sistema de inmovilización. Sin embargo estos cambios pueden alterar la actividad de la enzima. Este tipo de inmovilización da más resistencia a los cambios de pH y de temperatura, sin embargo la red que se forma en la inmovilización a veces impide que el sustrato llegue al sitio activo o que su trayectoria sea más lenta (Kharlampieva, y otros, 2010).

Actualmente el método más novedoso de cross-linking consiste en la cristalización de enzimas y su posterior reticulado con glutaraldehído (Cross-Linked Enzyme Crystals o CLECs). El aumento de estabilidad se basa en la obtención de un entramado cristalino, donde las moléculas de enzima están rodeadas exclusivamente por otras moléculas de proteína. De esta manera la propia enzima actúa como soporte, y su estructura terciaria está estabilizada por las uniones covalentes intermoleculares. La estructura cristalina posee canales microscópicos (20-50Å) que

permiten el paso de sustratos hasta el centro activo de la enzima donde se cataliza la reacción. Estos cristales pueden soportar temperaturas elevadas y pH extremos, así como la acción de las proteasas. Esta tecnología se ha aplicado a enzimas utilizados en la obtención de compuestos enantioméricamente puros y en la síntesis de péptidos (Brady, y otros, 2009).

La formación de CLEC's requiere una proteína extremadamente pura, y del método adecuado para la cristalización de enzimas. La formación de cristales implica que sólo un tipo de enzima puede ser incorporado dentro de la partícula, lo que implica un elevado costo del proceso, dejando a un lado la aplicación a nivel industrial de éste método (Brady, y otros, 2004).

Un método menos costoso de mejorar la proximidad de enzimas para la reticulación es simplemente la precipitación de la proteína y el entrecruzamiento de los agregados para formar partículas de 50-100 mm de diámetro (Brady, y otros, 2009).

2.2.3. Ventajas y desventajas del uso de enzimas inmovilizadas

Como ventajas del empleo de enzimas inmovilizadas se puede destacar (Batista, y otros, 2006):

1. El aumento de la estabilidad de la enzima.
2. La posible reutilización, por lo que disminuyen los costos del proceso.
3. La posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control, adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada. Los diferentes tipos de reactores enzimáticos son tanque agitado, tanque agitado con alimentación continua, lecho fluidizado y alimentación continua, lecho empacado y alimentación continua, lecho empacado en continuo con recirculación y tanque agitado, con alimentación continua y recuperación por ultrafiltración. Estos reactores con enzimas inmovilizadas permiten el empleo de cargas elevadas de enzima, la cual mantendrá su actividad durante más tiempo. Estos sistemas pueden incluir el reciclado, lo que permite la obtención de productos con mayor pureza.

Las principales desventajas del proceso de inmovilización son (Brady, y otros, 2009):

1. La alteración de la conformación de la enzima respecto de su estado nativo.
2. La gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte.
3. Siempre suele haber una pérdida de actividad de la enzima durante la inmovilización.
4. El biocatalizador es más caro que la enzima nativa.

2.2.4. Soportes para inmovilización

Al considerar un soporte para inmovilizar una enzima se deberá tener en cuenta factores tales como el pH, la temperatura, la fuerza iónica, la presión, agitación, la conjugación de cofactores y el proceso de separación del sustrato del producto. Los soportes pueden variar de forma (láminas, tubos, cilindros, esferas), tamaño, propiedades físicas, químicas, encontrándose una gran variedad de compuestos clasificándose de acuerdo con la tabla 4 (Flores, 2011).

Tabla 4. Clasificación de soportes usados para inmovilización.

Soportes inorgánicos		Soportes orgánicos	
Naturales:	Manufacturados:	Polímeros naturales	Polímeros sintéticos
Arcillas como bentonita, piedra pómez, sílice.	Óxidos de metales y vidrio de tamaño de poro controlado vidrio no poroso alúmina, cerámicas cristales y gel de sílice.	Polisacáridos: celulosa, almidón, dextranos, agarosa, alginatos, quitosano.	Poliiolefinas: poliestireno
		Proteínas fibrosas: colágeno, queratina (Cruz, 2007).	Polímeros acrílicos: poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos.
		Otros tipos: alcohol polivinílico, poliamidas	

Características de los soportes para inmovilización

Aunque no existen soportes universales, hay algunos principios para su selección, entre ellos los cuales se encuentran (Vaz, 2009):

- El material debe estar disponible en abundancia y a bajo precio.
- El proceso de inmovilización tiene que ser simple y efectivo con la consideración de retención de la actividad enzimática.
- La capacidad y eficiencia de las enzimas inmovilizadas tiene que ser alta.
- El diseño del reactor con respecto al mecanismo manejado del biocatalizador tiene que ser simple (Flores, 2011).

Un soporte ideal para una aplicación dada es aquel que aumente la interacción con el sustrato, disminuya la inhibición por el producto, cambie el pH aparente óptimo hasta el valor deseado, frene el crecimiento microbiano y sea fácilmente recuperable para poder volverlo a utilizar. El soporte debe ser estable en solución y no debe deteriorarse en las condiciones de reacción, debe ser rígido mecánicamente, por lo que se deben precisar necesidades técnicas y económicas (costo, calidad, funcionalidad y seguridad) para definir un buen catalizador en términos de eficiencia e integración del costo efectivo (Flores, 2011).

2.2.5. Principales métodos de inmovilización de enzimas

A) Inmovilización por encapsulación con alginato.

El alginato es uno de los polímeros más utilizados como soporte de inmovilización en productos alimenticios y farmacéuticos, los usos del alginato en estos productos se deben a su espesamiento, estabilidad y la formación de geles y películas (Lyu, y otros, 2004). Es extraído primariamente de tres especies de algas marrones; éstas incluyen *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum* y *Macrocystis pyrifera*. Los alginatos son una familia de polisacáridos lineales no ramificados, conteniendo cantidades variables de ácido 1,4- β -D-manurónico y de ácido α -L-gulurónico (figura 6). La composición y extensión de las secuencias y el peso molecular determinan las propiedades físicas de los alginatos (Domínguez, y otros, 2005).

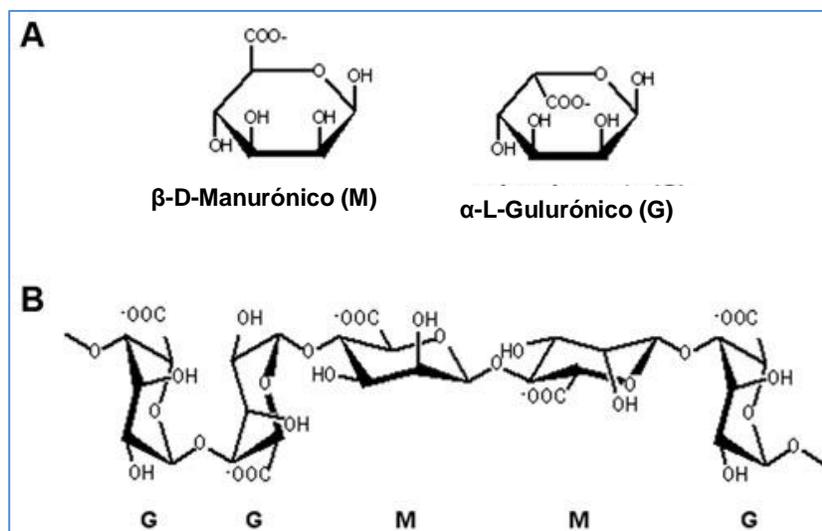


Figura 6. Información de la estructura de alginato (Domínguez, y otros, 2005): A. los monómeros en alginato; B. la cadena de alginato.

Las enzimas a inmovilizar se mezclan con el alginato de sodio para que en el momento de estar en contacto con el cloruro de calcio, se lleve a cabo el intercambio de iones divalentes por monovalentes, quedando atrapada la molécula de enzima dentro de la esfera de alginato de calcio.

Mecanismo de formación del gel de alginato de calcio

Cuando a una solución de alginato de sodio de concentración definida se le añade una solución de un metal divalente como el calcio a una concentración en exceso se forma un gel insoluble (Vaz Domínguez, 2009).

La transición de sol a gel se observa a la vista. La masa gelificada es un copolímero de dos tipos de segmentos, los segmentos de bloque G entrelazados por interacciones intermoleculares y los segmentos de bloque M disueltos (Domínguez, y otros, 2005).

Un segmento del polisacárido que esté formado por monómeros de ácido gulurónico (poliguluronato) presenta una forma similar a una cinta rizada, con hendiduras en las cuales encajan perfectamente los iones calcio, formando una estructura llamada “modelo de caja de huevos” (figura 7).

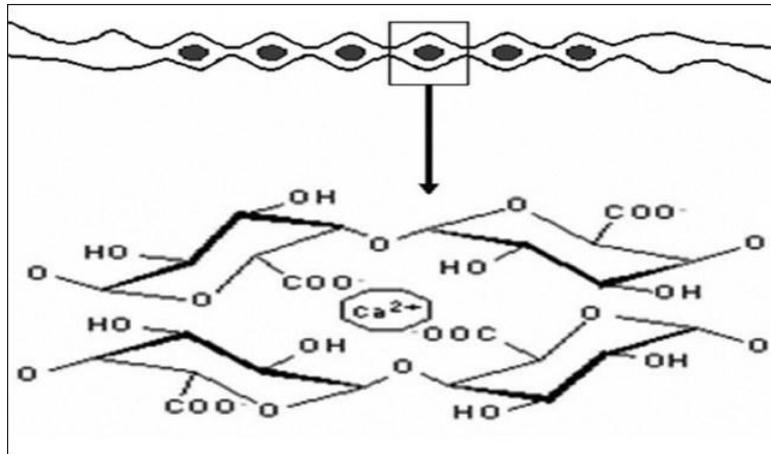


Figura 7. Modelo caja de huevo

Estos enlaces cruzados se estructuran mediante la quelación de un solo ion calcio a través de los grupos hidroxilo y carboxilo en cada uno de los pares de las cadenas de polímeros esto se observa en la figura 8.

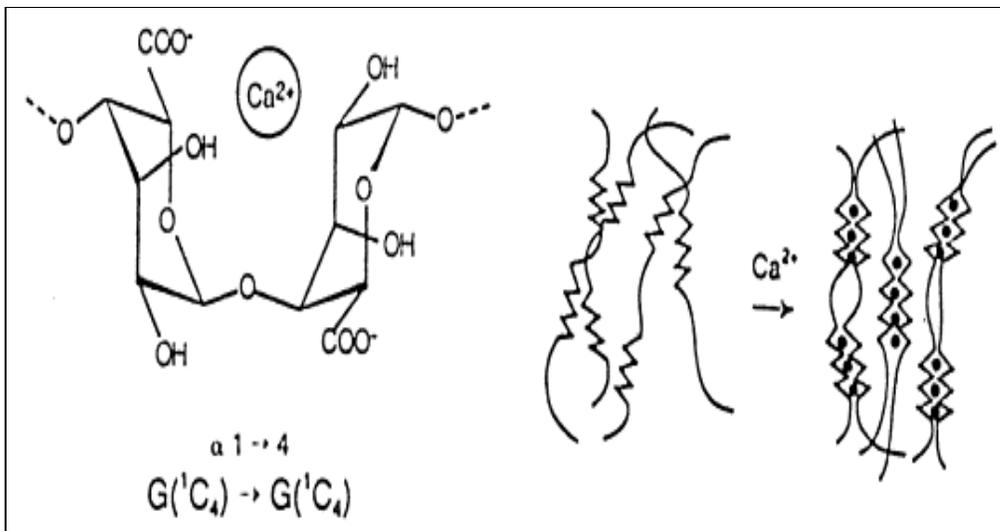


Figura 8. Gelificación con ion calcio

Una gelificación inmediata se produce cuando los iones de calcio se contactan con las moléculas de alginato, produciendo una jalea esférica al dejar caer gota a gota una solución acuosa de alginato de sodio en una solución de calcio. Dado que el gel de alginato está compuesto de las uniones iónicas generadas por reacción entre los alginatos y los cationes divalentes/polivalentes, este gel permanece en una fase irreversible incluso bajo calor. No se produce ruptura cuando este gel de alginato es esterilizado al calor, calentado en un horno eléctrico o se aplican procesos de congelación/descongelación (Lu, y otros, 2007).

Debido a que el alginato es soluble en agua, se ha observado que al trabajar varias veces con este tipo de inmovilización el soporte se disuelve, por tal motivo se propone hacer un recubrimiento con quitosano, un polímero insoluble en agua, para así aumentar el número de ciclos de uso. La velocidad de reacción de la gelificación entre los alginatos y los iones calcio puede controlarse mediante el ajuste de la velocidad de ionización del calcio seleccionando un tipo adecuado de sal de calcio, usando secuestrantes de combinación y ajustando a un nivel de pH apropiado, dependiendo de la sal usada (Vaz Domínguez, 2009).

B) Unión covalente en soporte sólido (cristales de sílica)

La aplicación de un método de inmovilización por unión covalente, el procedimiento más efectivo, conlleva efectuar un tratamiento de activación de los grupos químicos superficiales del soporte, para que sea posible la reacción de éstos con los grupos nucleófilos de las proteínas. La activación debe realizarse en condiciones drásticas, incompatibles con la estabilidad de las enzimas, por lo que la inmovilización se ha de efectuar una vez que el soporte ha sido activado. Además, la elección del soporte es un aspecto primordial, ya que debe conciliar la facilidad para poder introducir en su superficie un elevado número de grupos funcionales (capaces de reaccionar con determinados restos nucleófilos de la cadena polipeptídica de la enzima) con sus propiedades químico-físicas y mecánicas. A este respecto, la principal discriminación se produce al elegir entre un soporte inorgánico (vidrios porosos, sílice, alúmina, etc.,) o un polímero orgánico, tipo poliestireno (Yiu, y otros, 2005).

La formación de un enlace covalente entre una molécula orgánica, en este caso una enzima, y el soporte inorgánico supone, en principio el método "ideal" para unir cualquiera de las posibles moléculas de interés. Las enzimas se fijan al soporte en su superficie, de forma aislada unas de otras lo que le confiere eficiencia catalítica y una importante reducción de las limitaciones debidas a la transferencia de masa. Esto les confiere además mayor resistencia a la desactivación en condiciones extremas de funcionamiento, pH, temperatura, etc., pudiéndose, además, almacenar

durante largo tiempo sin perder su actividad, pues ésta se produce muchas veces como consecuencia de interacciones inter-enzimáticas (Yiu, y otros, 2005).

En la actualidad, el método más convencional para efectuar la activación de un soporte inorgánico pasa por la "silanización" de los grupos hidroxilos superficiales, con un organosilano.

Soportes como la sílice, la alúmina o el cristal poroso, previamente funcionalizados con grupos amino por activación con 3-aminopropil- trietoxisilano (APTES), se han utilizado en la inmovilización de enzimas por sus excelentes propiedades mecánicas (Dávila, y otros, 2006). Los pasos de silanización se muestra en la figura 9.

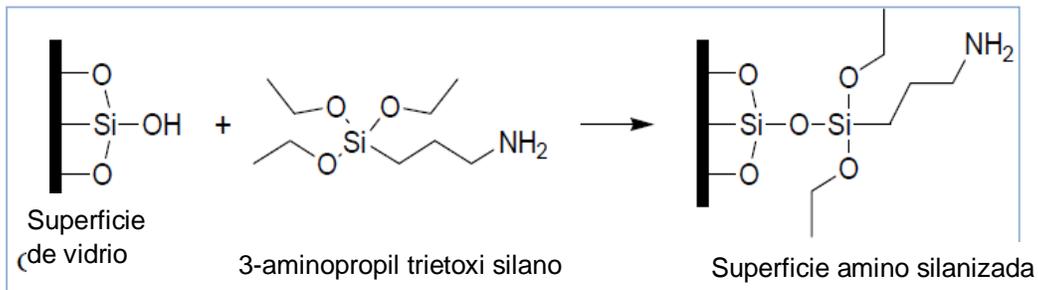


Figura 9. Silanización del soporte en este caso cristales de sílice

En muchos casos la introducción del grupo aldehído se efectúa uniendo glutaraldehído (Durán, y otros, 2002), según el esquema de la figura 10.

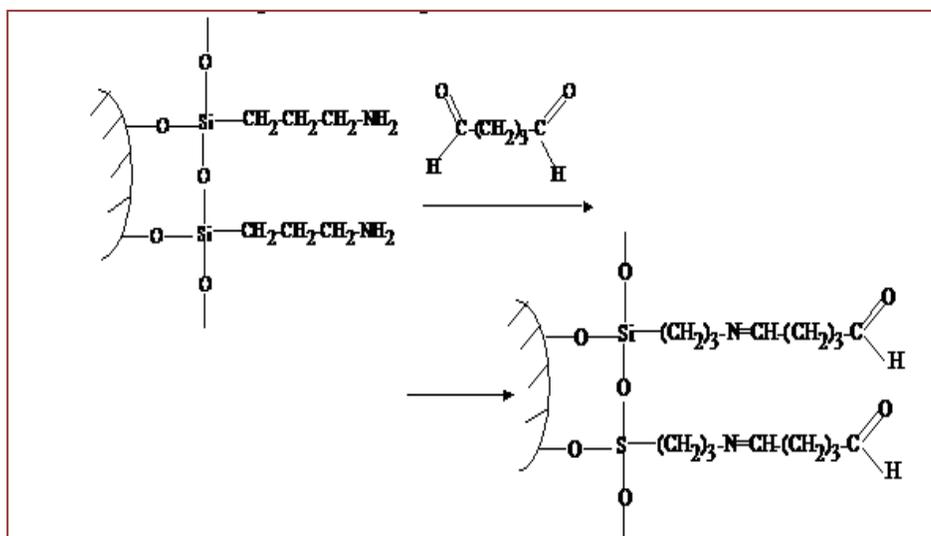


Figura 10. Activación con glutaraldehído, del soporte previamente silanizado.

Después de haber unido el glutaraldehído al grupo silano, se une la enzima aprovechando los grupos $-NH_2$ de ésta, para formar un enlace imínico, como se observa en la figura 11.

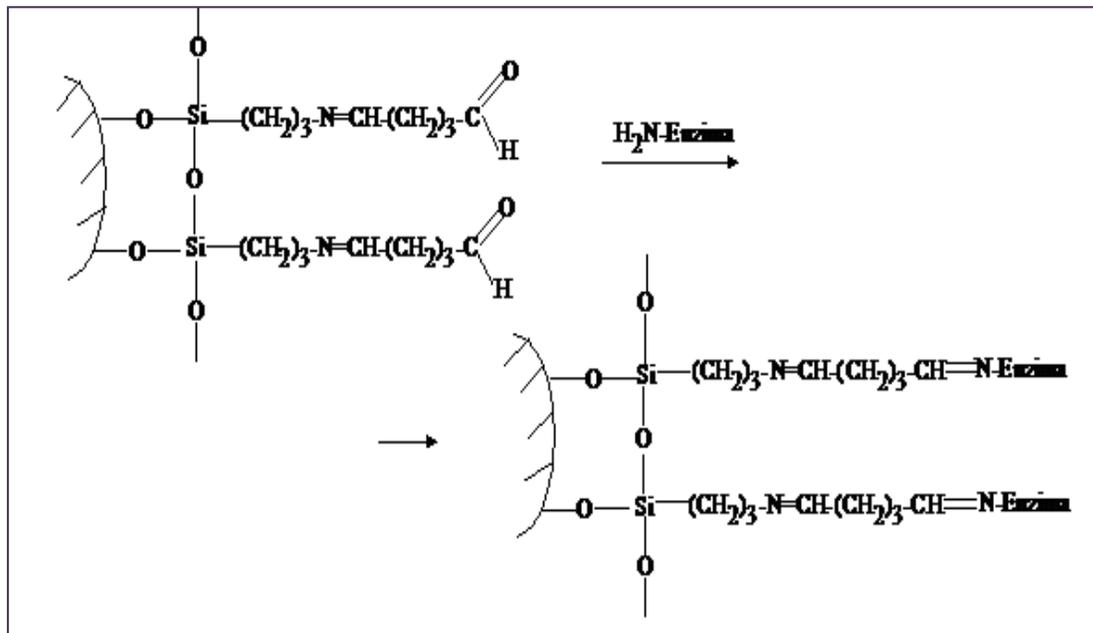


Figura 11. Inmovilización covalente de la enzima a través del grupo $-NH_2$ terminal

C) Inmovilización de enzimas por entrecruzamiento con quitosano.

El quitosano presenta un potencial e interesante valor económico, debido a sus versátiles actividades biológicas y aplicaciones químicas; el quitosano es biodegradable, biocompatible, pues no se produce respuesta del sistema inmune y no tóxico, características que unidas a su naturaleza policationica (figura 12), han estimulado su empleo en diversas aplicaciones biomédicas (Sánchez, y otros, 2007).

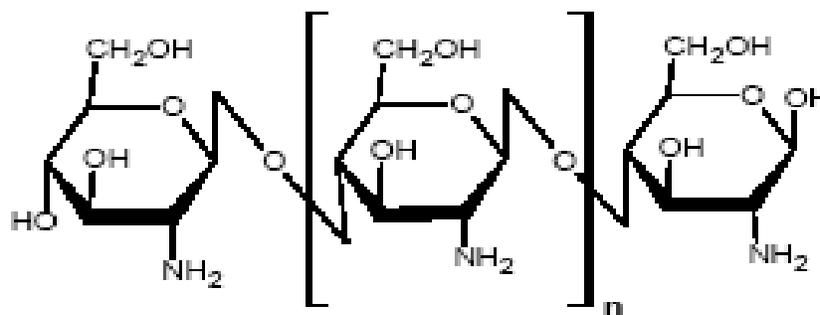


Figura 12. Estructura de quitosano

Entre los agentes entrecruzantes más empleados se encuentran los dialdehídos como el glicoxal y glutaraldehído. La reacción se da entre el grupo aldehído que forma un enlace imina covalente con los grupos amino primarios del quitosano, debido a la resonancia establecida con enlaces dobles adyacentes vía reacción de Schiff (Sánchez, y otros, 2007).

Las aminas reaccionan con compuestos carbonílicos por medio de una adición nucleofílica. Si la amina es primaria el producto de adición final se deshidrata para formar una imina. Los dialdehídos permiten que la reacción se produzca directamente en un medio acuoso sin necesidad de moléculas auxiliares (reductores) que puedan disminuir su biocompatibilidad (figura 13); sin embargo, una desventaja de la utilización de estos compuestos es su toxicidad. Las enzimas se unen al soporte por medio de un enlace tipo inmínico (Sánchez, y otros, 2007).

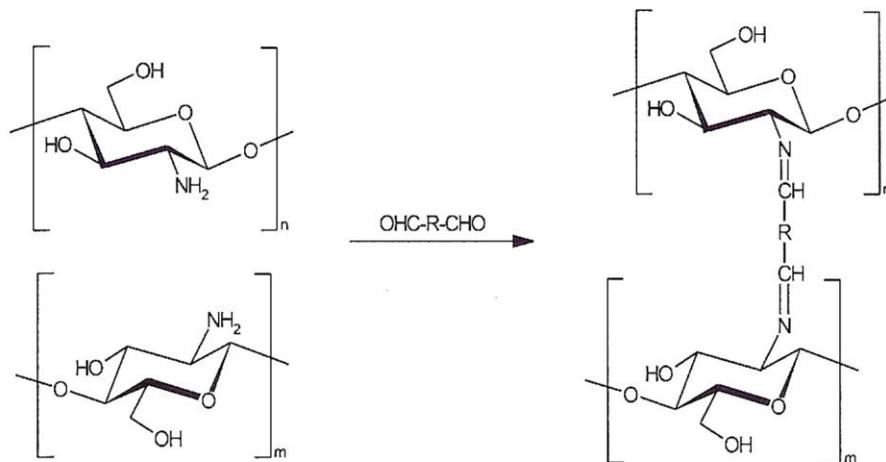


Figura 13. Entrecruzamiento de las cadenas de quitosano con un dialdehído.

El entrecruzamiento covalente permite obtener una red permanente que facilita la difusión de agua y mejora las propiedades mecánicas, debido a esto se han utilizado para la inmovilización de enzimas aplicadas a la biorremediación (Zhang, y otros, 2009).

2.2.6. Enzimas ligninolíticas inmovilizadas

La inmovilización de enzimas que degradan la lignina, ha sido ampliamente investigada principalmente para la decoloración de efluentes textiles, debido a la

similitud que tienen los colorantes empleados en la industria textil con la lignina que podrían ser degradados por estas enzimas.

El uso de enzimas inmovilizadas permite el re-uso de la enzima y reduce el costo del proceso de decoloración en aplicaciones industriales. De las enzimas ligninolíticas, la inmovilización de lacasa ha sido la más estudiada, esta ha sido inmovilizada en diferentes soportes, geles tales como sefarosa (agarosa), sefadex (dextran), y materiales basados en celulosa han tenido buena retención de actividad en estos materiales altamente hidrofílicos, sin embargo los geles tienden a comprimirse o expandirse y no pueden ser usados en reactores de lecho empacado (Kandelbauer, y otros, 2004).

La lacasa se ha inmovilizado en soportes inorgánicos tales como alúmina, sílica, se han obtenido buenos resultados porque primero se activa la superficie del material con 3-aminopropil trietoxi silano para introducir aminas y unir la enzima a la superficie con glutaraldehído, sin embargo estos materiales tienden a romperse limitando la agitación mecánica. Algunos soportes usados en los últimos 6 años han sido los soportes acrílicos y se han reportado muy buenas eficiencias en la retención de la actividad enzimática (Champagne, 2009).

Existen pocas investigaciones sobre la decoloración con peroxidasa inmovilizada, quizá porque se requiere peróxido de hidrógeno para que esta enzima realice la oxidación, y éste debe ser agregado cuidadosamente para no afectar la actividad de la enzima o desactivarla. La peroxidasa de *Sccharum spontaneum* inmovilizada sobre polietileno decoloró 15 lotes de Procion Green HE-4BD, con una adición cuidadosa de peróxido de hidrógeno que favoreció la vida media de la enzima por 60 h (Shaffiqu, y otros, 2002). Cuando López et al (López, y otros, 2004), inmovilizó MnP de *Bjerkandera sp*, ésta decoloró el colorante azo, naranja II.

En lo que se refiere a la decoloración de colorantes utilizando Lac o MnP inmovilizadas se pueden mencionar algunos trabajos indicados en la tabla 5.

Tabla 5. Enzimas ligninolíticas inmovilizadas utilizadas para decoloración de colorantes.

Enzima	Fuente	Método de inmovilización	Colorante	Eficiencia de decoloración	Referencia
Lacasa	Cerrena	Sílica activada	Índigo	78-85% (5h)	(Rekuć, y

	<i>unicolor</i>	con varios silanos	carmin		otros, 2009)
Lacasa	<i>Trametes hirsuta</i>	Covalente Al ₂ O ₃	Índigo carmin	50-90%	(Ryan, y otros, 2003)
Lacasa	<i>Trametes hirsuta</i>	Encapsulación en esferas de alginato	Índigo carmin	96% (24 h)	(Domínguez, y otros, 2005)
Mn – Peroxidasa	<i>Bjerkandera sp</i>	Retención en membrana	Naranja II	92% (50 min)	(López Díaz, 2005)

2.3. Colorantes textiles

Colorante tintóreo es el producto capaz de dar color a la fibra textil, la más elemental división de los colorantes es la que distingue entre colorantes natural y artificial. Los colorantes empleados actualmente en la industria textil son artificiales en un alto porcentaje.

Las características de los colorantes artificiales son superiores a las de los naturales pues estos son insolubles en agua, evitando que las prendas se destiñan (Mansilla, y otros, 2001).

La síntesis química puede conseguir colorantes con cualidades apropiadas a los fines textiles que se les va a dar. Por lo regular los colorantes textiles tienen gran persistencia en el ambiente, por lo que los métodos de tratamiento clásicos no son útiles para su remoción debido a que oxidaciones o reducciones parciales pueden generar productos secundarios altamente tóxicos (Quintero, y otros, 2010). En la tabla 6 se observa la clasificación de los colorantes sintéticos (Hunger, 2007).

Tabla 6. Clasificación de colorantes textiles sintéticos

Tipo	Característica
Ácidos	Tienen diferentes grados de solidez. Su grupo cromóforo es aniónico los azoicos son los tintes amarillos, anaranjados, rojos, escarlatas, marinos sólidos, algunos verde-oscuros, y marrones (mezclas de varios azoicos).
Básicos	Empleados para tinción directa de lana, seda y, sobre todo, las acrílicas, en las que se obtienen colores vivos y brillantes y con muy buena solidez. Tiñen las fibras animales de forma directa
Directos	Empleados para la tinción de celulósicos, con muy buenas solidez.

A la tina	Necesitan del oxígeno ambiental para ser efectivos. Su constitución química es análoga a la del índigo.
Pigmentación	Necesitan de aglutinantes para su fijación. Colorantes dispersos Fino grado de dispersión. Se usan con auxiliares "carriers". Necesitan de aglutinantes para su fijación.
Dispersos	Fino grado de dispersión. Empleados para la tintura de rayón, acetatos y poliésteres. Se usan con auxiliares "carriers".
Sulfurosos	Empleados para fibras celulósicas. Muy económicos pero de resultados pobres de matices. Colorantes de complejo metálico Se emplean en la lana. De buena solidez.
Sobre mordente	Necesitan de algún material que los fije a la superficie a colorear. Son poco utilizados actualmente.
Reactivos	Empleados en la tintura de fibras celulósicas, mediante reacción química; producen matices de coloreado muy vivos y brillantes.

Los colorantes azoicos tienen una clasificación amplia, a su vez son divididos en cuatro secciones, la clasificación de los cuatro secciones dependen del número de grupo azo en la molécula colorante. La profundidad del color es relacionado con la estructura molecular del colorantes. También es relacionado con los grupos cromóforos como $-N=N-$ ó $>C=O$ (Hunger, 2007).

La estructura química del colorante es importante para que pueda ser atacada por las enzimas, ya que hay una preferencia por anillos aromáticos ricos en electrones y ocurre una oscilación entre el doble enlace y el simple a lo largo de la cadena molecular conjugada (Hunger, 2007).

2.3.1. Índigo

El colorante índigo (2,2´bisíndigo), (CI Vat Blue I) o índigo tina, con fórmula química $C_{12}H_{10}O_2N_2$, (figura 14) es un polvo cristalino azul oscuro. Su principal aplicación es en la industria de la mezclilla. Tiene un alto punto de fusión (390-392 °C), es insoluble en agua, alcohol o éter debido a las fuerzas intermoleculares fuertes causadas por los puentes de hidrógeno, soluble en cloroformo, nitrobenzeno, o ácido sulfúrico concentrado.

En el estado sólido el índigo forma un polímero en el cual cada molécula de índigo se ha unido a cuatro moléculas a su alrededor. En los disolventes no polares,

el índigo es presentado como un monómero, mientras en solventes polares la asociación intermolecular ocurre y la solución es azul (Quintero, y otros, 2010).

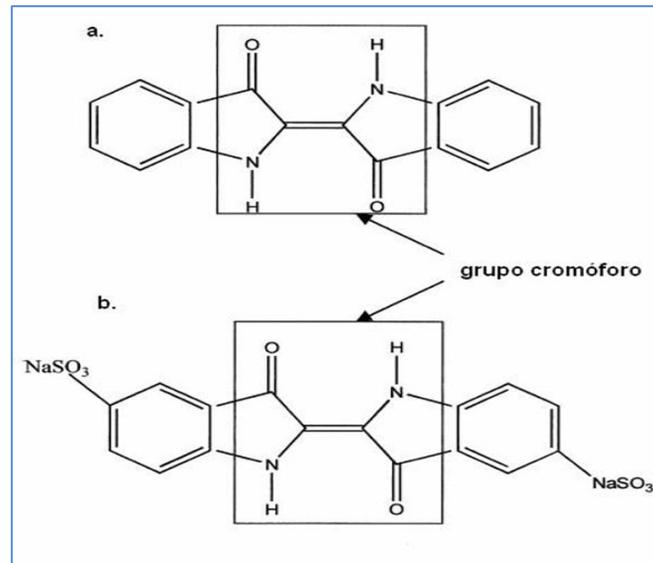


Figura 14. Molécula a) índigo; b) índigo carmín

El índigo pertenece al grupo de los tintes tina, los cuales en el proceso de teñido permanecen sin fijarse entre el 5 y el 20% (Quintero, y otros, 2010).

2.3.2. Índigo carmín

El índigo sulfatado también se conoce como índigo carmín:

Fórmula química: $C_{16}H_8O_8N_2S_2Na_2$, figura 14b.

Peso molecular: 466,37 g/mol

Composición: C(41.17%); H(1.72%); O(27.45%); N(6,00%); S(13.72%); N(6%); S(13.72%); Na (9.86%);

Longitud de onda de máxima absorbancia = 611nm

El índigo carmín (IC) es uno de los colorantes más viejos y también uno de los más ampliamente usados, su principal aplicación industrial es el teñido de ropa (pantalones de mezclilla azul), también ha sido empleado como indicador de pH pues vira de azul (pH 11.4) a amarillo (pH 14), también es utilizado en microscopía de tinción en biología (Gemeay, y otros, 2003).

El índigo carmín es un compuesto de clase índigo tina de alta toxicidad que puede causar irritación de ojos y piel al ser humano. El consumo del tinte en las madres embarazadas puede causar en los fetos daños en su naturaleza reproductiva, desarrollo mental e intoxicación. Cuando es administrado intravenosamente en los pacientes para evaluar el sistema urinario, causa hipertensión severa, efectos cardiovasculares y respiratorios. Puede causar también irritación gastrointestinal con náusea, vómito y diarrea. Este colorante al igual que todos los utilizados en la industria textil no es completamente consumido en el proceso de teñido, cerca de un 20 % no se fija, por lo cual, es desechado a diferentes cuerpos acuíferos, causando un deterioro ambiental.

Remoción de índigo carmín

Para su remoción se emplean diferentes métodos químicos, físicos y tratamientos biológicos (Quintero, y otros, 2010).

La oxidación química emplea agentes oxidantes como el ozono (O_3), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o el permanganato (MnO_4) para cambiar la composición química de un compuesto o grupo de compuestos, como tintes. Gemeay et al., (Gemeay, y otros, 2007) estudiaron la actividad catalítica de polianilina/ MnO_2 ($PANI/MnO_2$) hacia la degradación oxidativa índigo carmín en presencia de H_2O_2 como oxidante, las reacciones siguieron una cinética de primer orden. Los procesos utilizando H_2O_2/UV son los más usados en los procesos de oxidación avanzada para el tratamiento de contaminantes peligrosos presentes en aguas residuales, porque no generan lodo y logran alta remoción de DQO en un corto tiempo, sin embargo tienen un alto costo (Alberty, 2008). Se ha obtenido una remoción del 100% de colorante utilizando técnicas electroquímicas para decoloración de color índigo como la incineración electroquímica de índigo carmín (Quintero, y otros, 2010).

La adsorción del índigo, método físico, ha sido evaluada usando lodo residual deshidratado de una planta de tratamiento de agua residual como adsorbente (Dhaouadi, y otros, 2008). La adsorción de índigo carmín en biosorbentes y polímeros naturales ha sido ampliamente investigada, encontrándose que el

quitosano presenta procesos espontáneos al contrario de lo que sucede con la quitina, siendo el quitosano favorable para la adsorción de IC y la quitina desfavorable. También se han probado materiales residuales tales como las cenizas de las plantas de generación de energía, un producto residual de la extracción de la soya y el carbón extraído de los granos del café, encontrándose que se deben realizar tratamientos previos a los materiales para que ocurra la difusión del IC, siendo importante el tamaño de poro como en el caso del carbón residual de carbón que es el limitante en el proceso de adsorción (Quintero, y otros, 2011).

En los tratamientos biológicos, la decoloración de IC usando microorganismos puros (algas, hongos y bacterias) o consorcios, es difícil la separación del producto con respecto a las células y a los demás componentes, aunque el uso de consorcios incrementa la eficiencia de decoloración, pero se puede llegar hasta la mineralización del colorante (Quintero, y otros, 2011). Otro método biológico de decoloración es el uso de enzimas., tanto libres como inmovilizadas, las más utilizadas son las ligninolíticas provenientes de hongos de la pudrición blanca (Quintero, y otros, 2010), en la tabla 5 se muestran 3 sistemas de inmovilización utilizados para la decoloración de IC. En la decoloración de IC se han identificado productos de degradación como isatina sulfonada y ácido antranílico (Campos, y otros, 2001).

Existen tecnologías químicas, físicas y biológicas para el tratamiento de agua residual textil con índigo. La elección del tratamiento está en función de la calidad de agua del efluente, el uso, los costos de la tecnología, ventajas y desventajas (Quintero, y otros, 2010).

3. JUSTIFICACIÓN

En Tlaxcala hay micro y pequeñas empresas que se dedican al lavado y al teñido de la mezclilla, sus descargas se envían a cuerpos de agua sin tratamiento previo o con un pretratamiento deficiente, ocasionando problemas ambientales por la excesiva cantidad de colorante que impide el paso de la luz, evitando que la flora acuática lleve a cabo la fotosíntesis. Además de que la descomposición los colorantes, principalmente los del tipo azo, por acción de la luz produce compuestos mutagénicos y/o carcinogénicos.

El índigo es uno de los principales componentes del agua residual de las lavanderías textiles que se dedican al suavizado y lavado de la mezclilla. El tratamiento de este tipo de efluente es uno de los más difíciles porque el índigo es de origen sintético y tiene una estructura molecular aromática compleja, la cual es más estable y difícil de biodegradar; a esto se le suma que dependiendo del tipo de acabado que lleve la mezclilla o la época del año en la que se realice, la composición del agua residual puede ser más fácil de tratar (lavado de telas) o más difícil (teñido, mercerizado, blanqueo), variando considerablemente el pH (2-12) y la temperatura a la cual es vertido el efluente.

Se sabe que los sistemas de tratamiento de agua del tipo físico-químicos convencionales como coagulación-floculación remueven eficientemente el color pero generan grandes cantidades de lodo, no acabando con el problema; los sistemas avanzados de oxidación pueden oxidar los colorantes pero son costosos y presentan problemas de operación, resultando no viables para la aplicación industrial. Existe una gran variedad de tratamientos biológicos para la remoción de índigo carmín, sin embargo uno de los más estudiados en los últimos años es usar enzimas provenientes de hongos ligninolíticos, por la similitud que tienen las estructuras de los colorantes con la lignina; al utilizar enzimas se reducen los períodos de tratamiento, el volumen de lodos es menor que al usar microorganismos, el proceso se puede modificar en función de los sustratos. No obstante, el uso de enzimas aumenta el costo del tratamiento, lo cual puede solucionarse inmovilizándolas pudiendo reutilizarlas; además se vuelven más estables mecánicamente y químicamente.

Para inmovilizar las enzimas generalmente se parte de la enzima pura, lo cual incrementa los costos.

Por lo anterior en este trabajo se realizó la inmovilización de enzimas extracelulares de *Trametes versicolor* sin previa purificación, bajo diferentes formas y utilizando diferentes soportes; esto para evaluar la cinética de decoloración de índigo carmín con los sistemas de inmovilización y cuantificar los ciclos de uso que pueden soportar dichos sistemas. También se determinó la fitotoxicidad de los productos puesto que algunos investigadores que han utilizado sistemas biológicos para degradar colorantes reportan subproductos de decoloración tóxicos, que no se pueden usar como agua de riego. Todo esto se llevó a cabo como una alternativa para proponer las bases para diseñar un sistema de tratamiento adecuado para la remoción del índigo carmín.

4. HIPÓTESIS

La decoloración de efluentes textiles se puede realizar usando enzimas extracelulares de *Trametes versicolor* inmovilizadas sin previa purificación, presentes en un concentrado del medio de cultivo residual de crecimiento.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Comparar la cinética de decoloración de índigo carmín utilizando diferentes sistemas de inmovilización de enzimas extracelulares de *Trametes versicolor* sin previa purificación y evaluar la fitotoxicidad de los productos de decoloración.

5.2. Objetivos específicos

1. Seleccionar medios de cultivo para el crecimiento de *Trametes versicolor* con la finalidad de que produzca una cantidad de enzimas suficiente para que se lleve a cabo la inmovilización de las mismas.

2. Evaluar el efecto de 3 disolventes (agua, etanol, acetona) usados en la reacción de silanización, en la eficiencia de la inmovilización de enzimas en sílica amorfa comercial.

3. Evaluar métodos de inmovilización de enzimas ligninolíticas extracelulares usando diferentes soportes y métodos de inmovilización:

- cristales de sílica amorfa comercial y sílica formada a partir de tetraetilortosilicato (unión covalente enlace inmínico),
- cristales de sílica formada a partir de tetraetilortosilicato (unión covalente via tiones)
- Alginato-quitosano (encapsulación de enzimas)
- Quitosano (Entrecruzamiento)

4. Evaluar el efecto del pH y la temperatura sobre la velocidad de decoloración del índigo carmín usando los diferentes sistemas con enzimas inmovilizadas.

5. Determinar los parámetros cinéticos K_G y $V_{m\acute{a}x}$ para la decoloración del índigo carmín usando los sistemas de enzimas inmovilizadas.

6. Determinar la fitotoxicidad de los productos de decoloración del índigo carmín con los diferentes sistemas de inmovilización.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

De manera general se presenta un diagrama (figura 15) en el cual se observa la estrategia experimental seguida en el presente trabajo.

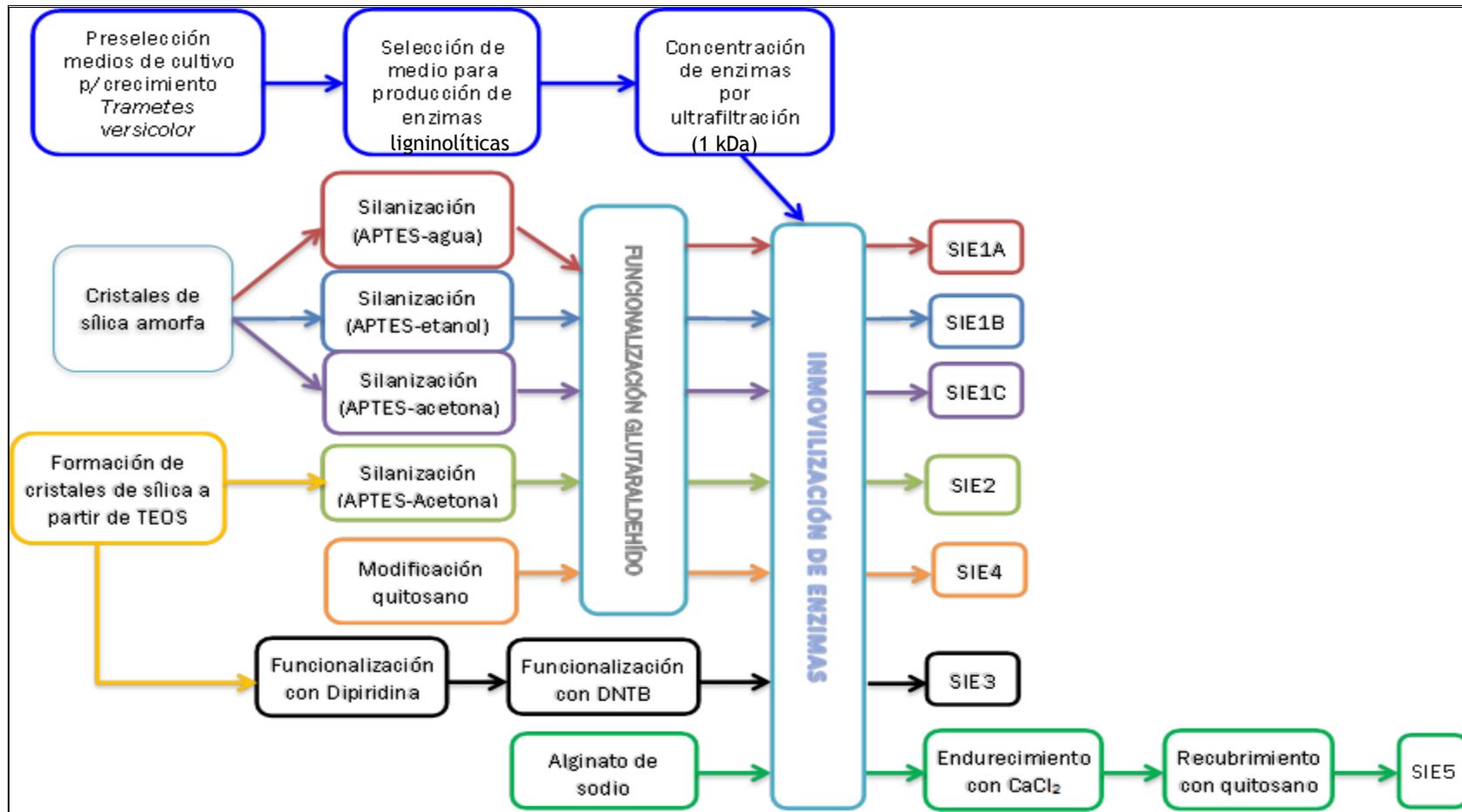


Figura 15. Metodología general seguida en el desarrollo de la tesis.

APTES (Amino propil trietoxi silano); TEOS (tetraetil *orto*-silicato); DNTB (ácido 5.5'ditiobis(2-nitrobenzoico)); SIE (Sistema de inmovilización enzimática)

6.1. Evaluación de medios de cultivo para producción de enzimas ligninolíticas.

Para definir el medio de cultivo de producción a utilizar se llevó a cabo el análisis de 12 medios de cultivo residuales del crecimiento de *Trametes versicolor*, a éstos se les cuantificó la actividad enzimática lacasa y cantidad de proteína excretada. Se prepararon 100 mL de los 12 medios de cultivo en matraces Erlenmeyer de 250 mL, cuya composición se muestra en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

Tabla 7. Composición de medios preseleccionados para el crecimiento de *Trametes versicolor*

	Medios de cultivo (cantidades de compuesto g/L)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Agar extracto de malta			11.5									
All-Bran		7										
Bran Flakes					30		30	30	30			
Cloruro de calcio						0.05			0.05			0.1
Cloruro de potasio												0.5
Dextrosa	14											
Extracto de levadura	1.4			5						3	2	15
Extracto de malta			10.5			20			20	40	3.5	
Extracto de peptona											0.1	
Fosfato de calcio				0.3								
Fosfato de magnesio				0.5								
Fosfato de potasio dibásico	0.7											
Fosfato de potasio monobásico	0.322			0.5							0.5	2
Fosfato de sodio dibásico					0.19		0.19	0.19	0.19			
Fosfato de sodio monobásico					0.73		0.73	0.73	0.73			
Peptona de Caseína	1.4											
pH		5.75	5.92								4.5	

Rastrojo maíz										20		
Sacarosa		6.3		10.5							10	4
Salvado			10.5						0.6	20		10
Sulfato cúprico				0.25		0.05			0.05			0.5
Sulfato de amonio				2								0.875
Sulfato de magnesio	0.35			0.5							0.5	0.5
Sulfato de Zinc				0.02								
Sulfato Ferroso				0.02								
Sulfato manganoso				0.02		0.05			0.05			0.5

Posteriormente se esterilizaron a 121 °C, 17.5 psi durante 15 min, se inocularon con un fragmento de 1 cm² de micelio de *Trametes versicolor* crecido en agar papa dextrosa (PDA). Después de 21 días de la inoculación el medio residual se separó del micelio y se filtró con papel filtro Whatman No. 1.

Se cuantificaron las proteínas contenidas en el medio de cultivo residual (ver 6.2.5.), después del crecimiento fúngico y se midió la actividad enzimática de lacasa usando ABTS (ver 6.2.1) y peroxidasa por la oxidación del guayacol (ver 6.2.3).

Para determinar el día óptimo de producción enzimática diariamente a partir del 3er. día de crecimiento fúngico se tomaron muestras de 10 mL del medio 12 (por triplicado), en un ambiente estéril cuantificando proteína y actividad enzimática tanto lacasa como peroxidasa.

6.1.1. Concentración y semi-purificación de enzimas extracelulares.

Una vez crecido el hongo sobre el medio de cultivo fue separado el micelio del medio de cultivo residual (MCR). El MCR se centrifugó a 5000 rpm durante 15 min, posteriormente el sobrenadante se filtró con papel Whatman No. 1.

500 mL de MCR ya filtrado se concentró mediante ultrafiltración con una membrana de celulosa de 1 kDa, a una presión de 3.45 bar, usando N₂ durante 4

horas, obteniéndose el concentrado enzimático (CE), obteniéndose un volumen final de 50 mL.

6.2. Determinaciones analíticas

6.2.1. Determinación de la actividad enzimática Lacasa con ABTS

En un tubo (HACH) de 10 mL se preparó una mezcla de: 0.4 mL del CE, 0.4 mL de buffer acetatos (0.2 M), pH 5, 2.8 mL de agua desionizada y 0.4 mL de ABTS (5 mM). El testigo se preparó mezclando 0.4 mL del CE, 0.4 mL de buffer acetatos (0.2 M), a pH 5 y 3.2 mL de agua desionizada. Se leyó a 25 °C el cambio de absorbancia a 728 nm cada 15 s por 3 min, usando un espectrofotómetro portátil UV-Visible HACH DR 2800. Se graficó el cambio de absorbancia contra el tiempo. La pendiente correspondió a la velocidad inicial (v_0) de oxidación del ABTS con lacasa. Se calculó la actividad enzimática Lacasa (AEL) tomando en cuenta el coeficiente de extinción molar del ABTS ($\epsilon=14,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Solís Oba, y otros, 2005) y la dilución del CE. Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima requerida para catalizar la oxidación de 1 μmol de sustrato por minuto a 25 °C.

6.2.2. Determinación de la actividad enzimática lacasa con siringaldazina (4-Hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído azino)

En un tubo (HACH) de 10 mL se preparó una mezcla de: 2.2 mL de buffer Britton-Robinson (Britton, y otros, 1931) 100 mM, pH 5), 0.3 mL de siringaldazina (0.216 mM) en metanol absoluto y 0.5 mL del CE. El testigo se preparó: 2.2 mL de buffer Britton-Robinson (100 mM, pH 5), 0.3 mL de siringaldazina (0.216 mM) en metanol absoluto y 0.5 mL de agua de ionizada (Wang, y otros, 2010). Se leyó a 25 °C el cambio de absorbancia a 530 nm cada 15 s por 3 min. Se calculó la actividad tomando en cuenta el coeficiente de extinción molar del producto oxidado de siringaldazina ($\epsilon=65,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Wang, y otros, 2010) y la dilución del CE.

6.2.3. Determinación de la actividad enzimática peroxidasa con guayacol.

Se midió el cambio de absorbancia con el tiempo, de preparó una solución conteniendo: 2 mL de buffer fosfatos (100 mM, pH 6.1), 0.4 mL de guayacol (1% v/v) en etanol, 2 mL agua destilada, 0.4 mL de H₂O₂ (0.5%v/v) y 0.1 mL del CE. El testigo se preparó mezclando 2 mL de buffer fosfatos (100 mM, pH 6.1), 0.4 mL de guayacol (1% v/v) en etanol, 2.1 mL agua destilada, 0.4 mL de H₂O₂ (0.5% v/v). Se leyó a 25 °C el cambio de absorbancia a 470 nm cada 20 s por 2 min. Se calculó la actividad tomando en cuenta el coeficiente de extinción molar del tetraguayacol ($\epsilon=26600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Gutiérrez, y otros, 2005) y la dilución del concentrado de enzimas.

6.2.4. Determinación de la actividad enzimática MnP con rojo fenol

Se midió el cambio de absorbancia de una mezcla de reacción conteniendo: 0.4 mL de lactato de sodio (0.25 M), 0.2 mL de MnSO₄ (2 mM), 0.8 mL de 0.5% de albúmina de suero bovino (ASB), 0.4 mL de rojo fenol (0.1% v/v), 2 mL del CE, la reacción se inició agregando 0.2 mL de H₂O₂ (2 mM) en buffer succinatos (pH 4.5) (Lopes, y otros, 2009). El testigo se preparó mezclando: 0.4 mL de lactato de sodio (0.25 M), 0.2 mL de MnSO₄ (2 mM), 0.8 mL de 0.5% de ASB, 0.4 mL de rojo fenol (0.1% v/v), 2.2 mL del CE en buffer succinatos (pH 4.5). Se leyó a 25 °C el cambio de absorbancia a 610 nm cada 20 s por 5 min. Se calculó la actividad enzimática MnP (AEP) tomando en cuenta el coeficiente de extinción molar del rojo fenol oxidado ($\epsilon=22,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Mouso, y otros, 2007) y la dilución del concentrado de enzimas.

6.2.5. Cuantificación de proteína por el método de Bradford.

Se prepararon soluciones con 2, 4, 6, 8 y 10 µg/mL de albúmina en NaCl (0.15 M) para trazar la curva de calibración. El blanco se preparó con 2 mL de NaCl (0.15 M) y 2 mL de reactivo de Bradford. Se colocaron 2 mL de solución de albúmina con 2 mL de reactivo de Bradford, se agitó con un vórtex y después de

10 minutos se leyó la absorbancia a $\lambda=595$ nm. Se repitió para todas las soluciones de albúmina. La curva de calibración se hizo graficando la concentración de proteína contra la absorbancia (Kruger, 2002).

A 2 mL del CE se añadieron 2 mL de reactivo de Bradford, se mezcló usando un vórtex, después de 10 minutos se leyó la absorbancia a $\lambda =595$ nm y se calculó la cantidad presente de proteína usando la curva de calibración.

6.3. Inmovilización de enzimas extracelulares de *Trametes versicolor*.

Se realizaron los siguientes sistemas de inmovilización enzimática (SIE):

SIE 1. Sílica amorfa comercial silanizada con APTES en 3 diferentes disolventes agua, etanol y acetona (1A, 1B y 1C) y funcionalizada con glutaraldehído por enlace covalente.

SIE 2. Sílica formada a partir de TEOS, silanizada con APTES en acetona y funcionalizado con glutaraldehído por enlace covalente.

SIE 3. Sílica formada a partir de TEOS, funcionalizada con ditiopiridina y ácido ditiobis nitrobenzoico por enlace covalente vía tioles.

SIE 4. Quitosano funcionalizado con glutaraldehído por entrecruzamiento.

SIE 5. Alginato con recubrimiento de quitosano por encapsulación.

A todos los sistemas de inmovilización enzimática se les determinó la cantidad de proteína que fue inmovilizada (6.2.5) y las AEL y AEP (6.2.2 y 6.2.4) después de la inmovilización, así como la actividad específica lacasa (AEEL) y actividad específica peroxidasa (AEEP); por último se realizó un balance de proteína. Para la determinación de las actividades enzimáticas tanto lacasa como Mn peroxidasa de los sistemas de inmovilización y para la cuantificación de proteína inmovilizada se emplearon 0.2 g de enzima-soporte seco.

6.3.1. Sistema de inmovilización 1.

Se mezclaron 5 g de cristales de sílica amorfa comercial con 50 mL de solución de NaOH (2% v/v), se calentaron por 2 horas a 85 ± 5 °C manteniendo agitación suave. Esto permitió formar grupos SiONa en la sílica. La sílica tratada se decantó y lavó con agua destilada. Posteriormente se le adicionaron 50 mL de

HNO₃ (20% v/v), y se dejaron reaccionar por 30 minutos sin agitación a temperatura ambiente. Con este tratamiento ácido se desplazó el Na quedando grupos hidroxilo terminales. La sílica se decantó y lavó con agua destilada. Después se llevó a cabo la silanización de la sílica, utilizando 3 disolventes para definir si el disolvente utilizado en la silanización influye en la cantidad de enzima inmovilizada y en el porcentaje de actividad enzimática retenida, los cuales se describen a continuación.

- A. Con 50 mL de una solución de APTES (4% v/v) en agua por 2 horas a $85 \pm 5^\circ\text{C}$ con agitación suave (Solís Oba, 2005).
- B. Con 50 mL de una solución de APTES (4% v/v) en acetona por 24 horas a $43 \pm 2^\circ\text{C}$ sin agitación (Zille, y otros, 2003).
- C. Con 50 mL de una solución de APTES (4% v/v) en etanol (Castro, y otros, 2009) por 24 horas a temperatura ambiente sin agitación.

La silanización permitió introducir grupos aminos unidos al hidroxilo. Se decantó y lavó la sílica con agua destilada. Se agregaron 25 mL de glutaraldehído (3% v/v) y se dejaron por 3 horas con agitación suave a $65 \pm 5^\circ\text{C}$. En esta etapa se forman bases de Schiff entre los grupos amino y los aldehídos. La sílica se decantó y lavó con agua destilada. Se adicionaron 5 mL del CE obtenido por ultrafiltración con una concentración de proteína de 2.5 ± 0.3 g/L de CE y se dejaron 15 horas en contacto con la sílica, las enzimas se unieron covalentemente al soporte mediante los grupos aldehído introducidos previamente. Finalmente la sílica nuevamente se decantó y lavó con agua destilada hasta que en los lavados no se registró actividad lacasa o peroxidasa.

La sílica con la enzima inmovilizada fue centrifugada con 40 mL de buffer acetatos pH 5, a 10,000 rpm durante 20 min y se dejó secar a temperatura ambiente durante 30 h.

6.3.2. Formación de cristales por el método Sol-Gel.

Se llevó a cabo la formación del soporte de cristales de sílica mezclando volúmenes iguales de etanol (25 mL), agua destilada (25 mL) y TEOS (25 mL), la

mezcla se agitó suavemente para homogeneizar. Se formaron dos fases en el seno de la disolución, a las cuales se agregaron algunas gotas de HCl concentrado, para formar una sola fase (Castro, y otros).

La disolución final obtenida fue homogénea e incolora. Ésta disolución se dejó evaporar a temperatura ambiente durante cinco días, el proceso de evaporación favoreció la formación de los cristales de sílica, cuyo tamaño se determinó antes de fijar las enzimas (0.2-2 mm) (Castro, y otros, 2009).

6.3.3. Sistema de inmovilización enzimática 2.

Se mezclaron 5 g de sílica cristales formados a partir de TEOS (ver 6.3.2) con 50 mL de solución de NaOH 1 M, se dejaron reaccionar por 1 h, a temperatura ambiente y sin agitación. La sílica tratada se decantó y lavó con agua destilada. Posteriormente se le adicionaron 50 mL de HNO₃ (1 M), y se dejaron reaccionar por 10 minutos a temperatura ambiente. La sílica se decantó y lavó con agua destilada (Castro, y otros, 2009).

Después se llevó a cabo la silanización de la sílica con 50 mL de APTES (20% v/v) en acetona por 2 horas a 50 °C y sin agitación. Se decantó y lavó la sílica con agua destilada. Se agregaron 25 mL de una solución acuosa de glutaraldehído al 10% (previamente tratado durante 20 min a 64 °C, para disminuir su toxicidad) a la sílica silanizada, se dejó interactuar durante 2 h a 24 ± 3°C (Lee, y otros, 2006). La sílica se decantó y lavó con agua destilada.

Se adicionaron 5 mL del CE conteniendo 2.5 ± 0.3 g de proteína /L de CE y se dejó 24 horas en contacto con la sílica. Finalmente la sílica nuevamente se decantó y lavó con agua destilada hasta que los lavados no tuvieran actividad lacasa y/o peroxidasa. Se dejó secar el soporte a temperatura ambiente durante 30 h.

6.3.4. Sistema de inmovilización 3

Este método fue desarrollado usando dos soluciones de tioles [2,2'ditiopiridina (DTP) y ácido 5,5'ditiobis(2-nitrobenzoico) (DNTB)], ambos a una concentración de 2 mM en metanol (50% v/v). El procedimiento consistió en sumergir los cristales de sílica formados a partir de TEOS (ver 6.3.2) durante 2 h a temperatura ambiente en el DTP, posteriormente se lavaron los cristales con metanol (50% v/v). Subsecuentemente fueron sumergidos en DNTB durante dos horas a temperatura ambiente y posteriormente fueron lavados con metanol (50% v/v), se adicionaron 5 mL del CE conteniendo 2.5 ± 0.3 g de proteína /L de CE, dejándolo interactuar durante 24 h a temperatura ambiente. Finalmente los cristales de sílica fueron lavados con agua destilada, hasta que no se detectó actividad enzimática lacasa y/o peroxidasa en los lavados; la sílica se dejó secar a temperatura ambiente durante 30 h (Castro, y otros, 2009).

6.3.5. Sistema de inmovilización 4.

La solución de quitosano fue preparada disolviendo 1.0 g de quitosano en 100 mL ácido acético (2% v/v) y diluído con agua destilada hasta llegar a 200 mL; llegando a una concentración de 5.0 g/L. La solución de quitosano fue añadida a una solución de NaOH (2 M), para formar un flóculo blanco, se lavó con agua desionizada para neutralizar. 20 mL de una solución acuosa de glutaraldehído (5% v/v) fue añadido al soporte y agitado continuamente por 8 h a temperatura ambiente, se dejó sedimentar durante toda la noche, se filtró y lavó 5 veces para remover el glutaraldehído no asociado. El producto obtenido fue un polvo húmedo de quitosano reticulado con glutaraldehído. El soporte fue añadido a 10 mL del CE (2.5 ± 0.3 g proteína /L CE) y fueron agitados continuamente a temperatura ambiente durante 16 h y posteriormente se mantuvo a 4 °C durante toda la noche. Se lavó y filtró hasta que no se detectó actividad enzimática lacasa y/o peroxidasa en los lavados y se dejó a secar a temperatura ambiente durante 48 h (Zhang, y otros, 2009).

6.3.6. Sistema de inmovilización 5.

Se preparó una solución de alginato de sodio (2% m/v) en agua desionizada. Se mezclaron 20 mL de la solución de alginato con 2.5 mL del concentrado enzimático (2.5 ± 0.3 g/L de proteína) obteniendo una relación 1:8 (v/v), la mezcla fue agitada hasta su completa homogenización. La mezcla CE–alginato fue goteada con una jeringa a una solución de CaCl_2 (2% m/v). Las esferas se dejaron endurecer durante una hora bajo ligera agitación. Las esferas fueron removidas del medio de encapsulación y lavadas con CaCl_2 (0.5% m/v) (Lu, y otros, 2007).

Se preparó una solución de quitosano que contenía quitosano (0.3% m/v) en una solución de HCl 0.1 M. Se formó una capa de quitosano cuando las esferas se introdujeron en 100 mL de la solución de quitosano, conteniendo CaCl_2 (0.5% m/v, pH 5.4). Las esferas se dejaron en agitación durante 30 minutos y después se lavaron con CaCl_2 (0.5% m/v) para remover el quitosano no unido (Lu, y otros, 2007). Posteriormente se lavó con acetona, para eliminar el agua presente dentro de la esfera de alginato-quitosano, posteriormente se dejó evaporar la acetona residual durante 4 h, obteniéndose esferas de 0.1 – 1 mm de diámetro.

6.4. Pruebas de decoloración y cuantificación de ciclos de uso.

La decoloración de índigo carmín (IC) se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL, los cuales contenían 50 mL de solución IC (100 ppm) y la cantidad de soporte correspondiente de acuerdo a la tabla 8, cada experimento fue preparado por triplicado. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, pH 6.34 y sin agitación, hasta la total decoloración, monitoreando la disminución de color cada hora usando un espectrofotómetro; la concentración de IC se determinó de acuerdo con una curva patrón de IC a diferentes concentraciones (5, 10, 20, 30, 40 ppm) leída a 610 nm, usando como blanco agua.

Se usaron como controles soporte con enzima desnaturalizada y soporte sin enzima. La concentración de IC utilizada para la determinación de las v_0 de decoloración con todos los sistemas se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$[IC]_{acción\ enzimática} = [IC]_{cuantificado} - \{[IC]_{adsorbido\ en\ soporte} + [IC]_{acción\ de\ la\ luz}\}$$

Se evaluó la decoloración utilizando 2.5 ± 0.005 mL de concentrado enzimático, y 47.535 ± 0.005 mL de IC 100 ppm.

Tabla 8. Cantidad de soporte inmovilizado usado para la decoloración.

		Matraz	Sistema	Cantidad de soporte (g)
Muestras de estudio	Soporte con enzima activa	1	1A	3.023 ± 0.010
		2	B	3.008 ± 0.008
		3	1C	3.000 ± 0.005
		4	2	6.124 ± 0.031
		5	3	6.110 ± 0.040
		6	4	3.250 ± 0.007
		7	5	3.500 ± 0.008
C o n t r o l e s	Soporte con enzima desnaturalizada	8	1A	3.023 ± 0.010
		9	1B	3.008 ± 0.008
		10	1C	3.000 ± 0.005
		11	2	6.124 ± 0.031
		12	3	6.110 ± 0.040
		13	4	3.250 ± 0.007
		14	5	3.500 ± 0.008
	Soporte sin enzima	15	1A	3.023 ± 0.010
		16	1B	3.008 ± 0.008
		17	1C	3.000 ± 0.005
		18	2	6.124 ± 0.031
		19	3	6.110 ± 0.040
		20	4	3.250 ± 0.007
		21	5	3.500 ± 0.008

Las enzimas desnaturalizadas fueron esterilizadas a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 psi por 30 min en autoclave, verificándose que las enzimas no tuvieran actividad. El soporte sin enzima fue tratado como el que se utilizó para inmovilizar las enzimas. Las cantidades representan una cantidad de proteína similar de 6.4 ± 0.5 g de proteína contenidas en 2.5 ± 0.005 mL de CE.

Después de la decoloración se filtró el residuo y se lavó el soporte con agua destilada. Después se agregó nuevamente el mismo volumen de solución de índigo carmín (100 ppm) a la enzima inmovilizada y así sucesivamente para cuantificar los ciclos de reuso, esto sólo para las muestras de estudio, no así para los controles.

6.5. Efecto del pH en la decoloración del IC usando los sistemas de inmovilización.

Uno de los objetivos al inmovilizar una enzima es ampliar el rango de pH en el cuál la enzima es activa, para esto se evaluó la velocidad de decoloración en distintos valores de pH (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12) usando matraces Erlenmeyer de 250 mL, conteniendo 40 mL del buffer correspondiente de acuerdo a la tabla 9, 10 mL de solución IC (500 ppm) y la cantidad de soporte con enzima inmovilizada y sin enzima (controles) indicada en la tabla 8. La decoloración se realizó a temperatura ambiente y sin agitación hasta la total decoloración, monitoreando la disminución de color cada hora usando un espectrofotómetro. Las mezclas de reacción para la enzima libre contenían 2.5 mL de CE, 37.5 mL del buffer correspondiente a cada pH y 10 mL de IC (500 ppm).

Debido a que se ha reportado cambio en la intensidad de color del IC cuando se varía el pH, se utilizaron como controles soluciones de índigo carmín ajustada a los mismos valores de pH indicados.

Tabla 9. Buffers utilizados para la evaluación del efecto del pH en la decoloración de IC

pH	Buffer utilizado
2	Buffer fosfato (0.2 M)
3	
4	
5	Buffer acetatos (0.2 M)
6.1	
7	Buffer fosfato (0.2 M)
8	
9	
10	Buffer carbonatos (0.2 M)
11	
12	KCl – NaOH (0.2 M)

Nota. La concentración de IC se determinó de acuerdo con una curva patrón de IC a diferentes concentraciones (5, 10, 20, 30, 40 ppm, incubado a los pH's mostrados en la tabla 7) medidos a 610 nm, usando como blancos los buffers correspondientes a cada pH, y para el caso de la enzima libre los blancos fueron

una mezcla del CE, con la misma dilución que en el matraz, y los buffer de cada pH.

6.6. Efecto de la temperatura en la decoloración de IC usando los sistemas de inmovilización.

La decoloración se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 mL, y se llevó a cabo a diferentes temperaturas: 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, y 90 °C, pH 6.34, sin agitación, utilizando un baño maría Thermo Scientific . Los matraces contenían la misma cantidad de soporte que se indica en la tabla 8. Las mezclas de reacción de enzima libre contenían 2.5 mL del CE y 40 mL de IC (125 ppm). Como controles se utilizaron soluciones de IC (100 ppm) incubadas a las mismas temperaturas que los soportes con enzimas inmovilizadas activas.

6.7. Determinación de parámetros cinéticos

Para evaluar el efecto de la concentración de sustrato (IC) en la velocidad de decoloración, usando una cantidad de proteína constante (6.4 ± 0.5 g) se prepararon mezclas de reacción en matraces Erlenmeyer de 250 mL, conteniendo 50 mL de una solución de índigo carmín a diferentes concentraciones y a las condiciones de pH y temperatura óptimas para cada soporte, las cuales se muestran en la tabla 5. Los controles fueron muestras de índigo carmín a las mismas condiciones en que se evaluó la velocidad de decoloración mostrado en la tabla 10. Las cantidades de soporte fueron agregadas para obtener una cantidad similar de proteína de acuerdo a la tabla 8. Las concentraciones de IC que se evaluaron fueron elegidas de acuerdo a la velocidad de decoloración de una muestra de IC (100 ppm).

Tabla 10. Concentraciones y condiciones de evaluación de parámetros cinéticos.

Sistema de inmovilización	Cantidad de soporte (g)	pH	Temperatura (° C)	Concentraciones de IC (ppm)
CE	2.465 ± 0.005 mL	4	50	50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000
4	4.000 ± 0.007	5		
1A	3.023 ± 0.010	3	60	50, 100, 200, 400, 600, 750, 800
1B	3.008 ± 0.008	4		
1C	3.000 ± 0.005	4		

2	6.124 ± 0.031	5	50	15, 25, 50, 75, 100, 125, 150
3	6.110 ± 0.040	6		

6.8. Estabilidad de almacenamiento

Los soportes del sistema 1 con enzima inmovilizada fueron almacenados a 4°C y a temperatura ambiente, y se midió la AEL con siringaldazina (6.2.2.) y AEP con rojo fenol (6.2.4). La actividad enzimática (Lac y MnP) fue evaluada cada semana, hasta la pérdida total de actividad. Lo mismo fue evaluado para el sistema 4 pero éste sólo fue almacenado a 4 °C.

6.9. Cromatografía en capa fina de productos de decoloración

Se utilizó como eluyente la siguiente mezcla: 2.5 mL de diclorometano, 250 µL de metanol y una gota de ácido acético glacial. Se colocó el eluyente en la cámara de cromatografía. Los experimentos se hicieron de la siguiente forma: se aplicaron los estándares, isatina (I), isatina sulfonada (IS) y ácido antranílico (AA) y el producto de decoloración correspondiente (PIC) de acuerdo a la tabla 11, en la placa de sílica de 4 x 8 cm. El índigo carmín a diferentes concentraciones 1600, 800, 500 y 200 ppm fue decolorado con el sistema 1C, 4, 2 y 3 respectivamente.

Tabla 11. Muestras aplicadas en la sílica

No. placa	I	IS	AA	PIC 1600 ppm	PIC 800 ppm	PIC 500 ppm	PIC 200 ppm
1	X	X	X	X			
2	X	X	X				X
3	X	X	X			X	
4	X	X	X		X		

Posteriormente, se introdujo la placa y se realizó la cromatografía hasta que ya no se observó cambio. La placa se extrajo de la cámara y se dejó secar en la campana de extracción, luego se observó la placa con una lámpara UV, para marcar las similitudes y calcular los Rf.

6.10. Análisis de fitotoxicidad de los productos de decoloración

Se colocaron 10 semillas de lechuga sobre papel filtro en cada sección de una caja Petri con dos divisiones, el papel filtro se humedeció con 2 mL de la solución a evaluar: productos de decoloración con cada uno de los sistemas de inmovilización (PIC-1A, PIC-1B, PIC-1C, PIC-2, PIC-3, PIC-4 y PIC-5) y la solución de 100 ppm de IC. Como testigo se utilizó agua destilada. Las cajas petri se incubaron a temperatura ambiente durante 4 días (Zucconi, y otros, 1981)..

Se cuantificaron las semillas germinadas diariamente y al 4° día se midió la elongación radicular de las plántulas de lechuga y se calculó el índice de germinación según (Varnero, y otros, 2007), con las siguientes relaciones:

$$PGR = \frac{\text{No. de semillas germinadas en el extracto}}{\text{No. de semillas germinadas en el testigo}} \times 100$$

$$CRR = \frac{\text{elongación de radículas en el extracto}}{\text{elongación de radículas en el testigo}} \times 100$$

$$IG = \frac{PGR \times CRR}{100}$$

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Evaluación de medios de cultivo para producción de enzimas ligninolíticas.

La formulación del medio de cultivo influye en la secreción de enzimas ligninolíticas, tales como la lacasa, que es de especial interés para la decoloración (Lorenzo, y otros, 2006), por tal razón es importante elegir una buena formulación para tener un crecimiento adecuado del hongo y por consiguiente una mayor producción de enzimas ligninolíticas. En la tabla 12 se presentan los resultados obtenidos del análisis de los medios de cultivo.

Tabla 12. Comparación de medios de cultivo para el crecimiento de *Trametes versicolor*.

Medio	AEL (U/L mc)	Proteína (mg/L mc)	AEEL (U/mg proteína)
2	459.2	11.1	41.6
4	<u>4,978.8</u>	<u>32.7</u>	<u>152.0</u>
5	1,112.7	10.5	105.5
7	1,441.7	43.8	32.9
9	529.1	19.1	27.7
11	301.0	26.4	11.2
12	<u>17,484.1</u>	<u>60.32</u>	<u>290.0</u>

AEL (Actividad Enzimática Lacasa), mc (medio de cultivo), AEEL (Actividad Enzimática Específica Lacasa)

De los doce medios formulados no se observó crecimiento en los medios 1, 3, 6, 8 y 10. El mejor medio fue el 12 pues presentó una actividad enzimática específica lacasa (AEEL) para *Trametes versicolor*, de 290 U/mg de proteína, casi el doble de lo que presentó el medio 4, el segundo con mejor AEEL.

En el medio 4, el crecimiento fúngico inició en el quinto día después de la inoculación, sin embargo en el medio 12 el crecimiento fue más lento empezando a crecer en el día 10, pero secretando una mayor cantidad de proteína, presentando una mayor actividad tanto Lac como MnP, como se observa en la figura 16.

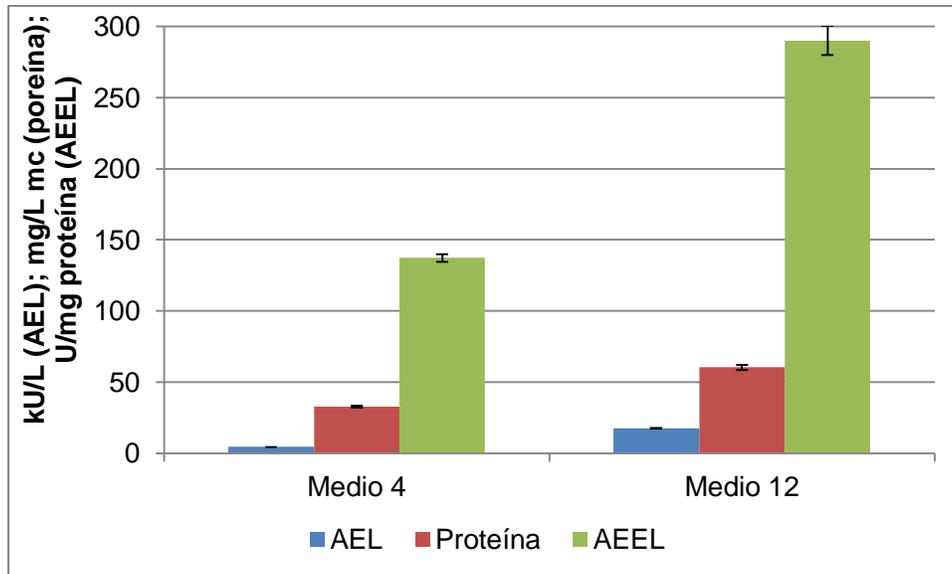


Figura 16. Comparación de medios de cultivo residual con mayor actividad enzimática lacasa al día 20 de incubación.

El medio 12 fue el que se utilizó para la producción de enzimas ligninolíticas para inmovilización. Después de la elección del medio de cultivo que mejor indujo la secreción de enzimas ligninolíticas se procedió a evaluar el día en el cual la actividad enzimática tanto Lac (AEL) como MnP (AEP) fuera máxima, encontrándose en el día 13 (figura 17).

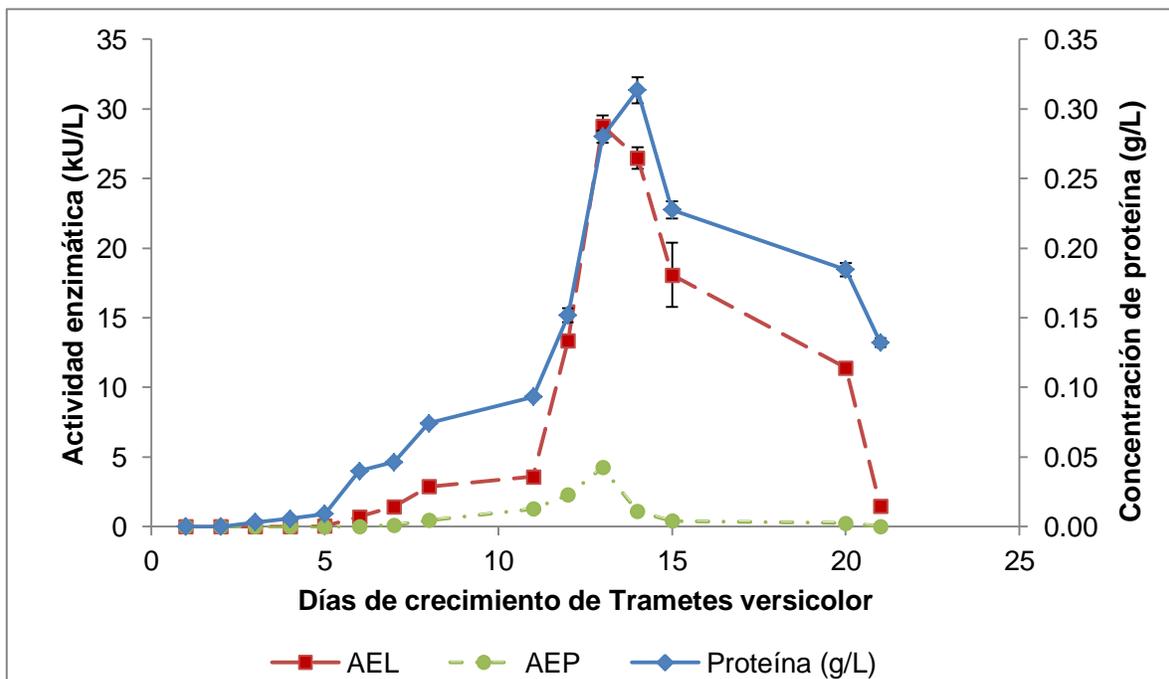


Figura 17. Evaluación del día óptimo de concentración de proteína

En la figura 17 se puede observar que la producción de enzimas incrementó con el tiempo, llegó a un máximo y posteriormente disminuyó, esto fue acorde con los ciclos de vida de los hongos y porque no hubo adición extra de fuente de nutrientes, resultando en la secreción de proteasas, que destruyen las enzimas activas utilizándolas como fuente de nutriente; la mayor cantidad de proteínas se encontró en el día 14. Con esta evaluación se definió el periodo de incubación del hongo para extraer la máxima cantidad de proteínas que presentaran actividad ligninolítica máxima y pasar al proceso de inmovilización.

Después del análisis se decidió que en el día 13 después de la inoculación fue el idóneo para separar el micelio y concentrar las enzimas ligninolíticas del medio de cultivo, y tener una mayor cantidad de éstas y con una buena actividad enzimática.

7.1.1. Concentración y semi-purificación de enzimas extracelulares.

En la figura 18 se graficaron las AEL y AEP, determinadas en el medio 12 antes de la ultrafiltración, así como del CE (C) después de ultrafiltrar el MCR y de los permeados (P) que no se retuvieron en la membrana de 1 kDa.

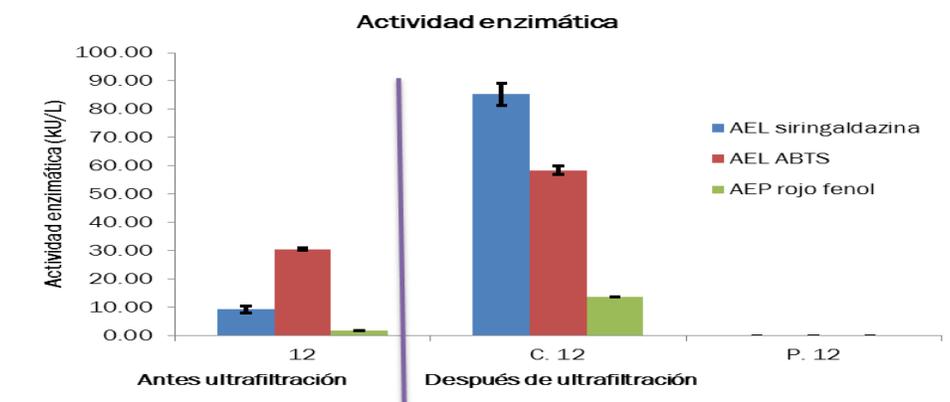


Figura 18. Actividad enzimática Lacasa (AEL) y Mn Peroxidasa (AEP) presentes en el MCR antes y después de ultrafiltración. 12 (medio 12), C.12 (Concentrado enzimático medio 12) y P. 12 (Permeado)

En la figura 18 se ve claramente que en el CE del medio de crecimiento 12 hubo actividad tanto Lac como MnP, y en los permeados fue casi nula. Resultando la ultrafiltración un buen sistema para la concentración de enzimas, como era de

esperarse, pues la enzima Lac tiene un peso molecular de 60-80 kDa (Juárez Rosete, 2008) y la MP de 46 kDa (Hofrichter, 2002).

Con la ultrafiltración la proteína se concentró aproximadamente 8 veces, pasando de una concentración de 0.31 a 2.54 g/L. La AEL medida con ABTS se duplicó, y en la AEL medida con siringaldazina aumentó 8 veces, de 9 a 85 kU/L. En el caso de la AEP también hubo un aumento significativo incrementando de 2 a 14 kU/L, equivalente a 7 veces la inicial. El CE presentó las siguientes características:

- Concentración de proteína de 2.54 ± 0.294 g/L,
- Actividad enzimática específica lacasa (AEEL) de 12.89 ± 1.334 kU/mg proteína.
- Actividad enzimática específica peroxidasa (AEEP) de 5.48 ± 0.620 kU/mg proteína.

7.2. Inmovilización de enzimas extracelulares de *Trametes versicolor*.

En la **tabla 13** se presentan los sistemas de inmovilización evaluados:

Tabla 13. Sistemas de inmovilización con sus principales características.

Sistema	Soporte	Tipo de inmovilización	Observaciones
1A	Sílica amorfa comercial	Covalente vía enlace inmínico	Silanizado con APTES - Agua
1B			Silanizado con APTES - Etanol
1C			Silanizado con APTES - Acetona
2	Sílica formada a partir de TEOS	Enlace covalente vía tioles	
3			
4	Quitosano	Reticulación	
5	Alginato quitosano	Encapsulación	

7.2.1. Sistema de inmovilización 1

El sistema de inmovilización 1 tuvo tres variantes (A, B y C) porque de acuerdo con la literatura se usaron esos disolventes en el paso de silanización, utilizando APTES en agua (Solís Oba, 2005), APTES en etanol (Castro, y otros) y APTES en acetona (Zille, y otros, 2003). Sin embargo este método tiene una importante debilidad asociada con la reactividad que el silicio presenta respecto a los grupos hidroxilos, con los que forma muy fácilmente silanoles. Por tanto, la presencia de agua o alcoholes en el medio de reacción imposibilita su aplicación, ya que los enlaces Si-C- son transformados inmediatamente en Si-OR, liberando la enzima, según la figura 19 (Yiu, y otros, 2005).

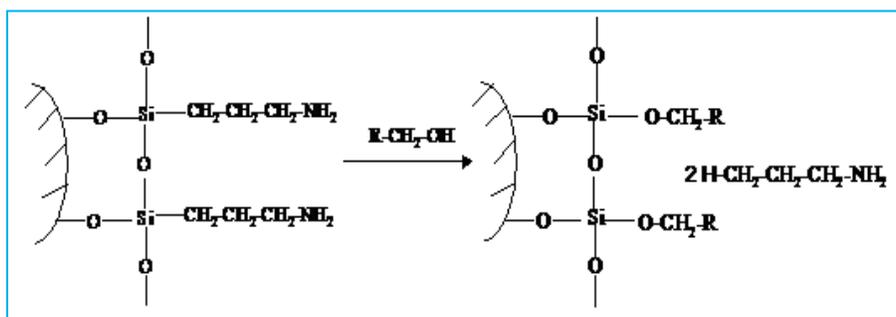


Figura 19. Sustitución electrófila de organosilanos por alcoholes.

De acuerdo con Yiu, y otros, 2005, se esperaría que hubiera un mayor % de proteína inmovilizada para el sistema 1C correspondiente a la silanización de APTES en acetona, pues éste es un disolvente que no tiene reactividad con los grupos terminales OH del soporte, como tienen el agua y el etanol, sin embargo no fue así, pues de acuerdo con un análisis de varianza no se encontró diferencia significativa con un $\alpha = 0.05$, en el porcentaje de proteína inmovilizada ($p = 0.393$), usando los 3 disolventes (figura 20).

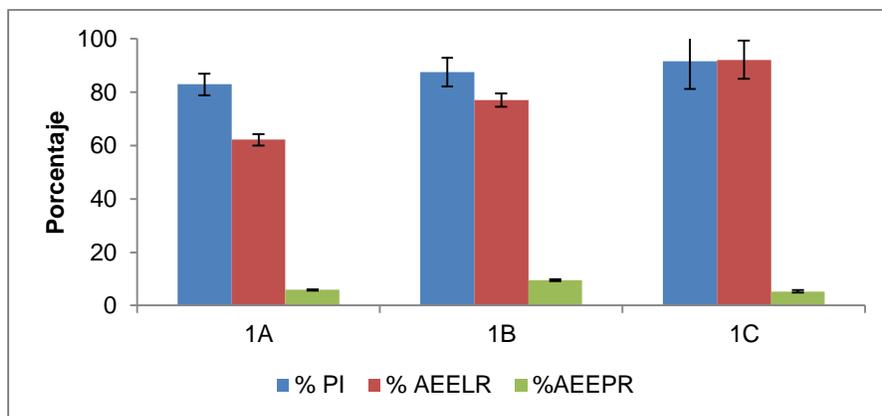


Figura 20. Comparación % proteína inmovilizada (PI), % Actividad enzimática lacasa retenida (AEELR) y % actividad enzimática Mn peroxidasa retenida (AEEPR) presente en las variantes del sistema 1.

En cuanto al % de actividad enzimática retenida Lac, si se encontró diferencia significativa con un ANOVA con $\alpha = 0.05$ ($P = 0.000603$), dando como resultado que el que mayor actividad lacasa mantuvo fue el sistema 1C (figura 20), en el cual se utilizó un disolvente que no interfiere en la reacción de silanización (Yiu, y otros, 2005). Para el caso de la actividad MnP también se encontró diferencia significativa con el mismo nivel de confianza ($P = 1.58 \times 10^{-5}$), siendo el sistema 1B el que mostró el mayor % de AEEP retenida (figura 20).

7.2.2. Comparación de sistemas de inmovilización

El complejo formado por la enzima-soporte fue evaluado por 4 principales parámetros: la cantidad de proteína unida, actividad enzimática, actividad específica de la enzima inmovilizada y la estabilidad de almacenaje (Bryjak, y otros, 2007), lo cual dependerá del soporte utilizado, las condiciones de inmovilización, el origen de las enzimas y la actividad inicial de éstas (Brady, y otros, 2009). La determinación de actividad lacasa en los soportes con enzima inmovilizada y CE fue con siringaldazina y la actividad Mn peroxidasa fue con rojo fenol.

En la tabla 14 se muestran 3 de los 4 parámetros evaluados para los sistemas de inmovilización, se encontró diferencia significativa con una $\alpha=0.05$, se observa que el sistema 1C retuvo la mayor cantidad de proteína (2.42 ± 0.022 mg/g soporte), la mayor AEL (28.56 ± 1.315 kU/g soporte), y AEEL (11.83 ± 0.631

kU/mg proteína), aunque no así para AEP y AEEP, siendo el sistema 1B con los mejores resultados para peroxidasa retenida (1.04 ± 0.061 kU/g soporte) y AEEP (0.52 ± 0.062 kU /mg proteína). Lo cual indica que hubo una diferenciación en las enzimas que se inmovilizaron según el soporte utilizado y para el caso del sistema 1 dependiendo del disolvente usado.

Es preferible que el sistema posea mayor AEEL que AEEP porque la enzima lacasa es más estable que la enzima Mn peroxidasa, a pesar de que la enzima peroxidasa tenga mayor potencial redox, ésta tiene una baja estabilidad, dando como resultado un menor número de usos de éste sistema.

Tabla 14. Características que mostraron los sistemas de inmovilización.

Sistema	Proteína (mg/g soporte)	AEL (kU/g soporte)	AEP (kU/g soporte)	AEEL (kU/mg proteína)	AEEP (kU/mg proteína)
1A	$2.12^a \pm 0.145$	$16.90^a \pm 0.907$	$0.68^a \pm 0.046$	$8.02^a \pm 0.899$	$0.32^a \pm 0.045$
1B	$2.01^a \pm 0.117$	$19.90^a \pm 0.199$	1.04 ± 0.061	$9.92^{a,b} \pm 0.689$	0.52 ± 0.062
1C	$2.42^a \pm 0.022$	28.56 ± 1.315	$0.69^a \pm 0.012$	$11.83^b \pm 0.631$	$0.29^{a,b} \pm 0.007$
2	$0.98^b \pm 0.061$	$9.04^b \pm 1.268$	0.19 ± 0.031	$9.25^{a,b} \pm 1.771$	$0.20^b \pm 0.038$
3	$1.00^b \pm 0.077$	$8.31^b \pm 0.525$	$0.03^b \pm 0.002$	$8.34^a \pm 1.114$	$0.03^c \pm 0.005$
4	$1.65^c \pm 0.092$	13.08 ± 0.068	$0.10^b \pm 0.006$	$7.93^a \pm 0.470$	$0.06^c \pm 0.006$
5	$1.47^c \pm 0.173$	$9.53^b \pm 0.021$	$0.04^b \pm 0.007$	$6.54^a \pm 0.803$	$0.03^c \pm 0.006$

Celdas sombreadas de rojo mejores resultados para lacasa y celdas sombreadas de amarillo mejores resultados para Mn peroxidasa. Los superíndices indican la similitud que hay entre los sistemas de inmovilización de acuerdo a una prueba de Tukey con un $\alpha = 0.05$.

Los resultados obtenidos para la cantidad de enzima inmovilizada por gramo de soporte fueron muy bajos en comparación con los reportados por otros autores (tabla 15), esto puede ser porque se usó un concentrado enzimático más no una enzima pura o con alto grado de pureza como en los casos citados en la tabla 15, y aunque tenía una buena concentración de enzima para ser un extracto enzimático (Lorenzo, y otros, 2006), la cantidad de enzimas es mucho menor que si se parte de una preparación de enzima pura, con concentraciones de enzimas de 4.7 g/L como en el caso de Rodríguez, y otros, 2007.

Tabla 15. Reportes de inmovilización de lacasa en varios soportes

Soporte	Proteína inmovilizada (mg/g soporte)	AEELR (%)	Referencia
Nanopartículas magnéticas de sílica porosa.	72.6	81.5	(Wang, y otros, 2010)
Nanopartículas magnéticas de sílica porosa. Con grupos iminodacetato + Cu ²⁺	98.1	92.5	(Wang, y otros, 2010)
Esferas de poli (GMA/EDGMA)	4.9	88	(Arica, y otros, 2009)
Quitosano	20	52	(Zhang, y otros, 2009)
Oro nanoporoso	16	NR	(Qiu, y otros, 2009)
Espuma de sílica mesoestructurada	NR	69	(Rekuć, y otros, 2009)
Celite R-633	NR	62	(Cabana, y otros, 2009)
Películas Poli (HEMA-g-GMA) – NH ₂	NR	71	(Bayramoglu, y otros, 2009)
Sepabeads EC-EP3	32.6	NR	(Kunamneni, y otros, 2008)
Soporte a base de celulosa	NR	17	(Rekuć, y otros, 2008)
Granocel, microesferas poliméricas magnéticas	94.1	68	(Wang, y otros, 2008)
Esferas magnéticas de sílica mesoporosa	82	79	(Zhu, y otros, 2007)
Quitosano-epiclorhidrina	16.3	82.6	(Bayramoglu, y otros, 2010)
Al ₂ O ₃	5.6	14-66	(Rodríguez Couto, y otros, 2007)
Sílica amorfa comercial	2.42	92.16	Presente trabajo

NR: No reportado

A pesar de ser importantes los parámetros mencionados en la tabla 14 no siempre son reportados en los artículos por otros investigadores, los cuales se enfocan más a los objetivos del trabajo que muchas veces es que la enzima inmovilizada realmente decolore o transforme determinado sustrato, no reportando así todos estos parámetros, los mayormente reportados son proteína inmovilizada (tabla 14) y % actividad retenida (figuras 20 y 21).

Se realizó un análisis de varianza con un $\alpha = 0.05$ encontrándose diferencia significativa en el % de proteína inmovilizada (PI) en los sistemas 2 – 5 ($P = 0.00098$), siendo el sistema 3 el que presentó mayor % PI (figura 21), con 39.2 %, este valor es bajo comparado con los obtenidos para el sistema 1 (figura 20); a pesar de utilizar el mismo soporte para inmovilizar, el sistema 3 fue tratado de manera diferente, mientras que en el sistema 1 se confinó el conjunto de enzimas orientándolas a formar un enlace covalente inmínico entre el grupo carboxilo del glutaraldehído y el grupo amino de los aminoácidos terminales de las proteínas; en el sistema 3 se orientó a formar enlaces covalentes de tipo tiol entre los grupos SH del soporte y los de la enzima; es bien conocido que las enzimas ligninolíticas de *Tv.* tienen un bajo contenido de grupos SH (Piontek, y otros, 2002), (Kim, y otros, 2005) no favoreciendo este tipo de inmovilización (sistema 3), y al contener un alto contenido de NH_2 se pudo haber formado un enlace de tipo peptídico (Piontek, y otros, 2002).

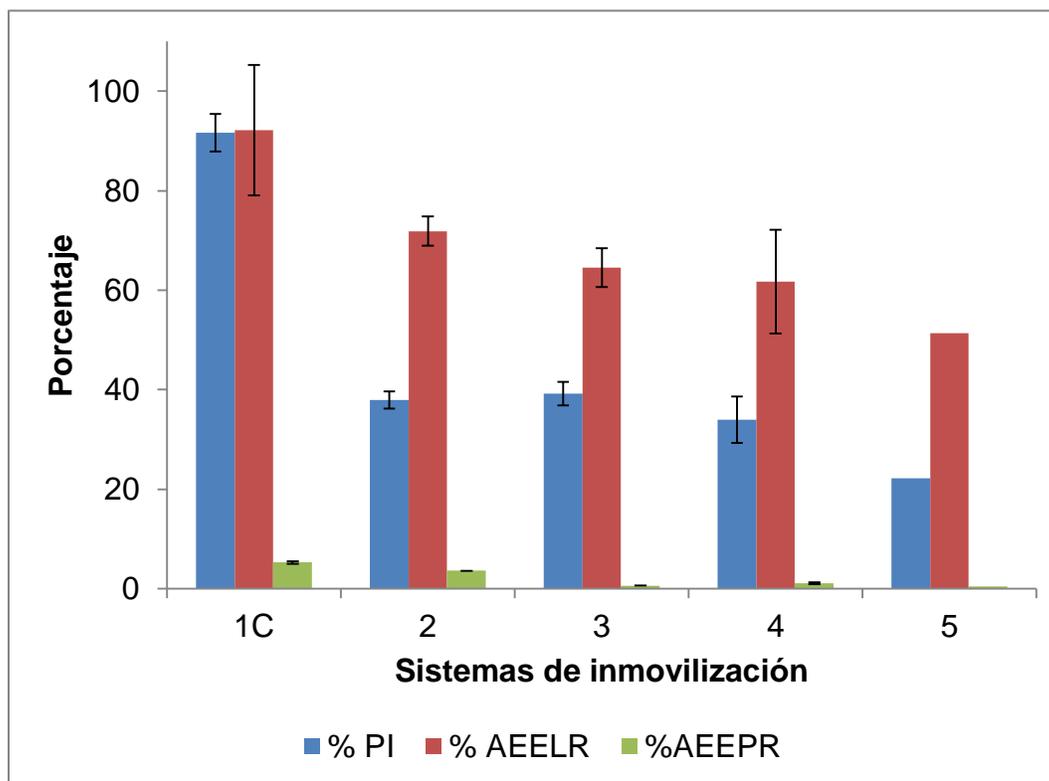


Figura 21. Comparación de sistemas de inmovilización 2 al 5. Porcentaje de proteína inmovilizada (% PI), % actividad enzimática específica lacasa retenida (% AEELR) y % actividad enzimática específica peroxidasa retenida (% AEEPR).

El sistema 2 basado en la inmovilización de una enzima a un compuesto inorgánico organosilanizado con APTES y funcionalizado con glutaraldehído, retuvo 37.9 % PI, menos de la mitad de la proteína inmovilizada en el sistema 1, esto principalmente se puede deber al origen de la sílica, puesto que fue sintetizado en medio ácido, el cual hay un mayor número de siloxanos unidos al átomo central de silicio, formando una red polimérica débilmente ramificada (Jal, y otros, 2004), esto puede impedir la interacción que tiene el APTES con la sílica, afectando por consiguiente la cantidad de enzima inmovilizada, además de que en la inmovilización en sílica también depende del tamaño de partícula y la porosidad de tales partículas (Ispas, y otros, 2009).

El sistema 1 y 4 comparten el mismo propósito, inmovilizar las enzimas por unión covalente con un enlace inmínico entre el grupo CO⁻ del glutaraldehído con grupos amino de los aminoácidos, sólo se cambió el soporte de uno de origen inorgánico (sílica) a uno de origen orgánico (quitosano), motivo por el cual se esperaba obtener un resultado similar en estos dos sistemas, sin embargo no fue así, pues en el sistema 4 se cuantificó 34 % PI, cerca de la 3^a parte de lo que se inmovilizó en el sistema 1, esto probablemente es debido a la cantidad de grupos aminos que tenía el quitosano, ya que este parámetro es muy importante para este tipo de inmovilización (Bayramoglu, y otros, 2010), el cual no fue cuantificado y quizá el quitosano no contaba con la cantidad necesaria para interactuar con las moléculas de glutaraldehído y que éste se uniera y posteriormente reaccionar con las enzimas

El sistema 5 mostró un %PI muy bajo (22.2 %) lo que puede ser debido a los lavados realizados durante el proceso de inmovilización y al tratarse de un método físico es muy fácil perder las proteínas al lavar el soporte, puesto que al utilizar gelificación iónica con partículas de gran tamaño es probable que las moléculas de enzima contenidas en el centro de la esfera se encuentren en solución acuosa y puedan migrar a través de la pared de la esfera (Martín Villena, y otros, 2009). Lu, y otros, 2007, encontraron un 46.93 % de proteína inmovilizada utilizando el método de gelificación por emulsión interna formando micropartículas

que retuvieron mayor cantidad de enzimas que la obtenida en el sistema 5 de este estudio.

Comparando todos los sistemas, el SIE 1 fue significativamente diferente con respecto a los sistema 2-5. No obstante, no se encontró diferencia significativa en el porcentaje de AEELR, para los sistemas 2-5, realizando un ANOVA con un nivel de confianza de 0.05 ($P = 0.1039$). El sistema 2 mantuvo una buena actividad enzimática específica lacasa (71.1 %), ésta de acuerdo con una prueba de Tukey es igual que la cuantificada con los sistemas 1B y 1C, los que en general tuvieron el mayor % AEELR (77 y 92 % respectivamente). Los sistemas 1A, 3, 4 y 5 mostraron un %AEELR similar entre ellos de acuerdo con la prueba de Tukey.

Varias publicaciones han reportado el uso de varios soportes para la inmovilización (tabla 15) en éstas publicaciones se mencionan diferentes porcentajes de actividad, los valores obtenidos en este proyecto entran dentro de ese rango, de 50-90% (figuras 21 y 22); el sistema de inmovilización con mayor actividad lacasa retenida fue el 1C (figura 20), con $91 \pm 4\%$, valor muy parecido al reportado por Wang (Wang, y otros, 2010). Por otro lado Durán (Durán, y otros, 2002) menciona que al utilizar soportes que tenían como base vidrio activado con APTES y funcionalizado con glutaraldehído se obtuvo el 90% de AEELR, valor muy semejante para el sistema 1C, no así para el 1A, 1B y 2, que se prepararon con el mismo tipo de inmovilización, esto puede ser debido a que se utilizó diferente disolvente para el paso de la silanización, y para el sistema 2 fue el mismo que para el 1C, pero se partió de una sílica sintetizada a partir de TEOS en medio ácido, mientras que para el sistema 1 fue sílica amorfa comercial, de la cual no se saben las condiciones en las que fue sintetizada.

Hubo diferencia significativa en el porcentaje de actividad enzimática específica peroxidasa cuantificado en los sistemas 1-5 ($\alpha = 0.05$, $P = 2.38 \times 10^{-8}$). En la figura 21 se puede observar que los valores obtenidos para este trabajo con respecto a la MnP fueron muy bajos comparados con los reportados, lo cual puede ser porque *Trametes versicolor*, produce mayor cantidad de enzima lacasa que

peroxidasa (Champagne, y otros, 2005) y a que se partió de un concentrado enzimático.

En lo que se refiere a la manganeso peroxidasa fúngica, no se han realizado muchas investigaciones de la inmovilización de ésta. Mielgo, y otros, 2003, utilizaron geles de agarosa funcionalizados con glutaraldehído para inmovilizar la MnP tanto covalentemente y por adsorción obteniendo 100 % y < 5% de actividad retenida respectivamente, con una MnP proveniente de *P. chrysosporium*. Por otra parte Van Aken, y otros, 2000 confinaron la MnP de *Aspergillus niger* en sílica porosa con poro controlado funcionalizado con APTES-glutaraldehído obteniendo soportes con 1.59 mg proteína por gramo de soporte con una actividad MnP retenida de 70 %.

7.3. Pruebas de decoloración

Se siguió la cinética de decoloración del IC con cada sistema de inmovilización y con el CE (control positivo) hasta que ya no fuera visible el color, como controles negativos se utilizó soporte sin enzima y soporte con enzima desnaturalizada (tabla 8), esto para evaluar si había adsorción de IC en el soporte, puesto que algunos autores que han estudiado la decoloración de diversos tintes con lacasas y/o MnP inmovilizadas atribuyen la remoción de colorante al soporte y no a la acción enzimática (Champagne, 2009). En la figura 22 se observa que sí hubo adsorción por parte del soporte. El soporte utilizado para el sistema 1A fue el que mostró mayor porcentaje de adsorción de IC tanto sin enzima como con enzima inmovilizada desnaturalizada (5 y 6 % respectivamente), el soporte que menos IC adsorbió fue que se uso para el sistema 3 (figura 22). La adsorción fue evaluada en el mismo tiempo en que la decoloración fue total con los sistemas de inmovilización.

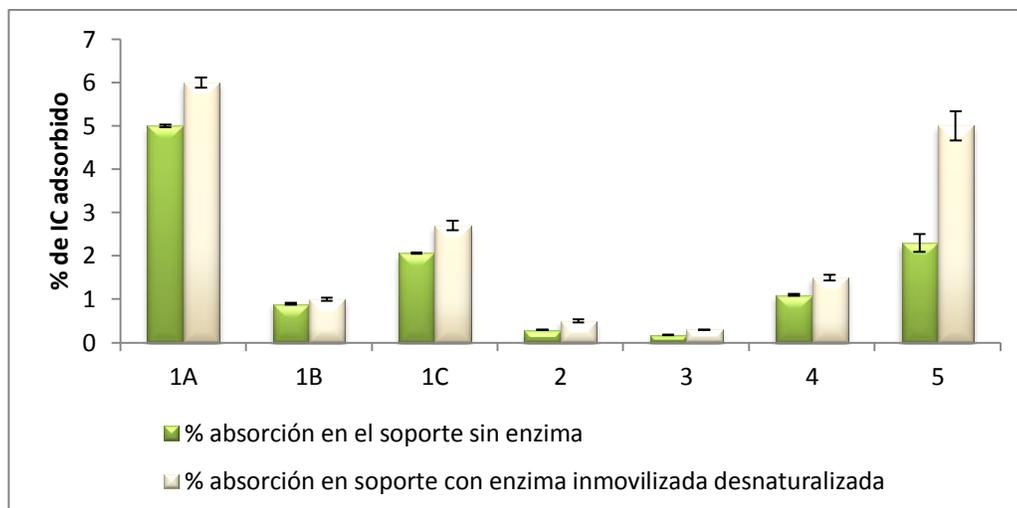


Figura 22. Porcentaje de IC adsorbido por los soportes utilizados en los diferentes sistemas de inmovilización enzimática.

Es importante señalar que la adsorción por parte de los soportes es favorable cuando es relativamente pequeña (<10 %), ya que si no hay adsorción en el soporte, el sustrato no podría llegar al sitio activo de las enzimas y la reacción no se llevaría a cabo (Champagne, 2009), en este estudio los valores se encuentran en este rango permitido.

La adsorción depende del tiempo en que estén en contacto el soporte y el colorante, al igual que la acción de la enzima, razón por la cual se midió la concentración de IC que tenían los controles con enzima inmovilizada desnaturalizada en el mismo intervalo de tiempo en el que se midió para los sistemas con enzima inmovilizada.

Otro factor importante observado es que al dejar por tiempos prolongados (>30 h) el IC se degrada por acción de la luz, para esto se usó IC a la misma concentración que en las muestras de estudio pero sin soporte y sin enzima, y se midió la concentración de colorante presente en el mismo intervalo de tiempo que en las muestras de estudio.

Para la obtención de los datos de v_0 se hizo un ajuste restando la cantidad de IC adsorbido por el soporte con enzima desnaturalizada y el que fue afectado por la acción de la luz. Cabe señalar que al final de la decoloración total el soporte no mostraba color, en la figura 23 se puede observar algunos soportes que

muestran la misma tonalidad que antes de que se pusieran en contacto con el IC, sistema 1A, 1B, 1C, 4 y 5.

En la figura 23 se muestran las imágenes de la decoloración de IC con cada uno de los sistemas de inmovilización y para el CE, en esta figura se puede observar que no necesariamente se obtiene una solución incolora, como en el caso de los sistemas 1 y 4; las tonalidades sugieren que la inmovilización de las diferentes enzimas ligninolíticas de *Tv.* no fue en la misma proporción en todos los sistemas, por la cual la remoción de IC no se lleva a cabo de la misma forma, dando posiblemente diferentes productos, lo cual está relacionado con las figuras 20 y 21.

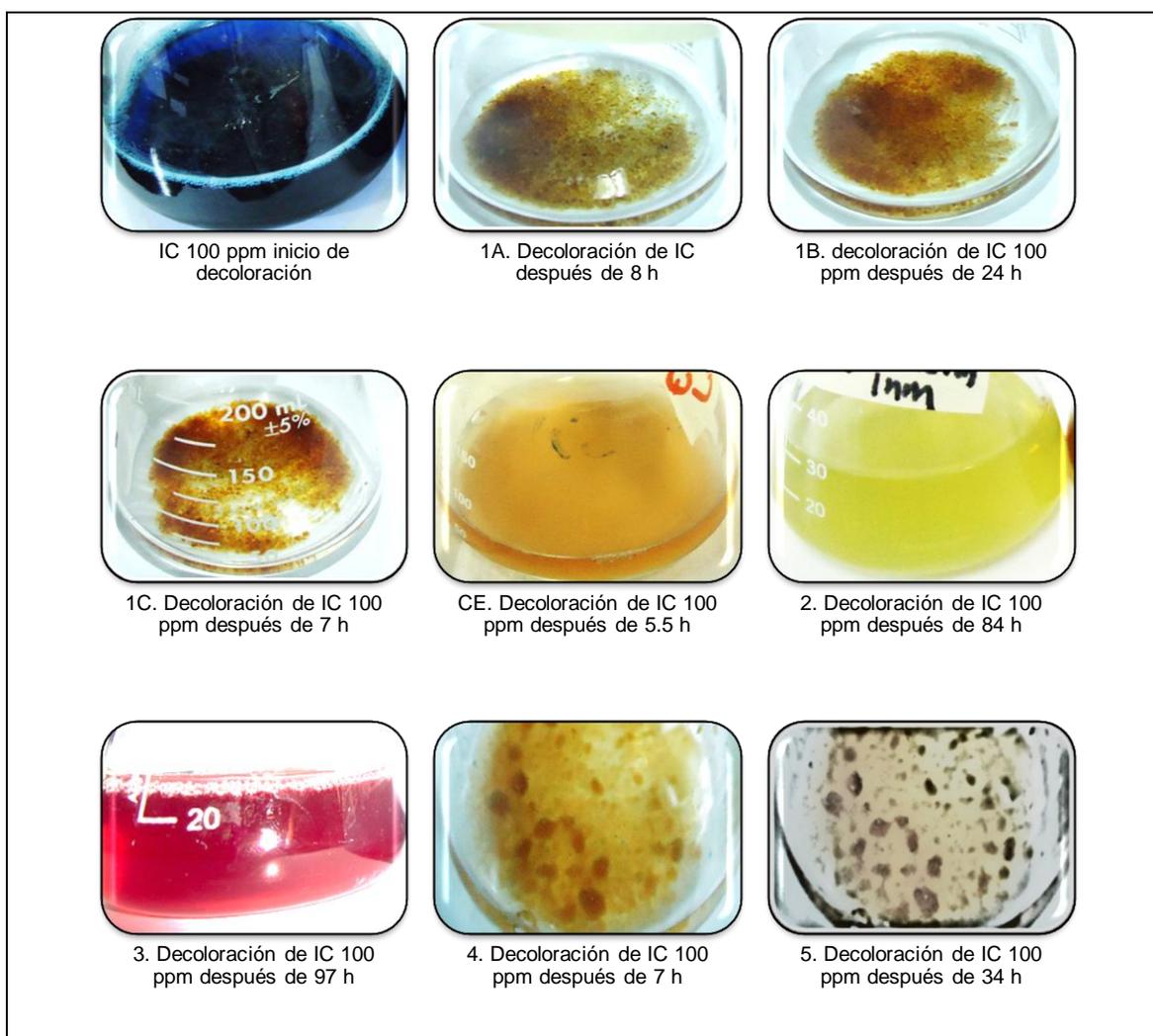


Figura 23. Productos de decoloración de IC 100 ppm con los diferentes sistemas de inmovilización y para el CE.

En la figura 24 se muestra el perfil de decoloración que siguieron los sistemas de inmovilización; los sistemas que presentaron un menor tiempo de decoloración fueron el sistema 1A, 1C y 4, decolorando en 7, 6.3 y 6.7 h respectivamente, 1 ± 0.354 h mayor que el presentado por el CE (5.7 h), resultados similares fueron reportados por otros investigadores (Rekuć, y otros, 2009). Rekuć, y otros, 2009, utilizaron lacasa de *Cerreña unicolor*, inmovilizada en un soporte de sílica activada con varios silanos-glutaraldehído, para decolorar índigo carmín (concentración no mencionada) y se decoloró el 78 – 85 % del colorante en 5h.

Los sistemas 2, 3 y 5 tuvieron una velocidad de decoloración baja (tabla 16) comparado con la del CE y los demás sistemas, decolorando en 1-4 días, esto las hace vulnerables (Matto, y otros, 2009) y poco factibles para su utilización en aplicaciones industriales (Wesenberg, 2003) porque mientras con los otros sistemas se llevaron a cabo entre 3 y 4 ciclos de decoloración en estos fue sólo 1.

Tabla 16. Velocidades iniciales (v_0) y tiempo de decoloración de índigo carmín (100 ppm) que presentaron los sistemas de inmovilización y el CE a 30 °C y pH 6.34.

Sistema de inmovilización	v_0 ($\mu\text{M}/\text{min}$)	Tiempo de decoloración total IC 100 ppm (h)
1A	6.305	7
1B	0.907	24
1C	1.293	6.3
2	0.148	84
3	0.138	97
4	0.807	6.7
5	0.242	34
CE	1.212	5.7

En la figura 25 se observa el cambio de concentración de IC con los métodos de inmovilización 1A, 1B, 1C y 4, mismos que tuvieron un tiempo de decoloración del mismo orden de magnitud que el del CE, se ve que mientras el sistema 1A degradó al índigo carmín hasta tener 20 μM de colorante en un tiempo relativamente rápido (0.5 h), la posterior decoloración fue muy lenta necesitando hasta 7h para la total decoloración. El sistema 1C a pesar de ser más lento que el 1A al principio de la reacción degradando el IC hasta una concentración de 18 μM en 3h 10 minutos y requirió de un tiempo total de decoloración menor (tabla 16).

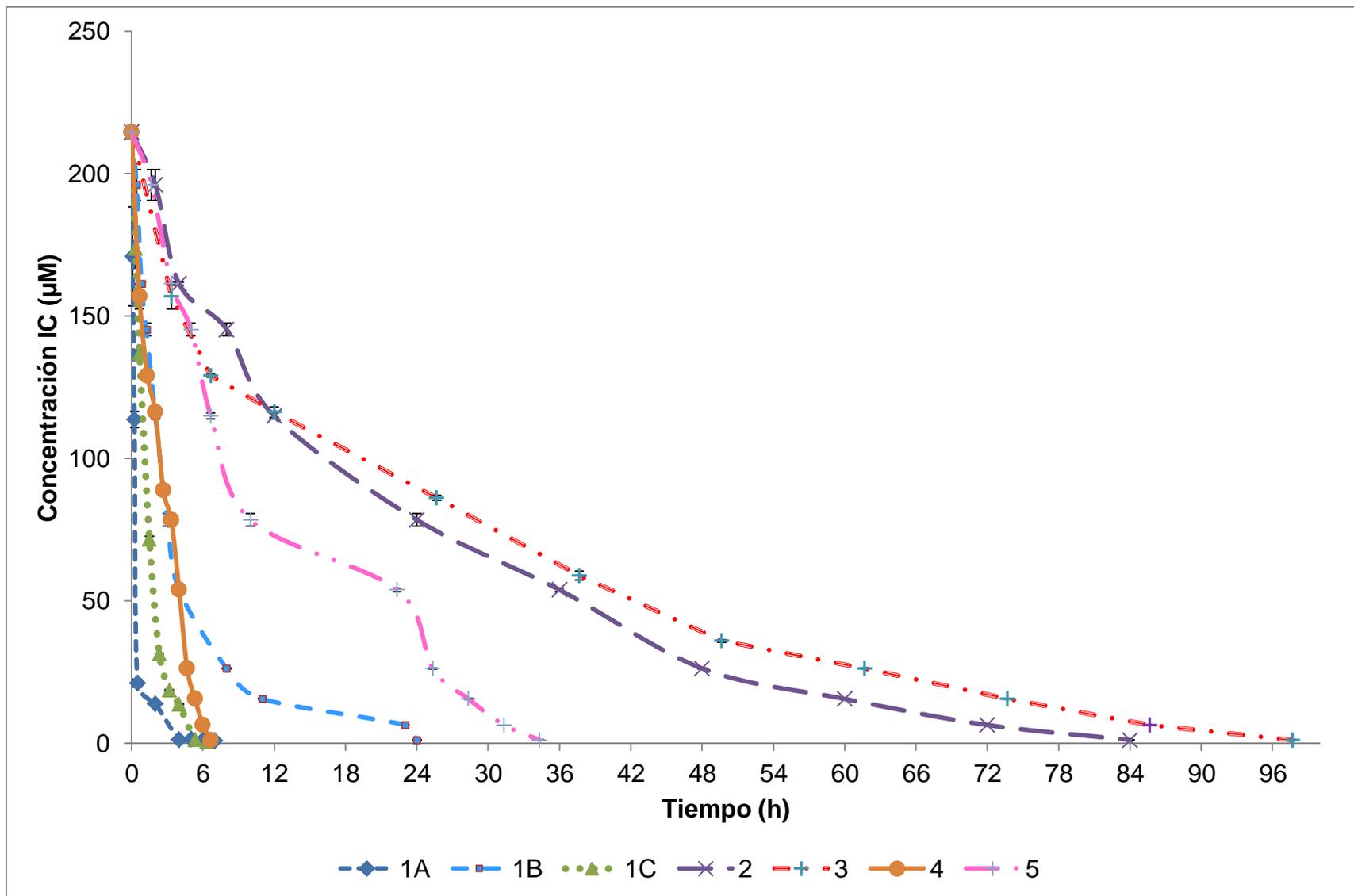


Figura 24. Cinética de decoloración de IC 100 ppm

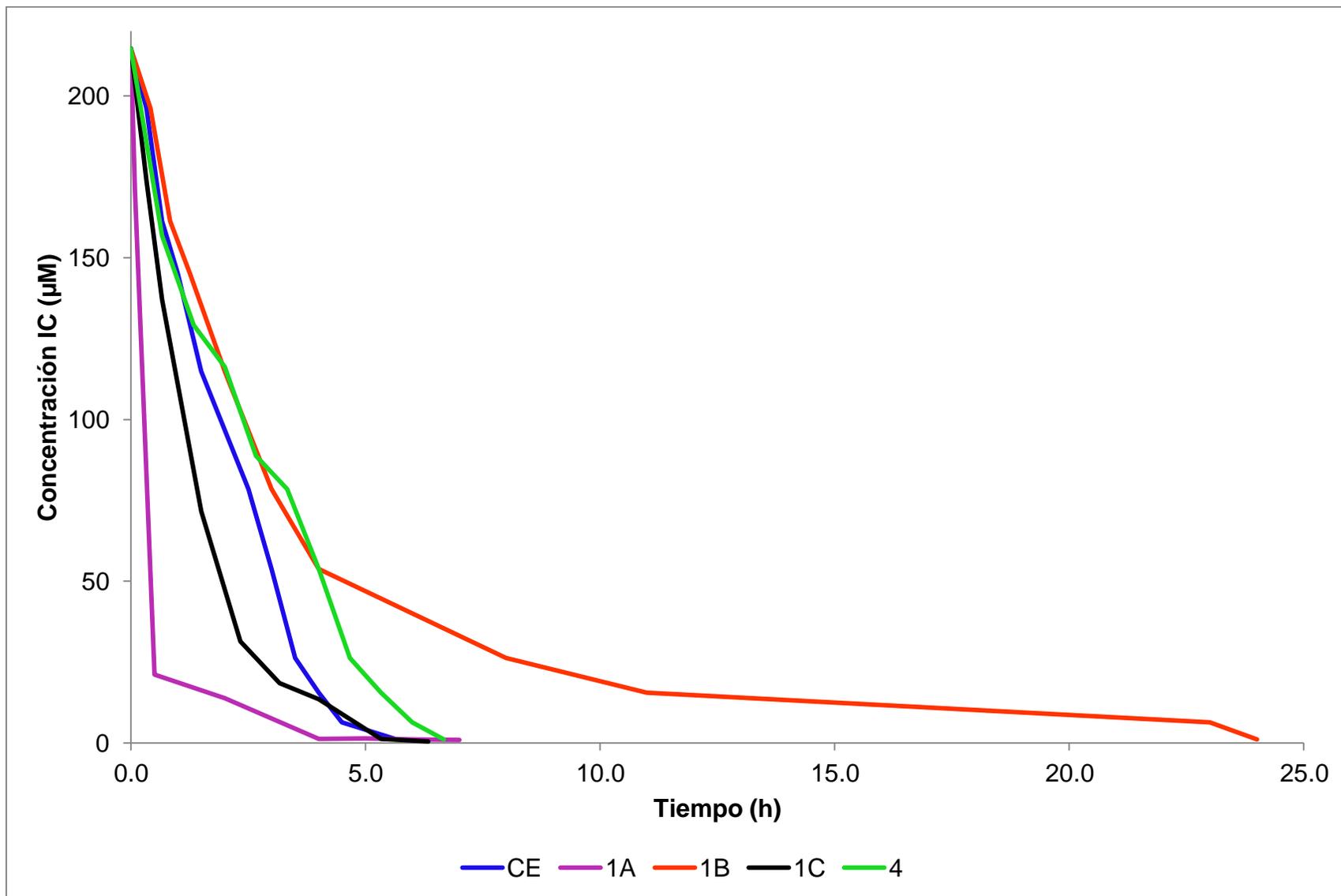


Figura 25. Cinética de decoloración de sistemas de inmovilización 1 y 4 comparados con el CE.

El sistema 1B mostró un tiempo de decoloración muy alto (24 h) en comparación con la enzima libre y los sistemas 1A, 1C y 4, lo que probablemente esté relacionado a que el soporte tiene una adsorción baja y por lo tanto la difusión del IC hasta el sitio activo es más lenta, algo parecido sucedió para los sistemas 2 y 3.

7.4. Ciclos de uso para decoloración

El principal propósito por el que se lleva a cabo una inmovilización enzimática es para que el proceso sea rentable y entre más larga sea la vida media del sistema de inmovilización mayor será la posibilidad de aplicar el proceso de decoloración a un efluente industrial. Para evaluar la estabilidad de la enzima se cuantificaron los ciclos de reacción en los cuales la enzima todavía posee la habilidad de decolorar el índigo carmín en el lapso de 4 meses.

En la figura 26 se observa cómo fue aumentando el tiempo requerido para la decoloración total para todos los sistemas de inmovilización al usarlos en diferentes ciclos, el sistema 3, con 7 ciclos de uso en el lapso de 4 meses fue el que más tardó en remover el colorante, 97 h en el primer ciclo y 178.5 h en el último ciclo, esto podría sugerir que no se llevó a cabo la inmovilización de tipo covalente por medio de grupos tioles, puesto que perdió actividad con el uso (figura 27). El sistema 2 mostró 6 ciclos de decoloración. El sistema 5 fue el que menos ciclos de uso tuvo, decolorando sólo 2 veces, se considera que fue un mal biocatalizador puesto que no cumplió con el objetivo de la inmovilización, reutilizar la enzima.

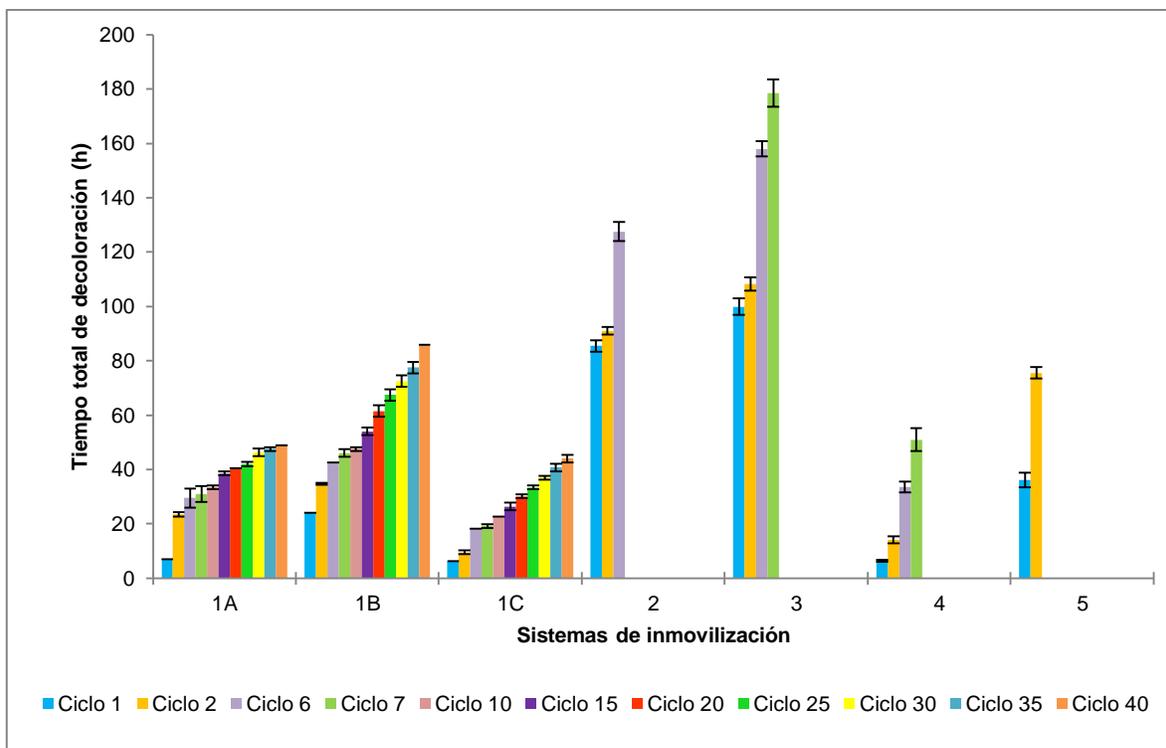


Figura 26. Ciclos de uso de decoloración de IC 100 ppm en el lapso de 4 meses.

En la figura 27 se observan las velocidades de decoloración evaluadas durante 4 meses para todos los sistemas de inmovilización: el sistema que menos cambio presentó en las velocidades de decoloración durante los distintos ciclos de uso fue el sistema 1B (figura 27), a pesar de que no fue el más rápido en decolorar en el primer ciclo, fue el que mayor % de velocidad promedio presentó en el ciclo 40, mostrando un 23% de la velocidad en el ciclo 1.

Los sistemas 1A y 1C mostraron el mismo perfil de variación en la velocidad en los diferentes ciclos de uso, sin embargo el que presentó mayor velocidad fue el 1C, puesto que este llegó a decolorar hasta 45 ciclos de uso en 4 meses y con el sistema 1A se completaron 41 ciclos.

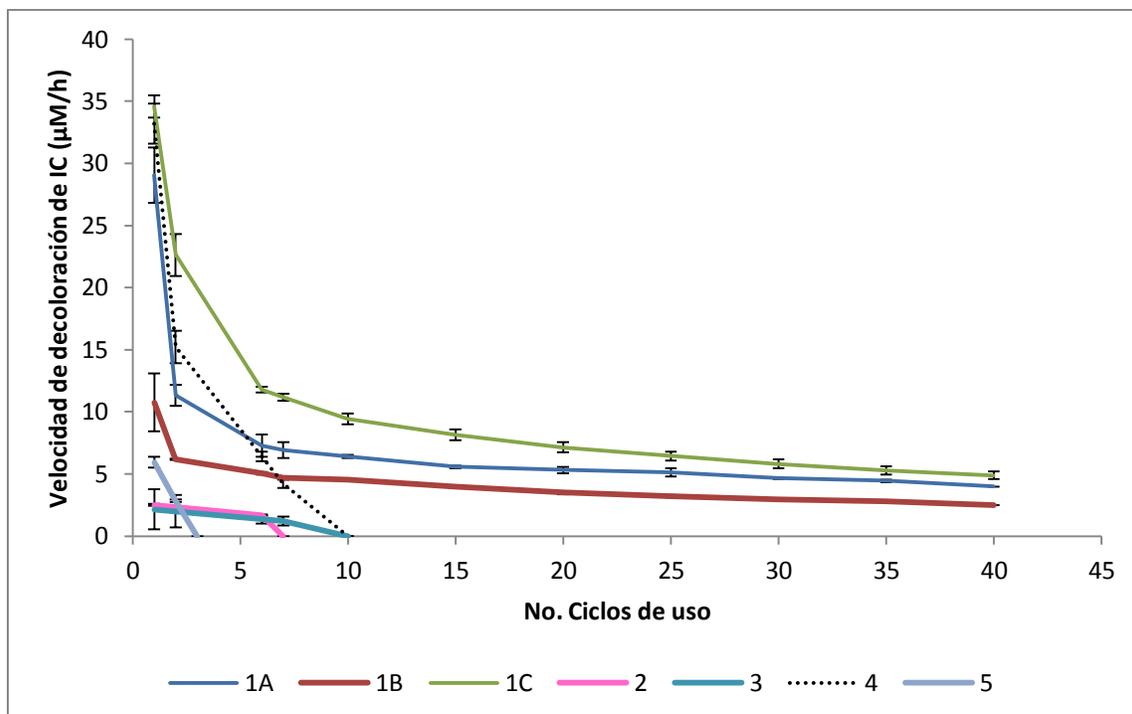


Figura 27. Velocidad promedio de decoloración de IC 100 ppm, en los diferentes ciclos de uso evaluados en 4 meses.

El sistema 4 fue el que presentó la mayor pérdida de velocidad con pocos ciclos de uso, 7 ciclos, siendo un método de reticulación se esperaba que tuviera una mayor estabilidad (Bayramoglu, y otros, 2010), sin embargo no fue así, probablemente porque el quitosano no tenía la cantidad de grupos amino adecuada, pues la cantidad de grupos aminos que tenga el quitosano y el tamaño de partícula del precipitado obtenido influyen en la cantidad de enzima que se une al soporte y el tipo de enlace que se llevará a cabo (Brady, y otros, 2009).

El CE mostró 5 ciclos de uso y sólo tuvo una pérdida del 30 % de su velocidad de decoloración en el primer ciclo, sin embargo ésta no se puede separar del producto y evitando su fácil manejo, pues al ir agregando colorante el volumen va aumentando, razón por la cual no es viable para la aplicación industrial (Elnashar, 2010).

En este trabajo se obtuvo un número mayor de ciclos de uso, utilizando el índigo carmín que es el colorante más ampliamente usado para la industria de la mezclilla, consiguiendo decolorarlo en promedio 40 ciclos, en 4 meses, con los sistemas de inmovilización del sistema 1.

En la literatura se ha reportado que una lacasa de *Trametes hirsuta* inmovilizada en Al_2O_3 , presentó 14% de actividad retenida oxidando ABTS al finalizar 28 lotes de reacción (Rodríguez Couto, y otros, 2007); Arica (Arica, y otros, 2009) menciona que realizó la decoloración de rojo reactivo 120 por 6 ciclos utilizando el mismo lote de enzima; Wang (Wang, y otros, 2010) reporta 10 reusos con una actividad retenida de 86.6 %. Kandelbauer (Kandelbauer, y otros, 2004) inmovilizó lacasa de *Trametes hirsuta* en alúmina, con doble capa de silanos y funcionalizada con glutaraldehído y la usó en un reactor por lote utilizándola al menos 20 ciclos, sin mostrar reducción en su velocidad de decoloración.

7.5. Efecto del pH en la decoloración del IC usando los sistemas de inmovilización.

Con el fin de ser eficaz como un catalizador en aplicaciones que involucran la conversión de un sustrato objetivo, las enzimas inmovilizadas deben ser estables bajo diversas condiciones ambientales tales como el pH (Cardinal-Watkins, y otros, 2011).

El efecto de pH sobre la velocidad de decoloración de índigo carmín (IC) del conjunto de enzimas libres y para las enzimas inmovilizadas en los diferentes sistemas se muestran en las figuras 28 y 29, se puede observar que se logró ampliar el rango de pH en el cual decoloran las enzimas inmovilizadas en los sistemas 1A y 1C con respecto a la enzima libre (figura 28), decolorando en todos los valores de pH analizados (2-12), aunque la enzima libre mostró una mayor actividad a pH 4, ésta ya no se puede reutilizar para posteriores decoloraciones, puesto que se desnaturaliza en valores de pH igual o menores a 2 e igual o mayores a 6 y la enzima inmovilizada en el sistema 1 no perdió una apreciable de actividad en los 3 ciclos de uso en el que se probó variando el pH en un rango de 3-9, la disminución de su velocidad de decoloración con los sistemas 1A, 1B y 1C fue de 40, 38 y 30 % respectivamente.

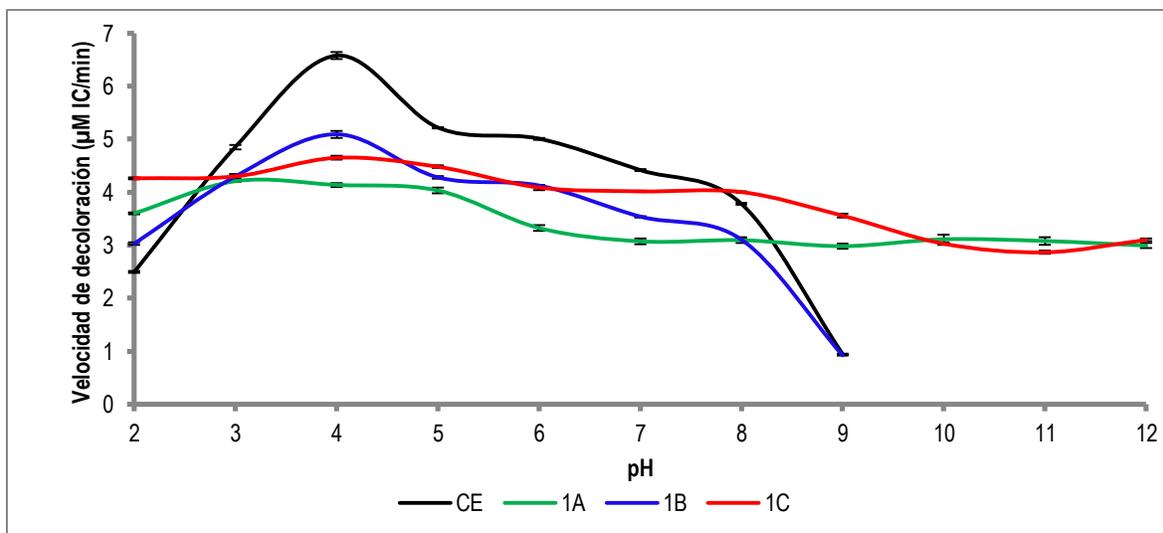


Figura 28. Efecto del pH sobre la velocidad de decoloración de IC con el sistema 1 y la enzima libre (CE).

El pH óptimo presentado por las enzimas libres extracelulares de *Trametes versicolor* y las inmovilizadas en los diferentes soportes fue ligeramente ácido (tabla 17), en general la inmovilización de enzimas desplaza el perfil de pH a regiones más ácidas o básicas de acuerdo al soporte utilizado (Huang, y otros, 2007).

Tabla 17. pH y temperatura óptimos encontrados para la decoloración de IC con los diferentes sistemas y el CE

Sistema de inmovilización	pH	Temperatura (°C)
CE	4	50
4	5	
1A	3	60
1B	4	
1C	4	
2	5	50
3	6	
5	5	50

Uno de los objetivos principales de la inmovilización enzimática es confinar las enzimas para que éstas tengan mayor capacidad de tolerar los cambios de pH y mantener una actividad enzimática, igual o mayor que la que presenta el CE, en un rango más amplio, esto no se obtuvo pues todos los sistemas de inmovilización presentaron velocidades de decoloración inferiores a los del CE. Los sistemas 1B, 2, 3, 4 y 5, presentaron una baja estabilidad en uno de sus extremos de pH:

- el sistema 1B tuvo un comportamiento similar al de CE (figura 28), decolorando en un rango de pH de 2-9, no decolorando en medio básico fuerte;
- los sistemas 2 y 4 decoloraron en un rango de pH de 3-7 (figura 29),
- el sistema 3 decoloró en un rango de 2-9 presentando vulnerabilidad en pH básico fuerte (figura 29),
- por último el sistema 5 sólo decoloró en medio ácido en un rango corto de 2-5 (figura 29). En el sistema 5 el soporte se disolvió a pH mayores de 5 dificultando así que se llevara a cabo la decoloración).

Los sistemas 1B, 2, 3, 4 y 5 no decoloraron en pH muy básico lo que se puede deber a que el plegamiento de la estructura terciaria tiene cadenas laterales ionizables que no fueron afectadas por el proceso de inmovilización (Huang, y otros, 2007), presentando un perfil parecido a la del CE, caso del sistema 1B o que quizá fueron afectados de manera negativa como es el caso de los sistemas 2, 3, 4 y 5 que mostraron una muy baja velocidad de decoloración comparado con CE.

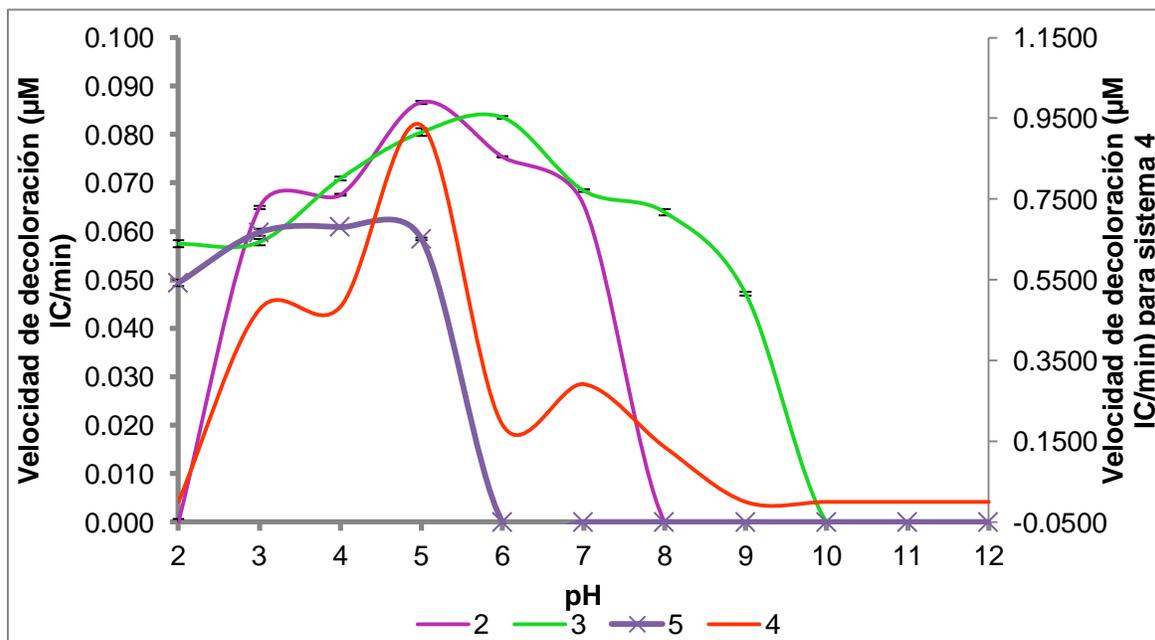


Figura 29. Efecto del pH sobre la velocidad de decoloración de IC con los sistemas 2, 3, 4 y 5.

En la figura 30 se ve el efecto que tuvo el pH sobre la velocidad relativa de decoloración del índigo carmín con el sistema 1, esto es comparada con la velocidad de decoloración de la enzima libre, se observa que al inmovilizar se amplió el rango de estabilidad a los cambios de pH de 2-12, presentando velocidades relativas de decoloración de 71 hasta 377.3% para el sistema 1C que fue el que más amplió el rango de pH, el que le siguió fue el sistema 1A que presentó velocidades relativas de 63.3 hasta 316% en el mismo rango que el 1C. El sistema 1B mantuvo una velocidad relativa superior a 77.9% llegando hasta 97.7%, pero como ya se comentó no se aumentó el rango de pH.

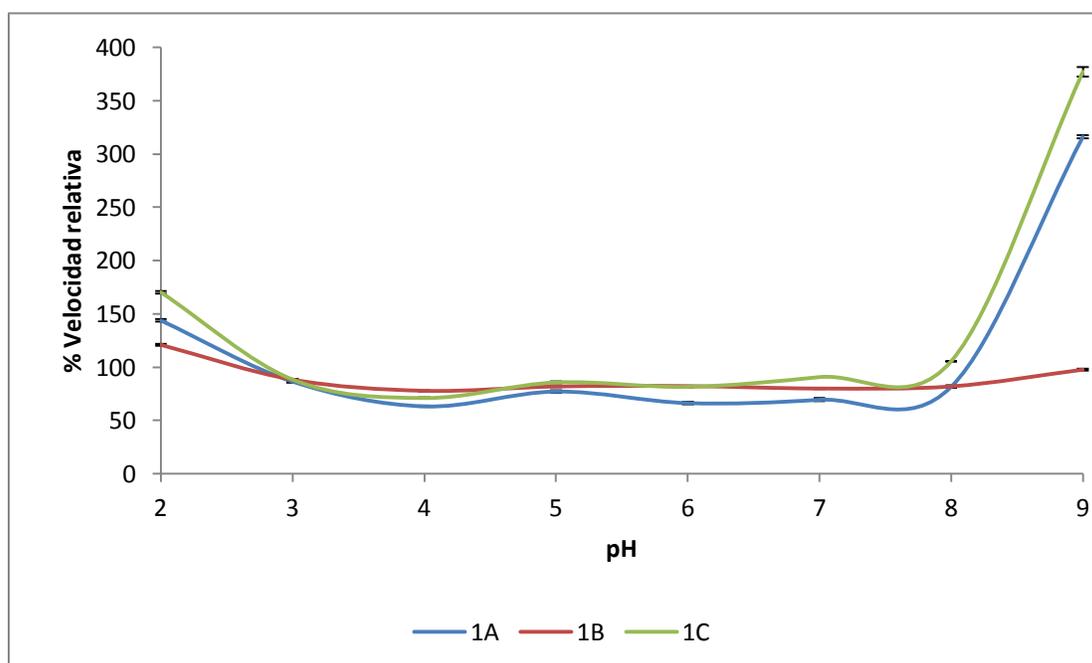


Figura 30. Efecto del pH sobre la velocidad relativa de decoloración de IC con el sistema 1. Sólo se muestra el % de velocidad relativa puesto que la enzima libre no decoloró en pH > 9

En la figura 31 se observa la estabilidad que tuvieron los sistemas de inmovilización 2-5 a los cambios de pH, la cual no se incrementó, mostrando velocidades relativas de decoloración muy bajas, inferiores a 20% comparado con el CE, el sistema que menos estabilidad al pH proporcionó a la enzima fue el sistema 5, a partir de pH 6 ya no se registró actividad enzimática; el sistema 4 a pesar de decolorar al índigo en un rango de pH de 3-8 no proporcionó una buena estabilidad a la enzima, mostró un máximo de velocidad relativa en pH 5 siendo

baja (18%), comparada con la mostrada por el sistema 1, además muestra comportamiento muy diferente esperado en una enzima y al presentado por los demás sistemas, estas características lo hacen no adecuado para su aplicación industrial ya que el pH de los efluentes textiles varía dependiendo de los procesos que se llevan a cabo en esta industria.

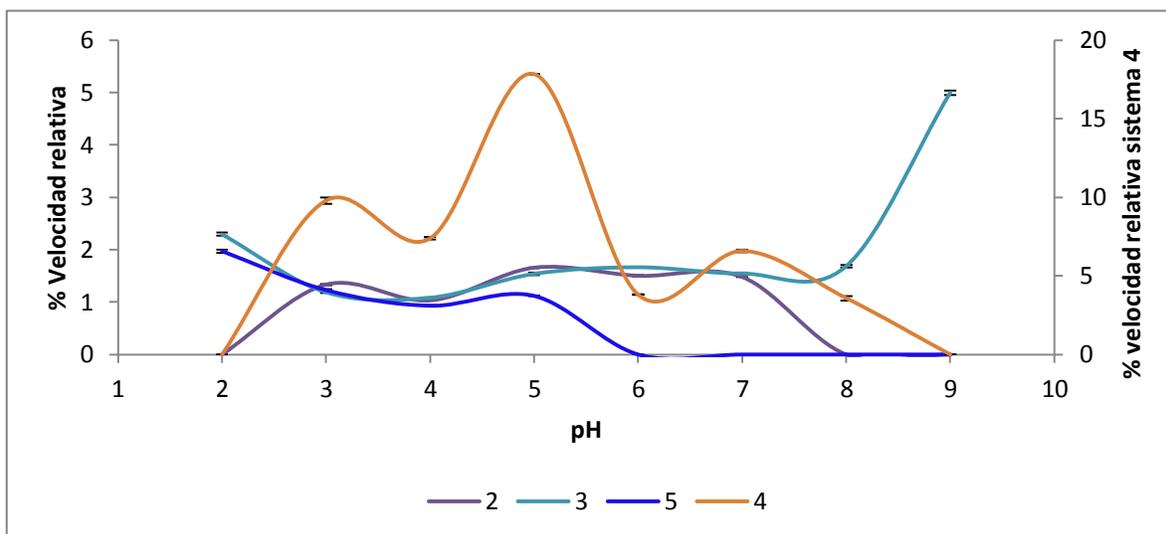


Figura 31. Efecto del pH sobre la velocidad relativa de decoloración de IC con los sistemas 2-5.

Autores que han trabajado con la inmovilización de lacasa reportan que la inmovilización incrementa poco la estabilidad al pH, Huang, y otros, 2007, reportan que tanto para la lacasa libre de *Pycnoporus sanguineus* y la inmovilizada por adsorción el pH óptimo fue de 3, no viendo alguna ventaja con la inmovilización en cuanto a la resistencia a cambios de pH. Bayramoglu, y otros, 2010, realizaron una inmovilización por entrecruzamiento con quitosano activado con epiclorhidrina y reporta una ligera ampliación del rango de tolerancia al pH, la enzima libre tuvo pH óptimo de 5 mientras que la inmovilizada presentó una actividad superior al 90% de la inicial en el pH de 5-6.5, utilizando una lacasa de *Trametes versicolor*.

El sistema 1C presentó el mismo pH óptimo que la enzima libre, pero a diferencia de ésta, se observó estabilidad en el rango de pH (2-8), manteniendo de un 85 – 100 % de la actividad, y más del 62 % de actividad en pH de 9-12, lo cual lo hace un sistema adecuado para aplicación industrial, ya que el pH de los efluentes varía desde valores ácidos hasta básicos (Juárez, 2008).

7.6. Efecto de la temperatura en la decoloración de IC usando los sistemas de inmovilización.

El efecto de la temperatura sobre la velocidad de decoloración es una variable importante ya que puede tener un doble efecto; En primer lugar, la mayoría de las enzimas se inactivan en condiciones elevadas de temperatura (70 – 80 °C) o incluso moderadas (40 – 50 °C) y algunas se puede desactivar a temperaturas por debajo de 10 °C; se cree que la inactivación térmica es causada principalmente por la desnaturalización de la estructura terciaria de la enzima a través del desplegamiento de la proteína o por interrupción del sitio activo de la enzima. En segundo lugar, de acuerdo con la Ley de Arrhenius, la velocidad de reacción tiende a aumentar con la temperatura (Cardinal-Watkins, y otros, 2011). Estos efectos se pueden observar en las figuras 32 y 33, en todos los sistemas y en el CE al ir aumentando la temperatura, la velocidad de decoloración aumentó, de acuerdo con la teoría de Arrhenius, llegaron a una temperatura óptima y posteriormente la velocidad de decoloración disminuyó poco a poco.

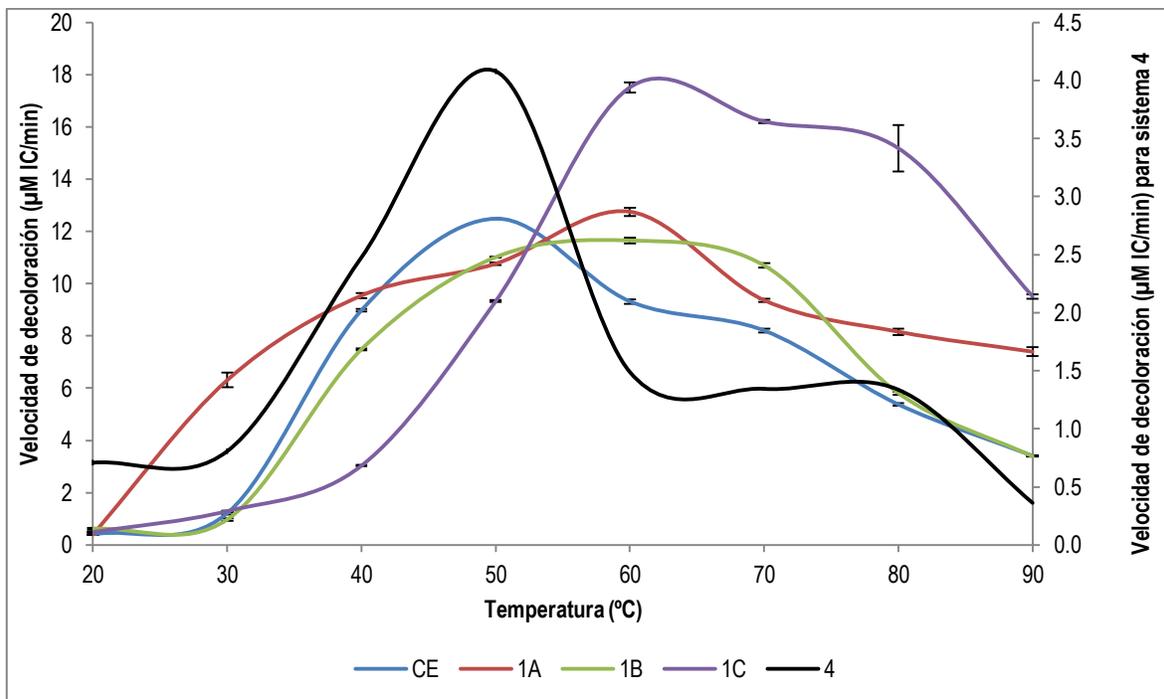


Figura 32. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de decoloración de IC con los sistemas 1, 4 y CE.

La temperatura óptima para la decoloración de IC con la enzima libre fue de 50 °C mientras que con los sistemas de inmovilización se presentó entre 50 – 60 °C (tabla 17). El incremento de 10 °C en la temperatura óptima para el sistema 1, comparado con la enzima libre, podría deberse a que al cambiar las propiedades físicas y químicas de la enzima, mediante la inmovilización y la posible formación de un enlace covalente a través de los grupos amino de las enzimas con el soporte pudo haber reducido la flexibilidad conformacional resultando en una alta energía de activación para la molécula evitando que ésta reorganice la conformación adecuada para unirse al sustrato, dando mayor estabilidad al sitio activo (Arica, y otros, 2009).

Comparado con el CE, el sistema de inmovilización 1, con sus tres variantes, aumentó el rango de temperatura en el cual se lleva a cabo la decoloración del IC (figura 32), en un rango de 20 – 70 °C tuvo 3 ciclos de uso con una eficiencia similar a la del primer ciclo de uso, desnaturalizándose después del primer uso a temperaturas iguales o mayores a 80 °C, mientras que para el CE sólo se mantuvo la velocidad de decoloración en temperaturas de 20 – 40 °C.

Para el caso del sistema 4 la velocidad de decoloración a 60 °C fue casi la tercera parte de la velocidad presentada en su temperatura óptima, lo que probablemente se podría deber a una inactivación en gran proporción de las enzimas al ser incubadas a esa temperatura, este resultado lo hace poco atractivo para su aplicación industrial.

Los sistemas de inmovilización 2, 3 y 5 mostraron velocidades de decoloración promedio muy bajas comparadas con las de la enzima libre y con los sistemas 1 y 4, teniendo un máximo a 50 °C, para estos sistemas no hubo corrimiento en el valor de la temperatura óptima, con respecto al CE, lo cual puede ser debido a que se afectó el sitio activo de la enzima en el proceso de inmovilización, o que la confinación de las enzimas no fue adecuada.

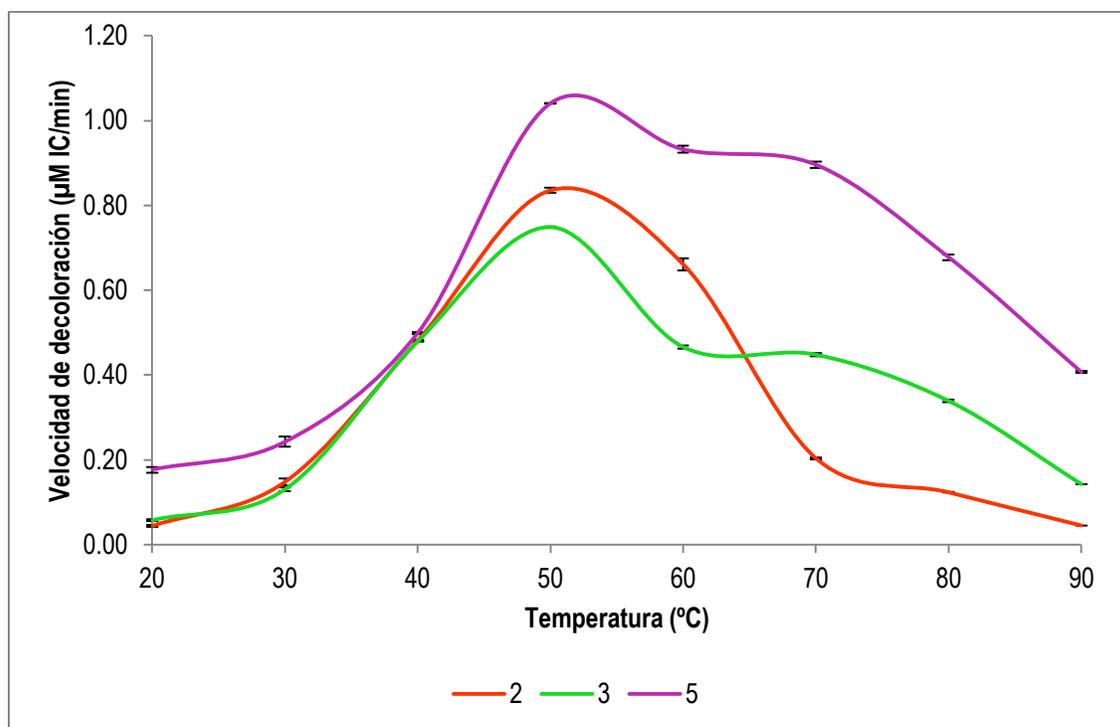


Figura 33. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de decoloración de IC con sistemas 2, 3 y 5.

En la figura 34 se aprecia la estabilidad que tuvieron las enzimas en los sistemas 1 y 4 ante los cambios de temperatura. El sistema 1A presentó buena estabilidad térmica, pues su porcentaje de velocidad relativa casi siempre fue superior a 100 % a excepción de la presentada en la temperatura 50 °C (90%); el sistema 1C tuvo buena estabilidad térmica en 20-30 y 50-90 °C, mostrando una velocidad relativa baja (< 50%) en 40 °C.

El sistema 1B amplió el rango de resistencia a los cambios de temperatura pues tuvo velocidades relativas superiores a los 75% a temperaturas de 20–80 °C. Un sistema no recomendable es el sistema 4 pues de acuerdo a lo observado en la figura 34, éste presenta velocidades menores que el CE, con % de velocidad retenida inferiores a 50 %.

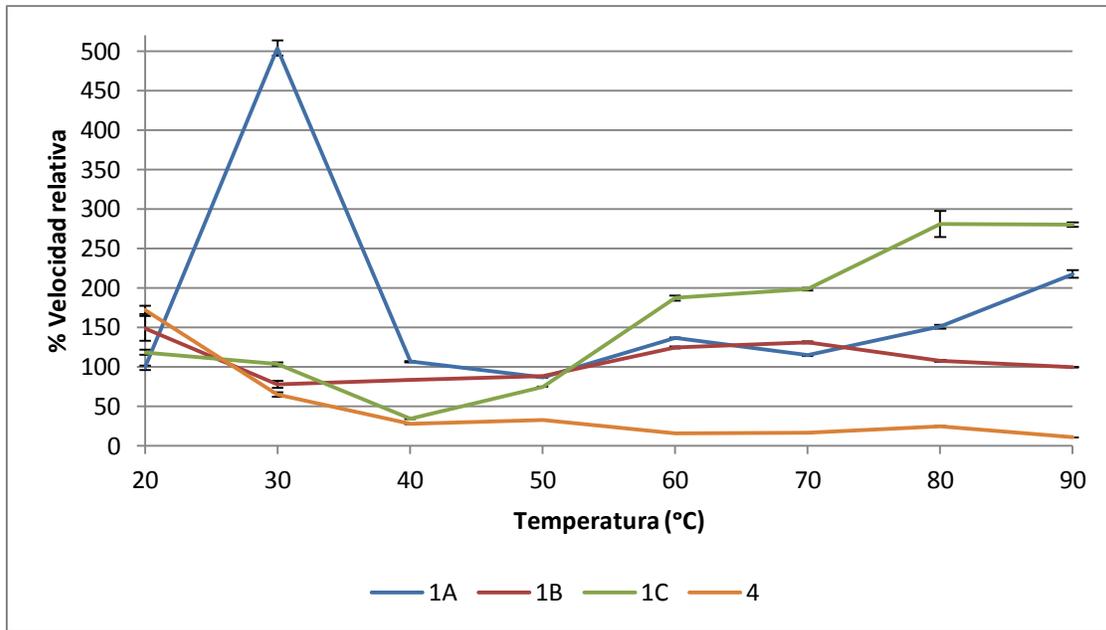


Figura 34. Efecto de la temperatura sobre la velocidad relativa de decoloración de IC con los sistemas de inmovilización 1 y 4.

Para el caso de los sistema 2, 3 y 5 se encontró una muy baja estabilidad térmica pues presenta velocidades relativas menores a 45 % (figura 35), sin embargo los cambios en la velocidad de decoloración no fueron tan marcados como en el caso de pH.

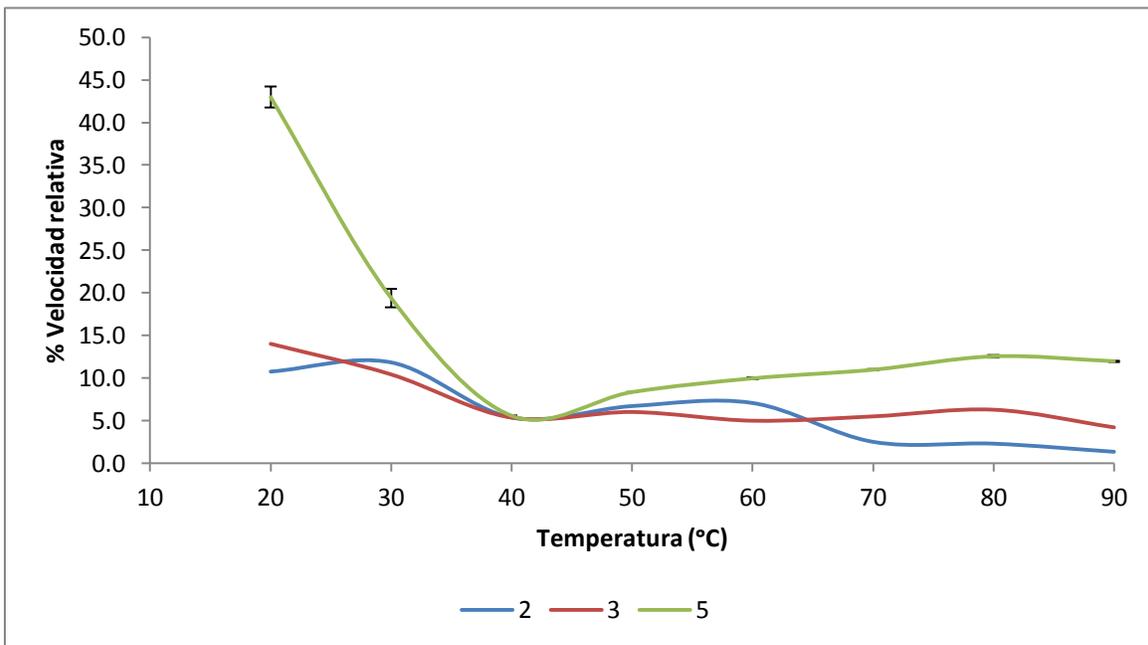


Figura 35. Efecto de la temperatura sobre la velocidad relativa de decoloración de IC con los sistemas de inmovilización 2, 3 y 5.

7.7. Determinación de parámetros cinéticos.

Los parámetros cinéticos se determinaron, empleando diferentes concentraciones de IC y una cantidad constante de proteínas (6.4 ± 0.5 g proteína), las diversas mezclas de reacción estuvieron constituidas como se menciona en 6.7. El avance de cada reacción se evaluó por espectrofotometría de absorción molecular UV-Vis.

Se graficaron las velocidades iniciales contra la concentración de IC y se encontró que muestra las características de una cinética enzimática de Michaelis-Menten. En este modelo cinético adopta la hipótesis del estado estacionario, según la cual la concentración del complejo enzima-sustrato es pequeña y constante a lo largo de la reacción. La cinética sigue la siguiente ecuación:

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{[S] + k_m} \quad (1)$$

Para el caso particular de las enzimas extracelulares de *Trametes versicolor* inmovilizadas en los diferentes sistemas probados se llamó K_G a la relación de constantes de velocidad, y a $V_{m\acute{a}x}$ a la velocidad máxima a la cual ocurre la saturación de sustrato. En la figura 36, se observa el cambio de velocidad inicial respecto a la concentración de sustrato (índigo carmín) que mostraron los sistemas de inmovilización 1. Obteniéndose una cinética de Michaelis-Menten.

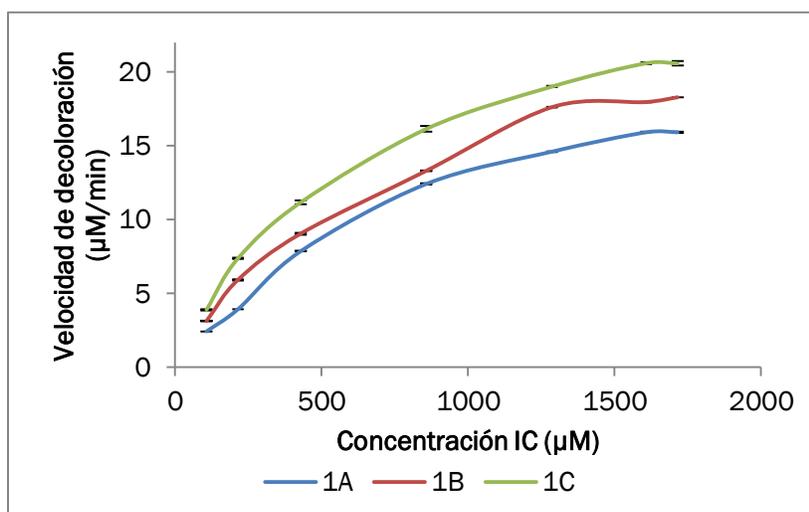


Figura 36. Cinética de Michaelis-Menten con enzimas inmovilizadas del sistema 1.

Los valores de K_m son los más ampliamente usados para probar la habilidad de la enzima para unirse al sustrato, debido a que la $V_{m\acute{a}x}$ depende de la cantidad de enzima que se utilice para el experimento (Alberty, 2008).

Los valores de K_G aparente, al igual que los de $V_{m\acute{a}x}$ fueron calculados usando el modelo del doble recíproco de Lineweaver-Burk, estos valores se muestran en la figura 37. Se observó un incremento en el valor de K_G , utilizando los sistemas de inmovilización, comparado con el obtenido para la enzima libre, siendo entre 20 y 40 % mayores para los sistemas 1B, 1C y 4, mientras que para el sistema 3 y 1A fue de 63 y 79 % de incremento respectivamente, el incremento mayor fue el que presentó el sistema 2, dando como resultado la $V_{m\acute{a}x}$ baja. El aumentar el valor de K_G la afinidad por índigo carmín disminuye, dando como resultado una $V_{m\acute{a}x}$ menor y haciendo que el proceso de decoloración sea más lento. El sistema donde menos aumentó el valor de K_G fue el 1C (713 μM) respecto a la enzima libre (604 μM).

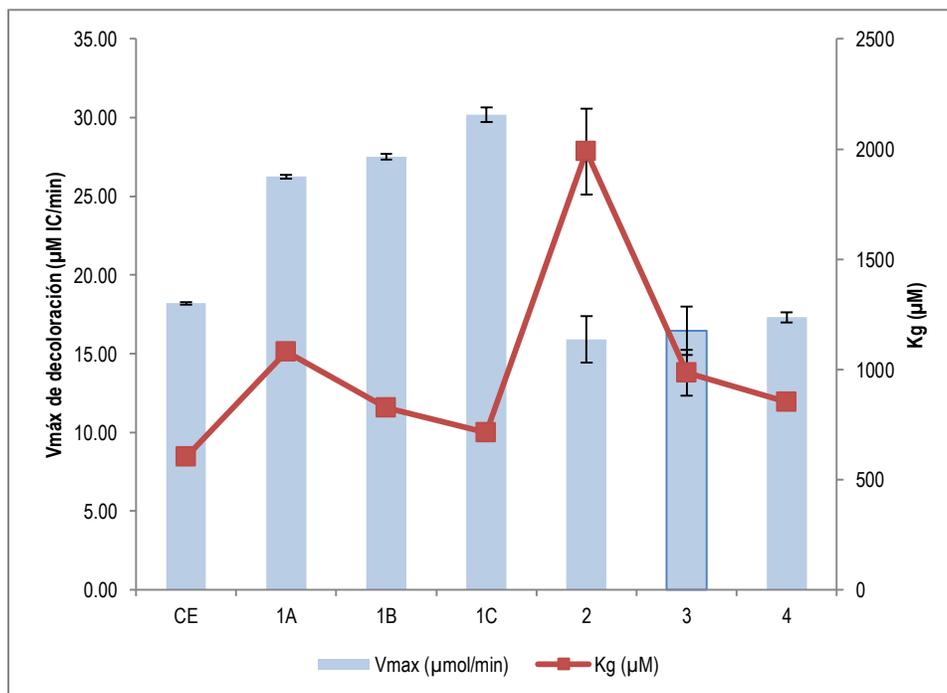


Figura 37. Parámetros cinéticos de decoloración con las enzimas inmovilizadas

Otros investigadores (Durán, y otros, 2002) reportan una baja afinidad por el sustrato debido a limitaciones difusionales, decremento en la flexibilidad de la enzima después de la inmovilización y a impedimentos estéricos. Bayramoglu (Bayramoglu, y

otros, 2010) reportó una K_M aparente de 9.4 y 19.7 μM para la enzima libre e inmovilizada respectivamente, utilizando siringaldazina.

Hasta el momento no se han encontrado reportes de $V_{m\acute{a}x}$ para la decoloración de índigo carmín, la mayoría de los investigadores analizan las enzimas inmovilizadas con un sustrato modelo (Champagne, 2009) y realizan decoloraciones con una misma concentración de índigo carmín, reportando sólo porcentajes de decoloración, no así una constante, además de que al analizar la $V_{m\acute{a}x}$ esta varía dependiendo del sustrato y de la concentración de éste y de la enzima.

En la figura 37 se observa que el sistema 1C tuvo una $V_{m\acute{a}x}$ superior a los demás sistemas, presentando una K_G ligeramente superior a la de la enzima libre con un aumento de 19 % con respecto a esta, lo que sugiere que la enzima se inmovilizó de forma adecuada, aunque si hubo afectación en el sitio activo, debido al proceso de inmovilización (Arica, y otros, 2009), sin embargo se conservó la afinidad suficiente para llevarse a cabo la decoloración con una buena velocidad. Algo similar sucedió con el sistema 1B en el cual el valor de K_G (835 μM) fue mayor que el de la enzima libre y también mostró una $V_{m\acute{a}x}$ (27.52 $\mu\text{M}/\text{min}$) superior a la de la enzima libre. El sistema 1A muestra una K_G con aumento del 77 % con respecto a la del CE, sin embargo tuvo una buena velocidad de decoloración ($V_{m\acute{a}x} = 26.24 \mu\text{M}/\text{min}$). Los sistemas más afectados en el proceso de inmovilización fueron del 2-4 pues mostraron K_G superiores a las de la enzima libre y velocidades máximas similares a ésta.

7.8. Estabilidad de almacenamiento

Un criterio importante para la industria es reducir la cantidad de enzima requerida para llevar a cabo el tratamiento, esto es que las enzimas inmovilizadas permanezcan activas durante un período sustancial de tiempo. Para satisfacer este criterio, es esencial que (1) la enzima inmovilizada sea estable cuando se almacena durante períodos prolongados de tiempo antes de o entre usos y (2) la enzima sea estable en condiciones de reacción (Cardinal-Watkins, y otros, 2011). En este proyecto sólo se evaluó la estabilidad de la enzima cuando ésta se almacena a 4 °C y a temperatura ambiente, esto en un periodo de 16 semanas, para los sistemas 1 y 4, pues fueron los

sistemas que menor tiempo de decoloración requirieron, datos mostrados en las figuras 39 y 40.

En la figura 38a se observa que los sistemas 1A, 1B y 1C mostraron 95, 94 y 98.2 % AEL inicial respectivamente después de 16 semanas de almacenamiento a 4 °C, proveyendo estabilidad de almacenaje para la enzima lacasa; mientras que el sistema 4 perdió la actividad con el tiempo teniendo 58% AEL retenida en la semana 16, la enzima libre perdió toda su actividad en la semana 16.

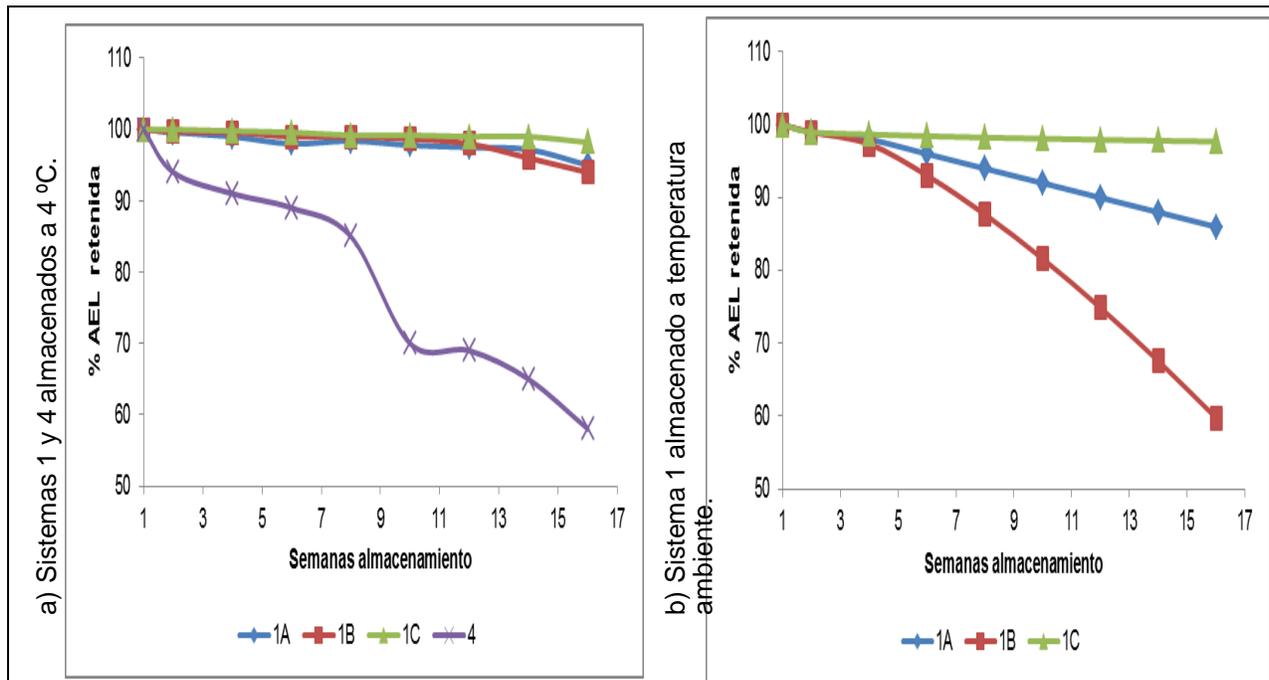


Figura 38. Estabilidad de almacenamiento, actividad enzimática lacasa a) para el sistema 1 y 4 almacenados a 4 °C, b) sistema 1 almacenado a temperatura ambiente.

En cuanto a la estabilidad de almacenamiento a temperatura ambiente, se observó que el sistema 1C retuvo un 97.7 % de actividad enzimática lacasa después de 16 semanas de estar almacenada a temperatura ambiente, sólo fue 0.5 % menor que en el caso del almacenamiento a 4 °C; el sistema 1B perdió actividad lacasa presentando sólo el 57.7 % AEL en la misma semana, también hubo una pérdida considerable de actividad en el sistema 1A, que retuvo un 86 % de la actividad lacasa inicial, estos datos pueden observarse en la figura 38b, la enzima libre perdió su total actividad en la semana 2 al estar almacenada a temperatura ambiente.

De acuerdo con la literatura la estabilidad enzimática lacasa en almacenamiento a 4 °C, para el sistema 1 y a temperatura ambiente (1C) fue buena, Qiu (Qiu, y otros, 2009) reporta 72 % de AEL retenida a las 6 semanas de almacenamiento a 4 °C, y Huang el 85 % de AEL para una lacasa de *Pycnoporus sanguineus* después de un mes de almacenamiento a la misma temperatura (Huang, y otros, 2007), Arica (Arica, y otros, 2009) menciona que la lacasa de *Rhus vernificera* presentó 52 % de AEL después de 6 semanas de almacenamiento, se puede decir que el sistema 4 mostró una estabilidad moderada pues está dentro del rango de lo reportado por otros autores, y en un mayor tiempo de almacenaje.

En la figura 39, se muestra el porcentaje de actividad enzimática peroxidasa retenida por los sistemas de inmovilización 1 y 4 a 4 °C después de 16 semanas (figura 39a), la pérdida de actividad peroxidasa fue muy rápida para los dos sistemas. En la figura 39b se observa como la actividad peroxidasa se perdió totalmente en 12 semanas a temperatura ambiente, a pesar de no haber dado estabilidad de almacenaje se encontró que la inmovilización si le confirió mayor estabilidad a las enzimas pues para el caso de actividad enzimática peroxidasa la enzima libre perdió su actividad a los 2 días de almacenamiento.

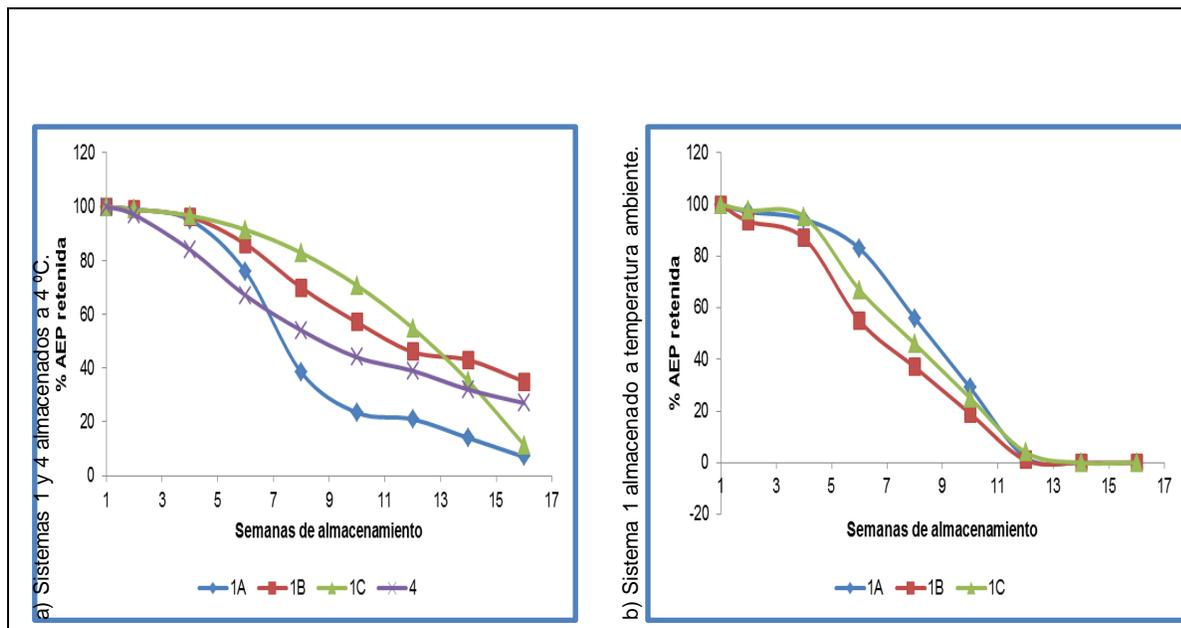


Figura 39. Estabilidad de almacenamiento, actividad enzimática peroxidasa a) para el sistema 1 y 4 almacenados a 4 °C, b) sistema 1 almacenado a temperatura ambiente.

7.9. Cromatografía en capa fina

Se ha reportado que la degradación de índigo carmín por medio de enzimas ligninolíticas como Lac y MnP tiene intermediarios como el ácido isatin-5-sulfónico (Kandelbauer, y otros, 2004), que pueden ser más tóxicos que el colorante, y para el caso de índigo sintético se han reportado isatina y ácido antranílico (Campos, y otros, 2001) como productos de oxidación.

Para identificar si había alguno de estos compuestos en los productos de decoloración se realizó la cromatografía en capa fina, las placas se muestran en la figura 40, en esta se muestran 4 placas, una para los productos de decoloración de IC 1600 ppm con el sistema 1C, producto de decoloración de IC 500 ppm con sistema 2, producto de decoloración de IC 200 ppm con sistema 3 y por último producto de decoloración de IC 800 ppm con el sistema 4.

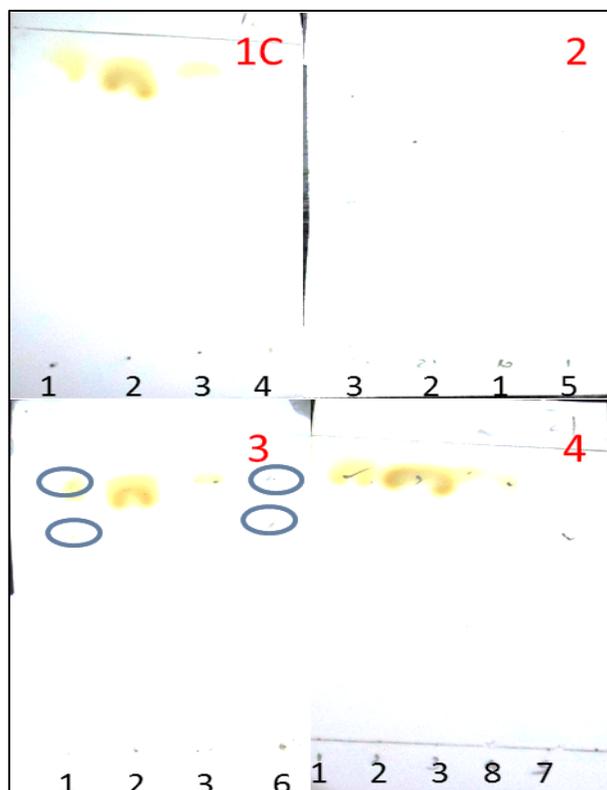


Figura 40. Cromatografía en capa fina de los productos de decoloración. Los compuestos agregados en las diferentes columnas son: 1, Isatina sulfonada; 2, Ácido antranílico; 3, Isatina; 4, producto IC 1600 ppm; 5, producto IC 500 ppm; 6, producto IC 200 ppm; 7, producto IC 800 ppm; 8, IC 500 ppm.

Para las decoloraciones hechas con los sistemas 1C, 2 y 4 no se encontró alguna similitud con los estándares colocados en cada una de las placas, mientras que en la placa correspondiente a los productos de decoloración con el sistema 3 se encontró similitud con el patrón de isatina sulfonada, puntos encerrados en óvalos en la figura 41.

Con este tipo de análisis no se puede decir con exactitud si se trata o no de isatina sulfonada, puesto que se necesita de más análisis para verificar que está o no presente, en los productos de decoloración de IC. El sistema 5 no se incluyó en estas pruebas debido a su bajo contenido de enzimas y a su baja actividad enzimática retenida, por lo que no se obtuvo productos de decoloración en la concentración necesaria para aplicar en la placa.

7.10. Análisis de fitotoxicidad de los productos de decoloración.

Los distintos tratamientos que actualmente se utilizan para la remoción de colorante índigo carmín tienen desventajas como generar muchos lodos en el caso del físico-químico, los sistemas biológicos generalmente se producen productos tóxicos, y los sistemas avanzados de oxidación son muy caros y no son costeables para la industria. Un objetivo del presente proyecto es tener un sistema de tratamiento que decolore al índigo carmín y que el agua resultante se pueda usar para riego, por ello al final se evaluó la fitotoxicidad.

Una de las formas de evaluar la fitotoxicidad es por medio del método desarrollado por Zucconi, y otros, 1981, en el cual se cuantifican las semillas germinadas de lechuga durante 4 días y se mide la elongación de sus radículas, se establece una relación entre éstas obteniéndose un índice de germinación, el cual indica la presencia de residuos fitotóxicos o no.

En la figura 41 se muestran los índices de germinación obtenidos para los productos de decoloración de IC 100 ppm con los diferentes sistemas de inmovilización, se incluyeron también el CE, el colorante sin tratamiento y los soportes de los sistemas 3 y 5.

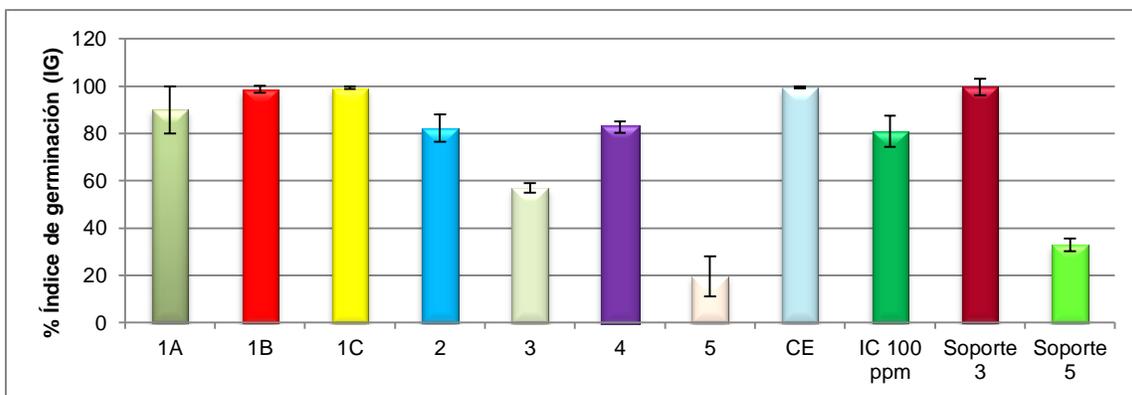


Figura 41. % IG de los productos de decoloración de IC.

De acuerdo con Varnero, y otros, 2007, y Zucconi, y otros, 1981, se considera que un compuesto es fitotóxico cuando tiene un índice de germinación menor a 80 %, siguiendo este criterio se encontró que los productos de decoloración del sistema 3 y 5 fueron fitotóxicos, pues mostraron valores de 57 y 20 % IG respectivamente, como se muestra en la figura 41, cabe señalar que el soporte del sistema 5 mostró fitotoxicidad severa con un IG de 32 %, lo que ocasionó que los productos de decoloración del IC con el sistema 5 sean fitotóxicos severos. El soporte del sistema 3 no mostró fitotoxicidad pero si los productos de decoloración del índigo carmín con este sistema, lo cual concuerda con lo encontrado en la cromatografía en placa fina, donde presumiblemente se produjo isatina sulfonada, lo cual posiblemente le dé ese carácter de fitotóxico moderado.

En la figura 42 están las imágenes de las radículas de lechuga, se ve que con los productos de decoloración de los sistemas 1A, 1B, 1C y de la enzima libre (CE) tuvieron una mayor elongación con respecto a los productos de decoloración obtenidos con los otros sistemas de inmovilización. Esto indica que al final del proceso de decoloración con los sistemas de inmovilización 1, 2 y 4 el agua residual puede emplearse para riego.

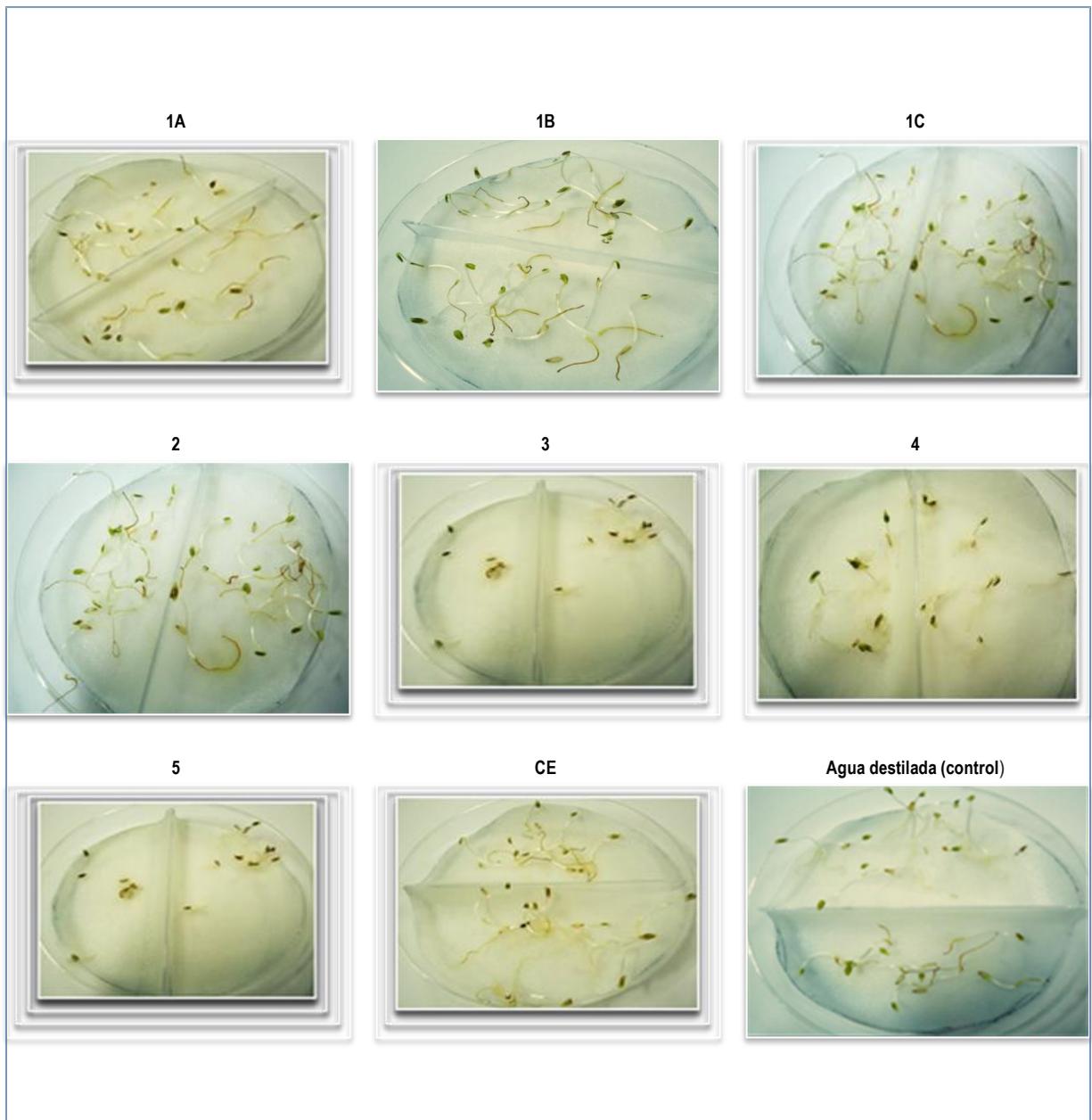


Figura 42. Prueba de fitotoxicidad de los productos de decoloración del índigo carmín con los diferentes sistemas de inmovilización.

8. CONCLUSIONES

El mejor sistema de inmovilización fue el 1C, tuvo la mayor cantidad de actividad lacasa retenida, decoloró el índigo carmín conservando más del 62% de la actividad en el pH óptimo en un rango de pH de 2-12, aumentó su temperatura óptima y amplió el rango de temperatura (50 – 80 °C), se trabajaron 45 ciclos de uso (4 meses) degradando índigo carmín, los productos de decoloración de éste sistema no resultaron fitotóxicos con un índice de germinación de 100%, manteniendo el mayor porcentaje de actividad enzimática retenida después de 16 semanas de almacenamiento a 4 °C.

El disolvente utilizado para la silanización no influyó en la cantidad de enzima inmovilizada pero si en el % de AEEL y AEEP, el que mayor porcentaje de AEEL tuvo fue el 1C y el que mayor AEEP fue el 1B.

Según la eficiencia del sistema de inmovilización será el número de ciclos de uso y el porcentaje de actividad residual a lo largo de los ciclos de uso. El sistema 1C fue el que presentó mayor número de reusos, manteniendo el 15% de la velocidad de decoloración inicial después de los 45 ciclos evaluados en 4 meses.

La inmovilización con el sistema 1A y 1C incrementó la estabilidad de la enzima al pH, incrementando el rango de pH en el cual se lleva a cabo la decoloración, de 2-12.

En general las enzimas inmovilizadas con los diferentes sistemas probados fueron menos vulnerables a los cambios de temperatura que a los cambios de pH; con el sistema 1 se mostró buena estabilidad térmica, aumentando el rango de temperatura al cual se lleva la decoloración, siendo el que mayor estabilidad tuvo el sistema 1A.

Se afectó la afinidad del sustrato con el sitio activo, obteniéndose valores de K_G superiores a los del CE, sin embargo se conservó la afinidad suficiente para llevarse a cabo la decoloración con una buena velocidad. El sistema 1C tuvo la $V_{m\acute{a}x}$ más alta.

En general los productos de decoloración del índigo carmín con la enzima inmovilizada no fueron fitotóxicos por lo que este tipo de sistemas se podría utilizar para remover índigo carmín de los efluentes textiles industriales y aprovecharse el agua residual.

Referencias bibliográficas

Alberty Robert A. Determination of kinetic parameters of enzyme-catalyzed reaction $A + B + C \rightarrow$ products with the minimum number of velocity measurements. [Publicación periódica] // The Journal of Physical Chemistry. B. - 2008. - 20 : Vol. 30. - págs. 1225-1231.

Arica M Yakup, Altintas Begum y Bayramoğlu Gülay Immobilization of laccase onto spacer-arm attached non-porous poly(GMA/EGDMA) beads: application for textile dye degradation. [Publicación periódica] // Bioresource Technology. - 2009. - 2 : Vol. 100. - págs. 665-669. - 1873-2976.

Baldrian P Purification and characterization of laccase from the white-rot fungus *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme. [Publicación periódica] // Applied Microbiology and Biotechnology. - 2004. - 5 : Vol. 63. - págs. 560-563.

Batista Viera Francisco y Brena Beatriz M. Enzyme immobilization [Sección de libro] // Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells / ed. Guisan Jose M.. - Totowa, NJ : Editorial Humana Press Inc, 2006. - 2ª edición.

Bayramoglu G. y Arica M.Y. Immobilization of laccase onto poly(glycidylmethacrylate) brush grafted poly(hydroxyethylmethacrylate) films – enzymatic oxidation of phenolic compounds. [Publicación periódica] // Materials Science and Engineering C. - 2009. - Vol. 29. - págs. 1990-1997..

Bayramoglu Gulay, Yilmaz Meltem y Yakup Arica M. Preparation and characterization of epoxy-functionalized magnetic chitosan beads: laccase immobilized for degradation of reactive dyes [Publicación periódica] // Bioprocess and Biosystems Engineering. - 2010. - Vol. 33. - págs. 439-448.

Berg Jeremy Mark, Tymoczko John L. y Stryer Lubert Bioquímica [Libro]. - Barcelona, España : Editorial Reverté, 2008. - 6ª : págs. 206-234.

Bisswanger Hans Enzyme Kinetics: Principles and Methods [Libro]. - Weinheim, Alemania : Editorial WILEY-VCH, 2008. - 2ª edición : págs. 59-95.

Brady Dean [y otros] Optimisation of the enantioselective biocatalytic hydrolysis of naproxen ethyl ester using ChiroCLEC-CR [Publicación periódica] // Enzyme and Microbial Technology. - 2004. - 4 : Vol. 34. - págs. 283-291. - 01410229.

Brady Dean [y otros] Spherezymes: a novel structured self-immobilisation enzyme technology. [Publicación periódica] // Bio Med Central Biotechnology. - 2008. - 8 : Vol. 8. - págs. 1-11.

Brady Dean y Jordaan Justin Advances in enzyme immobilisation. [Publicación periódica] // Biotechnology Letters. - 2009. - 11 : Vol. 31. - págs. 1639-1650.

Britton Hubert Thomas Stanley y Robinson Robert Anthony CXCVII.- Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal [Publicación periódica]. - 1931. - págs. 1456-1462.

Bryjak Jolanta [y otros] Laccase immobilization on copolymer of butyl acrylate and ethylene glycol dimethacrylate [Publicación periódica] // Biochemical Engineering Journal. - 2007. - 3 : Vol. 35. - págs. 325-332. - 1369703X.

Bukh Christian, Lund Martin y Bjerrum Morten J. Kinetic studies on the reaction between *Trametes villosa* laccase and dioxygen [Publicación periódica] // Journal of Inorganic Biochemistry. - 2006. - 9 : Vol. 100. - págs. 1547-1557.

Cabana H. [y otros] Immobilization of laccase from the white rot fungus *Coriolopsis polyzona* and use of the immobilized biocatalyst for the continuous elimination of endocrine disrupting chemicals. [Publicación periódica] // Bioresource Technology. - 2009. - Vol. 100. - págs. 3447-3458.

Campos Rui [y otros] Indigo Degradation with Laccases from *Polyporus* sp. and *Sclerotium rolfsii* [Publicación periódica] // Textile Research Journal. - 2001. - 5 : Vol. 71. - págs. 420-424.

Campos Rui [y otros] Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. [Publicación periódica] // Journal of Biotechnology. - 2001. - 2-3 : Vol. 89. - págs. 131-139.

Cao Linqiu y Schmid Rolf D. Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design [Libro]. - Weinheim, Alemania : Editorial WILEY-VCH, 2006. - 1ª edición : págs. 53-60, 169-200, 397-406.

Cardinal-Watkins Chantale y Nicell Jim A. Enzyme-Catalyzed Oxidation of 17 β -Estradiol Using Immobilized Laccase from *Trametes versicolor*. [Publicación periódica] // Enzyme Research. - 2011. - Vol. 2011. - págs. 1-11. - 2090-0414.

Castro María De Los Ángeles y González Ignacio Influence of the immobilization processes of laccase enzyme (*Trametes versicolor*) on a glassy carbon electrode on the electrochemical behavior of modified electrode and its use for detection of ferulic acid and vanillin acid [Publicación periódica] // *Talanta*.

Castro María De Los Angeles [y otros] Influence of the type of support and immobilization mechanism on the activity and stability of Laccase (*Trametes versicolor*) [Publicación periódica]. - 2009. - págs. 5-23.

Champagne Paul Philippe Dye decolourization by immobilized laccase and impact of auxiliary chemicals on dy decolourization [Informe] : Tesis Doctorado / Departamento de Ingeniería Química ; Queen's University. - Ontario, Canadá : [s.n.], 2009. - págs. 5-35.

Champagne Paul Philippe y Ramsay Juliana Akit Contribution of manganese peroxidase and laccase to dye decoloration by *Trametes versicolor*. [Publicación periódica] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. - 2005. - 3 : Vol. 69. - págs. 276-285. - 0175-7598.

Chang Thomas M. S. y Prakash Satya Procedures for microencapsulation of enzymes, cells and genetically engineered microorganisms. [Publicación periódica] // *Molecular Biotechnology*. - 2001. - 3 : Vol. 17. - págs. 249-260.

Chiacchierini E., Restucia D. y Vinci G. Bioremediation of Food Industry Effluents: Recent Applications of Free and Immobilised Polyphenoloxidases [Publicación periódica] // *Food Science and Technology International*. - 2004. - 6 : Vol. 10. - págs. 373-382.

Cho Nam Seok [y otros] Production of Fungal Laccase and Its Immobilization and Stability [Publicación periódica] // *Journal of The Faculty of Agriculture Kyush University*. - 2008. - 1 : Vol. 53. - págs. 13-18.

Copeland Robert A. Enzymes. A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis [Libro]. - Estados Unidos de América : Editorial WILEY-VCH, 2000. - 2ª edición : págs. 109-141,188-258.

Cruz Pacheco Karina Inmovilización de *Lactobacillus delbrueckii* como vector probiótico. [Informe] : Tesis Maestría / Departamento de Bioprocesos ; UPIBI-IPN. - 2007. - pág. 92.

Dávila Gustavo y Vázquez-Duhalt Rafael Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales [Publicación periódica] // Mensaje Bioquímico.. - 2006. - Vol. 30. - págs. 29-55.

Dhaouadi H. y F. M'Henni Textile mill effluent decolorization using crude dehydrated sewage sludge [Publicación periódica] // Chemical Engineering Journal. - 2008. - Vol. 138. - págs. 111-119.

Domínguez Alberto, Rodríguez Couto Susana y Sanromán M^a Ángeles Dye decolorization by *Trametes hirsuta* immobilized into alginate beads [Publicación periódica] // World Journal of Microbiology and Biotechnology. - 2005. - 4 : Vol. 21. - págs. 405-409. - 0959-3993.

Durán Nelson [y otros] Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports : a review [Publicación periódica] // Enzyme and Microbial Technology. - 2002. - Vol. 31. - págs. 907-931.

Elnashar Magdy M. M. Review Article: Immobilized Molecules Using Biomaterials and Nanobiotechnology [Publicación periódica] // Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology. - 2010. - 01 : Vol. 01. - págs. 61-76. - 2158-7027.

Flores Miranda Grisel Adriana Efecto de un proceso de inmovilización por gelación iónica sobre la actividad proteolítica de mexicaína [Informe] : Tesis Maestria / Departamento de Bioprocesos ;UPIBI - IPN. - 2011. - pág. 84.

Gemeay A. [y otros] Preparation and characterization of polyaniline/manganese dioxide composites and their catalytic activity [Publicación periódica] // Journal of Colloid and Interface Science. - 2007. - Vol. 308. - págs. 385-394.

Gemeay Ali H. [y otros] Kinetics and mechanism of the heterogeneous catalyzed oxidative degradation of indigo carmine [Publicación periódica] // Journal of Molecular Catalysis A: Chemical. - 2003. - Vol. 193. - págs. 109-120.

Ghosh Swapan Kumar Functional coatings: By Polymer Microencapsulation [Libro]. - Weinheim, Alemania : Editorial WILEY-VCH, 2006. - 1^a edición : págs. 29-66.

Gutiérrez Correa José y Stoppani Andrés O. M. Inactivación de la Dihidrolipoamida Deshidrogenasa de *Trypanosoma cruzi* por Fenotiazinas en presencia de Citocromo c y Peróxido de Hidrógeno . Efectos de los Antioxidantes [Publicación periódica] // Parasitología Latinoamericana. - 2005. - 14 : Vol. 60. - págs. 105-121.

Haas R., Tsivunchyk, O., Steinbach, K., von Löw, E., Scheibner, K., Hofrichter, M. Conversion of adamsite (phenarsarzin chloride) by fungal manganese peroxidase. [Publicación periódica] // Applied Microbiology and Biotechnology. - 5 : Vol. 63. - págs. 564-566.

Hamid Mohsina y Khalil-ur-Rehman Potential applications of peroxidases [Publicación periódica]. - 2009. - 4 : Vol. 115. - págs. 1177-1186.

Hofrichter Martin Review : lignin conversion by manganese peroxidase (MnP) [Publicación periódica] // Enzyme and Microbial Technology. - 2002. - Vol. 30. - págs. 454-466.

Huang Jun [y otros] Zinc tetraaminophthalocyanine-Fe₃O₄ nanoparticle composite for laccase immobilized [Publicación periódica] // International Journal of Nanomedicine. - 2007. - 4 : Vol. 2. - págs. 775-784.

Hunger Klaus Industrial Dyes. Chemistry Properties Applications [Libro]. - Weinheim, Alemania : Editorial WILEY-VCH, 2007. - 1ª edición : págs. 40-43.

Illanes Andrés Enzyme Biocatalysis. Principles and Applications [Libro]. - Valparaíso : Editorial Springer, 2008. - 1ª edición : págs. 1-39. 107-197.

Ispas Cristina, Sokolov Igor y Andreescu Silvana Enzyme-functionalized mesoporous silica for bioanalytical applications. [Publicación periódica] // Analytical and Bioanalytical Chemistry. - 2009. - 2 : Vol. 393. - págs. 543-54. - 0021600822502.

Jal P. K., Patel S. y Mishra B. K. Chemical modification of silica surface by immobilization of functional groups for extractive concentration of metal ions [Publicación periódica] // Talanta. - 2004. - Vol. 62. - págs. 1005-1028.

Juárez Rosete Manuel Eloy Tratamiento de efluentes generados por la industria textil, aplicando sistemas biotecnológicos, químicos y electroquímicos. [Informe] : Tesis Maestría / Departamento de Biotecnología Aplicada ; CIBA-IPN Tlaxcala. - 2008. - pág. 111.

Kamitsuji H [y otros] Production and induction of manganese peroxidase isozymes in a white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. [Publicación periódica] // Applied Microbiology and Biotechnology. - 2004. - 3 : Vol. 65. - págs. 287-294. - 0175-7598.

Kandelbauer Andreas [y otros] Study of dye decolorization in an immobilized laccase enzyme-reactor using online spectroscopy. [Publicación periódica] // *Biotechnology and Bioengineering*. - 2004. - 4 : Vol. 87. - págs. 552-563.

Katuri Krishna P. [y otros] Laccase-membrane reactors for decolorization of an acid azo dye in aqueous phase: process optimization. [Publicación periódica] // *Water Research*. - 2009. - 15 : Vol. 43. - págs. 3647-3658. - 1879-2448.

Kharlampieva Eugenia [y otros] Co-cross-linking Silk Matrices with Silica Nanostructures for Robust Ultrathin Nanocomposites [Publicación periódica] // *American Chemical Society Nano*. - 2010. - 12 : Vol. 4. - págs. 7053-7063.

Kim Yongho [y otros] Cloning of a Manganese Peroxidase cDNA Gene Repressed by Manganese in *Trametes versicolor* [Publicación periódica] // *Journal of Microbiology*. - 2005. - 6 : Vol. 43. - págs. 569-571.

Kruger Nicholas J The Bradford method for protein quantitation. [Sección de libro] // *The Protein Protocols Handbook*. - Totowa, Nueva Jersey : Editorial Humana Press Inc, 2002. - 2ª edición. - 1064-3745.

Kunamneni A. [y otros] Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers [Publicación periódica] // *Process Biochemistry*. - 2008. - 2 : Vol. 43. - págs. 169-178. - 13595113.

Lee Dong Hwan [y otros] Lipase Immobilization on Silica Gel Using a Cross-linking Method [Publicación periódica] // *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. - 2006. - 5 : Vol. 12. - págs. 777-782.

Lopes de Oliveira Patrícia [y otros] Purification and partial characterization of manganese peroxidase from *Bacillus pumilus* y *Paenibacillus* sp [Publicación periódica] // *Brazilian Journal of Microbiology*. - 2009. - Vol. 40. - págs. 818-826.

López C. [y otros] Dye Decolorization by Manganese Peroxidase in an Enzymatic Membrane Bioreactor [Publicación periódica] // *Biotechnology Progress*. - 2004. - 1 : Vol. 20. - págs. 74-81.

López Díaz Carmen Oxidación del tinte azo Orange II mediante MnP en reactores enzimáticos operados en continuo [Informe] : Tesis Maestría / Departamento de Ingeniería Química ; Universidad de Santiago de Compostela. - Santiago de Compostela, España : [s.n.], 2005. - págs. 23-40, 152-157.

Lorenzo M [y otros] Inhibition of laccase activity from *Trametes versicolor* by heavy metals and organic compounds. [Publicación periódica] // *Chemosphere*. - 2005. - 8 : Vol. 60. - págs. 1124-1128. - 0045-6535.

Lorenzo Miriam, Moldes Diego y Sanromán M^a Angeles Effect of heavy metals on the production of several laccase isoenzymes by *Trametes versicolor* and on their ability to decolourise dyes. [Publicación periódica] // *Chemosphere*. - 2006. - 6 : Vol. 63. - págs. 912-917.

Lu Lei, Zhao Min y Wang Yan Immobilization of Laccase by Alginate–Chitosan Microcapsules and its Use in Dye Decolorization [Publicación periódica] // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. - 2007. - 2 : Vol. 23. - págs. 159-166. - 0959-3993.

Lyu Su-Yun [y otros] Preparation of alginate/chitosan microcapsules and enteric coated granules of mistletoe lectin. [Publicación periódica] // *Archives of Pharmacal Research*. - 2004. - 1 : Vol. 27. - págs. 118-126.

Mansilla Héctor D., Lizama Cristian y Rodríguez Juan Tratamiento de residuos líquidos de la industria de celulosa y textil [Sección de libro]. - La Plata, Argentina : Editorial Red CYTED VII, 2001.

Martín Villena M. J. [y otros] Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos [Publicación periódica] // *ARS Pharmaceutica*. - 2009. - 1 : Vol. 50. - págs. 43-50.

Matto Mahreen y Husain Qayyum Decolorization of direct dyes by immobilized turnip peroxidase in batch and continuous processes. [Publicación periódica] // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. - 2009. - 3 : Vol. 72. - págs. 965-71. - 1090-2414.

McMullan G. [y otros] Microbial decolourisation and degradation of textile dyes [Publicación periódica] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. - 2001. - 1-2 : Vol. 56. - págs. 81-87.

Mielgo I [y otros] Covalent immobilisation of manganese peroxidases (MnP) from *Phanerochaete chrysosporium* and *Bjerkandera* sp. BOS55 [Publicación periódica] // *Enzyme and Microbial Technology*. - 2003. - 7 : Vol. 32. - págs. 769-775. - 01410229.

Moss G. P. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of

Enzymes by the Reactions they Catalyse [En línea]. - 2012. - <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>.

Mouso Nora, Diorio Luis y Forchiassin Flavia Acción de *Stereum hirsutum* (Wild) Pers. en la degradación de colorantes [Publicación periódica] // Revista Iberoamericana de Micología. - 2007. - Vol. 24. - págs. 294-298.

Piontek Klaus, Antorini Matteo y Choinowski Thomas Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. [Publicación periódica] // The Journal of Biological Chemistry. - 2002. - 40 : Vol. 277. - págs. 37663-37669. - 0021-9258.

Qiu H. J. [y otros] Immobilization of laccase on nanoporous gold: comparative studies on the immobilization strategies and the particle size effects. [Publicación periódica] // Journal of Physical Chemistry A.. - 2009. - Vol. 113. - págs. 2251-2525.

Qiu Lingfeng y Huang Zhixin The treatment of chlorophenols with laccase immobilized on sol-gel-derived silica [Publicación periódica] // World Journal of Microbiology and Biotechnology. - 2009. - 5 : Vol. 26. - págs. 775-781. - 0959-3993.

Quintero Luz y Cardona Santiago Evaluación del tratamiento biológico para remoción de color índigo de agua residual industrial textil [Publicación periódica] // Revista Gestión y Ambiente. - 2011. - 2 : Vol. 14. - págs. 105-113.

Quintero Luz y Cardona Santiago Tecnologías para la decoloración de tintes índigo e índigo carmín [Publicación periódica] // Dyna. - 2010. - 162 : Vol. 77. - págs. 371-386.

Rekuć A. [y otros] Laccase immobilization on the tailored cellulose-based Granocel carriers [Publicación periódica] // International Journal of Biological Macromolecules. - 2008. - Vol. 42. - págs. 208-215.

Rekuć Adriana [y otros] Laccase immobilization on mesostructured cellular foams affords preparations with ultra high activity [Publicación periódica] // Process Biochemistry. - 2009. - 2 : Vol. 44. - págs. 191-198.

Rodríguez Couto S. [y otros] Coating of immobilised laccase for stability enhancement: A novel approach [Publicación periódica] // Applied Catalysis A: General. - 2007. - Vol. 329. - págs. 156-160.

Rogers Alistair y Gibon Yves Enzyme Kinetics: Theory and Practice [Sección de libro] // Plant Metabolic Networks / ed. Schwender Jörg. - New York, NY : Editorial Springer Science, 2009. - 1ª edición.

Ruíz Dueñas Francisco J. [y otros] Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. [Publicación periódica] // Journal of Experimental Botany. - 2009. - 2 : Vol. 60. - págs. 441-452. - 1460-2431.

Ryan S. [y otros] An acid-stable laccase from *Sclerotium rolfsii* with potential for wool dye decolourization [Publicación periódica] // Enzyme and Microbial Technology. - 2003. - 6 : Vol. 33. - págs. 766-774. - 01410229.

Sánchez B. Andrés [y otros] Síntesis y caracterización de hidrogeles de quitosano obtenido a partir del camarón langostino (*Pleuroncodes planipes*) con potenciales aplicaciones biomédicas [Publicación periódica] // Revista Iberoamericana de Polímeros. - 2007. - 4 : Vol. 8. - págs. 241-267.

Sánchez B. Andrés [y otros] Utilización de soportes de hidrogel de quitosano obtenidos a partir de desechos del camarón langostino (*Pleuroncodes Planipes*) para el crecimiento "in vitro" de fibroblastos humanos. [Publicación periódica] // Revista Iberoamericana de Polímeros. - 2007. - 5 : Vol. 8. - págs. 347-362.

Shaffiqu T. [y otros] Degradation of textile dyes mediated by plant peroxidases [Publicación periódica] // Applied Biochemistry and Biotechnology. - 2002. - 1 : Vols. 102-103. - págs. 315-326.

Solís Oba María Myrna [y otros] An electrochemicalspectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediator 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by immobilized laccase. [Publicación periódica] // Journal of Electroanalytical Chemistry. - 2005. - Vol. 579. - págs. 59-66.

Solís Oba María Myrna Estudio del mecanismo de acción del ABTS y la Lacasa para la oxidación de compuestos orgánicos [Informe] : Tesis Doctorado / Departamento de Biotecnología ; Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. - México, D.F. : [s.n.], 2005. - pág. 30.

Van Aken Benoît [y otros] Co-immobilization of manganese peroxidase from *Phlebia radiata* and glucose oxidase from *Aspergillus niger* on porous silica beads [Publicación periódica] // Biotechnology Letters. - 2000. - Vol. 22. - págs. 641-646.

Varnero M. María Teresa, Rojas A. Claudia y Orellana R. Roberto Índice de fitotoxicidad en residuos orgánicos durante el compostaje [Publicación periódica] // Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal. - 2007. - 1 : Vol. 7. - págs. 28-37.

Vaz Domínguez Cristina Inmovilización covalente y orientada de enzima lacasa sobre distintas superficies para su uso como cátodo en pilas de combustible [Informe] : Tesis Doctorado / Departamento de Química Física Aplicada ; Universidad Autónoma de Madrid. - España : [s.n.], 2009. - págs. 7-20.

Vaz Domínguez Cristina Inmovilización covalente y orientada de enzima lacasa sobre distintas superficies para su uso como cátodo en pilas de combustible [Informe] : Tesis Doctorado / Departamento de Química Física Aplicada ; Universidad Autónoma de Madrid. - España : [s.n.], 2009. - págs. 7-20.

Wang Chun-lei [y otros] Isolation and characterization of a novel *Bacillus subtilis* WD23 exhibiting laccase activity from forest soil [Publicación periódica] // African Journal of Biotechnology. - 2010. - 34 : Vol. 9. - págs. 5496-5502.

Wang F. [y otros] Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase by metal affinity adsorption on magnetic chelator particles. [Publicación periódica] // Journal of Chemical Technology and Biotechnology. - 2008. - Vol. 83. - págs. 97-104.

Wesenberg D White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents [Publicación periódica] // Biotechnology Advances. - 2003. - 1-2 : Vol. 22. - págs. 161-187. - 07349750.

Yiu Humphrey H. P. y Wright Paul A. Enzymes supported on ordered mesoporous solids: a special case of an inorganic-organic hybrid [Publicación periódica] // Journal of Materials Chemistry. - 2005. - 35-36 : Vol. 15. - págs. 3690-3700.

Zhang Jianbo [y otros] Removal of 2,4-dichlorophenol by chitosan-immobilized laccase from *Coriolus versicolor* [Publicación periódica] // Biochemical Engineering Journal. - 2009. - 1 : Vol. 45. - págs. 54-59. - 1369703X.

Zhu Y. [y otros] Immobilization of *Trametes versicolor* laccase on magnetically separable mesoporous silica spheres. [Publicación periódica] // Chemistry of Materials. - 2007. - Vol. 19. - págs. 6408-6413.

Zille Andrea [y otros] Immobilized laccase for decolourization of Reactive Black 5 dyeing effluent. [Publicación periódica] // Biotechnology Letters. - 2003. - 17 : Vol. 25. - págs. 1473-1477.

Zucconi F. [y otros] Evaluating toxicity in immature compost. [Publicación periódica] // Biocycle. - 1981. - Vol. 22. - págs. 54-57.