



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA

**Producción de lacasa a partir de hongos
ligninolíticos utilizando vinazas y bagazo de origen
mezcalero**

TESIS

**Para obtener el grado de Maestro en Ciencias: Productos
Naturales y Alimentos**

Presenta:

I.A. Stefi Castillejos Márquez

Director:

Dr. Vania S. Robles González

Co-Director:

Dra. Ileri V. Robles González

Huajuapán de León, Oaxaca. Enero de 2015.

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología del Instituto de Agroindustrias de la Universidad Tecnológica de la Mixteca, bajo la dirección del Dr. Vania Shuhua Robles González y la Dra. Ileri Victoria Robles González. Para el desarrollo de este proyecto se contó con el apoyo económico de PROMEP a través del proyecto con Clave de Registro UTMIX-PTC-035 y con beca CONACYT 484043/288472.

DEDICATORIA

A mis padres Raúl y Bertha por su apoyo, amor, cariño y comprensión de mi ausencia. Por el valor y fuerza que me otorgaron para poder salir adelante.

A mi hermanito Rubert, por su cariño y amor correspondido.

A Héctor, por su gran amor y el apoyo brindado a lo largo del desarrollo de esta tesis.

A mis amigos: Cora, Dess, Mara, Xoch, Chano, Kevin, Cachito y Lau por su motivación y ánimos. A Armando, Evelyn, y Abimael por su apoyo, ayuda y ser grandes amigos siempre. A Vania, que más que asesor, fue un excelente amigo. A Mag y Nan por los ánimos y apoyo.

A mis familiares que siempre estuvieron pendientes de mi desarrollo profesional
Mis abuelas, Mis tíos y Mis primos.

Son parte de lo que me da fuerza para salir adelante, Los quiero muchísimo.

Stf.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, el Dr. Vania Shuhua Robles González, por todos los conocimientos que me transmitió, todas sus enseñanzas y consejos. Por ser un gran amigo y su apoyo incondicional siempre.

A mi Co-directora, la Dra. Ileri V. Robles González, por los conocimientos transmitidos, por su apoyo en la redacción del escrito y consejos.

A mis sinodales, la Dra. Edith G. González Mondragón, por su apoyo en el desarrollo de una parte experimental de la tesis y sus muchos consejos, así como sus comentarios que permitieron mejorar el manuscrito. El Dr. Raúl Salas Coronado y al Dr. Rogelio Valadez Blanco por sus acertados comentarios, consejos y sugerencias que permitieron mejorar el manuscrito de esta tesis.

A CONACYT por la beca otorgada 484043/288472.

A PROMEP por la beca parcial otorgada UTMIX-PTC-035.

ÍNDICE

	Página
Índice de tablas	7
Índice de figuras	8
Abreviaturas	10
Resumen	11
1. Introducción	12
2. Marco teórico	14
2.1 Enzimas	14
2.1.1 Actividad enzimática	14
2.1.2 Clasificación de las enzimas	15
2.1.3 Obtención y producción de enzimas	16
2.2 Hongos ligninolíticos	17
2.2.1 Definición	17
2.2.2 Características	17
2.2.3 Mecanismo enzimático	18
2.2.4 Enzimas ligninolíticas	20
2.2.5 Lacasas	21
2.2.5.1 Mecanismo de reacción	22
2.2.5.2 Aplicaciones	24
2.3 Sustrato utilizado para la producción de enzimas	27
2.3.1 Vinazas de origen mezcalero y bagazo de agave	28
2.3.1.1 Generación de vinazas y bagazo durante el proceso de elaboración del mezcal	28
2.3.1.2 Características fisicoquímicas de las vinazas y bagazo	29
2.3.1.3 Problemas ambientales	30
2.4 Sistemas fermentativos para la producción de enzimas	32
2.4.1 Selección del sistema de fermentación	34
2.5 Inmovilización de hongos ligninolíticos	35
2.6 Purificación de enzimas	36
2.6.1 Membranas de filtración	37
3 Justificación	40
4 Hipótesis	41
5 Objetivos	41

Generales	41
Específicos	41
6. Metas	42
7. Metodología	44
Etapa 1. Caracterización fisicoquímica de la vinaza de origen mezcalero (VM) y bagazo de agave	44
Etapa 2. Evaluación de medios de cultivo para el crecimiento de los hongos ligninolíticos	51
Etapa 3. Evaluación de la actividad de lacasa en las cepas de <i>Pleurotus</i> spp. y <i>Trametes versicolor</i> CDBB-h-1051	53
Etapa 4. Obtención de lacasa mediante fermentación en estado sólido y cultivo sumergido	53
Etapa 5. Purificación parcial de lacasa	57
8. Resultados y discusión	61
9. Conclusiones	80
10. Perspectivas	82
11. Referencias	83
Apéndice	92
Anexo A	101

ÍNDICE DE TABLAS

Nº de Tabla	Página
1. Características generales de las enzimas ligninolíticas	20
2. Aplicaciones de lacasa en la industria textil, papelera y ambiental	25
3. Ventajas y desventajas de la fermentación en estado sólido	33
4. Residuos sólidos empleados para la producción de enzimas en sistema de fermentación en estado sólido	34
5. Características de las operaciones de membranas	38
6. Parámetros determinados en la vinaza de origen mezcalero	62
7. Parámetros determinados en el bagazo de <i>Agave potatorum</i> Zucc y <i>Agave angustifolia</i> Haw	63
8. Actividad enzimática obtenida de las cepas de <i>Trametes versicolor</i> CDBB-h-1051 (Tv) y <i>Pleurotus spp.</i> evaluadas en Caldo Dextrosa Sabouraud 2% (medio C) y Caldo Dextrosa Sabouraud 2% + Extracto de Malta (medio D)	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº de Figura	Página
1. Esquema de acción del sistema ligninolítico en la degradación de lignina	19
2. Estructura de lacasa. Los átomos de cobre son mostrados con esferas amarillas	23
3. Mecanismo de reacción del sitio activo de las lacasas	24
4. Oxidación de subunidades fenólicas de lignina por la acción de lacasa	26
5. Proceso general de producción de mezcal	29
6. Representación esquemática de las formas de operación de las membranas	38
7. Plan general de trabajo	44
8. Pellets dobles formados con polvo de <i>Agave angustifolia</i> Haw–UTMB (a) o <i>Trametes versicolor</i> CDBB-h-1051 (b)	66
9. Cinética de actividad enzimática de lacasa obtenidas empleando pellets dobles formados con polvo de penca de <i>Agave angustifolia</i> Haw y <i>Trametes versicolor</i> CDBB-h-1051 y vinazas mezcaleras diluidas a: 670 mg EF/L (□); 900 mg EF/L (◇); y control (Caldo Dextrosa Sabouraud 2%) (Δ)	67
10. Cinéticas de actividad enzimática de lacasa obtenidas empleando pellets dobles formados con polvo de penca de <i>Agave angustifolia</i> Haw y cepa UTMB y vinazas mezcaleras diluidas a: 670 mg EF/L (□); 900 mg EF/L (◇); y control (Caldo Dextrosa Sabouraud 2% + Extracto de Malta) (Δ)	68
11. Cinética de actividad enzimática de lacasa empleando polvo de <i>Agave potatorum</i> Zucc- <i>Trametes versicolor</i> CDBB-h-1051 (◇) y polvo de <i>Agave angustifolia</i> Haw- <i>Trametes versicolor</i> CDBB-h-1051 (□)	70
12. Cinética de actividad enzimática de lacasa empleando polvo de <i>Agave potatorum</i> Zucc-UTMB (◇) y polvo de <i>Agave angustifolia</i> Haw-UTMB (□)	71
13. Cinética de actividad enzimática de lacasa empleando <i>Trametes versicolor</i> CDBB-h-1051+polvo <i>Agave potatorum</i> Zucc+Caldo Dextrosa Sabouraud 2% (□) y <i>Trametes versicolor</i> CDBB-h-1051+ Caldo Dextrosa Sabouraud 2% (◇)	72
14. Cinética de actividad enzimática de lacasa en fermentación en estado sólido, empleando como humidificador: Caldo Dextrosa Sabouraud 2%	73

(□), vinazas diluidas a: 670 mg EF/L (◇), 900 mg EF/L (Δ), 1300 mg EF/L (○), 1900 mg EF/L (■)

15. Gel de electroforesis SDS-PAGE. Carril E: estándar de pesos moleculares; Carril 1: Muestra purificada parcialmente obtenida a partir de pellets dobles de *Trametes versicolor* CDBB-h-1051+*Agave angustifolia* Haw en Caldo Dextrosa Sabouraud 2%; Carril 2: muestra purificada parcialmente obtenida de la fermentación en estado sólido; Carril 3: muestra purificada parcialmente obtenida de la fermentación en cultivo sumergido 77
16. Zimograma de actividad de lacasa. Carril 1 Muestra purificada parcialmente obtenida a partir de pellets dobles de *Trametes versicolor* CDBB-h-1051+*Agave angustifolia* Haw en Caldo Dextrosa Sabouraud 2%; Carril 2: muestra purificada parcialmente obtenida de la fermentación en cultivo sumergido; 3: muestra purificada parcialmente obtenida de la fermentación en estado sólido 78

ABREVIATURAS

	Abreviatura
Ácido 3, 5- dinitrosalicílico	DNS
Acetileno	Ac
Actividad enzimática de lacasa	AELac
Agar bacteriológico	AB
Aire	A
2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)	ABTS
Bagazo de <i>Agave angustifolia</i> Haw.	Ah
Bagazo de <i>Agave potatorum</i> Zucc	Pz
Caldo Dextrosa Sabouraud 2%	CDS-2%
Conductividad eléctrica	K
Demanda bioquímica de oxígeno	DBO
Demanda química de oxígeno	DQO
Ditiotreitol	DTE
Equivalentes de ácido gálico	EAG
Equivalentes de fructosa	EF
Extracto de Malta	EM
Fermentación en estado sólido	FES
Fermentación en cultivo sumergido	FEC
Gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio	SDS-PAGE
Glutaciona	GSH
1-hidroxibenzotriazol	HBT
Hongo ligninolítico	HL
Lacasa	Lac
Lignino peroxidasa	LiP
Manganeso peroxidasa	MnP
<i>Pleurotus spp.</i>	Ps
Sólidos suspendidos	SS
Sólidos suspendidos fijos	SSF
Sólidos suspendidos volátiles	SSV
Sólidos totales	ST
<i>Trametes versicolor</i> CDBB-h-1051	Tv
Vinazas mezcaleras	VM

RESUMEN

En el presente estudio se llevó a cabo la producción de lacasa mediante el uso de vinazas de origen mezcalero y bagazos de pencas de *Agave potatorum* Zucc (Pz), *Agave angustifolia* Haw (Ah) y los hongos ligninolíticos *Trametes versicolor* CDBB-h-1051 (Tv) y *Pleurotus spp.* (Ps); en sistemas de fermentación en cultivo sumergido (FCS) y estado sólido (FES). Las condiciones óptimas para la producción de lacasa en FCS consistió en el uso de pellets formados con Ah-Tv y vinazas mezcaleras diluidas a una concentración de azúcares reductores de 900 mg EF /L, obteniéndose al día 15 una AELac de 2485 UI/L. Las condiciones óptimas para la producción de lacasa en FES, fueron al día 12 de fermentación, utilizando la cepa Tv y el bagazo de la penca de Pz, obteniéndose una actividad enzimática de lacasa (AELac) de 1389 UI/L. Posteriormente, la lacasa obtenida a partir de FCS y FES se sometió a separación y purificación parcial mediante membranas de micro- y ultrafiltración. EL uso SDS-PAGE permitió la identificación de cuatro bandas intensas, dos de las cuales tuvieron pesos moleculares de 100 kDa y entre 75-50 kDa. El zimograma constató la presencia de al menos dos bandas con actividad de lacasa, lo cual podría corresponder a la presencia de isoenzimas producidas por *Trametes versicolor* CDBB-h-1051. El zimograma apoyó lo observado en los resultados obtenidos de AELac determinadas en las FCS y FES. Se concluyó que las vinazas y el bagazo de origen mezcalero sirvieron como sustratos alternativos para la producción de lacasa.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad el uso de enzimas a nivel industrial se ha incrementado. Una enzima de alto interés es la lacasa, debido a sus aplicaciones en la industria alimentaria, textil, papelería y ambiental, entre otras. Algunas aplicaciones en la industria de los alimentos son, *i*) Estabilidad de vinos y cerveza (Giovanelli, 1989; Mathiasen, 1995; Mc Murrough *et al.*, 1999; Conrad *et al.*, 2000), *ii*) clarificante en jugos de frutas (Cantarelli, 1986; Siebert, 1999), y *iii*) mejorador de la calidad de la masa en panadería, (Si, 1994; Selinheimo *et al.*, 2006; Renzetti *et al.*, 2010). De igual manera, es considerada una enzima verde porque cataliza la oxidación de sustratos utilizando oxígeno molecular como último aceptor de electrones y teniendo como producto final agua (Osma *et al.*, 2010). La lacasa está ampliamente distribuida en plantas, bacterias y hongos; de acuerdo con la literatura, la mayor parte de lacasa ha sido producida por hongos ligninolíticos. (Kahramana y Yesilada, 2003; Giardina *et al.*, 2010; Tišma *et al.*, 2012).

La aplicación industrial de lacasa se ha visto limitada debido a su alto costo de producción. Un factor que contribuye en ese aumento, es el sustrato utilizado para el microorganismo productor de la enzima (Osma *et al.*, 2011). Por tal motivo en los últimos años se ha optado por utilizar desechos agroindustriales como sustratos alternativos.

Se han realizado estudios empleando diversos desechos agroindustriales para la producción de lacasa mediante procesos de fermentación en estado sólido y en cultivo sumergido, observándose resultados favorables. Algunos de los sustratos líquidos que se han empleado son melazas, vinazas procedentes de la fermentación de caña de azúcar, residuos de la elaboración de aceite de oliva y suero de lácteo (Ramirez *et al.*, 2003; Boran y Yesilada, 2011; Sun *et al.* 2013); y como sustratos sólidos se han utilizado al salvado de trigo, rastrojo de trigo, caña de azúcar, harina de colza (Aguiar *et al.*, 2010; Boran y Yesilada, 2011; Chen *et al.*, 2011; Khalil *et al.*, 2011).

A nivel nacional el consumo de bebidas alcohólicas como el mezcal y el tequila ha ido en incremento (COMERCAM, 2013), y por lo tanto los desechos generados en su producción. Estos desechos son las vinazas y el bagazo, las primeras contienen azúcares remanentes de la fermentación, nitrógeno, ácidos fenólicos y pH bajos. Por su parte el bagazo es un residuo ligninolítico en cuya composición se ha reportado la presencia de fructanos, fibra, celulosa, hemicelulosa y lignina, así como compuestos fenólicos, los cuales pueden ser utilizados como sustrato para el crecimiento de hongos ligninolíticos y para la producción de enzimas ligninolíticas como lacasa.

Debido a lo anterior, en el presente trabajo se produjo lacasa mediante dos sistemas de fermentación. El primero consistió en fermentación en cultivo sumergido empleando pellets dobles formados por bagazo *Agave angustifolia* Haw y los hongos *Trametes versicolor* CDBB-h-1051 ó *Pleurotus spp.* Y el segundo sistema utilizado fue fermentación en estado sólido utilizando al los bagazos *Agave angustifolia* Haw y *Agave potatorum* Zucc y a los hongos *Trametes versicolor* CDBB-h-1051 y *Pleurotus spp.* en su forma libre. De igual manera, se realizó la purificación parcial de lacasa mediante el uso de membranas de micro- y ultrafiltración.

2. MARCO TEÓRICO

En esta sección se describirá de manera general el proceso de producción de enzimas, se expondrán los conceptos más relevantes para entender el trabajo realizado y se mostrarán algunos trabajos para la producción de lacasa reportados en los últimos años.

2.1 Enzimas

Las enzimas son proteínas que cuentan con un sitio catalítico en su estructura, lo cual les confiere actividad enzimática atribuida a su capacidad de disminuir la energía de activación en una reacción. Esta acción enzimática ocurre por la formación del complejo enzima-sustrato. Una característica propia de las enzimas es su especificidad, de la cual existen diferentes grados desde la absoluta que son específicas para un solo sustrato o relativas las cuales reconocen a un grupo funcional como sustrato (Crestini y Argyropoulos, 1998; Pickard *et al.*, 1999). El sustrato es la sustancia sobre la que actúan las enzimas y tiene mucha relación con la especificidad. Cuando las enzimas son multisustrato la especificidad es relativa hacia todos ellos, como en el caso de las deshidrogenasas, algunas peroxidasas o kinasas. Algunas enzimas provenientes de la misma fuente llevan a cabo la catálisis de las mismas reacciones a pesar de que sus estructuras son diferentes, a estas enzimas se les denomina isoenzimas. Para algunas enzimas es necesario un componente adicional para llevar a cabo la reacción, al cual se le denomina coenzima, teniendo algunas de ellas la capacidad de regresar a su estado natural una vez terminada la reacción (Battaner, 2009).

2.1.1 Actividad enzimática

La actividad enzimática es la velocidad con la que ocurre una reacción que ha sido catalizada, y se puede determinar midiendo la cantidad de sustrato que se consume o la cantidad de producto formado por unidad de tiempo. La velocidad de una reacción enzimática es directamente proporcional a la concentración de enzima, por tanto es una medida para determinar la cantidad de enzima que está presente en un medio. La actividad enzimática se expresa en unidades de

velocidad, habiendo dos principalmente, *i*) Unidad internacional (UI) que es la actividad enzimática que transforma un μmol de sustrato por minuto a $25\text{ }^\circ\text{C}$; y *ii*) Katal (Kat) es la actividad enzimática que transforma un mol de sustrato por segundo, habiendo una equivalencia entre ellas de $1\text{ kat} = 6 \times 10^7\text{ UI}$. Dada la proporción de la actividad enzimática con la concentración de enzimas, esta última puede expresarse como UI/L o kat/L (Battaner, 2009).

La actividad enzimática puede ser afectada por agentes externos, los cuales la disminuyen o la anulan. Algunos factores son los inhibidores que pueden ser irreversibles o reversibles, la concentración del sustrato, concentración de producto, temperatura, pH y fuerza iónica. Por otro lado existen los activadores, que son sustancias que incrementan la actividad de una enzima, haciendo así más rápida la reacción que se está catalizando.

2.1.2 Clasificación de las enzimas

Las enzimas se clasifican de acuerdo al tipo de reacciones que catalizan, y existen 6 grupos principales:

- Oxidoreductasas: Transferencia de electrones (iones hidruro o átomos H).
- Transferasas: Transferencia de grupos de una molécula a otra.
- Hidrolasas: Reacciones que implican la ruptura hidrolítica de enlaces químicos.
- Liasas: catalizan la ruptura de enlaces C-C, C-S y algunos C-N, excluyendo enlaces peptídicos.
- Isomerasas: Transforman los sustratos de una forma isomérica en otra.
- Ligasas: Catalizan la formación del enlace entre C y O, S, N y otros átomos.

Las enzimas se encuentran en todos los seres vivos participando en las reacciones del metabolismo (Jegannathan y Nielsen, 2013). Las plantas y los animales han sido fuente tradicional de enzimas, sin embargo, debido a que las aplicaciones industriales de las enzimas requieren que estas sean producidas a

gran escala se ha incrementado el uso de enzimas producidas por microorganismos (Eliéser, 2003).

2.1.3 Obtención y producción de enzimas

Las enzimas pueden obtenerse y producirse de diversas fuentes, a nivel industrial generalmente se utilizan hongos y bacterias debido a que se pueden alcanzar grandes producciones y son fuente de una gran diversidad de enzimas que suelen utilizarse (Santos *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013). Algunas enzimas utilizadas son costosas, por ejemplo la celulasa tiene un precio de venta de US\$12/Kg grado industrial y de US\$206-2000/g como enzima purificada (Robles-González *et al.*, 2012); por otro lado, la lacasa llega a tener un costo de US\$140-292/g de enzima pura (www.sigmaaldrich.com; Osma *et al.*, 2011).

Dentro de los factores que afectan el costo total de la enzima podemos mencionar los siguientes, *i*) medio de cultivo, *ii*) gastos de operación (cultivo o incubación), *iii*) equipo utilizado, y *iv*) gastos de producción (extracción, separación y purificación de la enzima) (Osma *et al.*, 2011). Un factor importante a tomar en cuenta en el proceso de producción de enzimas, es el sustrato o medio de cultivo utilizado debido a que se le atribuye una alta influencia en el costo final de la enzima (Hareshk y Dattam, 2002; Castillo, 2005; Osma *et al.*, 2010). Por tal motivo, se han buscado sustratos más económicos para disminuir su costo de producción y como consecuencia su costo de venta (Kahraman y Yesilada, 2001; Pant y Adholeya, 2007; Osma *et al.*, 2011). Por lo anterior, en los últimos años ha incrementado el interés en utilizar residuos industriales (sueros, colorantes, vinazas, aguas negras, etc.) como sustratos para aplicaciones biotecnológicas. Sin embargo, sólo algunos microorganismos como los hongos de putrefacción blanca u hongos ligninolíticos cuentan con un complejo enzimático que les permite utilizar como fuente de carbono y energía a este tipo de residuos de naturaleza recalcitrante (Takemori *et al.*, 1992; Archibald *et al.*, 1997; Dellamatrice *et al.*, 2005).

2.2 Hongos ligninolíticos

2.2.1 Definición

Los hongos ligninolíticos u hongos de putrefacción blanca se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza; pueden vivir en ambientes húmedos y secos; su temperatura óptima de crecimiento varía entre 20 y 30 °C. Los hongos ligninolíticos tienen una función importante en la naturaleza porque ayudan a la descomposición de la materia orgánica mediante la hidrólisis de sustratos por medio de su sistema enzimático, para posteriormente absorberlos a través de su fina pared celular (Archibald *et al.*, 1997).

2.2.2 Características

La mayoría de los hongos ligninolíticos pertenecen al grupo *Basidiomycetes*, estos organismos pueden causar la degradación simultánea de la lignina y de polisacáridos de la pared celular de los sustratos (Kahraman y Yesilada, 2003; Tišma *et al.*, 2012). Al degradar la lignina, estos hongos consiguen acceso a la celulosa y hemicelulosa, que aprovechan como fuente de carbono y energía (Homolka *et al.*, 1997; Mickiashvili *et al.*, 2006). Este tipo de hongos contienen un sistema enzimático extracelular único y con especificidad relativa.

El mecanismo para la degradación de lignina tiene como base la producción de radicales libres como activadores, lo que permite que estas enzimas sean catalíticamente activas sobre una gran diversidad de sustratos orgánicos, lo cual les confiere un uso potencial en diferentes áreas como industria, alimentaria, farmacéutica, ambiental, textil y papelera (Mendonça *et al.*, 2010; Gedikli *et al.*, 2010).

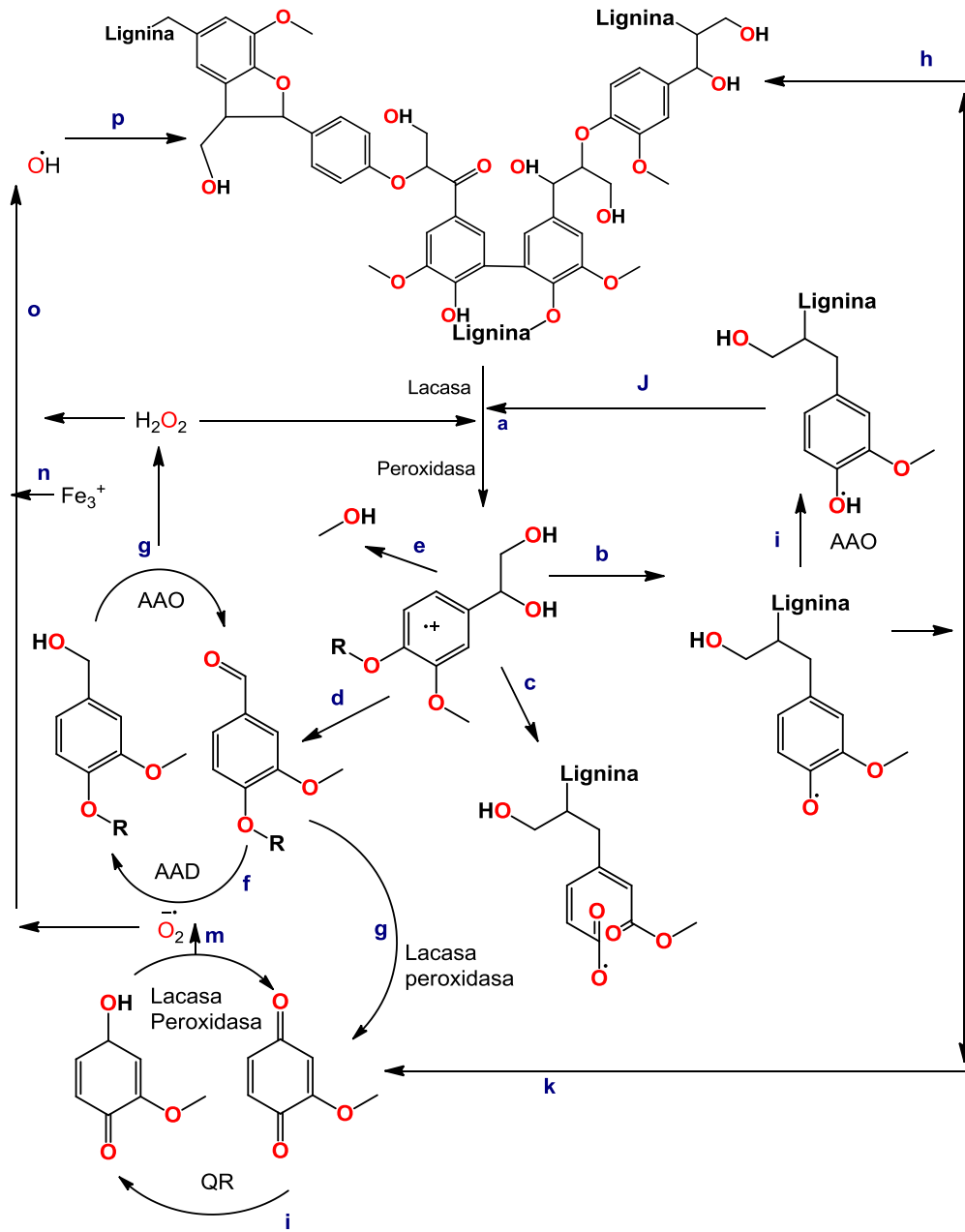
Los hongos ligninolíticos se han empleado para la producción de enzimas utilizando residuos industriales y agroindustriales, debido a que cuentan con un complejo enzimático que les permiten degradar sustratos complejos. Algunas de las cepas que han sido usadas son *Trametes versicolor*, *Pleurotus spp.*, *Trametes*

multicolor, *Pleurotus sajor caju* (Leitner *et al.*, 2002; Kahraman y Yesilada, 2003; Giardina *et al.*, 2010; Tišma *et al.*, 2012).

2.2.3 Mecanismo enzimático

Los mecanismos enzimáticos utilizados para la degradación de la lignina son oxidativos y producen radicales libres, los cuales al ser muy reactivos, reaccionan entre sí volviéndose a polimerizar, iniciándose reacciones que pueden seguir cualquier camino sin control, a lo cual se le denomina “combustión enzimática” (Kirk y Farrel, 1987). Dentro de las enzimas de los hongos ligninolíticos se encuentran las peroxidasa, que contienen un grupo hemo lignino peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP), estas enzimas reducen al oxígeno para la producción de peróxido de hidrógeno. Otra enzima que forma parte del mecanismo de degradación es la lacasa, la cual reduce el oxígeno disuelto en agua y oxida sustratos fenólicos formando radicales catiónicos, quinonas o radicales fenóxilo (Archibald *et al.*, 1997; Osma *et al.*, 2010).

En el proceso de degradación de lignina, la LiP, en presencia de peróxido de hidrógeno, tiene la capacidad de tomar los electrones de la molécula de lignina para crear un radical catión que a continuación inicia una reacción oxidativa que resulta en la oxigenación y la despolimerización de la lignina. La MnP, oxida al Mn (II) a Mn (III), el cual tiene la capacidad de difundirse en la estructura de la lignina y de iniciar el proceso de oxidación. La lacasa, una fenol oxidasa que no requiere de peróxido de hidrógeno como activador para degradar directamente a la lignocelulosa, ataca a los grupos fenólicos de la lignina e inicia un proceso de oxidación (Figura 1).



Nota: AAO: Aril alcohol oxidasa; AAD: Aril alcohol .deshidrogenasa; QR: Quinona reductasa. Letra de a-p: vías de formación de productos.

Figura 1. Esquema de acción del sistema ligninolítico en la degradación de lignina (Gutiérrez y Martínez, 1996)

2.2.4 Enzimas ligninolíticas

Las enzimas ligninolíticas son producidas por el hongo cuando éste se encuentra en un medio con limitaciones de carbono y nitrógeno (Sathiya *et al.*, 2007). Como se mencionó anteriormente, se han descrito tres enzimas ligninolíticas que son producidas por los hongos de la pudrición blanca: lignino-peroxidasa (LiP), manganeso-peroxidasa (MnP) y lacasa (Lac). En la Tabla 1 se muestra un resumen de sus características generales.

Tabla 1. Características generales de enzimas ligninolíticas

Características de las enzimas	MnP ¹ (1.11.1.13) Mn(II): H ₂ O ₂ oxidoreductasa	LiP ¹ (1.11.1.14) diarilpropano O ₂ H ₂ O ₂ oxidoreductasa	Lac ^{2,3} (1.10.3.2) p- benzodiol O ₂ Oxidoreductasa
Grupo proteico	Hemo (Fe II)	Hemo (Fe II)	Cobre I,II=I Cobre III=2
PM (KDa)	32- 62.5	38 – 47	60 – 100
Punto isoeléctrico	2.8 – 7.2	3.2 – 4.7	3- 7
pH	2.6 – 4.5	2.0 – 5.0	2.0 – 8.5
Productoras de H ₂ O ₂	Si	Si	No
Sustrato	Mn ²⁺	Amplia, aromáticos incluidos, no fenólicos	Amplia, fenólicos

Referencias: ¹Yadav *et al.*, 2009; ²Osma *et al.*, 2010; ³Madhavi y Lele, 2006.

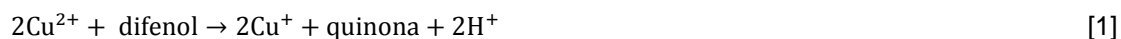
De las enzimas ligninolíticas, la LiP y MnP son peroxidases ligninolíticas que tienen en común la estructura de su grupo prostético presente en el centro activo (grupo hemo o férrico protoporfirina). Sin embargo, difieren en el sustrato sobre el que actúan, siendo la LiP una enzima con especificidad relativa que oxida compuestos aromáticos de alto potencial redox tales como el alcohol veratrílico, metoxibencenos y modelos diméricos no fenólicos de lignina (Hammel *et al.*, 1985). Mientras que la MnP es específica en sus sustratos reductores, siendo el Mn²⁺ el único capaz de completar eficientemente su ciclo catalítico (Zhang *et al.*,

2006). Ambas enzimas peroxidadas son productoras de peróxido de hidrógeno durante su ciclo de acción (Bonugli-Santos *et al.*, 2011). Por su parte la lacasa es una oxidoreductasa que se distingue de las peroxidadas debido a que produce agua en lugar de peróxido de hidrógeno en su ciclo catalítico (Osma *et al.*, 2010).

Las enzimas ligninolíticas pueden actuar separadas o formando un complejo, lo cual dependerá de la capacidad de HL para producirlas y dada la especificidad relativa que presentan, tienen un alto potencial de aplicaciones. Sin embargo, se ha encontrado que la lacasa es la que realiza la acción principal en las aplicaciones del complejo y por tanto ha incrementado el interés por esta enzima (Arora y Kumar, 2010).

2.2.5 Lacasas

Las lacasas, bencenodiol: oxígeno oxidoreductasas (EC 1.10.3.2), son enzimas multicobre con actividad fenoloxidasas. Se distinguen de la mayoría de las fenoloxidasas debido a que en la reducción del oxígeno producen agua en lugar de peróxido de hidrógeno. (Ecuaciones 1 y 2) (Latour, 1988; Yaropolov *et al.*, 1994).



Las lacasas son enzimas glicosiladas, pueden provenir principalmente de algunos hongos, plantas y bacterias. Las funciones biológicas de las lacasas en los hongos ligninolíticos se relacionan con la morfogénesis, la pigmentación de los conidios, la formación de rizoforos, el desarrollo de cuerpos fructificantes y la protección frente a compuestos fenólicos tóxicos liberados durante la degradación de la lignina (Archibald *et al.*, 1997). La mayoría de las lacasas tiene un peso molecular de entre 60-100 kDa (Madhavi y Lele, 2006; Marugesan *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2007; Osma *et al.*, 2010). Del 10 al 50% del peso molecular es atribuido a la

glicosidación, siendo la manosa el carbohidrato que comúnmente se encuentra unido a dichas enzimas. El contenido de carbohidratos está relacionado con la estabilidad estructural de la enzima y con su protección frente a procesos de proteólisis e inactivación por radicales (Yoshitake *et al.*, 1993; Ko *et al.*, 2001).

Las lacasas son enzimas termoestables, el intervalo óptimo de temperaturas varía entre 50 y 70°C (Morozova *et al.*, 2007b). Poseen un punto isoeléctrico entre 2.6-4.5 y presentan actividad en un intervalo de pH entre 2.0 y 8.5 (Thurston, 1994; Leonowicz *et al.*, 2001; Morozova *et al.*, 2007b). Catalizan la oxidación de sustratos, como compuestos fenólicos (*orto* y *para* difenoles, metoxifenoles, etc.), aminas aromáticas (Yaropolov *et al.*, 1994; Collins y Dobson, 1997), iones inorgánicos (Morozova *et al.*, 2007a) e incluso pueden llevar a cabo desmetilaciones (Kirk *et al.*, 1987) y deshalogenaciones en el caso de compuestos sustituidos. Algunos autores reportan que pueden llegar a oxidar compuestos no fenólicos ante la presencia de mediadores como complejos de elementos de transición (octocianomolibdato de potasio o octanocianotungsteno); complejos de Fe^{II} con O-fenantrolina y 4,4-dimetilbipiridina; o sustratos orgánicos de la lacasa como el ABTS (2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), HBT (1-hidroxibenzotriazol) o TMPO (2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy) (Crestini y Argyropoulos, 1998; Pickard *et al.*, 1999; Morozova *et al.*, 2007a).

2.2.5.1 Mecanismos de reacción

Las lacasas son *p*-difenol oxidoreductasas que contienen átomos de cobre en su centro activo (Figura 2).

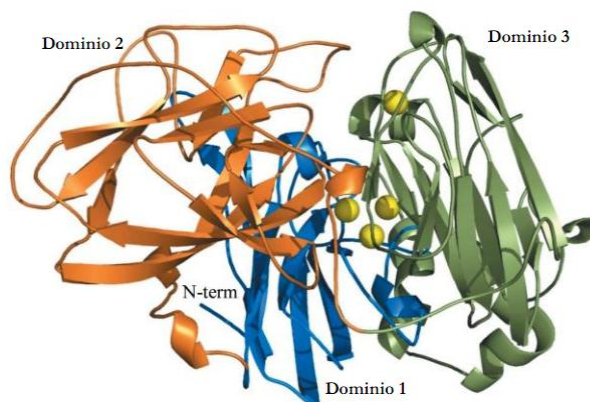


Figura 2. Estructura de lacasa. Los átomos de cobre son mostrados con esferas amarillas (Lyashenko *et al.*, 2006)

Los átomos de cobre presentes en el centro activo de las lacasas se clasifican en tres tipos (1, 2 y 3) y se sabe cual es el papel dentro de la estructura de la enzima (Leontievsky *et al.*, 1997):

- i)* Cobre tipo 1 (T1): responsable del color azul de la enzima. Absorbe en la región del visible (605 nm) causada por el enlace covalente cobre-cisteína. Este cobre es el sitio donde ocurre la oxidación del sustrato.
- ii)* Cobre tipo 2 (T2): Tiene afinidad por aniones (F^{-1} , CN^{-1}) que actúan como inhibidores de la actividad de la enzima. No presenta absorbancia en la región visible.
- iii)* Cobre tipo 3 (T3): es un complejo formado por un par de iones Cu^{2+} - Cu^{2+} los cuales están enlazados a través de un grupo hidróxilo que cumple la función de puente. Absorbe a 330 nm dada la presencia del grupo hidróxilo.

El mecanismo de reacción de la lacasa es la siguiente, los cobres T2 y T3 forman un grupo de átomos de cobre, en este lugar se reduce al oxígeno molecular presente en el medio. El cobre del centro de sitio T1 es el primer aceptor de electrones del sustrato. Después, los electrones se transfieren al centro T2-T3, los cuales al recibir cuatro electrones reducen una molécula de oxígeno a agua (Figura 3).

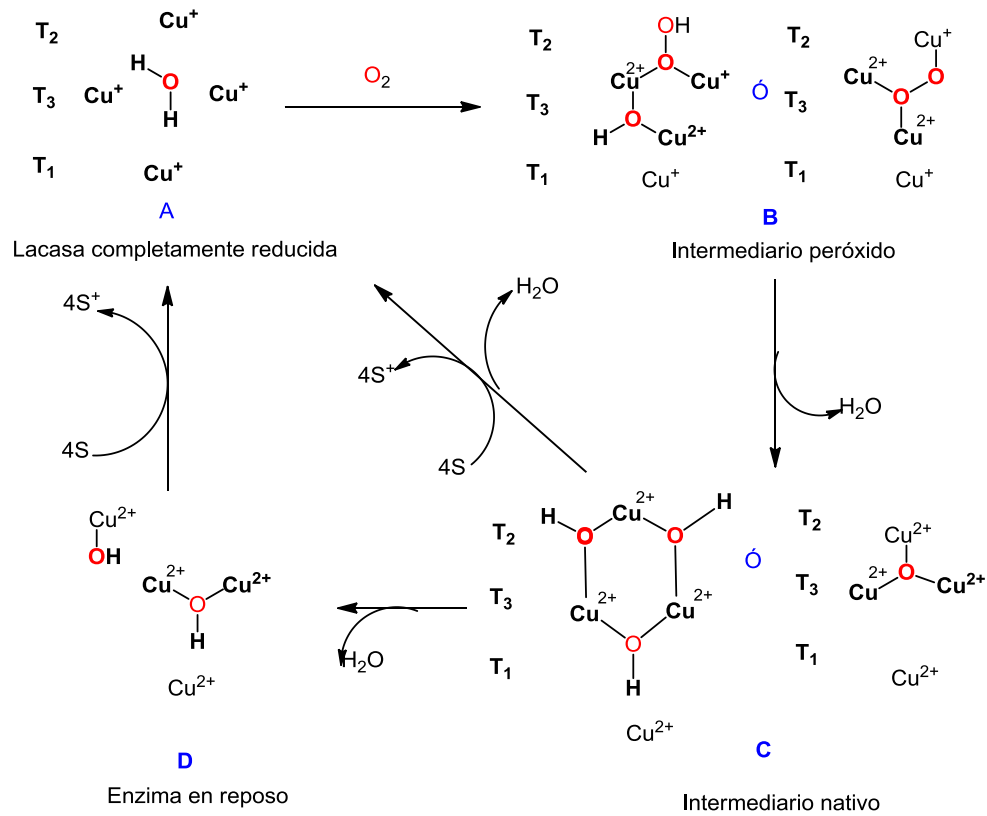


Figura 3: Mecanismo de reacción del sitio activo de las lacasas (Shleev *et al.*, 2006). S: Sustrato

2.2.5.2 Aplicaciones

Las lacasas son enzimas versátiles, catalizan reacciones de oxido-reducción de la cual surgen todas sus aplicaciones (Mayer y Staples, 2002). Son catalogadas como enzimas de alto interés en la biotecnología industrial y ambiental dada su especificidad sobre diversos sustratos (Osma *et al.*, 2011).

En la Tabla 2 se muestran algunas aplicaciones de la lacasa en la industria textil, papelera y ambiental.

Tabla 2. Aplicaciones de lacasa en la industria textil, papelera y ambiental

Aplicaciones	Ref.
Despolimerización de la lignina	
Deslignificación de pastas de madera	1, 2, 3, 4, 5
Blanqueo de pastas Kraft	
Degradación de blanqueo de colorantes textiles	6, 7, 8
Biodegradación de hidrocarburos xenobióticos aromáticos policíclicos.	9, 10

Referencias: ¹Archibald *et al.*, 1997; ²Lund y Ragauskas, 2001; ³Ubasart *et al.*, 2011; ⁴Martín y Gutiérrez, 2011; ⁵Oriol *et al.*, 2013. ⁶Mc Kay, 1979; ⁷Cripps *et al.*, 1990; ⁸Cooper, 1993; ⁹Pointing, 2001; ¹⁰Bamforth y Singleton, 2005.

En la industria papelera, la lacasa, se utiliza principalmente para la despolimerización de la lignina. Esta acción se lleva a cabo mediante el ataque a subunidades fenólicas de la lignina (Figura 4).

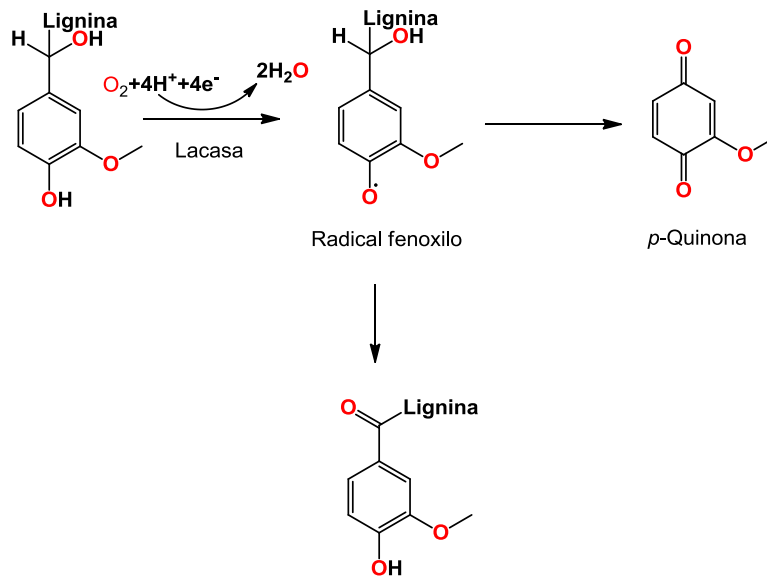


Figura 4. Oxidación de subunidades fenólicas de lignina por la acción de lacasa (Archibald *et al.*, 1997)

En la industria textil, ésta enzima, se utiliza ampliamente para la remoción de colorantes; debido a que algunos de ellos son compuestos polifenólicos, y por lo tanto sustratos para la lacasa (Archibald *et al.*, 1997; Reyes *et al.*, 1999).

En la industria alimentaria, diversos alimentos y bebidas contienen fenoles que pueden servir como sustratos para la lacasa. De esta forma, se pueden obtener productos alimenticios modificados por lacasa logrando así nuevos productos (Minussi *et al.*, 2002; Kirk *et al.*, 2002). Cabe resaltar que la lacasa es considerada como aditivo generalmente reconocido como seguro (GRAS, por sus siglas en inglés) (FAO, 2014).

Algunas aplicaciones de la lacasa en la industria alimentaria son las siguientes. En la industria vinícola, la función principal de la lacasa, es la oxidación de los polifenoles, reduciendo el sabor a corcho y/o astringencia en los vinos embotellados y añejados (Conrad *et al.*, 2000). En la industria cervecera y de jugos se utiliza como clarificante, ya que las principales sustancias que causan turbidez son compuestos polifenólicos. La lacasa tiene la capacidad de formar complejos de compuestos fenólicos, precipitándolos y facilitando su eliminación

(Giovanelli, 1989, Cantarelli, 1986; McMurrough *et al.*, 1999; Mathiasen, 1995; Siebert, 1999). En panadería, la lacasa mejora la calidad de la masa al actuar sobre el arabinoxilano y el ácido ferúlico rompiendo el enlace cruzado entre ellos (Si, 1994; Selinheimo *et al.*, 2006., Renzetti *et al.*, 2010). También, la lacasa actúa en el mejoramiento de los parámetros sensoriales para el control de olores, el mejoramiento del sabor y la reducción de compuestos indeseables como compuestos fenólicos o ácidos grasos oxidados. Otra aplicación de la lacasa, es en el mejoramiento sensorial de productos ricos en ácidos grasos como el cacao y el aceite de soya (Takemori *et al.*, 1992; Petersen y Mathiasen, 1996); en estas sustancias la enzima realiza reacciones de desoxigenación, en donde utiliza al oxígeno como su último aceptor de electrones para catalizar las reacciones de óxido-reducción (Kuuva *et al.*, 2003). Por otro lado debido a su alto potencial redox la lacasa ha sido utilizada como biosensor (Arora y Kumar, 2010).

2.3 Sustrato utilizado para la producción de enzimas

Uno de los parámetros a considerar para la obtención de enzimas, es el sustrato, el cual debe proporcionar una fuente óptima de carbono y nitrógeno para el crecimiento de cada microorganismo. Los medios comerciales comunmente empleados para el crecimiento de microorganismos productores de enzimas son, medio Tien y Kirk (Dominguez *et al.*, 2007; Silvério *et al.*, 2013), Caldo Papa Dextrosa (Pant y Adholeya, 2007; Li-Qiong *et al.*, 2011), y medios complejos sintéticos (Salony *et al.*, 2006; Téllez-Téllez *et al.*, 2008), los cuales tienen constituyentes que suelen tener un costo elevado. Por lo que en los últimos años se ha optado por el uso de sustratos alternativos como son los residuos provenientes de la industria textil, aguas residuales y sólidos agroindustriales. Estos residuos son de interés a nivel mundial debido a que muchos de sus componentes orgánicos pueden ser utilizados como sustrato para el crecimiento de microorganismos productores de enzimas (Moldes *et al.*, 2003; Strong, 2010; Saval, 2012).

2.3.1 Vinazas de origen mezcalero y bagazo de agave

Las vinazas y el bagazo son residuos agroindustriales provenientes de la producción de mezcal. El estado de Oaxaca produce el 60% de mezcal de todo el país. En el año 2013 se produjeron 4,067,969 litros de mezcal certificado (COMERCAM, 2013), los cuales durante su procesamiento generaron más 81 millones de kilogramos de bagazo y 61 millones de litros de vinazas. Este tipo de residuos pueden ser utilizados como sustrato para el crecimiento de hongos ligninolíticos para la producción de enzimas ligninolíticas como la lacasa. Estos usos se atribuyen debido a la presencia de azúcares como fuente de carbono para los HL y compuestos fenólicos; los cuales, se ha reportado que tienen un efecto inductor sobre la producción de lacasa (Gedikli *et al.*, 2010).

2.3.1.1 Generación de vinazas y bagazo durante el proceso de elaboración de mezcal

Las vinazas se definen como los residuos líquidos remanentes en la etapa de la destilación de los azúcares fermentados provenientes de melazas, caña de azúcar, jugos de uva, agave, etc. (Robles-González *et al.*, 2012). El proceso de elaboración del mezcal se realiza en cuatro etapas, cocción, molienda, hidrólisis, fermentación y destilación (Figura 5). En esta última etapa se obtiene como subproducto a las vinazas. El bagazo de agave es el residuo sólido obtenido de las operaciones de molienda (después de la extracción de los jugos) y del troceado (Duran y Pulido, 2007).

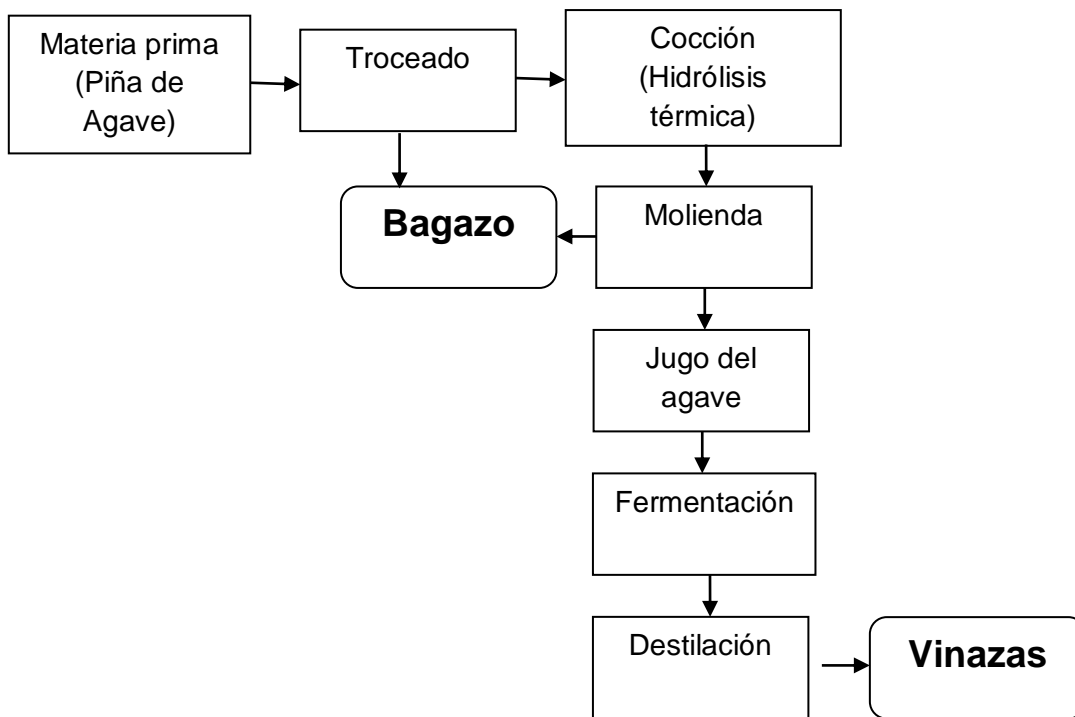


Figura 5. Proceso general de producción de mezcal (Robles-González *et al.*, 2012)

2.3.1.2 Características fisicoquímicas de las vinazas y bagazo

Las vinazas presentan una composición variada que depende de la materia prima empleada para la fermentación, así como de otros aspectos del proceso de producción como las aguas de lavado para la limpieza de los fermentadores y destiladores y las aguas de enfriamiento o aguas de condensación (Duarte *et al.*, 1997). Las vinazas se caracterizan por tener concentraciones de materia orgánica altas expresada como demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y demanda química de oxígeno (DQO), que pueden tomar valores en intervalos de 35,000 a 50,000 mgO₂/L y de 70,000 a 150,000 mg O₂/L, respectivamente (Madejón *et al.*, 2001; Nandy *et al.*, 2002; Sangave *et al.*, 2007), pH ácidos de 3.5 a 4.0, presencia de compuestos fenólicos 478-541 mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/L (Sales *et al.*, 1987; Capasso *et al.*, 1992); cenizas 1,550–2,000 mg/L, sólidos disueltos (el 50% de estos sólidos corresponde a azúcares reductores) (Sangave *et al.*, 2007b), compuestos no volátiles del caldo de fermentación, concentraciones altas de sales minerales (Robles-González *et al.*, 2012), conductividad electrolítica alta (250-300

dS m⁻¹) y fuerte coloración marrón oscuro por la presencia de melanoidinas (García *et al.*, 1997; Jiménez *et al.*, 2003; Peña *et al.*, 2003; Coca *et al.*, 2005).

Algunas características de las vinazas como el contenido de fenoles y el pH ácido, pueden favorecer la producción de enzimas de interés industrial como la lacasa, utilizando hongos ligninolíticos. Los hongos ligninolíticos poseen un sistema enzimático extracelular que les permite utilizar como sustrato medios recalcitrantes como este residuo agroindustrial (Gedikli *et al.*, 2010).

Por otra parte, dentro de los residuos sólidos orgánicos, los residuos ligninolíticos son los que en mayor cantidad se producen a nivel mundial (Tengerdy y Szakacs, 2003). De manera general están constituidos principalmente de 50% de celulosa, y el otro 50% de hemicelulosa y lignina (Bisaria 1998; Pandey *et al.*, 2000a, b). Dentro de los residuos ligninolíticos, se encuentra el bagazo de agave en cuya composición se ha reportado la presencia de fructanos (López y Urias-Silva, 2007), fibra, celulosa, hemicelulosa y lignina (Greene, 1932; López y Urias-Silva, 2007; García-Reyes y Rangel- Méndez, 2009); compuestos fenólicos (Elisashvili *et al.*, 2010), saponinas (Díaz *et al.*, 2013), cenizas (6.0% y 7.4%) (Li *et al.*, 2012; Liñan-Montes *et al.*, 2014) y la presencia de Cu, Zn y Ca (Liñan-Montes *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que para la producción de enzimas algunos compuestos pueden servir como inductores; en el caso de la lacasa, la presencia de fenoles, Cu y lignina pueden estimular su producción e inclusive llegar a incrementarla (Elisashvili *et al.*, 2006).

2.3.1.3 Problemas ambientales

La descarga de vinazas al ambiente sin ningún tratamiento previo altera la composición química y física de los suelos, debido a los niveles altos de salinidad (250-300 dS/m) y los contenidos altos de fósforo (0.06 g/kg) de este efluente. Además, los sólidos suspendidos presentes pueden azolver los suelos provocando en ellos una menor permeabilidad, lo que favorece la presencia de fermentaciones anaerobias que generan olores desagradables y la re-movilización de metales

pesados previamente presentes en el suelo. Así mismo, la presencia de compuestos fenólicos y polifenólicos de naturaleza ácida en las vinazas, puede provocar inhibición en la germinación de semillas y daños a los cultivos, así como efectos negativos en la actividad microbiológica del suelo (Kannabiran y Pragasam, 1993; Díaz *et al.*, 2002). García *et al.* (1997) demostraron que el bajo pH (pH=2) que presentan las vinazas ésta asociado a la remoción de metales pesados en el suelo.

También, estos residuos pueden incrementar la temperatura de los cuerpos receptores (suelo o aguas), debido a que la temperatura a la cual son vertidas oscila entre los 50 y 90°C, lo que provoca la disminución de la solubilidad de oxígeno, que es un parámetro crítico para los sistemas acuáticos (Jiménez *et al.*, 2005; Mane *et al.*, 2006). Además, la turbidez en las vinazas provocada por los sólidos suspendidos y su coloración café oscuro pueden restringir la penetración de la luz, provocando una reducción de la oxigenación del agua por la inhibición de la fotosíntesis, lo que trae como consecuencia daño a la vida acuática (Fitzgibbon *et al.*, 1995). Las cargas orgánicas e inorgánicas altas de las vinazas pueden causar en los diferentes cursos de agua, la presencia de canales o ríos de compuestos orgánicos putrescibles (como compuestos sulfurados) con olores desagradables (Pant y Adholeya, 2007b). La concentración relativamente alta de nutrientes de P y N en las vinazas puede causar eutrofización en los cuerpos de agua, depósitos y canales (Vlyssides *et al.*, 1997).

El bagazo contiene cantidades considerables de lignina, que por sus características químicas es un compuesto muy difícil de biodegradar (Sharari *et al.*, 2011). Por lo que cuando este residuo es desechado al ambiente provoca condiciones anaerobias en los suelos (Tengerdy y Szakacs, 2003, Nigam *et al.*, 2009) y contaminación en los mismos, debido a su contenido de minerales y fenoles, disminuyendo la fertilidad en tierras de cultivo (Díaz *et al.*, 2002).

2.4 Sistemas fermentativos para la producción de enzimas

Las estimaciones del valor de inversión para la producción de enzimas a nivel industrial han incrementado de US\$1 billones en 1995 (Godfrey y West, 1996) a US\$1.5 billones en el año 2000 (McCoy, 2000). Hoy en día se invierten aproximadamente US\$2.7 billones (www.megazyme.com). A escala de laboratorio e industrial, existen dos sistemas de fermentación para la producción de enzimas, la fermentación en cultivo sumergido (FCS) y la fermentación en estado sólido (FES) (Aguilar *et al.*, 2002; Viniegra-González *et al.*, 2003).

La FCS es un sistema en el cual se realiza el proceso de fermentación en un sistema completamente líquido, y en este mismo se encuentran los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos. Su principales ventajas ante la FES son la facilidad de controlar los parámetros de pH, acidez, temperatura, concentración de nutrientes en el sistema, homogeneidad mediante la aplicación de sistemas de agitación, una mejor transferencia de masa y facilidad para extraer los metabolitos producidos (García, 1993). Además, en éste tipo de sistemas se pueden utilizar caldos de cultivo y cualquier residuo líquido para la producción de enzimas.

El término FES es aplicado en aquellos procesos donde se utilizan materiales insolubles en agua como sustrato para el crecimiento microbiano (Moo-Young *et al.*, 1983). Los microorganismos necesitan cierta cantidad de agua para crecer, por lo tanto la cantidad de agua suministrada en este tipo de sistema fermentativo no debe exceder la capacidad de saturación del material que forme la cama sólida (Laukevics *et al.*, 1984; Mudgett, 1986). En la Tabla 3 se muestran algunas de las ventajas y desventajas que ofrece el sistema fermentativo en estado sólido.

Tabla 3. Ventajas y desventajas de la fermentación en estado sólido

Ventajas	Desventajas
El medio de cultivo es simple, los sustratos sólidos pueden utilizarse solos o enriquecidos.	El uso de microorganismos está limitado a los que crecen a baja humedad.
El producto de interés está concentrado.	La determinación de parámetros de pH, acidez, O ₂ disuelto, se dificulta.
La baja humedad que se tiene en estos sistemas reduce la probabilidad de contaminación microbiana.	La transferencia de masa por difusión es limitada.
La cantidad de desechos líquidos generados es menor que en la fermentación en cultivo sumergido.	Los tiempos de cultivo son más largos que en la fermentación en cultivo sumergido.

Referencia: (Toca-Herrera *et al.*, 2007)

Las materias primas utilizadas para realizar el proceso de fermentación, han sido sustratos que provienen directa o indirectamente de la agricultura como son los cereales, aceites de semillas y residuos agroindustriales (Vandamme, 2009). Una de las ventajas de la FES es que los compuestos ligninocelulíticos utilizados como sustratos no requieren de pretratamientos para su uso, sino que son directamente inoculados con el microorganismo que se va a utilizar (Robinson *et al.*, 2001). La fermentación en estado sólido puede llevarse a cabo empleando cualquier material de desecho y residuo agroindustrial (Shankaranand y Lonsane, 1993; Tongwen y Weihua, 2002).

En la Tabla 4 se muestran algunos de los residuos sólidos que se han empleado como sustrato para la FES para la producción de enzimas. Como se puede observar una de las estrategias utilizadas ha sido el uso de desechos de cereales como salvado de trigo, rastrojo de maíz, lignocelulosa y bagazo de caña de azúcar; los cuales se han empleado principalmente para la producción de celulasa y enzimas ligninolíticas como LiP, MnP y Lac, mediante el uso de hongos ligninolíticos.

Tabla 4. Residuos sólidos empleados para la producción de enzimas en un sistema de fermentación en estado sólido

Hongo	Sustrato	Enzima producida	Ref.
<i>Penicillium decumbens</i> L-06	Residuos de salvado de trigo		1
<i>Pleurotus Ostreatus</i> , <i>Pleurotus sajor- caju</i>	Ligninocelulosa	Celulasa	2
<i>Trichoderma reesei</i> TG3	Rastrojo de maíz		3
<i>Trichoderma reesei</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Pleurotus sajor- caju</i>	Caña de azúcar	Enzimas ligninolíticas	4
<i>Trametes versicolor</i> 200801, <i>Funalia troji</i> ATCC 200800	Salvado de trigo		5
<i>Trametes versicolor</i> ATCC 44308, <i>Pleurotus ostreatus</i> FCL 247	Harina de colza	Lacasa	6
<i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC MYA-2306, <i>Trametes versicolor</i> NBR C4937	Residuos del tomate	Lacasa, xilanasas y proteasas	7

Referencias: ¹Long *et al.*, 2009; ²Khalil *et al.*, 2011; ³Chen *et al.*, 2011; ⁴Aguiar *et al.*, 2010; ⁵Boran y Yesilada, 2011; ⁶Zuchowski *et al.*, 2013; ⁷Iandolo *et al.*, 2011.

Otra ventaja que se le puede atribuir a la FES sobre FCS, es que las trazas de elementos que pudieran causar inhibición en el crecimiento de microorganismos e inclusive con la formación de un producto, no afectan a este tipo de fermentación.

2.4.1 Selección del sistema de fermentación

Los sistemas de fermentación FCS y FES ofrecen ciertas ventajas individuales, las cuales pueden facilitar la producción de enzimas. La selección del sistema de fermentación óptimo dependerá de la cepa, sustrato y enzima objetivo, así mismo se ha buscado realizar sistemas de fermentación combinando la FCS y FES, para incrementar las actividades enzimáticas obtenidas cuando se utilizan los sistemas de fermentación por separado (Rodríguez-Couto y Toca-Herrera, 2007).

2.5 Inmovilización de hongos ligninolíticos

Algunos de los problemas al utilizar microorganismos es su crecimiento sin control, la pérdida de biomasa por lavados, así como la susceptibilidad a cambios físicos o químicos del medio. Para evitar este tipo de problemas, se han implementado nuevas técnicas como la inmovilización de biomasa, la cual ha sido muy utilizada en los últimos años (Garzón-Jiménez y Barragán-Huerta, 2008). La inmovilización celular se define como la ubicación física de células en un espacio o región específica, de forma natural o inducida, en la cual son capaces de mantener una actividad catalítica deseada (Karel *et al.*, 1985). La inmovilización se realiza por procesos de adherencia a superficies o entre los microorganismos y nos ofrece las ventajas siguientes, *i)* fácil recuperación del caldo de fermentación, *ii)* se trabaja con mayor biomasa, *iii)* una mayor persistencia dentro del sistema y *iv)* una mayor resistencia a la toxicidad, con respecto al uso de microorganismos libres.

La inmovilización puede ser por atrapamiento en los espacios o poros de fibras y geles (Garzón-Jiménez y Barragán-Huerta, 2008). Los hongos filamentosos se pueden fijar al soporte de dos maneras, *i)* mediante la producción de polisacáridos que actúan como sustancias adherentes o *ii)* por la adsorción a soportes con porosidad alta lo cual permite que los filamentos penetren y colonicen el soporte. Otra manera de inmovilizar microorganismos consiste en aglomerar micelio en forma de pellets (en caso de hongos filamentosos) en un agitador rotatorio (Elisashvili *et al.*, 2010).

La inmovilización se ha realizado con soportes tales como residuos orgánicos, residuos agroindustriales, plásticos y fibras de vidrio (Shin *et al.*, 2002; Silverio *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2013; Boran y Yesilada, 2011). En el presente trabajo se inmovilizó a los hongos ligninolíticos en pellets dobles empleando polvo de agave como soporte para la producción de lacasa.

2.6 Purificación de enzimas

Las enzimas que son producidas por los microorganismos, pueden ser intracelulares o extracelulares, siendo las segundas las más fáciles de separar del medio de fermentación ya que no se requiere de una etapa de lisis celular. La purificación de enzimas consiste en una serie de pasos que permiten el aislamiento de un solo tipo de enzima a partir de una matriz compleja y requiere de técnicas y tratamientos bioquímicos. Generalmente se aplica la combinación de varias etapas que pueden ser, *i*) centrifugación y ultracentrifugación, *ii*) precipitación de las proteínas empleando soluciones de NH_4SO_4 (a diferentes porcentajes de saturación) o mediante tratamiento térmico, *iii*) separación mediante columnas de cromatografía (exclusión molecular, intercambio iónico, afinidad), *iv*) identificación mediante geles de electroforesis, y *v*) el uso de membranas de filtración (Okamoto *et al.*, 2000; Philippoussis *et al.*, 2011).

De manera general, cada método de purificación consiste en tres etapas principales, *i*) eliminación de desechos celulares, la cual comúnmente se realiza mediante procesos de filtración, microfiltración o centrifugación; *ii*) concentración del caldo de cultivo, y *iii*) eliminación de compuestos indeseados de diferente peso molecular al de la enzima, utilizando comúnmente la precipitación salina, ultracentrifugación y ultrafiltración (Bryjak y Rekuć, 2010).

La lacasa es de gran interés debido a sus aplicaciones a nivel industrial por lo que en ciertos usos es necesario someterla a un proceso de purificación (Minussi *et al.*, 2002; Kirk *et al.*, 2002). Se han reportado las siguientes metodologías para su extracción y purificación.

La extracción consiste en *i*) La homogenización del medio de cultivo, llevada a cabo mediante un mezclado de los cuerpos fructíferos del hongo, y *ii*) posteriormente la centrifugación de la muestra (13000 g/30 minutos), su recuperación y la filtración del sobrenadante.

Las estrategias para la purificación de la enzima son *i*) por el uso de agentes precipitantes y *ii*) mediante procesos de filtración (ultra y microfiltración). La

primera estrategia consiste en tomar el sobrenadante obtenido en la etapa de extracción y precipitar la proteína presente con NH_4SO_4 (45-80%) a 4°C; seguida de una cromatografía de intercambio iónico, siendo la más reportada intercambio aniónico, o por el uso de cromatografía de filtración en gel (Okamoto *et al.*, 2000; Autore *et al.*, 2009; Lettera *et al.*, 2010; Forootanfar *et al.*, 2011). La segunda estrategia consiste en: la concentración del sobrenadante por ultrafiltración a 4°C seguido por cromatografía de intercambio iónico, posteriormente se somete a ultrafiltración (10 kDa) para la concentración de la enzima y finalmente se hace pasar por una columna de intercambio aniónico (Li-Qion *et al.*, 2011; Salony *et al.*, 2006).

En el presente trabajo se utilizaron las operaciones de membrana de micro- y ultrafiltración para la purificación parcial de lacasa.

2.6.1 Membranas de filtración

Las membranas pueden discriminar entre dos o más tipos de moléculas por sus diferencias en tamaño, forma o estructura química. Los procesos de membrana se caracterizan por tener dos corrientes de alimentación; un retenido y un permeado. Si el objetivo es la concentración, el retenido generalmente es el producto; sin embargo, en el caso de purificación tanto el retenido como el permeado podrían ser el producto de interés.

Las membranas tienen dos formas de operación, *i*) filtración frontal (Figura 6a) en donde el flujo es perpendicular a la superficie filtrante, en este tipo de proceso se forma un gel que debe retirarse cada determinado tiempo por lo que el proceso no es continuo; y *ii*) filtración tangencial (Figura 6b) en donde el flujo es paralelo a la superficie filtrante, este tipo de proceso se lleva a cabo ejerciendo una presión y se establece un flujo de circulación de líquido es rápido así al tiempo que se efectúa la filtración, también se lleva a cabo la limpieza de la membrana lo que permite tener un flujo continuo (Mulder, 2012).

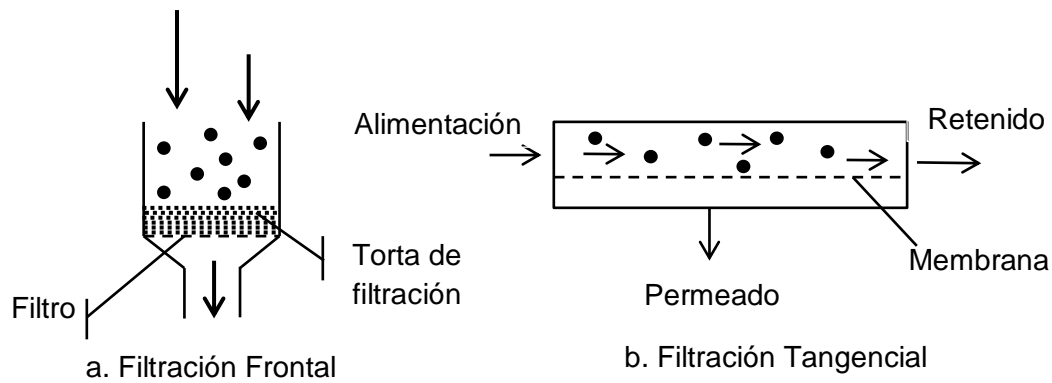


Figura 6. Representación esquemática de las formas de operación de las membranas (Mulder, 2012)

Los procesos de membrana cubren diversos problemas de separación con una membrana específica para cada requerimiento y pueden diferir en su estructura y funcionalidad. En la Tabla 5 se muestran algunas características de operaciones de membranas, la presión de operación, los tipos de membranas, así como, los tamaños del diámetro de poro y algunas aplicaciones industriales (Mulder, 2012).

Tabla 5. Características de las operaciones de membranas

Variable	Microfiltración	Ultrafiltración	Nanofiltración	Osmosis inversa
Presión de operación (Bar)	<2	1 – 10	10 – 25	Agua salobre: 15 – 25; agua de mar: 40 – 80
Tipo de membrana	Microporosa simétrica o asimétrica	Microporosa simétrica o asimétrica	Semipermeable simétrica	Semipermeable simétrica
Diámetro de poro	10 – 0.05 μm .	1 – 100 nm.	< 2 nm	< 2nm
Uso	Biocientífico Levaduras y hongos Bacterias Coloides.	Biocientífico Coloides, virus, proteínas, enzimas.	Eliminación de dureza en agua, etapa previa a osmosis inversa. Iones multivalentes.	Eliminación de iones Antibióticos, azúcares, ácidos orgánicos, iones orgánicos.

Los procesos de membrana son ampliamente utilizados en biotecnología debido a que las condiciones de operación no son drásticas, lo que permite que las biomoléculas sensibles no cambien sus propiedades (Charcosset, 2006). La ultra- y microfiltración son las técnicas más utilizadas, especialmente en separación o fraccionamiento de proteínas y/o enzimas (Koltuniewicz y Drioli, 2008). Algunos trabajos en los que se han empleado procesos de micro- y ultrafiltración para la concentración y/o purificación de enzimas se mencionan a continuación. Bryjak y Rekuć (2010) realizaron la purificación de lacasa a partir de *Cerrena unicolor*, cultivada en medio sintético, empleando membranas de microfiltración de 0.22 μm y de ultrafiltración biomax 100 y 10 kDa así como ultracel de 10 kDa. La microfiltración se empleó con el fin de eliminar residuos celulares y la ultrafiltración para la purificación de la enzima. Por otro lado, Pant y Adholeya (2010), empleando fermentación en estado sólido (paja de trigo humedecidas con vinazas obtenidas de la fermentación de melazas) y cepas del género *Ascomycota* y *Basidiomycota* obtuvieron enzimas ligninolíticas (lignino peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa), las cuales fueron recuperadas del medio de fermentación mediante filtración con papel Whatman No. 42, seguida de una centrifugación a 12,000 rpm por 30 minutos. Por último, utilizaron una membrana de ultrafiltración de 10 kDa la cual fue adecuada para realizar la concentración y purificación de las enzimas. Por su parte, Gottschalk *et al.* (2008) realizaron la concentración de lignino peroxidasa obtenida a partir de *Streptomyces viridosporus* T7A mediante el uso de una celda con agitación a nivel laboratorio con membranas de polisulfona de ultrafiltración de 10, 20 y 50 kDa. Realizaron la comparación de los resultados obtenidos con cada una de las membranas entre sí y con una membrana de celulosa de 20 kDa, y observaron que la mayor concentración de la enzima (90%) se logró con la membrana de polisulfona de 10 kDa.

3. JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas ha aumentado el interés por la producción de la enzima lacasa, debido a sus múltiples aplicaciones en diferentes áreas industriales como la textil, papelera, alimenticia y ambiental. Sin embargo, el costo de producción para obtener la enzima purificada es elevado, siendo un factor económico el sustrato utilizado para el crecimiento del microorganismo productor de la enzima. Por tal motivo, en diversos estudios se ha propuesto emplear sustratos económicos como son los residuos agroindustriales, que aunque tienen una naturaleza recalcitrante, pueden ser utilizados como sustrato por hongos ligninolíticos para la producción de lacasa.

En México, la elaboración de mezcal es una de las industrias que genera altos volúmenes de residuos agroindustriales. El estado de Oaxaca produce cerca del 60% del mezcal a nivel nacional, lo cual genera al aproximadamente 19 millones de kilogramos de bagazo y 14 millones de litros de vinazas, que son desechados al ambiente produciendo contaminación de suelos y cuerpos de agua. Las vinazas contiene azúcares reductores remanentes del proceso de fermentación y un pH ácido lo cual podría favorecer el crecimiento de hongos ligninolíticos; así mismo contienen ácidos fenólicos los cuales pueden servir como inductores para la producción de lacasa (Robles-González *et al.*, 2012; Gedikli *et al.*, 2010). Por su parte el bagazo, además de contener ácidos fenólicos, contiene lignina la cual puede servir como inductor para la producción de lacasa (Elisashvili *et al.*, 2006). Al mismo tiempo se les estaría dando un tratamiento a estos residuos para disminuir su impacto ambiental y un valor agregado al otorgarles un uso.

Por lo tanto, en el presente trabajo se propuso el aprovechamiento de los residuos generados por la industria del mezcal para la producción de lacasa a partir del uso de dos sistemas de fermentación, *i)* un sistema de fermentación en cultivo sumergido utilizando las vinazas e inmovilizando al hongo ligninolítico en pellets dobles con polvo de agave y *ii)* un sistema de fermentación en estado sólido usando al bagazo y al hongo ligninolítico. Además, se propuso un método para la

separación de la enzima producida del medio de cultivo y su purificación parcial mediante el uso de micro- y ultrafiltración.

4. HIPÓTESIS

Hipótesis 1. Las cepas parentales e híbridas de *Pleurotus spp.* así como la cepa de *Trametes versicolor* CDBB-h-1051, serán capaces de producir lacasa empleando como sustratos las vinazas y bagazo de origen mezcalero.

Hipótesis 2. La actividad enzimática de lacasa en fermentación en cultivo sumergido será mayor con respecto al incremento en la concentración de azúcares reductores presentes en las vinazas mezcaleras.

Hipótesis 3. El uso de vinazas mezcaleras como humidificador en la fermentación en estado sólido tendrá un efecto positivo sobre la actividad enzimática de lacasa.

5. OBJETIVOS

- **Objetivo general**

Producir lacasa a partir de *Pleurotus spp.* y *Trametes versicolor* CDBB-h-1051 empleando vinazas y bagazo de origen mezcalero como sustrato mediante la fermentación en cultivo sumergido y en estado sólido.

- **Objetivos específicos**

1. Efectuar la caracterización fisicoquímica las vinazas mezcaleras y del bagazo de agave.
2. Evaluar y seleccionar el mejor medio de cultivo líquido para el crecimiento de *Pleurotus spp.*
3. Evaluar las actividades enzimáticas de lacasa en las cepas de *Pleurotus spp.* y *Trametes versicolor* CDBB-h-1051 en estado libre.

4. Evaluar la actividad enzimática de lacasa en fermentación en cultivo sumergido utilizando vinazas mezcaleras y pellets formados con el HL+ bagazo de agave.
5. Evaluar la actividad de lacasa en fermentación en estado sólido empleando bagazo de agave como sustrato.
6. Realizar la extracción, separación y purificación parcial de lacasa.

6. METAS

- Objetivo 1.
 - Meta 1. Determinar los parámetros de composición (DQO, sólidos fijos, suspendidos y volátiles; sulfatos, fosfatos, nitrógeno total, fenoles totales, aromáticos totales, minerales, y azúcares reductores) de las vinazas mezcaleras.
 - Meta 2. Determinar las propiedades fisicoquímicas (pH, conductividad y color) de las vinazas mezcaleras.
 - Meta 3. Determinar los parámetros de composición (fibra, minerales, compuestos fenólicos y sólidos fijos) del bagazo de agave.
- Objetivo 2.
 - Meta 4. Evaluar visualmente el crecimiento de las cepas de *Pleurotus spp.* en cuatro distintos medios de cultivo complejos.
 - Meta 5. Seleccionar el medio de cultivo donde se observó crecimiento de las cepas de *Pleurotus spp.*
- Objetivo 3.
 - Meta 6. Realizar el cultivo, propagación y mantenimiento de *Pleurotus spp.* y *Trametes versicolor* CDBB-h-1051.
 - Meta 7. Determinar la actividad enzimática de lacasa en las cepas de *Pleurotus spp.* y *Trametes versicolor* CDBB-h-1051.
 - Meta 8. Seleccionar la cepa de *Pleurotus spp.* que tenga la mayor actividad enzimática de lacasa.

- Objetivo 4.
 - Meta 9. Realizar la inmovilización de *Pleurotus spp.* y *Trametes versicolor* CDBB-h-1051 mediante la formación de pellets dobles con el bagazo de agave.
 - Meta 10. Evaluar la influencia de la concentración de azúcares reductores en vinazas mezcaleras sobre la actividad enzimática de lacasa.
- Objetivo 5.
 - Meta 11. Evaluar el polvo de bagazo del *Agave angustifolia* Haw y *Agave potatorum* Zucc.
 - Meta 12. Evaluar las vinazas como humidificador.
- Objetivo 6.
 - Meta 13. Seleccionar las condiciones de FES y FCS con las mayores actividades de lacasa.
 - Meta 14. Obtener a la enzima lacasa parcialmente purificada mediante el uso de membranas de micro- y ultrafiltración.
 - Meta 15. Realizar las técnicas de SDS-PAGE y zimogramas para confirmar la purificación y presencia de la lacasa.

7. METODOLOGÍA

Plan general de trabajo

En la Figura 7 se muestra el plan general de trabajo, el cual se dividió en 5 etapas.

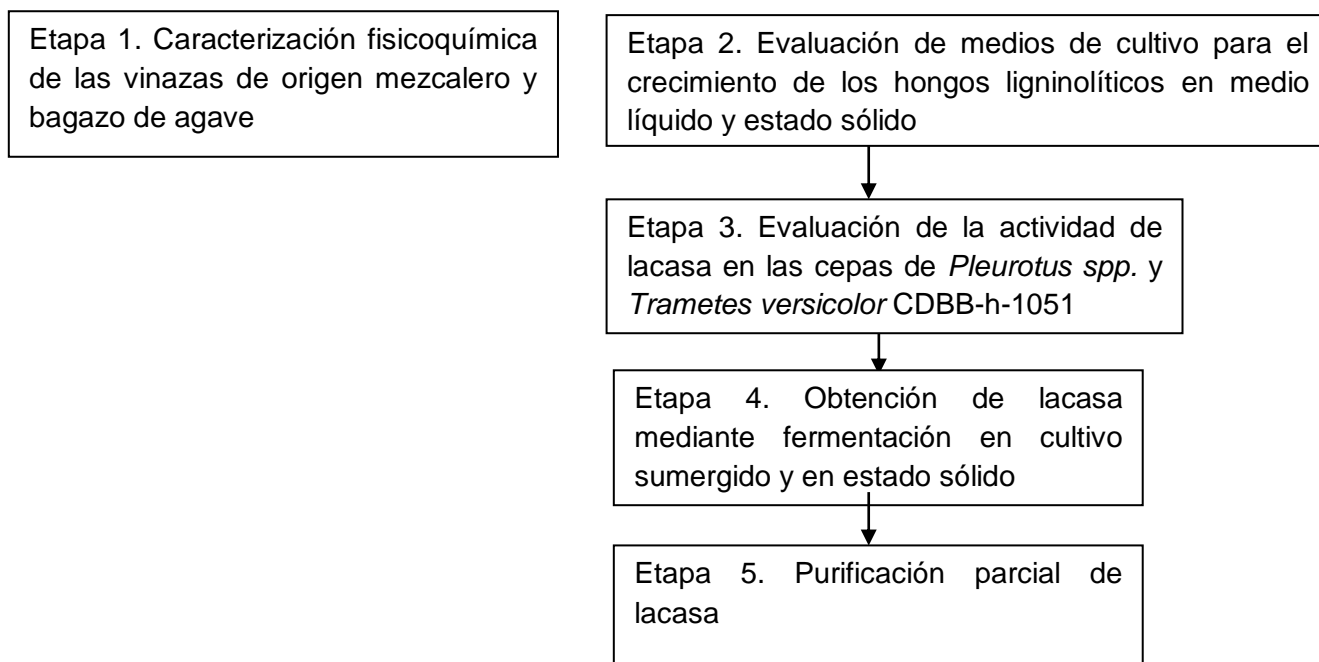


Figura 7. Plan general de trabajo

Etapa 1. Caracterización fisicoquímica de las vinazas de origen mezcalero (VM) y bagazo de agave

Las vinazas fueron sometidas a un pre-tratamiento que consistió en una sedimentación y centrifugación, antes de la determinación de los parámetros fisicoquímicos.

1.1 Obtención y caracterización fisicoquímica de las vinazas mezcaleras

Parámetros fisicoquímicos a evaluar:

1.1.1 pH (Método estándar 423)

El pH de las muestras de vinazas se midió con un potenciómetro, constituido por un electrodo de vidrio y un electrodo de referencia, a 25°C calibrado con soluciones buffer de pH 4.0 y 7.0. El experimento se llevó a cabo por triplicado.

1.1.2 Demanda Química de Oxígeno (DQO) (Método estándar 5220 D)

Se prepararon los siguientes reactivos:

1. **Reactivo 1** (solución digestora). Se adicionaron 10.2 g de $K_2Cr_2O_7$ y 33.3 g de $HgSO_4$ a 167 mL de H_2SO_4 concentrado, posteriormente se mezclaron con 500 mL de agua desionizada. La solución se enfrió y diluyó a 1 L con agua desionizada.
2. **Reactivo 2** (solución catalítica). 9.51 g de $AgSO_4$ se disolvieron en 1 L de H_2SO_4 .
3. **Reactivo 3** (Solución Stock). Se disolvieron 8.5 g de biftalato ácido de potasio ($KHC_8H_4O_4$) en agua desionizada, y se aforó a 1 L. Esta solución demanda 10,000 mg de O_2/L para su oxidación, ya que la DQO teórica de este compuesto es de 1.12 mg de $O_2/$ mg de biftalato. A partir de esta solución, se prepararon los testigos de concentración necesarios para elaborar la curva de calibración correspondiente (Apéndice 1).

Se le adicionaron 3.5 mL del Reactivo 1 y 1.5 mL del Reactivo 2 a tubos que contenían 2.5 mL de muestra convenientemente diluida, se agitaron durante 10 segundos, y posteriormente los tubos se colocaron en el reactor de baño seco a $150^\circ C$ por dos horas. Los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y el color desarrollado se leyó a 600 nm en un espectrofotómetro marca Hach modelo DR500. El espectrofotómetro se ajustó con un blanco de reactivo. El ensayo de los testigos de concentración y del blanco del reactivo se realizó de la misma forma y simultáneamente al de las muestras problema. El experimento se realizó por triplicado.

1.1.3 Sólidos totales (ST), suspendidos (SS), volátiles (SSV), suspendidos fijos (SSF) y volátiles totales (SVT) (Método estándar 2540)

Se llevó un crisol Gooch a peso constante en una estufa a $100^\circ C$ y se colocó un filtro de fibra de vidrio de $0.45\ \mu m$, con la superficie rugosa hacia arriba. El crisol Gooch se colocó en un matraz Kitasato provisto de un sostén de sargent y se

aplicó vacío, agregando suficiente agua destilada para que el disco se fijara en la base del crisol y cubriera completamente las perforaciones; se llevó a la mufla durante 15 minutos a $550\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se atemperó el crisol en un desecador y se pesó en la balanza analítica. Posteriormente, el crisol se colocó en el matraz Kitasato y se filtró 1 mL de muestra. Se secó en una estufa previamente ajustada a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante una hora. El crisol se atemperó en el desecador y se pesó en la balanza analítica, el resultado de esta pesada representa los sólidos suspendidos totales (SST). El crisol se pasó a la mufla a $550\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos, se dejó atemperar en el desecador y se pesó, con esto se determinaron los sólidos suspendidos fijos (SSF). Los sólidos suspendidos volátiles (SSV) se calcularon al restar SSF de SST. El experimento se llevó a cabo por triplicado.

1.1.4 Conductividad (Método estándar 2510 B)

La conductividad se determinó empleando un conductímetro modelo SENSION 156 marca HACH^{MR}. Se realizó la corrección por temperatura, sólidos disueltos totales y temperatura del instrumento conforme a lo señalado en el manual del instrumento. Se calibró con una solución estándar de cloruro de sodio de $1000\text{ }\mu\text{S/cm}$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se realizó la lectura de las muestras. El experimento se llevó a cabo por triplicado.

1.1.5 Sulfatos (Método 8051 HACH^{MR}) y fosfatos (Método 8048 HACH^{MR})

Se ajustó el espectrofotómetro a la longitud especificada para cada uno de los métodos (Anexo A-1). Se llenó una celda con 10 mL de muestra convenientemente diluida, posteriormente se le agregó el contenido de un sobre de reactivo HACH^{MR} y se agitó hasta obtener una mezcla homogénea. Se dejó reposar durante el tiempo especificado para una reacción completa (Anexo A-1). Se preparó un blanco con agua destilada.

La celda del blanco se colocó en un espectrofotómetro y se ajustó a cero, posteriormente, se introdujo la celda de la muestra y se leyó la absorbancia. La preparación de la muestra se repitió para obtener un duplicado de la lectura. El experimento se llevó a cabo por triplicado.

1.1.6 Nitrógeno total (Método 10071 HACH^{MR}). Método de Persulfato

Se adicionó a dos tubos de 10 mL un sobre de Nitrógeno Total Persulfato (persulfato de potasio; HACH^{MR}) para posteriormente agregarles 2 mL de muestra problema o agua desionizada (blanco). Se agitó vigorosamente durante 30 segundos para su mezcla completa. Se colocaron los tubos en una parrilla a 105 °C durante 30 minutos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se adicionó a cada uno de los tubos un sobre del reactivo A (metabisulfito de sodio) de nitrógeno total y se agitó durante 15 segundos dejándolos reaccionar por 3 minutos. Pasado el tiempo, se agregó a cada uno de los tubos un sobre del reactivo B (metabisulfito de sodio) de nitrógeno total, se agitó durante 15 segundos y se esperó 2 minutos de tiempo de reacción. 2 mL de las muestras, anteriormente digeridas, fueron adicionadas a tubos de Nitrógeno Total reactivo C (ácido sulfúrico), se agitaron lentamente y se esperó 5 minutos de tiempo de reacción. Por último las muestras se leyeron en un espectrofotómetro a 410 nm, calibrando a cero con el blanco. El experimento se realizó por triplicado.

1.1.7 Fenoles totales expresados como equivalentes de ácido gálico (Box, 1983)

Para el acondicionamiento de las vinazas, se tomaron 20 mL de muestra y se sometieron a extracción líquido-líquido por triplicado con 20 mL de acetato de etilo (v/v) a temperatura ambiente. Se combinaron las tres fracciones orgánicas y se eliminó el agua presente en los extractos con Na₂SO₄ anhidro. El acetato de etilo se evaporó empleando un rotavapor a 60 °C. Posteriormente, la muestra se resuspendió en 20 mL de una mezcla 60:40 de metanol-agua. La curva estándar se realizó empleando ácido gálico (Apéndice 2). Para el análisis, en tubos de ensaye de 10 mL se adicionaron 50 µL de muestra (o estándar), 3 mL de agua destilada y 250 µL de reactivo de Folin Ciocalteau 1 M. Las muestras se dejaron reposar por 5 minutos a temperatura ambiente y se agitaron por 15 segundos. Pasado el tiempo, se adicionaron 750 µL de Na₂CO₃ al 20 %, se homogeneizaron y se dejaron reposar por 40 minutos. Las muestras se leyeron a una absorbancia de 765 nm en un espectrofotómetro marca Hach modelo DR5000. El blanco se

preparó mediante la sustitución de la muestra por agua desionizada. Los resultados fueron expresados como equivalentes de ácido gálico/L. El experimento se llevó a cabo por triplicado.

1.1.8 Color café (absorbancia a 475 nm; Peña *et al.*, 2003)

Se tomó 5 mL de muestra y se centrifugó a 4000 x g durante 5 minutos, para eliminar los sólidos que se encuentren en la suspensión. Se filtró a través de un filtro Whatman No. 41. El filtrado se colocó en una celda de cuarzo para la determinación de la absorbancia a 475 nm. El experimento se llevó a cabo por triplicado.

1.1.9 Aromáticos totales (absorbancia a 254 nm; Benítez *et al.*, 2003)

La muestra se centrifugó a 4000 x g por 10 minutos, posteriormente se filtró a través de un filtro Whatman 41, el permeado se colocó en una celda de cuarzo con un paso de luz de 10 mm y se realizó la medición a 254 nm. Se utilizó agua como blanco de reactivo. El experimento se realizó por triplicado.

1.1.10 Minerales: Cu, Na, K, Ca, Zn, Fe, Mg, Ni, Cd; en vinazas mezcaleras (Método estándar 3111B)

Para el acondicionamiento de la muestra, se colocó 1 mL de vinazas mezcaleras en una cápsula de porcelana llevándola a peso constante utilizando una estufa a 100°C. La muestra se incineró y calcinó en una mufla a 600 °C. Posteriormente las cenizas obtenidas se disolvieron con ácido nítrico 0.5 M en un matraz de 100 mL previamente tratado. La determinación de los metales se realizó empleando un espectrofotómetro de absorción atómica marca GBC modelo 932AA. En Anexo A-2 se muestran los parámetros para cada metal analizado y las curvas de calibración obtenidas se muestran en el Apéndice 3. El experimento se llevó a cabo por triplicado.

1.1.11 Azúcares reductores. Método DNS (König *et al.*, 2002)

Para la preparación del reactivo DNS se disolvieron 0.8 g de NaOH en 40 mL agua destilada, se añadió lentamente 0.5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico y 15 g de tartrato de sodio y potasio, por último se aforó a 50 mL. Para cuantificar los azúcares reductores, se adicionaron 0.5 mL de la muestra y 0.5 mL del reactivo DNS en tubos de ensaye con rosca de 10 mL, se colocaron en baño de agua en ebullición por 5 min y se enfriaron en un baño de agua fría hasta temperatura ambiente. Una vez atemperados, se les adicionaron 5 mL de agua destilada, se agitaron y se leyó la absorbancia a 540 nm. Se realizó la curva patrón con respecto a fructosa (1, 2, 3, 5, 8 mM; Apéndice 4). La muestra se sustituyó por agua deionizada para el blanco de reactivos. Los resultados fueron expresados como equivalentes de fructosa/L. El experimento se realizó por triplicado.

1.2 Determinación de las propiedades físico-químicas del bagazo

Para el acondicionamiento de las muestras las pencas de *Agave angustifolia* Haw (Ah) y *Agave potatorum* Zucc (Pz) se colocaron en una autoclave a 15 psi durante 4 horas. Posteriormente, se realizó la extracción de los jugos y los bagazos obtenidos se secaron en una estufa a 60°C durante 8 horas. Por último, se realizó una reducción de tamaño, primero de manera manual y después empleando un molino ciclónico marca Foss modelo Cyclotec™ 1093, con malla de 0.5 mm. Los polvos colectados se guardaron en recipientes de plástico.

1.2.1 Fenoles totales expresados como equivalentes de ácido gálico (Box, 1983)

El tratamiento de la muestra se llevó a cabo mediante una hidrólisis alcalina empleando 0.2 g de polvo de las pencas de agave. Las muestras se colocaron en vasos de precipitados conteniendo 4 mL de una solución de NaOH 2N. Se agitaron durante 4 horas a 190 rpm en una agitador orbital marca IKA modelo KS 260. Posteriormente se ajustó el pH de las muestras a 2 con HCl 10%. La determinación de fenoles totales se realizó mediante el método de Folin y Ciocalteau (sección 1.1.7) empleando ácido gálico para la curva de calibración

(Apéndice 2). Los resultados fueron expresados como equivalentes de ácido gálico. El experimento se realizó por triplicado.

1.2.2 Minerales (Cu, Na, K, Ca, Zn, Fe, Mg, Ni) en muestras de bagazo de agave (Método estándar 3111B)

Para el pretratamiento de las muestras se calcinó 1 g de los bagazos en crisoles a peso constante. Posteriormente, las muestras calcinadas se disolvieron en 100 mL de ácido nítrico 0.5 M. Las determinaciones se llevaron a cabo según el procedimiento descrito en la sección 1.1.10. El experimento se realizó por triplicado.

1.2.3 Sólidos Fijos (Método estándar 2540)

Se pesó 1 gramo de polvo de bagazo y se colocó en un crisol a peso constante dejándolas en la mufla por 12 horas a 550 °C. Posteriormente, se les dejó atemperar y se registró el peso obtenido como Sólidos Fijos/g de bagazo. El experimento se realizó por triplicado.

1.2.4 Fibra Cruda (AOAC, 2000)

Se pesó 1 g de los bagazos y se colocaron en matraces bola de 500 mL, se les añadió 200 mL de ácido sulfúrico al 1.25% caliente y se colocó en ebullición por 30 minutos bajo condensadores de dedo frío. Posteriormente, se filtró el contenido a través de un embudo Büchner, el retenido se arrastró nuevamente al matraz bola de 500 mL con ayuda de 200 mL de NaOH al 1.25%. La mezcla se llevó a ebullición por 30 minutos. Finalizado el tiempo se filtró el contenido en un crisol Büchner a través de papel filtro libre de cenizas. Se realizó un lavado de agua caliente-HCl al 1% y posteriormente con sólo agua caliente, se lavó 2 veces con etanol y 3 veces con acetona. Se colocó el papel filtro en un crisol de porcelana y se llevó a peso constante en una estufa a 100 °C. Se incineró en la mufla a 550 °C por 12 horas y se registró el peso obtenido. El porcentaje de fibra se determinó por la resta del material insoluble menos cenizas entre el peso inicial de la muestra. El experimento se realizó por triplicado.

Etapa 2. Evaluación de medios de cultivo para el crecimiento de los hongos ligninolíticos en medio líquido y estado sólido

Durante los ensayos de fermentación en cultivo sumergido y en estado sólido se utilizaron 6 cepas de *Pleurotus spp.* de las cuales fueron 2 cepas parentales (UTMB y UTMR) y 6 cepas híbridas ($H_2R_2B_4$; $H_1R_4B_6$; $H_2R_3B_4$ y $H_3R_2B_1$); y 1 cepa de *Trametes versicolor* CDBB-h-1051 (Tv).

Las cepas parentales de *Pleurotus spp.* fueron aisladas en el Instituto de Agroindustrias de la Universidad Tecnológica de la Mixteca, así como las cuatro cepas híbridas obtenidas de la cruce de las dos cepas antes mencionadas, las cuales fueron gentilmente donadas por la Dra. Paula Guadarrama (2013). La cepa de *Trametes versicolor* CDBB-h-1051, provino de la colección del CINVESTAV.

2.1 Mantenimiento y propagación

Se realizó la resiembra y verificación de la pureza de la cepa empleando las técnicas microbiológicas para el mantenimiento y propagación de hongos. Las cepas se propagaron en medio sólido, en cajas Petri conteniendo agar bacteriológico y extracto de malta (AB+EM) para las cepas parentales e híbridas de *Pleurotus spp.* y para *Trametes versicolor* CDBB-h-1051, se incubaron a 30 °C por 8 días.

La propagación en medio líquido se realizó mediante la toma de un pedazo de 0.5 cm de diámetro del micelio (*Trametes versicolor* CDBB-h-1051 o *Pleurotus spp.*) formado en la superficie de la caja Petri y se inoculó en caldo dextrosa Sabouraud 2% para *Trametes versicolor* CDBB-h-1051. Las cepas de *Pleurotus spp.* se inocularon en el medio seleccionado en Etapa 2.2. Ambas cepas se incubaron entre 8 y 10 días a 30 °C.

2.2 Evaluación del medio líquido para el crecimiento de las cepas de *Pleurotus spp.*

Se probaron 4 medios complejos para el crecimiento de las cepas de *Pleurotus spp.*

i) Medio de cultivo A, modificado por lo reportado por Robledo-Narvaez *et al.* (2006).

Las cantidades en (g/L): Dextrosa anhidra (10.0), Peptona de caseína (2.5), K_2HPO_4 (1.0), KH_2PO_4 (1.0), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.5), NaCl (0.3), NH_4Cl (1.0), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0.1), Tiamina (0.02),

Solución de elementos traza 2mL: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (5.0), $MnSO_4 \cdot H_2O$ (4.0), $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (1.0), $ZnCl_2$ (1.0), $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ (0.5), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0.3), $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ (1.0).

ii) Medio de cultivo B, se sustituyó la dextrosa anhidra por extracto de malta del medio A.

iii) Medio de cultivo C, se empleó Caldo Dextrosa Sabouraud 2% (CDS 2%)

iv) Medio de cultivo D, Caldo Dextrosa Sabouraud 2% (CDS 2%) con adición de extracto de malta.

La cepa de *Trametes versicolor* CDBB-h-1051 se evaluó en el medio C. Se seleccionó el medio más adecuado de acuerdo a los parámetros siguientes, a) crecimiento del micelio de manera visual y b) mediante la determinación de actividad enzimática de lacasa. Las cepas de HL fueron inoculadas en su forma libre. El experimento se realizó por triplicado.

2.3 Evaluación del medio sólido

Se evaluaron los siguientes polvos de bagazo de agave, a) polvo de bagazo de penca de *Agave angustifolia* Haw (Ah); y b) polvo de bagazo de la penca de *Agave potatorum* Zucc (Pz) para su uso como sustrato en fermentación en estado sólido.

Se seleccionó el medio más adecuado para el crecimiento de las cepas de acuerdo a los siguientes parámetros, a) crecimiento del micelio de manera visual y

b) mediante la determinación de actividad enzimática de lacasa. El experimento se realizó por triplicado.

Etapa 3. Evaluación de la actividad de lacasa en las cepas de *Pleurotus spp.* y *Trametes versicolor* CDBB-h-1051

3.1 Evaluación de la actividad enzimática de lacasa en cepas de *Pleurotus spp.* y *Trametes versicolor* CDBB-h-1051

Se tomaron 2 mL de medio de cultivo y se filtraron a través de un papel Whatman 41, posteriormente se volvió a filtrar a través de una membrana regenerada de celulosa Econofiltro marca Agilent de 0.45 μm . El análisis se realizó inmediatamente después de la toma de muestra. La determinación de la actividad de lacasa se realizó conforme a lo señalado por Wolfenden y Wilson (1982) (sección 4.1.4). El experimento se llevó a cabo por triplicado.

3.2 Selección de la cepa de *Pleurotus spp.*

La selección de la cepa de *Pleurotus spp.* se realizó por la medición de actividad enzimática de lacasa, eligiendo a la cepa que mostró la mayor actividad.

Etapa 4. Obtención de lacasa mediante fermentación en estado sólido y cultivo sumergido

La producción de lacasa se realizó bajo dos sistemas de fermentación, *i*) fermentación en cultivo sumergido, en donde se evaluó el efecto del origen de la cepa del HL y la concentración de azúcares reductores presentes en las vinazas, sobre la AELac y *ii*) fermentación en estado sólido, se evaluó el efecto del origen de la cepa del HL y el tipo de bagazo de agave, sobre AELac. Así mismo, se evaluó el efecto del humidificador empleado sobre la AELac.

4.1 Cinética en fermentación en cultivo sumergido (FCS)

4.1.1 Propagación del Hongo ligninolítico

Se tomó un pedazo de 0.5 cm de diámetro del micelio (*Trametes versicolor* CDBB-h-1051 o *Pleurotus spp.*) formado en la superficie de una caja Petri con medio de propagación AB+EM. Las muestras se inocularon en matraces Erlenmyer conteniendo 100 mL del medio de cultivo líquido seleccionado en la Etapa 2 (sección 2.2) para las cepas de *Pleurotus spp.* y en CDS 2% para *Trametes versicolor* CDBB-h-1051. Se dejaron incubar en una incubadora marca Shel lab modelo SMI2 a 30 °C durante 10 días. Posteriormente, el micelio formado de *Trametes versicolor* CDBB-h-1051 y el de la cepa parental de *Pleurotus spp.* UTMB (seleccionadas en la etapa 2) en la superficie del matraz, se transfirieron a un vaso de vidrio estéril y se licuó. Se tomó una muestra de 1 mL y se determinó la concentración de sólidos suspendidos totales (SST) conforme a lo establecido en los métodos estándar 2540 (APHA-AWWA-WPC, 1998).

4.1.2 Formación de los pellets doble HL+ bagazo de agave

Se empleó polvo de bagazo de *Agave angustifolia* Haw previamente acondicionado en la Etapa 1 (sección 1.2) en una relación de bagazo/hongo ligninolítico de 50 mg de polvo de bagazo/30 mg biomasa del HL (SST). Para la formación del pellet, se tomaron 100 mL del medio de formación de pellets (medio A, Etapa 2) y se vertieron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se adicionaron 50 mg de polvo de bagazo y se esterilizó a 15 psi por 15 minutos. Posteriormente, se inoculó con 30 mg de los HL en base seca. Los matraces se colocaron en una agitadora orbital marca IKA modelo KS 260 a 140 rpm durante los primeros dos días y posteriormente a 150 rpm hasta la formación de los pellets (aproximadamente de 4 a 5 días). La formación de pellets se realizó a temperatura ambiente.

4.1.3 Desarrollo de la fermentación en cultivo sumergido

Se realizaron cinéticas en cultivo sumergido por lote, por duplicado, empleando matraces de 250 mL conteniendo 180 mL de vinazas mezcaleras previamente

diluidas a 670, 900, 1300 y 1900 mg de azúcares reductores expresados como equivalentes de fructosa (EF)/L, esterilizadas e inoculadas con pellets dobles, los cuales antes de ser inoculados se filtraron del medio de formación de pellets y se lavaron con agua isotónica esterilizada. La concentración de azúcares reductores en las vinazas mezcaleras fue expresada como equivalente de fructosa para facilitar la comparación de resultados. Los matraces se colocaron en una agitadora orbital marca IKA modelo KS 260 a 180 rpm a temperatura ambiente durante 18 días. La medición de actividad se realizó cada tercer día (Ming-Zeng *et al.*, 2002; Mougín *et al.*, 2002; Philippoussis *et al.*, 2011)

El seguimiento de la cinética a nivel matraz para la evaluación de la actividad de lacasa empleando vinazas mezcaleras + pellets formados por HL + bagazo de agave. Se realizó mediante la extracción de 2 mL del medio de cultivo (vinazas o medio control) y se midió la actividad enzimática de lacasa conforme a lo reportado por Wolfenden y Wilson (1982) (sección 4.1.4).

4.1.3.1 Diseño de experimento

El diseño de experimento consistió en un factorial general con una $\alpha=0.05$, donde el efecto del factor origen de la cepa del hongo lignilítico a dos niveles (Nivel 1 *Trametes versicolor* CDBB-h-1051 y Nivel 2 UTMB) y el factor concentración de equivalentes de fructosa a niveles de: 670, 900, 1300 y 1900 mg EF/L sobre la actividad enzimática fueron examinados (Apéndice 5).

Se utilizó al medio CDS 2% como medio control para *Trametes versicolor* CDBB-h-1051 y el medio de cultivo CDS 2% + Extracto de Malta para UTMB. La finalidad del medio control fue observar el efecto que tienen las vinazas como medio de cultivo para la producción de lacasa en comparación a un medio complejo.

4.1.4 Determinación de actividad enzimática de lacasa

Para cuantificar la actividad enzimática de lacasa, se utilizó una celda de cuarzo con un paso de luz de 10 mm, se añadieron 0.30 mL de buffer citrato-fosfato (pH 3.0), 0.10 mL del sustrato ABTS [ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-

sulfónico)] 1 mM, 1 mL de la muestra o agua (blanco) y se aforó a 2 mL con agua destilada (0.6 mL). La mezcla de reacción se realizó a 30 °C en un espectrofotómetro marca Hach modelo DR500 acoplada a una cámara termostática (“celda Peltier”). Se leyó el aumento de absorbancia a una longitud de onda de 420 nm, durante 5 minutos. Una unidad de actividad enzimática de lacasa (1 U de Lac) se define como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 μ mol ABTS/minutos*mL de solución de la enzima. La actividad enzimática volumétrica es definida como la actividad enzimática presente en un volumen definido del filtrado del sistema de fermentación.

4.2 Cinética de fermentación en estado sólido (FES) empleando polvo de bagazo de agave + HL

La cinética en estado sólido se realizó mediante muestras destructivas (muestras no recuperables). Se inocularon *n* muestras de bagazo mezcalero con el hongo ligninolítico. Se tomó muestra cada tercer día y se evaluó el parámetro de actividad enzimática de lacasa durante un periodo de 15 días. Para realizar la cinética se colocaron 0.5 g de bagazo de agave previamente acondicionado (tamaño de partícula 0.5 mm) en cajas Petri y se esterilizaron a 15 psi por 15 minutos. Posteriormente, se inocularon con 15 mg de biomasa de cada hongo ligninolítico (los cuales se propagaron como se indicó en la Etapa 4, sección 4.1), las cajas Petri se sellaron con papel parafilm y se dejaron a temperatura ambiente. Al tercer día se verificó el contenido de humedad y se adicionó con 5 mL de medio de humectación.

Los ensayos se realizaron en cajas Petri por duplicado y se determinó actividad enzimática de lacasa cada tercer día por 15 días. Para la determinación de la actividad enzimática se realizó el lavado del HL+bagazo de las cajas Petri, mediante la adición de 5 mL de buffer 0.1 M de citrato-fosfato pH 3 y se filtró a través de un filtro Whatman No. 41. La medición de la actividad enzimática de lacasa se llevó a cabo conforme a lo señalado por Wolfenden y Wilson (1982).

4.2.1 Diseño de experimento

El diseño de experimentos consistió en un factorial general, donde se evaluó el efecto de dos factores sobre la variable de respuesta que fue la actividad enzimática de lacasa, 1) origen del bagazo utilizado a dos niveles, pencas de *Agave potatorum* Zucc y pencas de *Agave angustifolia* Haw; y 2) la cepa de hongo ligninolítico a dos niveles, *Trametes versicolor* CDBB-h-1051 y *Pleurotus spp.* (Apéndice 6). Se empleó como medio control el medio CDS 2% el cual tuvo como finalidad observar el efecto del bagazo en la producción de lacasa.

Se empleó como medio control una unidad experimental la cual contenía al HL y como humidificador el medio CDS 2%. La finalidad fue observar el efecto del bagazo en la producción de lacasa.

Así mismo se evaluó el efecto de las vinazas como humidificador a concentraciones de 670, 900, 1300 y 1900 mg EF /L sobre la AELac. El medio control fue el medio CDS 2% (Apéndice 7). La finalidad fue observar el efecto que de las vinazas sobre la actividad enzimática de lacasa en la FES.

Etapas 5. Purificación parcial de lacasa

5.1 Selección de las condiciones en FCS y FES con mayor actividad de lacasa

Se eligieron las condiciones en FCS y FES con mayor actividad de lacasa. Se determinó el tiempo de fermentación al cual se obtuvo la máxima actividad enzimática de lacasa.

5.2 Separación y purificación parcial de lacasa del medio de fermentación

La separación y purificación parcial de la enzima lacasa del medio de cultivo se realizó mediante las siguientes etapas:

Fase 1. Separación de la biomasa, la muestra tomada en FES y FCS se filtró a vacío empleando un filtro Whatman No 41.

Fase 2. Eliminación de residuos del HL, 5 mL del filtrado, obtenido en la fase 1, contenidos en una jeringa se pasaron a través de una membrana de celulosa regenerada de 0.45 μm (econofiltro marca Agilent).

Fase 3. Concentración y purificación parcial de la lacasa, se tomaron 500 μL del filtrado obtenido en la fase 2 y se colocaron en un centricon con membrana de polisulfona de tamaño de poro de 10kDa (Millipore®). Se filtraron empleando una centrifuga marca Hangzhou Allsheng Instruments, modelo mini-10K, sin refrigerar, a 10,000 rpm por 5 minutos, dos veces, obteniendo un volumen final de 100 μL . Se recuperó el retenido el cual fue utilizado para las pruebas de electroforesis desnaturizante y los zimogramas.

5.3 Análisis de los extractos de fermentación en estado sólido y en cultivo sumergido mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes

El análisis de las muestras mediante electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, en sus siglas en ingles), se realizó con la finalidad de observar la purificación parcial de la muestra de FES y FCS. De igual manera se asociaron las bandas encontradas con los pesos moleculares para la lacasa.

Para el análisis se emplearon estándares de pesos moleculares de 250, 150, 100, 75, 50, 30, 25, 20, 15 y 10 kDa (Precision Plus Protein™ Standards, marca Biorad). Se utilizó un equipo marca BioRad modelo Mini-PROTEAN®, y geles de acrilamida al 7.5% (Anexo A-3).

Para la preparación del buffer de carga se pesaron 100 g de SDS, 1 g azul de bromofenol, 100 mL de glicerol y se disolvieron en 1 L del buffer Tris- HCl 0.2 M pH 6.8. Se agregaron 10 μL de mercaptoetanol por cada 1000 μL de buffer de carga antes de usarse.

Para la elaboración del buffer de corrida se pesaron: 2.04 g de Tris- Base, 9.8 g de glicina, 6.8 mL de SDS 10%; posteriormente se disolvieron en 850 mL de agua desionizada.

La solución teñidora se preparó con metanol al 40% (v/v); 10% ácido acético (v/v); y 0.25% azul Coomassie G-250 (p/v). Se mezclaron y se disolvió a homogeneidad, posteriormente se filtró empleando filtro Whatman No. 41. Para el desteñido del gel se empleó agua desionizada.

Para la preparación de la muestra se colocaron en un tubo eppendorf 50 μ L de la muestra concentrada y purificada parcialmente y buffer de carga en una relación 1:1 (v/v). Se mezcló usando un vortex (Ika modelo Vortex 3) y se colocó en un baño de agua en ebullición por 7 minutos. Posteriormente, 20 μ L de la mezcla se colocaron en un pozo del gel, y se completó el volumen con buffer de corrida. El tiempo de corrida fue de 90 minutos a 120 V. Una vez terminado, el proceso de tinción se llevó a cabo utilizando un microondas (marca Panasonic modelo NN-SF550M), para lo cual el gel se sumergió en la solución teñidora y se calentó con una potencia de 1000 watts por 2 minutos con intervalos de tiempo de 15 segundos. Previó al desteñido, el gel se enjuagó con agua desionizada y el desteñido se realizó igualmente con agua desionizada en horno de microondas, en las mismas condiciones de calentamiento antes mencionadas.

5.4 Identificación de la actividad de lacasa mediante Zimogramas

El zimograma se realizó para corroborar la presencia de actividad de lacasa en la muestra obtenida en la etapa 3. Se llevó a cabo una electroforesis en condiciones nativas empleando como sustrato una solución de ABTS 1 mM en buffer de citrato-fosfato pH 3. El gel nativo se elaboró con concentraciones de gel de acrilamida del 7% para el gel separador y 4% para el gel concentrador (Anexo A-4).

Para la preparación del buffer de carga se pesó 1 g azul de bromofenol y se midió 100 mL de glicerol y se disolvió en 1 L del buffer Tris- HCl 0.2 M pH 6.8.

Para la elaboración del buffer de corrida, se pesaron 2.04 g de Tris- Base, 9.8 g de glicina y se disolvieron en 850 mL de agua desionizada. Como sustrato se utilizó una solución de ABTS 1 mM, disuelta en buffer citrato-fosfato 0.1 M pH 3.0. En un

tubo eppendorf se agregaron 50 μ L de la muestra purificada parcialmente, y 50 μ L de buffer de carga en una relación 1:1 (v/v). Se mezcló mediante un vortex y posteriormente, 20 μ L de la mezcla se colocaron en un pozo del gel, completando el volumen con buffer de corrida. El tiempo de corrida fue de 90 minutos a 120 V. Una vez terminada, el gel se enjuagó con 25 mL de buffer citrato-fosfato 0.1 M pH 3.0, y se sumergió en 25 mL de una solución de ABTS 1 mM, a temperatura ambiente y en ausencia de luz, durante 10 minutos, pasado el tiempo se retiró la solución de ABTS y por último se enjuagó el gel con buffer citrato-fosfato 0.1M pH 3.0.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapas 1. Caracterización fisicoquímica de vinazas de origen mezcalero y bagazo de agave

La muestra de vinaza analizada presentó un color café oscuro ($Abs_{475nm} = 2.82$) lo cual podría deberse a la presencia de melanoidinas (Peña *et al.*, 2003). También, contenía una alta concentración de materia orgánica medida como DQO (62500 mg O₂/L) lo cual se encuentra asociada directamente con el contenido de azúcares reductores (5900 mg EF/L). Lo anterior concuerda con lo reportado por Malandra *et al.* (2003) quienes elaboraron una agua residual sintética similar a las aguas residuales de la industria vitivinícola, en cuanto al contenido de alcoholes, ácidos orgánicos y azúcares reductores; evaluando su contribución individual a la DQO total y demostraron que los azúcares fermentables contribuyen en gran medida a la demanda química de oxígeno (~50%).

El contenido de ácidos fenólicos totales fue de 497 mg EAG/L en la muestra de vinazas analizadas podría estar relacionado con el pH ácido (pH 2.5). Liu *et al.* (2009) demostraron que el pH ácido en el medio de cultivo favorece la producción de lacasa por hongos ligninolíticos. Por otro lado, se ha reportado en diversas investigaciones que los compuestos fenólicos y polifenólicos pueden actuar como inductores para la producción de lacasa (Elisashvili *et al.*, 2010; Gedikli *et al.*, 2010; Tišma *et al.*, 2012).

Las vinazas analizadas mostraron una conductividad eléctrica de 4.52 ± 0.012 μ S/cm, la cual está relacionada con el contenido de minerales como potasio, calcio y magnesio presentes en la muestra (Zhang y Wienhold, 2002). Se ha reportado que la presencia de cobre puede tener un efecto inductor en la producción de lacasa a bajas concentraciones (1-2 mM) (Hess *et al.*, 2002; Stajić *et al.*, 2006; Tinoco *et al.*, 2011).

Tabla 6. Parámetros determinados en vinazas de origen mezcalero

Parámetro	Resultados
DQO (mg O ₂ /L)	62500.0 ± 7053.0
Fenoles totales (mg EAG/L)	497.0 ± 109.0
Azúcares reductores (mg EF/L)	5900.0 ± 100.0
pH	2.4 ± 0.02
SST (mg/L)	9400.0 ± 2690.0
SSF (mg/L)	1200.0 ± 290.0
SSV (mg/L)	8200.0 ± 2970.0
Color (Abs _{475nm})	2.8 ± 0.1
Compuestos aromáticos totales (Abs _{254nm})	84.0 ± 3.6
Nitrógeno total (mg N/mL)	45.5 ± 3.5
N-NO ₃ ⁻ (mg/L)	228.8 ± 5.3
NO ₂ ⁻ (mg/L)	455.0 ± 21.0
SO ₄ ²⁻ (mg/L)	425.0 ± 7.0
PO ₄ ⁻³ (mg/L)	105.0 ± 5.0
Conductividad (µS/cm)	4.5 ± 0.01
Ca (µg/mL)	5.4 ± 0.5
Mg (µg/mL)	1.4 ± 0.2
K (µg/mL)	1.2 ± 0.2
Na (µg/mL)	0.05 ± 0.005
Fe (µg/mL)	0.05 ± 0.002
Cu (µg/mL)	0.02 ± 0.001
Zn (µg/mL)	0.004 ± 0.0004
Cd (µg/mL)	ND
Ni (µg/mL)	ND

Nota: ND: no detectable

En la Tabla 7, se muestran los resultados obtenidos en la caracterización del bagazo. Se observa que el contenido de compuestos fenólicos en el bagazo de Pz fue de 0.038 mg EAG/g bagazo y para Ah de 0.014mg EAG/g bagazo. Los valores reportados de cenizas han sido entre 6 y 7.8 %, en las hojas de *Agave tequilana* Weber, *Agave americana* y *Agave salmiana* (Li *et al.*, 2012; Liñan-Montes *et al.*, 2014). En base a lo anterior, los resultados de cenizas obtenidos para el Ah se

encontraron en el límite inferior (4.92%) y para Pz en el superior (9.9%) a lo reportado. Con respecto al contenido de fibra cruda para Pz y Ah, concuerdan con los reportados por Liñan-Montes *et al.* (2014), quienes obtuvieron valores de 39.97% para el bagazo de *Agave tequilana*. Cabe mencionar que la fibra cruda corresponde al contenido de hemicelulosa y lignina, esta última altamente recalcitrante debido a que no se puede degradar con facilidad por las bacterias presentes comúnmente en el suelo (Sharari *et al.*, 2011). Se ha reportado la presencia de lignina en pencas de *Agave lechuguilla*, *Agave salmiana* y *Agave tequilana* Weber, con valores entre 10 y 15% (Greene, 1932; Cerdeno-Cruz y Alvarez-Jacobs, 1999; García-Reyes y Rangel-Méndez, 2009), se ha comprobado que la presencia de lignina en los medios de cultivo para hongos ligninolíticos, estimula la producción de enzimas ligninolíticas, entre ellas la lacasa (Elisashvili *et al.*, 2006). Por otra parte, se ha reportado la presencia de Cu, Zn, y Ca en hojas de *Agave tequilana* (López y Urias-Silva, 2007), estos minerales se encontraron presentes en el bagazo de los agaves Pz y Ah, además de la presencia de Mg, Fe, Na y K.

Tabla 7. Parámetros determinados en bagazo de *Agave potatorum* Zucc y *Agave angustifolia* Haw.

Parámetro	<i>Agave potatorum</i> Zucc	<i>Agave angustifolia</i> Haw
Fenoles totales (mg EAG/g bagazo)	0.038 ± 0.002	0.014 ± 0.0005
Cenizas (%)	9.9 ± 0.4	4.92 ± 0.1
Fibra (%)	24.82 ± 0.9	41.89 ± 1.9
Ca (µg/g)	0.525 ± 0.009	0.41 ± 0.017
Mg (µg/g)	0.067 ± .01	0.054 ± 0.0002
K (µg/g)	0.095 ± 0.001	0.032 ± 0.0014
Na (µg/g)	0.001 ± 0.0003	0.0008 ± 0.0003
Fe (µg/g)	0.0022 ± 0.0005	0.0014 ± 0.0002
Cu (µg/g)	0.00095 ± 0.00003	0.00095 ± 0.00005
Zn (µg/g)	0.00053 ± 0.0005	0.0011 ± 0.00002
Cd (µg/g)	ND	ND
Ni (µg/g)	ND	ND

Nota: ND: no detectable

Etapas 2. Evaluación de los medios de cultivo para el crecimiento de los hongos ligninolíticos en medio líquido y estado sólido

En los medios líquidos C y D (Etapas 2, Actividad 2) el crecimiento de las cepas de *Pleurotus spp.* (Ps) fue positivo después de 10 días de incubación. En los medios A y B no se observó crecimiento del micelio de Ps. Así mismo, se observó crecimiento de las cepas de *Pleurotus spp.* y *Trametes versicolor* CDBB-h-1051 en los polvos de *Agave potatorum* Zucc y *Agave angustifolia* Haw.

Etapas 3. Evaluación de la actividad enzimática de lacasa en las cepas de *Pleurotus spp.* y *Trametes versicolor* CDBB-h-1051

Una vez probados los medios de cultivos líquidos C y D, se procedió a la evaluación de la actividad enzimática de lacasa en FCS por lote, con la finalidad de seleccionar la cepa y definir el medio de cultivo con el cual se obtuviera la mayor actividad enzimática. En la Tabla 8 se muestran los resultados de la actividad enzimática a los 10 días de fermentación obtenida con las diferentes cepas de *Pleurotus spp.* (Ps) en los medios C y D, y de *Trametes versicolor* CDBB-h-1051 (Tv) en el medio C.

Tabla 8. Actividad enzimática obtenida de las cepas de *Trametes versicolor* CDBB-h-1051 (Tv) y *Pleurotus spp.* evaluadas en Caldo Dextrosa Sabouraud 2% (medio C) y Caldo Dextrosa Sabouraud 2% + extracto de malta (medio D)

Cepa	Actividad enzimática (UI/L)
UTMB (Medio C)	94.0 ± 7.0
UTMB (Medio D)	248.0 ± 0.2
H1R4B6 (Medio C)	6.9 ± 0.1
H1R4B6 (Medio D)	81.0 ± 1.0
UTM-R (Medio C)	1.6 ± 0.03
UTM-R (Medio D)	7.4 ± 0.7
H2R2B4(Medio C)	6.4 ± 0.01
H2R2B4(Medio D)	18.3 ± 0.7
H2R3B4 (Medio C)	3.1 ± 1.0
H2R3B4 (Medio D)	2.4 ± 0.3
H3R2B1 (Medio C)	2.9 ± 0.03
H3R2B1 (Medio D)	81.0 ± 1.0
Tv (Medio C)	538.0 ± 58.0

La mayor actividad de lacasa se obtuvo con la cepa de Tv, con un valor de 538 UI/L. Para las cepas de Ps, se observó mayor actividad enzimática en el medio D. La máxima actividad obtenida fue con la cepa UTMB, con un valor de 248 UI/L. Por tal motivo se seleccionó a la cepa UTMB, para trabajar con ella en la producción de lacasa.

Etapa 4. Obtención de Lacasa mediante fermentación en cultivo sumergido y en estado sólido

Obtención de pellets dobles HL+ bagazo de agave

La formación de los pellets se logró a una proporción de 50 mg de bagazo y 30 mg de biomasa del HL. En la Figura 8 se muestran los pellets dobles formados con Ah+UTMB y Ah+Tv, los cuales presentaron diámetros promedio de 0.5 ± 0.1 cm.

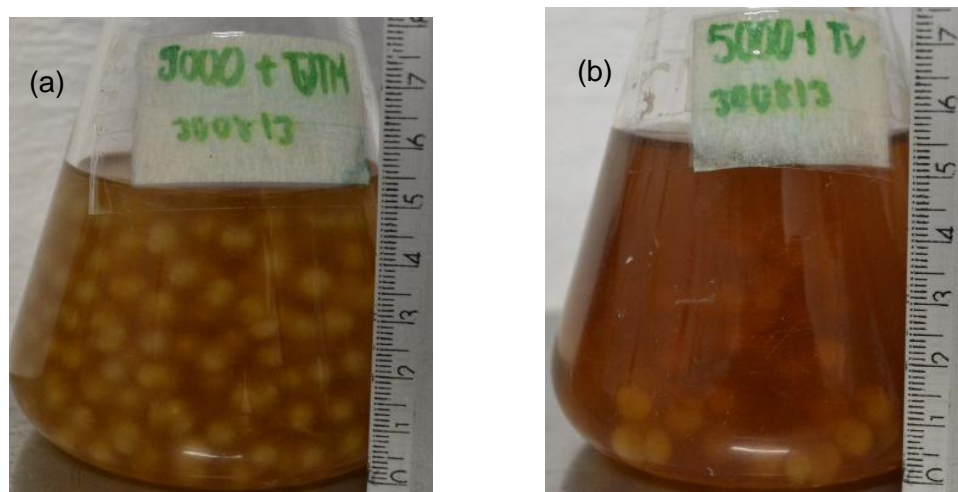


Figura 8. Pellets dobles formados con polvo de *Agave angustifolia* Haw-UTMB (a) o *Trametes versicolor* CDBB-h-1051 (b)

Cinética de fermentación en cultivo sumergido (FCS) por lote a nivel matraz

En las Figuras 9 y 10, se muestran los resultados obtenidos de las cinéticas de AELac empleando vinazas mezcaleras a concentraciones de 670, 900, 1300 y 1900 mg EF/L, y pellets dobles de Ah+Tv ó Ah+UTMB.

En la Figura 9 se observa que la mayor AELac se obtuvo con pellets dobles formados con Ah+Tv y vinazas mezcaleras diluidas a 900 mg EF/L obteniéndose 2485 ± 138 UI/L al día 15 de fermentación, sin embargo la prueba de rango multiple DUNCAN, a un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, mostró que no existe diferencia significativa en la AELac obtenida a partir del día 6 al 15 de

fermentación, lo cual indicó que el HL ya no produjo más enzima. Empleando vinazas diluidas a 670 mg EF/L, se observó un máximo de actividad en el día 3, posterior a este se observó un ligero decaimiento manteniéndose así hasta el final de la cinética (día 18). En el tratamiento control, la AELac se mantuvo constante (36 ± 3 UI/L) a lo largo de la cinética. La actividad de lacasa obtenida con vinazas a 900 mg EF/L fue 2 veces mayor que la máxima actividad de lacasa obtenida empleando vinazas con una concentración de 670 mg EF/L y 60 veces mayor que la actividad máxima de lacasa obtenida con el control. En ambas cinéticas al día 15 de fermentación la actividad mostró un decaimiento, lo cual podría deberse a la desnaturalización de la enzima por las proteasas liberadas durante la autólisis de los hongos o por el efecto inhibitor de la lacasa por producto (Cambria *et al.*, 2011). La AELac obtenida en esta etapa fue 200 veces mayor a lo reportado por Silverio *et al.* (2013) quienes obtuvieron una actividad enzimática de lacasa de 10.7 UI/L empleando pellets formados con *Trametes versicolor* MUM 04.100 y fibra sintética comercial en un medio de cultivo sintético y 4 veces mayor a lo obtenido por Feng *et al.* (2013), quienes obtuvieron una actividad de lacasa de 503.3 UI/L empleando pellets de alginato de calcio y *Trametes versicolor* CICC 14001, en un medio de cultivo sintético.

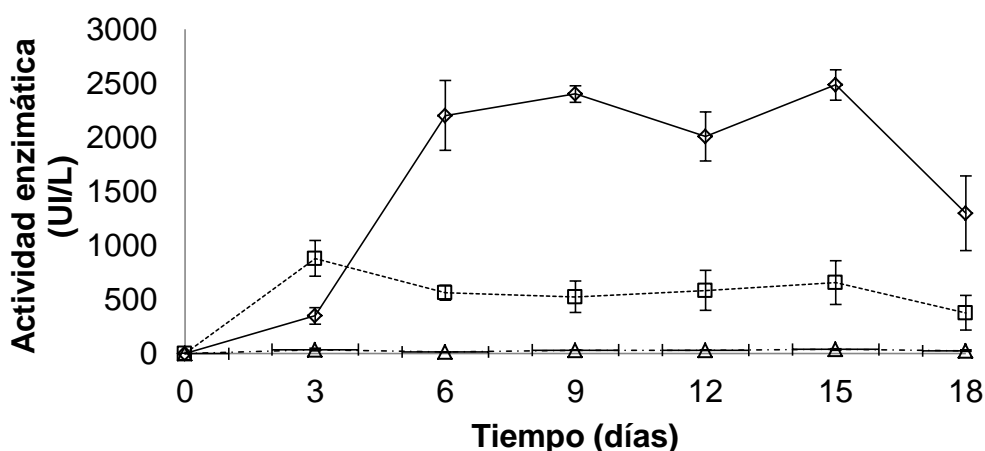


Figura 9. Cinética de actividad enzimática de lacasa obtenidas empleando pellets dobles formados con polvo de penca de *Agave angustifolia* Haw y *Trametes versicolor* CDBB-h-1051 y vinazas mezcleras diluidas a: 670 mg EF/L (□); 900 mg EF/L (◇); y control (Caldo Dextrosa Sabouraud 2%) (△)

En la Figura 10, se muestran los resultados de la cinética de AELac obtenida con pellets dobles formados con Ah-UTMB, se observa que la mayor AELac obtenida fue de 14 ± 0.05 UI/L empleando vinazas mezcaleras diluidas a 900 mg EF/L al tercer día de cinética, posteriormente se observa un decaimiento abrupto en la actividad enzimática, lo cual podría deberse a la desnaturalización de la enzima o a su inhibición por producto. La AELac obtenida con vinazas diluidas a 670 mg EF/L fue 10 veces menor a la obtenida con vinazas diluidas a 900 mg EF/L. La ANOVA mostró que existe diferencia significativa entre las AELac obtenidas con las vinazas diluidas y el control. La actividad enzimática obtenida en esta etapa fue 4 veces menor a la obtenida por Mikiashvili *et al.* (2006) quienes emplearon a la cepas de *Pleurotus ostreatus* 98 y *Pleurotus ostreatus* 108 formando pellets miceliarés en medio mineral, mostrando una AELac de 58 y 90 UI/L para ambas cepas respectivamente. Así mismo, fue 27 veces menor a la obtenida por Casieri *et al.* (2008) los cuales emplearon a la cepa de *Pleurotus ostreatus* inmovilizada en cubos de esponja de poliuretano en medio Tien y Kirk y obtuvieron una AELac de 382 UI/L.

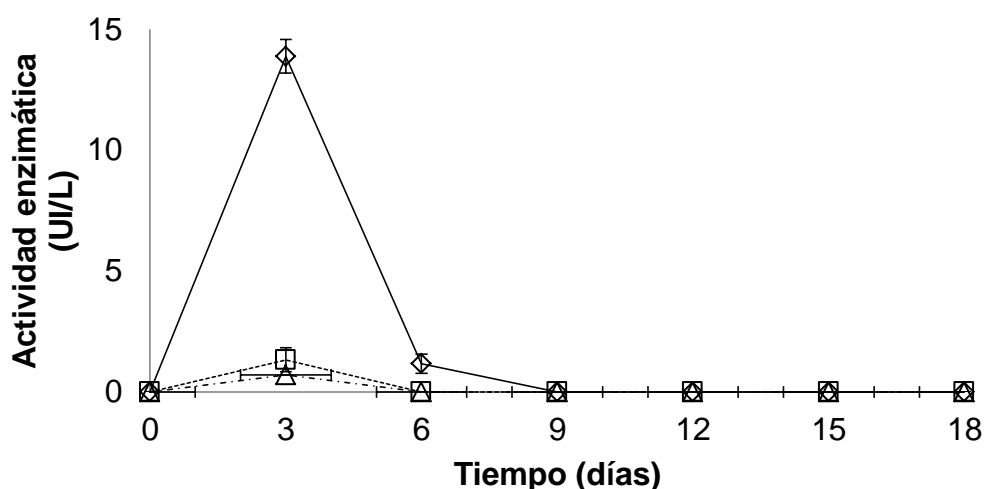


Figura 10. Cinéticas de actividad enzimática de lacasa obtenidas empleando pellets dobles formados con polvo de penca de *Agave angustifolia* Haw y cepa UTMB y vinazas mezcaleras diluidas a: 670 mg EF/L (□); 900 mg EF/L (◇); y control (Caldo Dextrosa Sabouraud 2% + Extracto de Malta) (Δ)

En vinazas diluidas a concentraciones de 1300 y 1900 mg EF/L no se observó actividad enzimática. Eggert *et al.* (1996) reportaron que a concentraciones altas de azúcares simples en el medio de cultivo, pueden causar inhibición en la producción de lacasa. Las muestras de vinazas con 1300 y 1900 mg EF/L contenían 0.47 mM y 0.7mM de ácidos fenólicos expresados como ácido respectivamente, se ha reportado que la presencia de algunos polifenoles y compuestos aromáticos pueden causar inhibición en la producción de lacasa, siendo la estructura química de los compuestos fenólicos la que determina la concentración a la cual se presenta la inhibición, se han reportado que algunos compuestos inhiben desde 0.5 mM hasta 20 mM (Xiao *et al.*, 2004; Elisashvili *et al.*, 2010).

El análisis de varianza (de dos factores con réplica) a un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, mostró que existe diferencia significativa entre el origen de la cepa y la concentración de azúcares reductores expresados como EF/L sobre la actividad enzimática de lacasa (Apéndice 8).

En la FCS la mayor AELac alcanzada fue empleando vinazas mezcaderas diluidas a una concentración de 900 mg EF/L y *Trametes versicolor* CDBB-h-1051 inmovilizado en pellets dobles formados con Ah, al noveno día de cinética.

La cepa de *Trametes versicolor* CDBB-h-1051 mostró una AELac mayor cuando se inmovilizó en los pellets dobles formados con bagazo de la penca del *Agave angustifolia* Haw (2485 UI/L) con respecto a la obtenida cuando se encontraba el hongo en su forma libre (538 UI/L, etapa 3). Resultados similares fueron obtenidos por Wang *et al.* (2013), quienes emplearon a *Trametes versicolor* CICC 14001 libre e inmovilizado obteniendo actividades de lacasa mayores empleando al hongo inmovilizado (470.5 UI/L) que empleando al hongo libre (328.9 UI/L). Caso contrario, se observó con la cepa parental de *Pleurotus spp.* UTMB, la cual tuvo una mayor AELac cuando se encontraba el hongo en su forma libre que inmovilizado formando pellets con el bagazo de la penca del *Agave angustifolia* Haw. Lo anterior podría ser causado por, *i)* La difusión del sustrato al sitio activo de la lacasa; *ii)* el proceso de inmovilización puede causar cambios en la

conformación de la proteína así como en su estado de ionización y disociación de la enzima dándole así menos estabilidad (Emine *et al.*, 1995; Zille *et al.*, 2003).

Cinética de fermentación en estado sólido (FES)

Los resultados de la actividad enzimática de lacasa, empleando las cepas de UTMB y Tv, en medio sólido usando como sustrato el polvo de bagazo de penca de *Agave potatorum* Zucc (Pz) y penca de *Agave angustifolia* Haw (Ah), se muestran en las Figuras 11 y 12. Para *Trametes versicolor* CDBB-h-1051 la mayor actividad enzimática de lacasa obtenida fue al sexto día con 487 ± 94 UI/L empleando polvo Pz (Figura 11), al día 9 se observa un decaimiento en la actividad enzimática de lacasa, el cual sigue sucediendo hasta el día 15 de fermentación. Esto puede deberse a la detención de producción de lacasa o que la enzima se encuentra desactivada ya sea por inhibición o por efecto de una hidrólisis. En la cinética obtenida con polvo Ah, la actividad enzimática se mantuvo constante del día 9 al día 15 de cinética con una actividad de 226 ± 5 UI/L, lo que puede indicar que se detuvo la producción de lacasa en el medio.

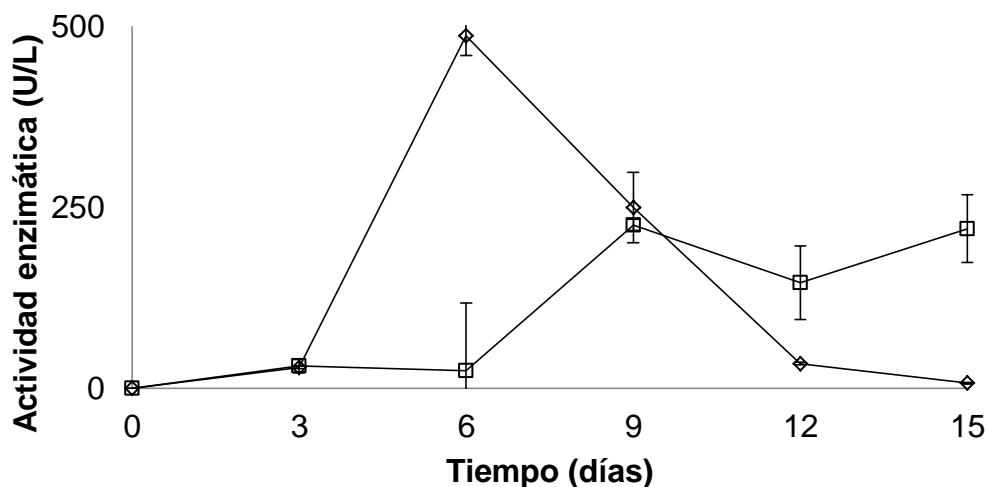


Figura 11. Cinética de actividad enzimática de lacasa empleando polvo de *Agave potatorum* Zucc-*Trametes versicolor* CDBB-h-1051 (◇) y polvo de *Agave angustifolia* Haw-*Trametes versicolor* CDBB-h-1051 (□)

Como se observa en la Figura 12, la mayor actividad enzimática de lacasa con UTMB fue al noveno día, empleando como sustrato Ah obteniéndose valores de actividad enzimática de 33.1 ± 1.3 UI/L, posteriormente se observa un decaimiento en la actividad lo que podría indicar una inactivación de la lacasa en el medio. Cuando se utilizó polvo Pz, se obtuvo una actividad similar el día 6 y 12 de 23 ± 0.05 UI/L. Posteriormente se observó un decaimiento de la actividad enzimática.

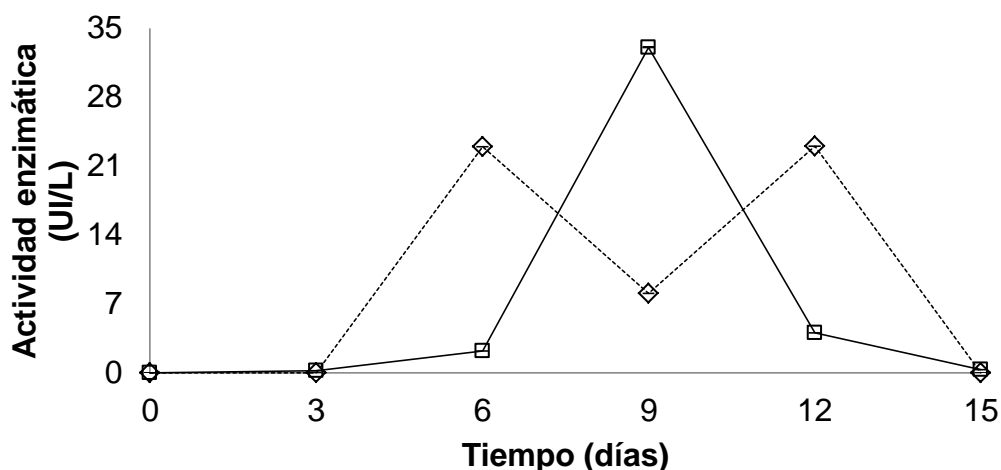


Figura 12. Cinética de actividad enzimática de lacasa empleando polvo de *Agave potatorum* Zucc-UTMB (◊) y polvo de *Agave angustifolia* Haw-UTMB (□).

La disminución de AELac obtenida al día 12 de fermentación empleando polvo de *Agave angustifolia* Haw-*Trametes versicolor* CDBB-h-1051 así como al día 9 de fermentación empleando polvo de *Agave potatorum* Zucc-UTMB podría deberse a errores indeterminados, o bien debido a la experimentación en sistemas biológicos, los cuales no se pueden controlar.

La ANOVA (dos factores con réplica) a un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, mostró que existe diferencia significativa entre el factor origen de la cepa ($Tv \neq UTM$) sobre la AELac. Sin embargo, con respecto al factor de origen del bagazo no se observó

diferencia significativa ($Pz=Ah$) sobre la AELac. Por otra parte, cuando existe interacción entre ambos factores, se observó diferencia significativa en la actividad de lacasa ($Pz-UTMB\neq Pz-Tv$) (Apéndice 9).

En la FES la mayor AELac se obtuvo empleando la cepa de *Trametes versicolor* CDBB-h-1051 y polvo de *Agave potatorum* Zucc al sexto día de cinética.

Para verificar que existe un efecto positivo por la presencia de bagazo en la unidad experimental sobre la AELac, se realizó una cinética de fermentación empleando como unidad experimental polvo Pz + micelio de Tv humidificado con medio CDS 2% (UE1), comparado con el control el cual no contenía polvo de agave Pz. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 13.

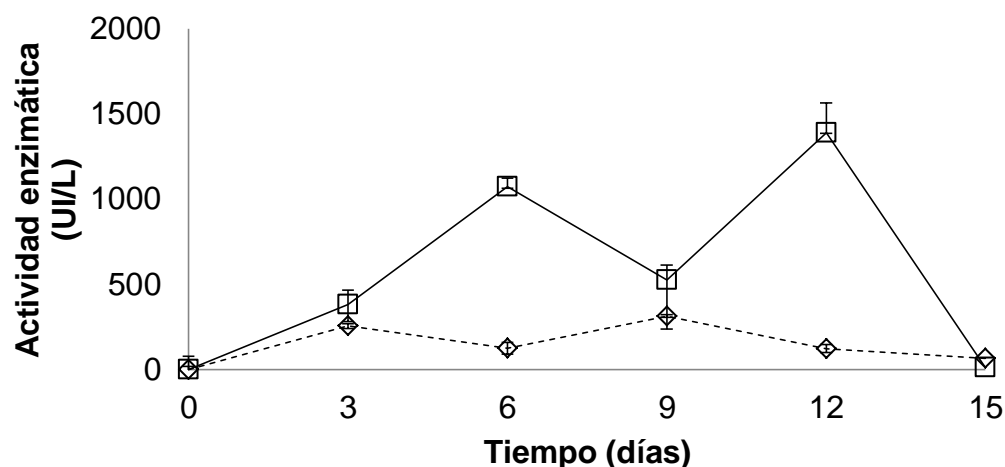


Figura 13. Cinética de actividad enzimática de lacasa empleando: *Trametes versicolor* CDBB-h-1051+polvo *Agave potatorum* Zucc+ Caldo Dextrosa Sabouraud 2% (□); *Trametes versicolor* CDBB-h-1051+ Caldo Dextrosa Sabouraud 2% (◇)

En la Figura 13 se observa que la UE1 obtuvo su máxima AELac al doceavo día de fermentación con 1389 ± 203 UI/L, posteriormente existe un decaimiento de la actividad enzimática, lo cual podría deberse a la desnaturalización de la enzima o

a la inhibición por sustrato en el medio (Cambria *et al.*, 2011). Cuando se omite al bagazo (medio control) se observa que la AELac disminuye en aproximadamente 1000 UI/L con respecto a la UE1. Las mayores actividades de lacasa obtenidas en la UE1 podría deberse a la presencia de fibra en el bagazo (24%) de la cual aproximadamente del 10 al 15% es lignina (Greene, 1932; Cerdeno-Cruz y Alvarez-Jacobs, 1999; García-Reyes y Rangel-Méndez, 2009), y a la presencia de ácidos fenólicos (0.038 mg EAg/g de bagazo), los cuales se ha reportado tienen un efecto inductor sobre la producción de lacasa (Gedikli *et al.*, 2010; Pozdnyakova *et al.*, 2010). La disminución de AELac obtenida al día 9 de fermentación podría deberse a errores indeterminados o bien debido a la experimentación en sistemas biológicos, los cuales no se pueden controlar. La ANOVA (factor simple) a un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, mostró que existe diferencia significativa debido a la presencia de bagazo en la FES sobre la AELac (Apéndice 10).

Con la finalidad de observar el efecto de las vinazas como humidificador en la FES, se realizó su evaluación a concentraciones de 670, 900, 1300, 1900 mg EF/L y como control al medio CDS 2%.

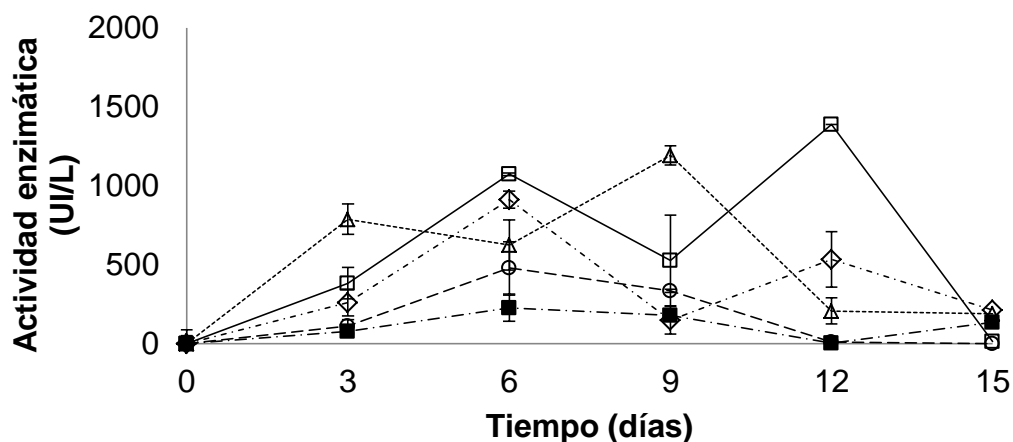


Figura 14. Cinética de actividad enzimática de lacasa en fermentación en estado sólido, empleando como humidificador: Caldo Dextrosa Sabouraud 2% (□), vinazas diluidas a: 670 mg EF/L (◇), 900 mg EF/L (Δ), 1300 mg EF/L (○), 1900 mg EF/L (■)

La vinaza diluida a 900 mg EF/L mostró ser el humidificador con el cual se obtuvo la mayor AELac 1193 ± 112 UI/L al noveno día de fermentación; seguido de las vinazas con 670 mg EF/L con una AELac de 861 ± 109 UI/L al sexto día de fermentación. Cuando se empleó vinazas con 1300 mg EF/L se observó una actividad máxima de 479 ± 30 UI/L, al sexto día; y con vinazas a 1900 mg EF/L, con una actividad máxima de 224 ± 15 UI/L al sexto día de fermentación (Figura 14).

La ANOVA (factor simple) a un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, mostró que existe un efecto significativo en la actividad de lacasa debido al humidificador empleado. Por otro lado, la prueba de rangos múltiples de DUNCAN indicó que no existe diferencia significativa entre el uso del medio CDS 2% y vinazas diluidas a 900 mg EF/L como humidificadores sobre la AELac, por lo que es posible la sustitución del medio CDS 2% por vinazas mezcaleras como humidificador en la FES, lo cual traería como consecuencia un ahorro de costos en los insumos. Sin embargo mostró que ambas muestras tuvieron diferencia significativa en la AELac con las vinazas diluidas a concentraciones de 600, 1300 y 1900 mg EF/L, así mismo las muestras antes mencionadas mostraron diferencias significativas entre ellas (Apéndice 11).

La mayor AELac obtenida en la FES fue empleando a la cepa *Trametes versicolor* CDBB-h-1051 y polvo de penca de *Agave potatorum* Zucc como sustrato humidificado con medio CDS 2% al doceavo día de fermentación con 1389 UI/L. Boran y Yesilada, (2011) obtuvieron una actividad máxima de lacasa de 8510 UI/L al día 10 de fermentación empleando a *Trametes versicolor* y salvado de trigo como sustrato humidificado con un medio mineral. Por su parte Moldes *et al.* (2003) obtuvieron una actividad de lacasa máxima de 3550 UI/L al día 15 de fermentación empleando a *Trametes hirsuta* y salvado de cebada como sustrato humidificado con medio de cultivo mineral. Téllez-Téllez *et al.* (2008), obtuvieron una actividad de lacasa máxima de 2430 UI/L utilizando a *Pleurotus ostreatus* y como soporte esponja de poliuretano humidificado con medio mineral en la producción de lacasa. Podemos observar que nuestros resultados se encuentran

por debajo del intervalo reportado de actividades enzimáticas obtenidas por FES, sin embargo esto puede deberse al sustrato utilizado, ya que se ha reportado la presencia de saponinas en el bagazo de origen mezcalero, lo cual podría causar inhibición en la producción de la enzima (Mei-Fang *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2013).

Comparación de las actividades enzimáticas obtenidas por fermentación en cultivo sumergido y fermentación en estado sólido

En el presente trabajo se obtuvieron mayores AELac empleando fermentación en cultivo sumergido con 2485 ± 138 UI/L comparada con la fermentación en estado sólido de 1389 ± 202 UI/L, esta diferencia podría deberse a que en la FCS existe una mayor disponibilidad de los azúcares reductores y compuestos fenólicos presentes en las vinazas, los cuales pueden actuar como inductores de la síntesis de lacasa a diferencia de la FES en donde el bagazo contiene una menor cantidad de dichos compuesto o bien la presencia de otros que pudieran estar causando su inhibición.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con lo obtenido por Elisashvili *et al.* (2008), quienes evaluaron la actividad enzimática de lacasa empleando como sustrato para FES hoja de árbol (*Fagus sylvatica*) y para FCS sustituyeron la concentración de azúcar presente en el medio mineral por 40 g/L de hojas de árbol. Las cepas utilizadas fueron *Pleurotus ostreatus* y *Lentinus edodes*; obtuvieron actividades máximas de lacasa en FES de 57 ± 4.7 U/frasco empleando *L. edodes* y 17 ± 1.8 U/frasco con *P. ostreatus*; en comparación con FCS donde obtuvieron actividades máximas de 89 ± 6.5 y 11 ± 0.9 U/frasco con *L. edodes* y *P. ostreatus* respectivamente. Como se puede apreciar los mejores resultados obtenidos fueron empleando FCS. Sin embargo, Coelho *et al.* (2010) obtuvieron resultados similares de actividades enzimáticas de lacasa en FES y en FCS. Para la fermentación en cultivo sumergido utilizaron medio mineral adicionado con 1% de mazorca de maíz y para la fermentación en estado sólido emplearon únicamente como sustrato a la mazorca de maíz. La cepa empleada fue *Ganoderma lucidum*, obtuvieron actividades de lacasa de 0.6 UI/L en ambos sistemas de fermentación.

Etapas 5. Purificación parcial de lacasa

Se seleccionaron las condiciones en las que se observó la mayor actividad de lacasa en FCS y FES. En FCS fue con vinazas mezcaleras a una concentración de 900 mg EF/mL y pellets formados con *Trametes versicolor* CDBB-h-1051 y bagazo de penca de *Agave angustifolia* Haw, al noveno día de fermentación. En FES fue empleando *Trametes versicolor* CDBB-h-1051 y como sustrato bagazo de penca de *Agave potatorum* Zucc humidificado con medio de cultivo CDS 2%, al doceavo día de fermentación. De la misma manera se realizó la purificación parcial del medio control que contenía pellets dobles de *Trametes versicolor* CDBB-h-1051+ polvo de *Agave angustifolia* Haw en medio CDS 2%.

Se logró la separación, concentración y purificación parcial de la enzima lacasa empleando membranas de 0.45 μm y de 10 kDa, a temperatura ambiente. Con la primera filtración se separó la biomasa presente en el medio de cultivo. Con la membrana de 10 kDa, se logró eliminar proteínas de menor peso molecular al del tamaño de poro y la concentración de la lacasa. Lo anterior se constató con los resultados obtenidos mediante SDS-PAGE y zimograma ya que se lograron ver bandas bien definidas e intensas.

En la Figura 15, se muestra el gel obtenido mediante SDS-PAGE. Para el medio control (carril 1) se observaron cuatro bandas intensas, que corresponden a los pesos moleculares de 100, 70-50 kDa, y dos bandas entre 30-15 kDa. Para FES (carril 2), se observan solo dos bandas intensas que corresponden a los pesos moleculares entre 75 y 50 kDa y la segunda corresponde a un peso molecular menor a 30 kDa y en FCS (carril 3) sólo se observó una banda entre 75 y 50 kDa.

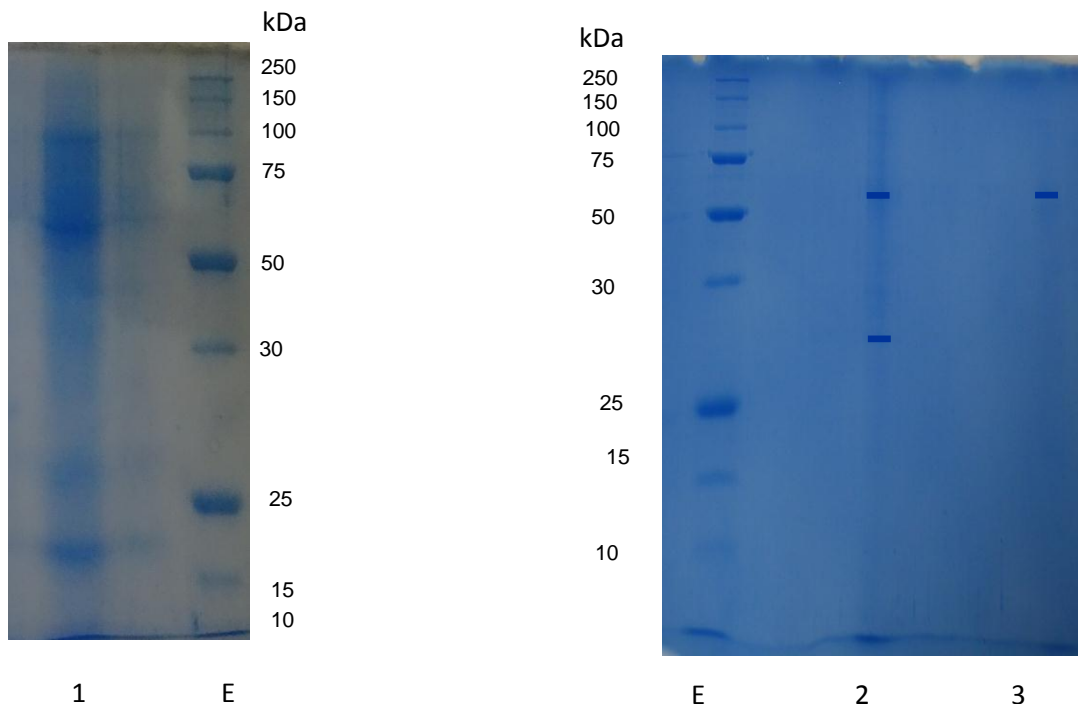


Figura 15. Gel de electroforesis SDS-PAGE. Carril E: estándar de pesos moleculares; Carril 1: Muestra purificada parcialmente obtenida a partir de pellets dobles de *Trametes versicolor* CDBB-h-1051+*Agave angustifolia* Haw en Caldo Dextrosa Sabouraud 2%; Carril 2: muestra purificada parcialmente obtenida de la fermentación en estado sólido; Carril 3: muestra purificada parcialmente obtenida de la fermentación en cultivo sumergido

En la Figura 16 se muestra el zimograma del control y de las muestras concentradas y parcialmente purificadas obtenidas en FES y FCS. Para la muestra control (carril 1) observaron dos bandas de color verde esmeralda y en las muestras de FES y FCS (Carril 2 y 3) se observa solo una banda color verde esmeralda, color característico del ABTS en su forma oxidada (Lu *et al.*, 2007; Pant y Adholeya, 2010), lo que indica la presencia de actividad de lacasa en la muestra parcialmente purificada, lo cual corrobora los resultados de actividad de lacasa obtenida en los cultivos de FCS y FES.

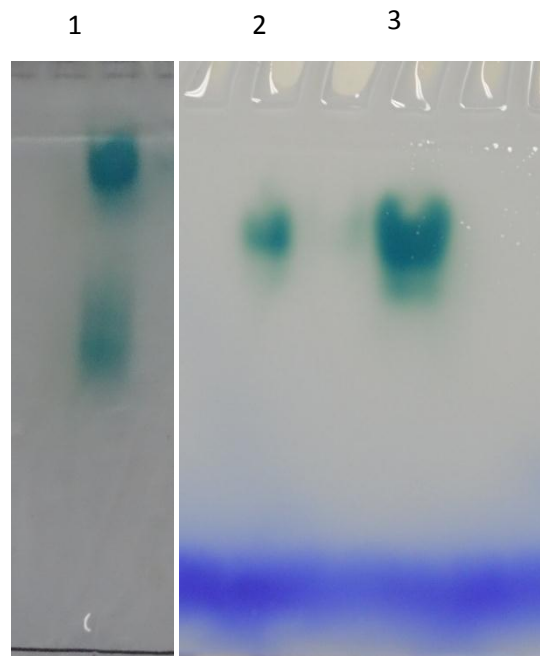


Figura 16. Zimograma de actividad de lacasa. Carril 1 Muestra purificada parcialmente obtenida a partir de pellets dobles de *Trametes versicolor* CDBB-h-1051+*Agave angustifolia* Haw en Caldo Dextrosa Sabouraud 2%; Carril 2: muestra purificada parcialmente obtenida de la fermentación en cultivo sumergido; 3: muestra purificada parcialmente obtenida de la fermentación en estado sólido

Se elaboró un gel SDS-PAGE con muestras de FCS y FES previo a su purificación parcial (imagen no mostrada) en el cual solo se observó un barrido en el carril de corrida, y no se logró observar ninguna banda definida. Se confirmó que se logró una purificación parcial de la enzima empleando las membranas de ultra- y microfiltración al observar solo una o dos bandas intensas y definidas (Figura 15). Así mismo, el peso molecular obtenido para algunas bandas (100 y 75-50 kDa) nos permite inferir que pudieran ser de la enzima lacasa.

Con respecto al zimograma, en el medio control se observaron dos bandas, las cuales corresponden a la presencia de isoenzimas de lacasa presentes en la muestra, sin embargo cuando se analizaron las muestras de FCS y FES sólo se observó una banda. Esto indica que el medio de cultivo tiene un efecto en la expresión de isoenzimas de lacasa. A partir de las bandas observadas en el zimograma se puede decir que la lacasa producida por *Trametes versicolor* CDBB-

h-1051 es termoestable ya que a pesar que el proceso de purificación parcial se hizo a temperatura ambiente, no se observó su inactividad.

Los pesos moleculares para las bandas observadas en SDS-PAGE en el presente trabajo (100 y 75-50 kDa) corresponden a pesos moleculares reportados para la enzima lacasa. Lu *et al.* (2007) utilizaron al hongo de putrefacción blanca *Picnoporus sanguineus* para la producción de lacasa en fermentación en cultivo sumergido. Ellos realizaron la purificación y posteriormente identificación de lacasa mediante SDS-PAGE determinando un peso molecular de 61.4 kDa, y realizaron un gel nativo para corroborar la presencia de la lacasa, utilizando como sustrato al ABTS 1 mM como medio de tinción de la actividad. Por otro lado, Baldrian (2004), utilizó al hongo ligninolítico *Daedalea quercina* para la producción de lacasa en fermentación en cultivo sumergido. Realizó la identificación de la enzima pura mediante SDS-PAGE, la cual mostró un peso molecular de 69 kDa. Así mismo elaboró un zimograma utilizando como sustrato ABTS y guayacol para comprobar la presencia de la enzima. Por su parte, Marugesan *et al.* (2006), emplearon al hongo ligninolítico *Pleurotus sajor-caju*, para la producción de lacasa en fermentación en cultivo sumergido. La lacasa purificada mostró un peso molecular de 61 kDa, realizaron un zimograma empleando como sustrato ABTS 1 mM o guayacol al 10 mM como tinción de actividad. Zhi-Xin *et al.* (2010), llevaron a cabo la producción de lacasa a partir de *Picnoporus sp.* SYBC-L1 en fermentación en cultivo sumergido, observaron dos isoenzimas de lacasa con pesos moleculares de 55.89 y 63.07 kDa determinados por SDS-PAGE. Realizaron un gel nativo empleando como medio de tinción de actividad a α -naftol a 0.5 mM. Por tal motivo, en las bandas encontradas mediante SDS-PAGE correspondientes a 100 y entre 50 y 75 kDa podrían ser isoenzimas de lacasa producidas por *Trametes versicolor* CDBB-h-1051.

Los resultados obtenidos en esta fase permiten confirmar la producción de lacasa en los medios de cultivo con vinazas mezcaleras y bagazo de agave. De igual manera confirma que se logró la purificación parcial de lacasa mediante el uso de membranas de ultra- y microfiltración.

9. CONCLUSIONES

Con respecto a los resultados de la verificación de las hipótesis planteadas en este proyecto, se concluye lo siguiente:

Hipótesis 1. Las cepas parentales e híbridas de *Pleurotus spp.* así como la cepa de *Trametes versicolor* CDBB-h-1051, serán capaces de producir lacasa empleando como sustratos las vinazas y bagazo de origen mezcalero. Se valida lo anterior debido a que las cepas de *Pleurotus spp.* así como la cepa de *Trametes versicolor* CDBB-h-1051 mostraron actividades enzimáticas de lacasa empleando como sustrato a las vinazas mezcaldas y bagazo de agave.

Hipótesis 2. La actividad enzimática de lacasa en fermentación en cultivo sumergido será mayor con respecto al incremento en la concentración de azúcares reductores presentes en las vinazas mezcaldas. Se valida lo antes mencionado en el intervalo de 670-900 mg EF/L, debido a que la AELac obtenida a 670 mg EF/L fue 2.8 veces menor a la obtenida con 900 mg EF/L.

Hipótesis 3. El uso de vinazas mezcaldas como humidificador en la fermentación en estado sólido tendrá un efecto positivo sobre la actividad enzimática de lacasa. No se valida lo anterior debido a que no existe diferencia significativa entre la AELac obtenida con vinazas diluidas a 900 mg EF/L y CDS 2% (control).

Adicionalmente se presentan las conclusiones de los resultados más relevantes de este trabajo.

- Las vinazas mezcaldas presentaron la presencia de ácidos fenólicos, azúcares reductores y minerales trazas como Cu, Zn y Fe. Las muestras

analizadas de bagazo mostraron la presencia de ácidos fenólicos y los siguientes minerales Cu, Zn y Fe a niveles traza.

- El medio líquido adecuado para el crecimiento de las cepas de *Pleurotus spp.* fue el medio CDS 2% con adición de extracto de malta.
- De las cepas de *Pleurotus spp.* evaluadas, la cepa parental UTMB mostró la mayor actividad enzimática.
- Se logró la obtención de pellets dobles a partir de polvo de *Agave angustifolia* Haw y las cepas de *Trametes versicolor* CDBB-h-1051 y *Pleurotus spp.*
- Las condiciones óptimas para la producción de lacasa en fermentación en cultivo sumergido fueron utilizando pellets formados con Ah-Tv y vinazas mezcaleras diluidas a una concentración de 900 mg equivalentes de fructosa/L al quinceavo día de cinética.
- Las condiciones óptimas para la producción de lacasa en la fermentación en estado sólido fueron con la cepa de Tv y bagazo Pz al doceavo día de fermentación.
- Se logró la purificación parcial de la enzima lacasa mediante el uso de membranas de 0.45 μm y de 10 kDa a temperatura ambiente. Mediante SDS-PAGE se identificaron dos bandas intensas con pesos moleculares de 100 y entre 75-50 kDa, los cuales han sido reportados para la enzima lacasa, y se constató la presencia de actividad de lacasa a partir de los resultados obtenidos con el zimograma donde se observaron dos bandas con actividad enzimática, lo cual puede indicar la presencia de isoenzimas.

10. PERSPECTIVAS

- Determinar de la composición de la fibra (lignina, celulosa y hemicelulosa) del bagazo.
- Escalar la producción de lacasa a nivel biorreactor del FCS.
- Probar el extracto fenólico de las vinazas como inductores en la producción de lacasa en los sistemas de fermentación en cultivo sumergido y estado sólido.
- Integrar el proceso de obtención de lacasa a una biorefinería para la utilización de los residuos orgánicos de la industria del mezcal.
- Realizar la purificación a homogeneidad de la lacasa.
- Caracterizar la estabilidad, catálisis y estructura de la lacasa producida por *Trametes versicolor* CDBB-h-1051 y *Pleurotus spp.*-UTMB.

11. REFERENCIAS

- Aguiar, M.M., Ferreira, L.F., Monteiro, R.T. (2010). Use of vinasse and sugarcane bagasse for the production of enzymes by ligninocellulolytic fungi. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 53 (5). [online].
- Aguilar, C.N., E. Favela-Torres, G. Viniegra- González and C. Augur. (2002). Culture conditions dictate protease and tannase production in submerged and solid-state cultures by *Aspergillus niger* Aa-20. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 102-103: 407-414.
- APHA-AWWA-WPC. (1998). Standard Methods for the examination of water and wastewater, 20th, Edition. APHA, WashingtonDC.
- Archibald, F.S., Bourbonnais, R., Jurase. K. L., Paise, M.G., Reid, I.D. (1997). Kraft pulp bleaching and deslignification by *Trametes versicolor*. *Journal of biotechnology*. 53: 215- 336.
- Arora, D.S., Kumar, S.R. (2010). Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 160: 1760–1788.
- Autore, F., Del Vecchio, C., Fraternali, F., Giardina, P., G., Faraco, V. (2009). Molecular determinants of peculiar properties of a *Pleurotus ostreatus* laccase: Analysis by site-directed mutagenesis. *Enzyme and Microbial Technology*. 45: 507–513.
- Baldrian, P. (2004). Purification and characterization of laccase from the white-rot fungus *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme. *Applied of Microbiology and Biotechnology*. 63: 560–563.
- Battaner, A. E. Introducción a la Bioquímica, 2. Parte 2ª: Enzimología [libro en línea] Universidad de Salamanca 2013 [Fecha de consulta: 10 noviembre 2014]. Disponible en <gredos.usal.es/jspui/bitstream/10366/119453/1/Enzimologia.pdf>.
- Benitez, F.J., Real, F.J., Acero, J.L., Garcia, J., Sanchez,M. (2003). Kinetics of the ozonation and aerobic biodegradation of wine vinasses in discontinuous and continuous processes. *Journal of Hazardous Materials*. B101, 203-218.
- Bamforth, S.M., Singleton, I. (2005). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 80 (7): 726-736.
- Bisaria, V.S. (1998). Bioprocessing of agro-residues to value added products. In A.M. Alexander (ed.) Bioconversion of waste materials to industrial products Blackie Academic and Professional, London.
- Boran, F., Yesilada, O. (2011). Enhanced production of laccase by fungi under solid substrate fermentation condition. *BioResources*. 6(4): 4404- 40416.
- Box, J.D. (1983). Investigation of the folin-ciocalteau phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water research*. 17 (5): 511-525.
- Bryjak, J., Rekuć, A. (2010). Effective purification of *Cerrena unicolor* laccase using microfiltration, ultrafiltration and acetone precipitation. *Applied of Biochemistry and Biotechnology*. 160:2219-2235.
- Bonugli-Santos, R.C., Durrant, L.R., Durães, S.L. (2011). The production of ligninolytic enzymes by marine derived basidiomycetes and their biotechnological potential in the biodegradation of recalcitrant pollutants and the treatment of textile effluents. *Water Air Soil Pollut*. [On line]
- Cambria, M.T., Ragusa, S., Calabrese, V., Cambria, A. (2011). Enhanced laccase production in white-rot fungus *rigidoporus lignosus* by the addition of selected phenolic and aromatic compounds. *Applied of Biochemistry and Biotechnology*. 163:415–422.
- Cantarelli, C. (1986). Trattamenti enzimatici sui costituenti fenolici dei mosti come prevenzione della maderizzazione. *Vinid'Italia*. 3: 87–98.
- Capasso, R., Cristinzio, G., Evidente, A., Scognamiglio, (1992). Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable. *Wastewaters.Phytochemistry*. 31: 4125–4128.
- Casieri, L., Varese, G.C., Anastasi, A., Prigione, V., Svobodová, K., Fllippelo-Marchislo, V., Novotný, Ā. (2008). Decolorization and detoxication of reactive industrial dyes by immobilized fungi *Trametes pubescens* and *Pleurotus ostreatus*. *Folia Microbiology*. 53 (1):44-52.
- Castillo, R.F. Biotecnología ambiental. *Tebar*. 2005.

- Cedeno-Cruz, M., and J. Alvarez-Jacobs. (1999). Production of Tequila from agave: historical influences and cotemporary processes. *In The Alcohol Textbook*. 225-241. UK: Nottingham University Press.
- Charcosset, C. (2006). Membrane processes in biotechnology: an overview. *Biotechnology Advances*. 24: 482-492.
- Chen, H., He, Q., Liu, L. (2011). Cellulase Production from the Corn Stover Fraction Based on the Organ and Tissue. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 16: 867-874.
- Coca, M., Peña, M., González, G., (2005). Variables affecting efficiency of molasses fermentation wastewater ozonation. *Chemosphere*. 60:1408–1415.
- Coelho, J., Marques, C., Oliveira, A., Bracht, A., Ferreira, M., Peralta, R. (2010). Comparative Removal of Bentazon by *Ganoderma lucidum* in Liquid and Solid State Cultures. *Current Microbiology*. 60:350–355.
- Collins, J.P., Dobson, W.D.A. (1997). Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied Environmental Microbiology*. 63:44-50.
- Conrad, L. S., Sponholz, W. R., Berker, O. (2000). Treatment of cork with a phenol oxidizing enzyme. US patent 6152966.
- Consejo Mexicano Regulador de la Calidad de Mezcal A.C. (COMERCAM). 2013.
- Cooper, P. (1993). Removing color from dye house wastewaters: a critical review of technology available. *Journal of Society Dyers and Colorist*. 109: 97 – 101.
- Crestini, C., Argyropoulos, D. S. (1998). The early oxidative biodegradation steps of residual Kraft lignin models with laccase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 6: 2161–2169.
- Cripps, C., Bumps, J.A., Aust D. (1990). Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Environmental Microbiology*. 56: 1114-1118.
- Dellamatrice, P., Monteiro, R., Kamida, H., Nogueira, N., Rossi, M., Blaise, C. (2005). Decolourization of municipal effluent and sludge by *Pleurotus sajor-caju* and *Pleurotus ostreatus*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 21: 1363–1369.
- Díaz, M., Madejon, E., López, F., López, R., Cabrera, F., (2002). Optimization of the rate vinasse/ grape marc for composting process. *Process Biochemistry*. 37: 1143–1150.
- Díaz, R. B., Zarur, C. M. A., Marrucho, I.M. (2013). Extraction of saponins from sisal (*Agave sisalana*) and juá (*Ziziphus joazeiro*) with cholinium-based ionic liquids and deep eutectic solvents. *European Food Research and Technology*. 237:965–975.
- Dominguez, A., Gómez, J., Lorenzo, M., Sanromán, A. (2007). Enhanced production of laccase activity by *Trametes versicolor* immobilized into alginate beads by the addition of different inducers. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23:367–373.
- Duarte, E., Martins, M., Carvalho, E., Costa, S., Spranger, I. (1997). An integrated approach for overcoming the environmental impacts of wineries wastewaters a Portuguese case study. In: Proceedings of International Symposium of the vine and wine, 07–10 October, 1997. Yangling, China: 1–5.
- Duran, M.H., Pulido, L.J. (2007). Análisis de la Molienda en el Proceso de elaboración de Mezcal. *Información tecnológica*. 18(1): 47-52.
- Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F.D., Eriksson, K.E.L. (1996). A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Letters*. 391: 144-148.
- Eliéser, C.J. (2003). Producción y aplicación de enzimas industriales. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*. 1(1): 9-15.
- Elisashvili, V., Penninckx, M., Kachlishvili, E., Asatiani, M., Kvesitadze, G. (2006). Use of *Pleurotus dryinus* for lignocellulolytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves. *Enzyme Microbiology and Technology*. 38: 998–1004.
- Elisashvili, V., Penninckx, M., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., Metreveli, E., Kharziani, T., Kvesitadze, G. (2008). *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of diverse composition. *Bioresource Technology*. 99: 457–462.
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., Khardziani, T., Agathos, S. N. (2010). Effect of aromatic compounds on the production of laccase and manganese peroxidase by white-rot basidiomycetes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 37:1091–1096.

- Emine, A., Leman, T. (1995). Characterization of immobilized catalases and their application in pasteurization of milk with H₂O₂. *Applied of Biochemistry and Biotechnology*. 50: 291–303.
- FAO, 2014. Base de datos en línea de la norma general del codex para los aditivos alimentarios (GSFA). www.codexalimentarius.net/gsaonline/additives. 9 de enero del 2015
- Feng, W., Chen.G., Chun-Zhao, L. (2013). Immobilization of *Trametes versicolor* cultures for improving laccase production in bubble column reactor intensified by sonication. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 40:141–150.
- Fitzgibbon, F.J., Nigam, P., Singh, D., Marchant, R. (1995). Biological treatment of distillery waste for pollution- remediation. *Journal of Basic Microbiology*. 35(5): 293–301.
- Forootanfar, H., Faramarzi, M.A., Ahmad Reza Shahverdi., Mojtaba Tabatabaei Yazdi. (2011). Purification and biochemical characterization of extracellular laccase from the *Ascomycete Paraconiothyrium variabile*. *Bioresource Technology*.102: 1808–1814.
- García, M. *Biología alimentaria*. Noriega editores. México: 1993.
- García, G.I., Bonilla, J.L., Jiménez, P.R., Ramos, E., (1997). Biodegradation of phenol compounds in vinasse using *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. *Water Research*. 31(8): 2005–2011.
- García-Reyes, R.B., Rangel-Mendez, J.R. (2009). Contribution of agro- waste material main components (hemicelluloses, cellulose and lignin) to the removal of chromium (III) from aqueous solution. *Journal of Chemistry and Technology and Biotechnology*. 84:1533–1538.
- Garzó- Jimenez, C., Barragán-Huerta, B.E. (2008). Inmovilización microbiana: Técnicas y usos en el tratamiento de residuos tóxicos. *Revista Sistemas Ambientales*. 1(2): 23-34.
- GBC scientific equipment PTY LTD. Antanasopoulos, K. Flame methods manual for atomic absorption.
- Gedikli, S., Aytar, P., Ünal, A., Yamaç, M., Çabuk, A. (2010). Enhancement with inducers of lacasse production by some strains and application of enzyme to dechlorination of 2, 4, 5-trichloropheno. *Electronic Journal of Biotechnology*.
- Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., Sannia, G. (2010). Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences*.
- Godfrey T, West SI: Introduction to industrial enzymology. *Industrial Enzymology*. Macmillan Press; 1996:1-8.
- Giovanelli, G. (1989). Enzymic treatment of malt polyphenols for beer stabilization. *Industria delle Bevande*.18, 497– 502.
- Gottschalk, L., Bon, E., Nobrega, R. (2008). Lignin peroxidase from *Streptomyces viridosporus* T7A: enzyme concentration using ultrafiltration. *Applied of Biochemistry and Ciotechnology*. 147:23-32.
- Greene, R.A. (1932). Composition of the fiber and waste of *Agave lechuguilla*. *Botanical Gazette*. 93: 484-491.
- Guaderrama-Mendoza, P.C. (2013). Productividad y caracterización de cepas parentales e híbridas provenientes de neohaplontes compatibles de *Pleurotus* spp. de la región mixteca. (Tesis doctoral inédita). Unidad Profesional Interdisciplinaria De Biología. Instituto Politécnico Nacional.
- Gutiérrez, A., Martínez, AT. (1996). Biodegradación de la lignina: Una perspectiva actual. *Revista Iberoamericana Micología*. 13:18-23.
- Hammel, K.E., Tien, M., Kalyanaraman, B., Kirk, T.K. (1985). Mechanism of oxidative Ca-Cb cleavage of a lignin model dimer by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. *Journal of Biology and Chemistry*. 260: 8348-8353.
- Hareshk, k., Dattam, M. (2002). Transformation of textile dyes by white- rot fungus *Trametes versicolor*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.102–103.
- Hess, J., Leitner, C., Galhaup, C., Kulbe, K.D., Hinterstoisser, B., Steinwender, M., Haltrich, D. (2002). Enhanced Formation of extracellular laccase activity by the white-rot fungus *Trametes multicolor*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 98.
- Homolka, L., Paltiel, J., Volakova, I., Nerud, F., Hadar, Y. (1997). The effect of growth conditions and genetic background on laccase production by the fungus *Pleurotus ostreatus*. *Microbiology*. 42(5): 527-529.

- landolo, D., Piscitelli, A., Sannia, G., Faraco, V. (2011). Enzyme Production by Solid Substrate Fermentation of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on Tomato Pomace. *Applied of Biochemistry and Biotechnology*. 163:40–51.
- Jegannathan, K., Nielsen, H. (2013). Environmental assessment of enzyme use in industrial production: a literature review. *Journal of Cleaner Production*. 42: 228-240.
- Jiménez, A. M., Borja, R., Martín, A. (2003). Aerobic- anaerobic biodegradation of beet molasses alcoholic fermentation wastewater. *Process Biochemistry*. 38: 1275–1284.
- Jiménez, A. M., Borja, R., Martín, A., Raposo, F. (2005). Mathematical modelling of aerobic degradation of vinasses with *Penicillium decumbens*. *Process Biochemistry*. 40: 2805–2811.
- Kahraman, S., Yesilada, O. (2001). Industrial and agricultural wastes for laccase production by white rot fungi. *Folia Microbiologica*. 46: 133-136.
- Kahraman, S., Yesilada, O. (2003). Decolonization and bioremediation of molasses wastewater by white-rot fungi in a semi-solid-state condition. *Folia Microbiologica*. 48(4): 525–52.
- Kannabiran, B., Pragasam, A., (1993). Effect of distillery effluent on seed germination, seedling grow than pigment content of Vignamungo (L.) Hepper (CVT9). *Geobioscience*. 20:108–112.
- Karel, S., Libicki, S., Robertson, C. (1985). The immobilization of whole cells engineering principles. *Chemical Engineering Science*. 40: 1321–1354.
- Khalil, I., Hoque, M.M., Basunia, M.A., Alam, N., Khan, A. (2011). Production of cellulase by *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* in solid state fermentation of lignocellulosic biomass. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 35: 333-341.
- Kirk, T.K., Farrell, R.L. (1987). Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. *Annu Review of Microbiology*. 41: 465-505.
- Kirk, O., Borchert, T. V., Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 13(4): 345–351.
- Ko, E. M., Leem, Y. E., Choi, H. T. (2001). Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57:98-102.
- Koltuniewicz, A., Drioli, E. membranes in clean technologies. Weinheim: Wiley- VCH. Great Britain: 2008.
- König, J., Grasser, R., Pikor, H., Vogel, K. (2002). Determination of xylanase, β -glucanase, and cellulose activity. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 374: 80-87.
- Kuuvu, T., Lantto, R., Reinikainen, T., Buchert, J., Autio, K. (2003). Rheological properties of laccase-induced sugar beet pectin gels. *Food Hydrocolloids*. 17 (5): 679–684.
- Latour, J.M. (1988). Les sites actifs binucléaires des protéines à cuivre: stimulants d' une nouvelle chimie de coordination du cuivre: The dinuclear active sites of proteins with copper: Stimulants of a new copper coordination chemistry. *Bulletin de la Société chimique de France*. 3: 508-523.
- Laukevics, J.J., A.F. Apsite, U.E. Viesturs R. Tengerdy. (1984). Solid substrate fermentation of wheat straw to fungal protein. *Biotechnology and Bioengineering*. 26: 1465-1474.
- Leitner, C., Hess, J., Galhaup, C., Ludwig, R., Nidetzky, B., Kulbe, K.D., Haltrich, D. (2002). Purification and characterization of laccase from the white- rot fungus *Trametes multicolor*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 98(100): 497- 507.
- Lettera, V., Piscitelli, A., Leo, G., Birolo, L., Pezzella, C., Sannia, G. (2010). Identification of a new member of *Pleurotus ostreatus* laccase family from mature fruiting body. *Fungal.Biology*. 114: 724- 730.
- Leonowicz, A., Cho, N. S., Luterek, J., Wilkolazka, A., Wojtas-Wasilewska, M., Matuszewska, A., Hofrichter, M., Wesenberg, D., Rogalski, J. (2001). Fungal laccase: properties and activity on lignin. *Journal of Basic Microbiology*. 41:185-227.
- Leontievsky, A., Myasoedova, N., Pozdnyakova, N., Golovleva, L. (1997). Yellow laccase of *Panustigrinus* oxidises non- phenolic substrates without electron- transfer mediators. *Federation of European Biochemical Societies letters*. 413: 446-448.
- Li, H., Foston, M.B., Kumar, R., Samuel, R., Gao, X., Hu, F., Ragauskas, A.J., Wyman, C.E. (2012). Chemical composition and characterization of cellulose for Agave as a fast growing, drought-tolerant biofuels feedstock. *Royal Society of Chemistry advances*. 2: 4951- 4958.
- Li-Qion, G., Xhuo- Xin, L., Xiao- Bing, Z., Zi- Rou, H., Jun- Fang, L. (2011). Production, purification, and characterization of a thermostable laccase from a tropical white- rot fungus. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 27:731–735.

- Liñán-Montes, A., De la Parra-Arciniega, S.M., Garza-González, M.T., García-Reyes, R.B., Soto Regalado, E., Cerino-Córdova, F.J. (2014). Characterization and thermal analysis of agave bagasse and malt spent grain. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 115:751–758.
- Liu, L., Lin, Z., Zheng, T., Lin, L., Zheng, C., Lin, Z., Wang, S., Wang, Z. (2009). Fermentation optimization and characterization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* strain 10969. *Enzyme and Microbial Technology*. 44: 426–433.
- Long, C., Ou, Y., Guo, P., Lio, Y., Cui, J., Long, M., Hu, Z. (2009). Cellulase production by solid state fermentation using bagasse with *Penicillium decumbens* L-06. *Annals of Microbiology*. 59 (3): 517-523.
- López, M.G., Urías-Silvas, J.E. (2007). Agave fructans as prebiotics. *Research Signpost*. 37/661(2).
- Lu, L., Min, Z., Bei- Bei, Z., Shun- Yu., Y., Xi- Jun, B., Wei, W., Yan, W. (2007). Purification and characterization of laccase from *Pycnoporus sanguineus* and decolorization of an anthraquinone dye by the enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74:1232–1239.
- Lund, M., Ragauskas, A.J. (2001). Enzymatic modification of kraft lignin through oxidative coupling with water-soluble phenols. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55: 699.
- Lyashenko, A.V., Zhukhlistova, N.E., Gabdoulkhakov, A.G., Zhukova, Y.N., Voelter, W., Zaitsev, V.N., Bento, I., Stepanova, E.V., Kachalova, G.S., Koroleva, O.V., Cherkashyn, E.A., Tishkov, V.I., Lamsin, V.S., Schirwitz, K., Morgunova, E.Y., Betzel, C., Lindley, P.F., Mikhailov, A.M. (2006). Purification, crystallization and preliminary X- ray study of the fungal laccase from *Cerrena maxima*. *Acta Crystallografia*. F. 62: 954- 957.
- Madejón, E., Díaz, M. J., López, R., Cabrera, F., (2001). Co-composting of sugar beet vinasse: influence of the organic matter nature of the bulking agents used. *Bioresource Technology*. 76: 275–278.
- Madhavi S. R., Lele, S.S. (2006). Increased production of extracellular laccase by the white rot fungus *Coriolus versicolor* MTCC 138. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22:921-926.
- Malandra, L., Wolfaardt, G., Zietsman, A., Viljoen-Bloom, M. (2003). Microbiology of a biological contactor for winery wastewater treatment. *Water Research*. 37: 4125–4134.
- Maruguesan, K., Arulmani, M., In- Hyun, N., Young- Mo, K., Yoon – Seok, C., Kalailchelvan, P.T. (2006). Purification and characterization of laccase produced by a white rot fungus *Pleurotus sajor-caju* under submerged culture condition and its potential in decolorization of azo dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72: 939–946.
- Mane, J.D., Modi, S., Nagawade, S., Phadnis, S.P., Bhandari, V.M., (2006). Treatment of spentwash using chemically modified bagasse and colour removal studies. *Bioresource of Technology*. 97: 1752–1755.
- Martín, E. M.E., Gutiérrez, V.J.C. Procedimiento de deslignificación de materiales lignocelulósicos. WO2012001195 A1. 5 Jan 2012. Appl. 28 Jun 2010.
- Mathiasen, T. E. (1995). Laccase and beer storage .PCT international application, WO 9521240 A2.
- Mayer, A. M., Staples, R.C. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*. 60: 551–565.
- McCoy, M. (2000). Novozymes emerges. *Chemical and Engineering News*. 19:23-25.
- McMurrough, I., Madigan, D., Kelly, R., O'Rourke, T. (1999). Haze formation shelf-life prediction for lager beer. *Food Technology*. 53(1): 58–63.
- Mc Kay, G. (1979). Waste color removal from textile effluents. *Journal American Dyestuff Reporter*. 86 (4): 29-36.
- Mei-Fang, Z., Xing-Zhong, Y., Hua, Z., Zhi-Feng, L., Hui, L., Li-Li, J., Guang-Ming, Z. (2011). Effect of Biosurfactants on Laccase Production and Phenol Biodegradation in Solid-State Fermentation. *Applied of Biochemistry and Biotechnology*. 164:103–114.
- Mendonça, M.J., Castro, M.A., Camarão, H. (2010). Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*.
- Mickiashvili, N., Wasse, S.P., Nevo, E., Elisashvili, V. (2006). Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostratus* ligninolytic enzyme activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22: 299-1002.
- Ming- Zeng, G., Yan-Yu, H., Li-Huang, H., Lian-Huang, D., Ning-Chen, Y., He-Huang, G., Bing Li, J. (2006). Laccase activities of a soil fungus *Penicillium simplicissimum* in relation to lignin degradation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 22: 317–324.

- Minussi, R. C., Pastore, G. M., Durán, N., (2002). Potencial applications of laccase in the food industry. *Trends Food Science Technology*. 13: 205-216.
- Moldes, D., Gallego, P.P., Rodríguez-Couto, S., Sanroman, A. (2003). Grape seeds: the best lignocellulosic waste to produce laccase by solid state cultures of *Trametes hirsuta*. *Biotechnology Letters*. 25: 491–495.
- Moo-Young, M., A. Moreira and R. Tengerdy. (1983). Principles of solid state fermentation. In: Fungal Biotechnology, Smith, J., D. Berry and B.Kristiansen (Eds.). Edward Arnold Publishers, London. 117-144.
- Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Shleev, S. V., Yaropolov, Y. I. (2007a). Laccase-mediator systems and their applications: A review. *Applied Biochemistry Microbiology*. 43:523-535.
- Morozova, V., Shumakovich, G. P., Gorbacheva, M. A., Shleev, S. V., Yaropolov, A. I. (2007b). “Blue” laccases. *Biochemistry Moscow*. 72:1136-1150.
- Mougin, C., Kollman, A., Jolival, C. (2002). Enhanced production of laccase in the fungus *Trametes versicolor* by the addition of xenobiotics. *Biotechnology Letters*. 24: 139–142.
- Mudgett, R. Manual of industrial microbiology and biotechnology. Demain, A., N. Solomon (Eds.). American Society for Microbiology, Washington, (1986). AD.66-83.
- Mulder, M. Basic principles of membrane technology. Kluwer academic publishers. USA: 2012.
- Nandy, T., Shastry, S., Kaul, S. N., (2002). Wastewater management in cane molasses distillery involving bioresource recovery. *Journal of Environmental Management*. 65(1): 25–38.
- Nigam, P. S., Gupta, N., Anthwal, A. (2009). Pre-treatment of agro-industrial residues. Biotechnology for agro-industrial residues. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*. 13-33.
- Okamoto, K., Yanagi, S., Sakai, T. (2000). Purification and characterization of extracellular laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Mycoscience*. 41: 7-13.
- Oriol, C.A., Vivero, R.M.B., Vidal, V.C., Lluçia, V.T. Preparación enzimática acuosa aislada y su uso para la funcionalización de la superficie del papel o soportes celulósicos. WO2013182723 A1. 12 Dec 2013. Appl. 4 Jun 2012.
- Osma, J. F., Toca-Herrera, J.L., Rodríguez-Couto, S. (2010). Uses of Laccases in the Food Industry. *Enzyme Research*.
- Osma, J.F., Toca-Herrera, J.L., Rodríguez-Couto, S. (2011). Cost analysis in laccase production. *Journal of Environmental Management*. 92: 2907-2912.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Brand, D., Mohan, R., Roussos, S. (2000a). Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*. 6:153–162.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Soccol, V.T. (2000b). Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*. 74: 69–80.
- Pant, D., Adholeya, A. (2007). Biological approaches for treatment of distillery wastewater: a review. *Bioresources Technology*. 98: 2321–2334.
- Pant, D., Adholeya, A. (2007b). Enhanced production of ligninolytic enzymes and decolorization of molasses distillery wastewater by fungi under solid state fermentation. *Biodegradation*. 18: 647-659.
- Pant, D., Adholeya, A. (2010). Concentration of fungal ligninolytic enzymes by ultrafiltration and their use in distillery effluent decolorization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25: 1793-1800.
- Petersen B. R., Mathiasen, T. E. (1996). Deoxygenation of a food item using a laccase, PCT international application, WO9631133 A1.
- Peña, M., Coca, M., González, G., Rioja, R., García, M.T. (2003). Chemical oxidation of wastewater from molasses fermentation with ozone. *Chemosphere*. 51: 893- 900.
- Philippoussis, A., Diamantopoulou, P., Papadopoulou, K., Lakhtar, H., Roussos, S., Parissopoulos, G., Papanikolaou, S. (2011). Biomass, laccase and endoglucanase production by *Lentinula edodes* during solid state fermentation of reed grass, bean stalk and wheat straw residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 27:285–297.
- Pickard, M. A., Roman, A. R., Tinoco, R., & Vazquez-Duhalt, R. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolisms by White rot fungi and oxidation by *Corioslopsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 3805–3809.

- Pointing, S.B. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57 (1-2): 20-33.
- Pozdnyakova, N.N., Nikiforova, S.V., Makarov, O.E., Turkovskaya, O.V. (2010). Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on laccase production by white rot fungus *Pleurotus ostreatus* D1. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 47 (5): 543–548.
- Ramírez, N.E., Vargas, M.C., Ariza, J.C., Martínez, C. (2003). Caracterización de la lacasa obtenida por dos métodos de producción con *Pleurotus ostreatus*. *Revista colombiana*. 5(2): 64-72.
- Renzetti, S., Courtin, C. M., Delcour, J. A., Arendt, E. K. (2010). Oxidative and proteolytic enzyme preparations as promising improvers for oat bread formulations: rheological, biochemical and microstructural background. *Food Chemistry*. 119 (4): 1465–1473.
- Reyes, R., Pickard, M., Vazquez-Duhalt, R. (1999). Hydroxybenzotriazole increase the range of textile dyes decolorized by immobilized laccase. *Biotechnology Letters*. 21:875–880.
- Robinson, T., Singh, D., Nigam, P. (2001). Solid state fermentation: A promising microbial technology for secondary metabolite production. *Applied of Microbiology and Biotechnology*. 55: 284–289.
- Robledo-Narvaez, P. N., Montes-Horcasitas M. C., Ponce-Noyola, M. T., Poggi-Varaldo, H. M., (2006). Production of biocatalysts of *Trametes versicolor* for the treatment of recalcitrant effluents of the pulp and paper industry. Battelle SBN 1-57477- 145- 0.
- Robles-González, V., Galíndez-Mayer, J., Rinderknecht-Seijas, N., Poggi-Varaldo, H. (2012). Treatment of mezcal vinasses: A Review. *Journal of Biotechnology*. 157: 524-546.
- Rodríguez-Couto, S., Toca-Herrera, J.L. (2007). Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology Advances*. 25:558–569.
- Sales, D., Valcárcel, M., Martínez de la Osa, E., Pérez, L. (1987). A depurative process for wine distilleries wastes. *Process of Biochemistry*. 22, 85– 99.
- Salony., Mishra, S., Bisaria, V. S. (2006). Production and characterization of laccase from *Cyathus bulleri* and its use in decolorization of recalcitrant textile dyes .*Applied of Microbiology and Biotechnology*. 71: 646–653.
- Santos. A.J.M., Martínez, R., Salvador, C., Candéias, F., Karmali, A., Caldeira, T. (2012). Protein–polysaccharides of *Trametes versicolor*: production and biological activities. *Medical Chemistry Research*. 21: 937–943.
- Sangave, P. C., Gogate, P. R., Pandit, A. B. (2007). Combination of ozonation with conventional aerobic oxidation for distillery wastewater treatment. *Chemosphere*. 68(1): 32- 41.
- Sangave, P. C., Gogate, P. R., Pandit, A. B., (2007b). Ultrasound and ozone assisted biological degradation of thermally pre- treated and anaerobically pretreated distillery wastewater. *Chemosphere*. 68(1): 42–50.
- Sathiya, P., Decamaran, M., Periyar, S., Marugesan, K., Kalaichelvan, P. (2007). Biosorption of textile dyes and effluents by *Pleurotus florida* and *Trametes hirsuta* with evaluation of their laccase activity. *Liranian Journal of biotechnology*. 5(2): 114-118.
- Saval, S. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: Pasado, Presente y futuro. *Bioteconología*. 16(2), 14- 46.
- Selinheimo, E., Kruus, K., Buchert, J., Hopia, A., Autio, K. (2006). Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. *Journal of Cereal Science*. 43(2):152–159.
- Shankaranand, V. S., Lonsane, B. K. (1993). Sugarcane press mud as a novel substrate for the production of citric acid by solid state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 9:377–380.
- Sharari, M., Latibari, A.J., Guillet, A., Aurousseau, M., Mouhamadou, B., Rafeiee, G., Mirshokraei, A., Parsapaghoh, D. (2011). Application of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in biotreatment of bagasse effluent. *Biodegradation*. 22:421–430.
- Shin, M., Nguyen, T., Ramsay, J. (2002). Evaluation of support materials for the surface immobilization and decoloration of amaranth by *Trametes versicolor*. *Applied of Microbiology and Biotechnology*. 60:218–223.
- Shleev, S., Reimann, C. T., Serezhenkov, V., Burbaev, D., Yaropolov, A. I., Gorton, L., Ruzgas, T. (2006). Autoreduction and aggregation of fungal laccase in solution phase: possible correlation with a resting form of laccase. *Biochimie*. 88: 1275-1285.

- Siebert, K. J. (1999). Protein-polyphenol haze in beverages. *Food Technology*. 53(1): 54–57.
- Silvério, S. C., Moreira, S., Milagres, A.M.F., Macedo, E.A., Teixeira, J.A., Mussatto, S.I. (2013). Laccase production by free and immobilized mycelia of *Peniophora ciñerea* and *Trametes versicolor*: a comparative study. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 36:365–37
- Si, J. Q. (1994). Use of laccase in baking industry. International patent application PCT/DK94/00232
- Stajić, M., Persky, L., Hadar, Y., Friesem, D., Duletić-Laušević, S., Wasser, S.P., Nevo, E. (2006). Effect of copper and manganese ions on activities of laccase and peroxidases in three *Pleurotus* species grown on agricultural wastes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 128: 87-96.
- Strong, P. J. (2010). Fungal remediation on amarula distillery wastewater. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 26:133–144.
- Sun, W., Xu, M., Xia, C., Li, A., Sun, G. (2013). Enhanced production of laccase by *Coriolus hisutus* using molasses distillery wastewater. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*. 7(2): 200–210.
- Takemori, T., Ito, Y., Ito, M., Yoshima, M. (1992). Flavor and taste improvement of cacao nib by enzymatic treatment. *Japan Kokai Tokkyo Koho*.
- Téllez- Téllez, M., Fernández, F.J., Montiel- González, A.M., Sánchez, C., Díaz- Godínez, G. (2008). Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid state fermentation. *Applied of Microbiology and Biotechnology*. 81: 675-679.
- Tengerdy, R.P., Szakacs, G. (2003). Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 13: 169–179.
- Tinoco, R., Acevedo, A., Galindo, E., Serrano-Carreón, L. (2011). Increasing *Pleurotus ostreatus* laccase production by culture medium optimization and copper/lignin synergistic induction. *Journal Industrial Microbiology and Biotechnology*. 38:531–540.
- Tišma, M., Žnidaršič-Plazl, P., Vasić-Rački, Đ., Zelić, B. (2012). Optimization of laccase production by *Trametes versicolor* cultivated on industrial waste. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 166: 36–46.
- Toca-Herrera, J. L., Osmá, J. F., Rodríguez-Couto, S. (2007). Potential of solid state fermentation for laccase production. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. 391-400.
- Tongwen, X. U., Weihua, Y. (2002). Citric acid production by electro dialysis with bipolar membranes. *Chemistry and Engineering Process*. 41: 519–524.
- Thurston, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*. 140:19-26.
- Ubasart, G.J., Vivero, R.M.B., Lluciá, V.T., Pastor, C.J.F. Preparación enzimática acuosa aislada y su uso para la funcionalización de la superficie del papel o soportes celulósicos. WO2011009979 A1. 27 Jan 2011. Appl. 23 Jul 2009.
- Vandamme, E.J. (2009). Agro-Industrial Residue Utilization for Industrial Biotechnology Products. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues*. 3-33.
- Viniegra-González, G., E. Favela-Torres, C.N. Aguilar, S. Romero-Gómez, G. Díaz-Godínez and C. Augur. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid systems. *Biochemistry and Engineering Journal*. 13: 157-167.
- Vlyssides, A. G., Israilides, C. J., Loizidou, M., Karvouni, G., Mourafeti, V., (1997). Electro- chemical treatment of vinasse from beet molasses. *Water Science of Technology*. 36 (2–3): 271– 278.
- Wang, F., Guo, C., Chun-Zhao, L. (2013). Immobilization of *Trametes versicolor* cultures for improving laccase production in bubble column reactor intensified by sonication. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 40:141–150.
- Wolfenden, B.S., Wilson, R.L. (1982). Radical cation as reference chromogens in studies of one electron transfer reactions; pulse radio analysis studies of ABTS. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*. 11: 805- 812.
- Xiao, Y. Z., Chen, Q., Hang, J., Shi, Y. Y., Wu, J., Hong, Y. Z., Wang, Y.P. (2004). Selective induction, purification and characterization of a laccase isozyme from the basidiomycete *Trametes sp.* AH28–2. *Mycologia*. 96:26–35.
- Yadav, M., Yadav, P., Yadav, K.D. (2009). Purification, characterization, and coal depolymerizing activity of lignin peroxidase from *Gloeophyllum sepiarium* MTCC-1170. *Biochemistry*. 74(10):1125-31.

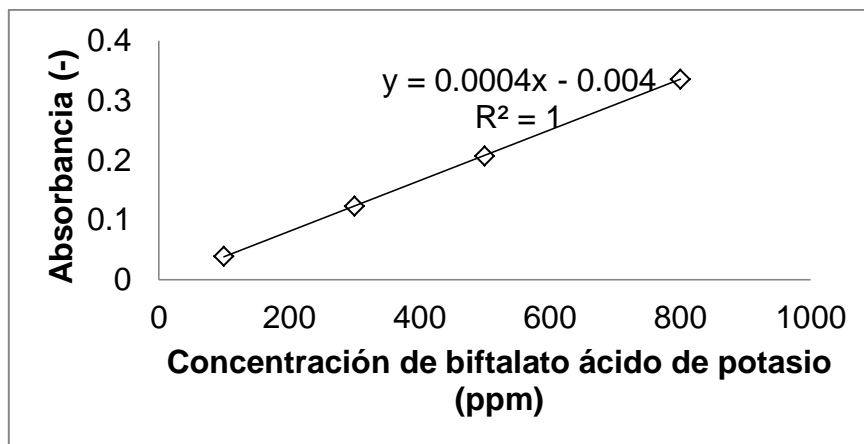
- Yaropolov, A. I., Skorobogatko, O. V., Vartanov, S. S., Varfolomeyev, S. D. (1994). Laccase properties, catalytic mechanism, and applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 49: 257-280.
- Yoshitake, A., Katayama, Y., Nakamura, M., Imura, Y., Kawai, S., Morohoshi, N. (1993). N-linked carbohydrate chains protect laccase-III from proteolysis in *Coriolus versicolor*. *Journal of General Microbiology*. 139:179-185.
- Zhang, R., Wienhold, B.J. (2002). The effect of soil moisture on mineral nitrogen, soil electrical conductivity, and pH. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*. 63 (2-3): 251-254.
- Zhang, M., Wu, F., Wei, Z., Xiao, Y., Gong, W. (2006). Characterization and decolorization ability of a laccase from *Panus rudis*. *Enzyme Microbiology Technology*. 39: 92-97.
- Zhi-Xin, W., Yu-Jie, C., Xiang-Ru, L., Guan-Jun, T., Yan-Yan, L., Feng, Z., Da-Bing, Z. (2010). Purification and characterization of two thermostable laccases with high cold adapted characteristics from *Pycnoporus sp.* SYBC-L1. *Process Biochemistry*. 45: 1720–1729.
- Zille, A., Tzanov, T., Gübitz, G., Cavaco-Paulo, A. (2003). Immobilized laccase for decolourization of Reactive Black 5 dyeing effluent. *Biotechnology Letters*. 25: 1473–1477.
- Żuchowski, J., Pecio, Ł., Jaszek, M., Stochmal, A. (2013). Solid-state fermentation of rapeseed meal with the white-rot fungi *Trametes versicolor* and *Pleurotus ostreatus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 171:2075–2081.

www.sigmaaldrich.com

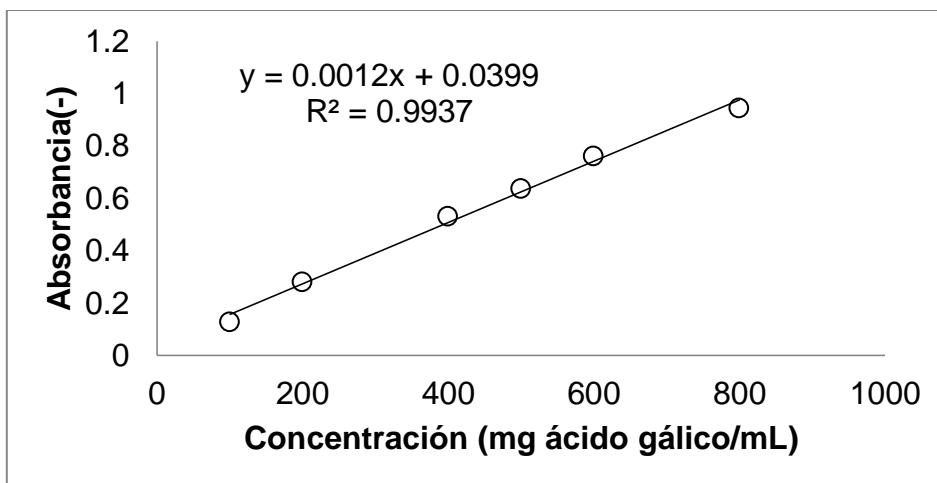
www.megazyme.com

APÉNDICE

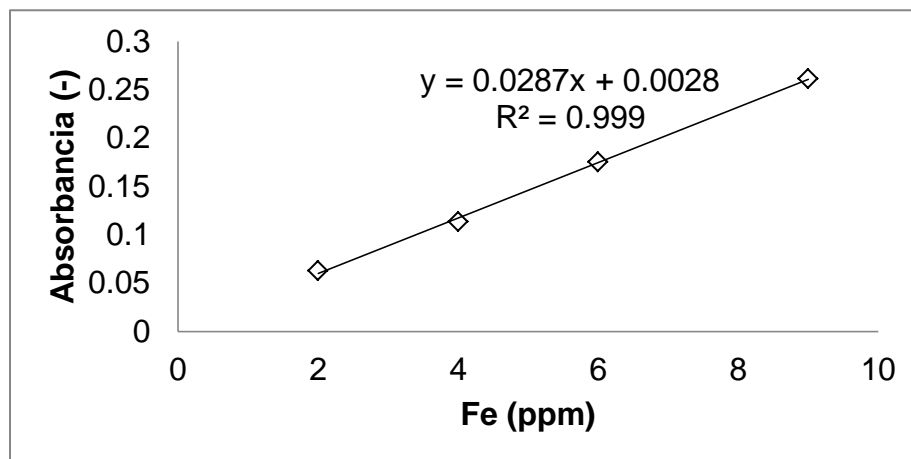
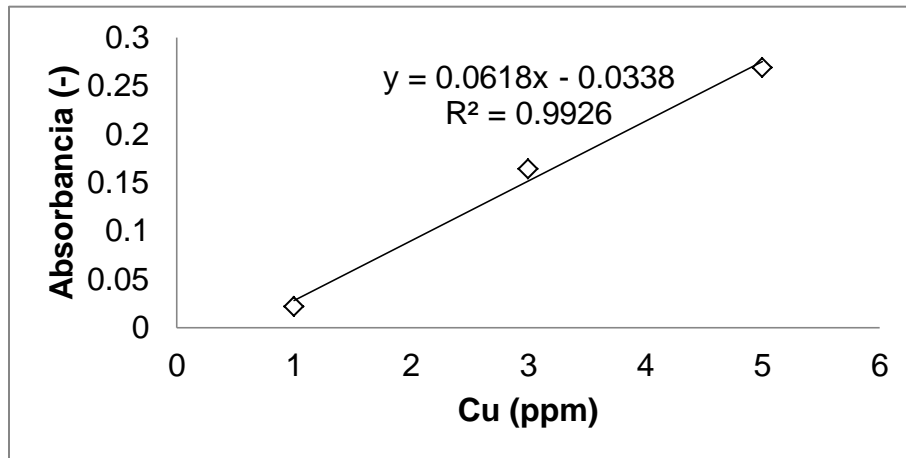
1. Curva de calibración para la determinación de la demanda química de oxígeno en las vinazas mezcaldas.

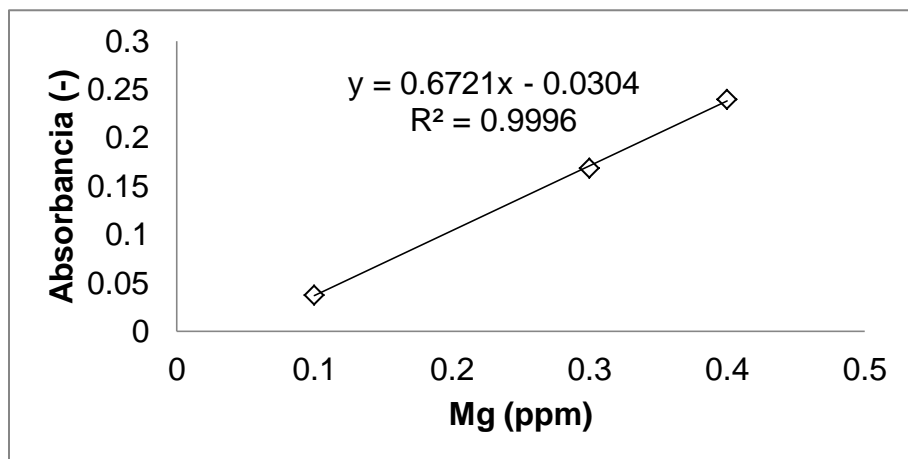
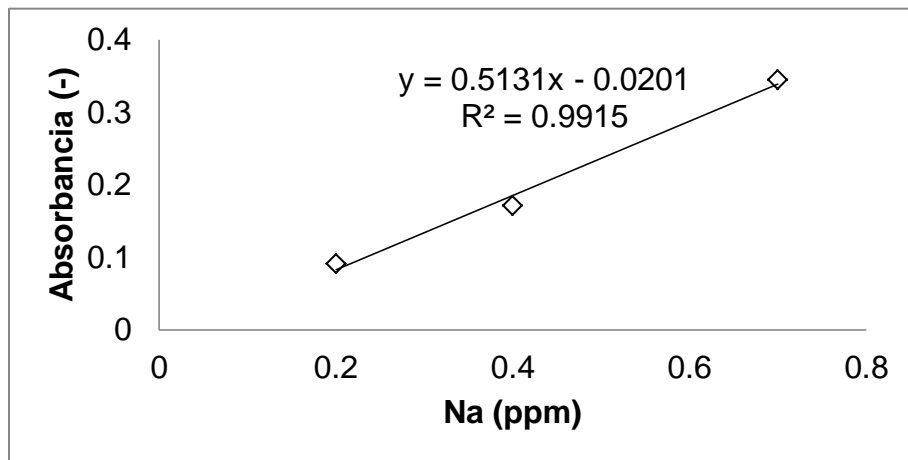
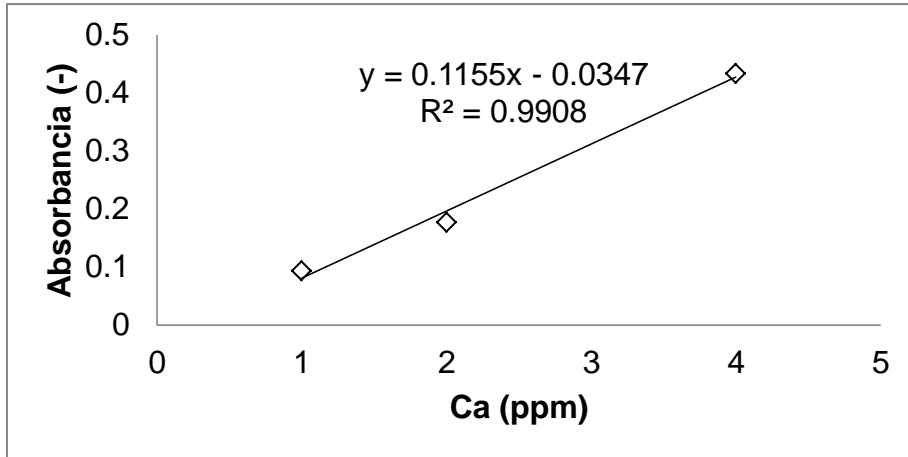


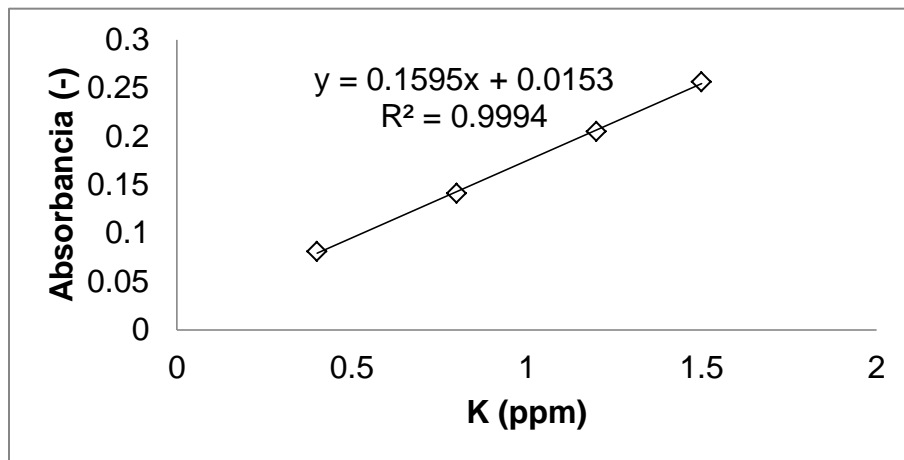
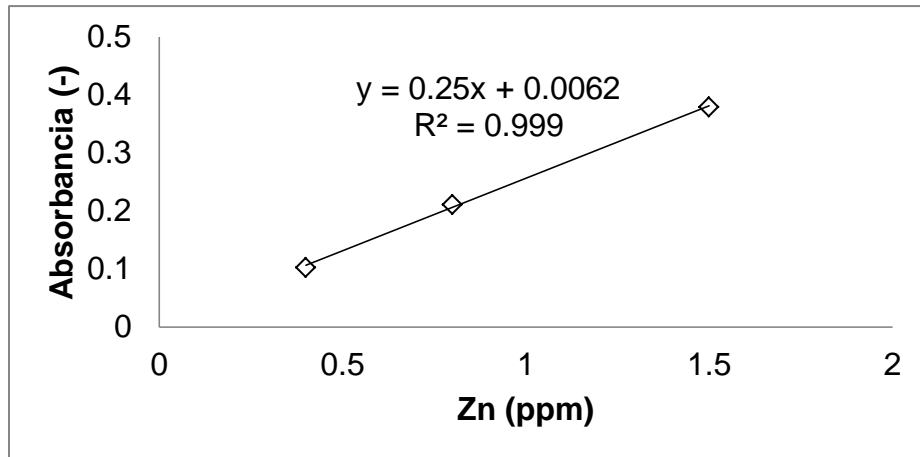
2. Curva de calibración para la determinación de fenoles totales.



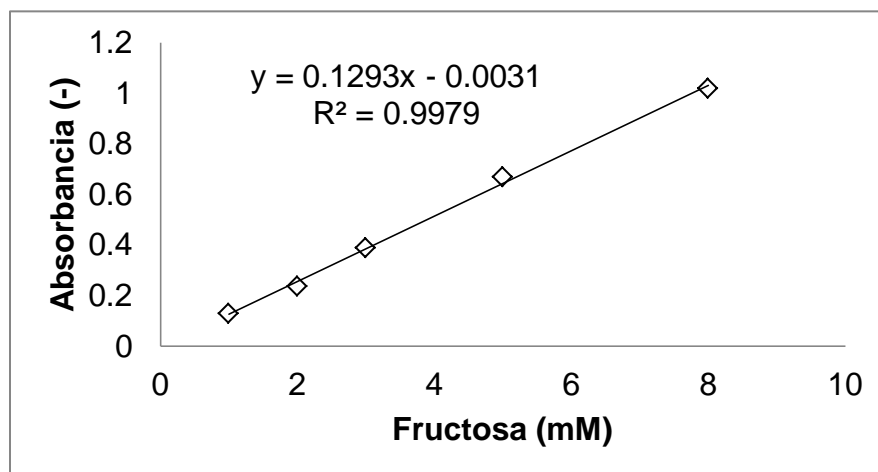
3. Curvas de calibración de metales identificados por espectroscopia de absorción atómica.







4. Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores como equivalentes de fructosa en las vinazas mezcaleras.



5. Diseño factorial general para los experimentos de la fermentación en cultivo sumergido.

Factor A Origen de la cepa	Factor B Concentración de azúcares reductores expresados como mg EF/L			
	670	900	1300	1900
<i>Trametes versicolor</i> CDBB-h-1051	X	X	X	X
<i>Pleurotus spp.</i>	X	X	X	X

6. Diseño factorial general para los experimentos de la fermentación en estado sólido.

Factor A Origen de la cepa	Factor B Polvo de bagazo de agave	
	Penca de <i>Agave potatorum</i> Zucc	Penca de <i>Agave angustifolia</i> Haw
<i>Trametes versicolor</i> CDBB- h-1051	X	X
<i>Pleurotus spp.</i>	X	X

7. Diseño para los experimentos de fermentación en estado sólido-humidificador.

	Control CDS 2%	Humidificador Concentración de azúcares reductores expresados como mg EF/L			
		670	900	1300	1900
HL+Polvo de bagazo	X	X	X	X	

8. ANOVA de dos factores con réplica de las muestras de fermentación en cultivo sumergido

RESUMEN	900 mgEF/L	670 mg EF/L	Control	Total
<i>UTM</i>				
Cuenta	2	2	2	6
Suma	27.67	2.63	1.2	31.5
Promedio	13.835	1.315	0.6	5.25
Varianza	0.00405	0.00045	0.02	44.32848
<i>Tv</i>				
Cuenta	2	2	2	6
Suma	4970.533	1763.033	76.10333	6809.67
Promedio	2485.267	881.5167	38.05167	1134.945
Varianza	19234.14	26827	126.352	1245545
<i>Total</i>				
Cuenta	4	4	4	
Suma	4998.203	1765.663	77.30333	
Promedio	1249.551	441.4158	19.32583	
Varianza	2042403	267194	509.6664	

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Fuente de variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Media de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>P- valor</i>	<i>F crit</i>
Muestra	3828632	1	3828632	497.3593	5.32E-07	5.987378
Columnas	3126261	2	1563130	203.0588	3.09E-06	5.143253
Interacción	3055500	2	1527750	198.4627	3.3E-06	5.143253
Dentro del grupo	46187.52	6	7697.92			
Total	10056581	11				

9. ANOVA de dos factores con réplica de las muestras de fermentación en estado sólido.

RESUMEN	Ah	Pz	Total
<i>Ps</i>			
Cuenta	2	2	4
Suma	0.066142	0.046008	0.11215
Promedio	0.033071	0.023004	0.028038
Varianza	0.000373	4.2E-09	0.000158
<i>Tv</i>			
Cuenta	2	2	4
Suma	0.451167	0.973833	1.425
Promedio	0.225583	0.486917	0.35625
Varianza	5.87E-05	0.017829	0.028728
<i>Total</i>			
Cuenta	4	4	
Suma	0.517308	1.019842	
Promedio	0.129327	0.25496	
Varianza	0.012498	0.077681	

ANOVA						
<i>Fuente de variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>P-valor</i>	<i>F crit</i>
Especie de HL	0.215447	1	0.215447	47.1939	0.002352	7.708647
Origen del bagazo	0.031567	1	0.031567	6.914892	0.058209	7.708647
Interacción Sin	0.036829	1	0.036829	8.067432	0.046852	7.708647
Sin	0.018261	4	0.004565			
Total	0.302104	7				

10. ANOVA de factor simple para evaluar el efecto del bagazo en la actividad de lacasa

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
CDS 2% +TV	2	629.2167	314.6083	1219.357
CDS 2%+Tv+PZ	2	2778.127	1389.063	82096.22

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Fuente de variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Media de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>P- valor</i>	<i>F crit</i>
Entre grupos	1154454	1	1154454	27.71279	0.034242	18.51282
Dentro de los grupos	83315.58	2	41657.79			
Total	1237769	3				

11. ANOVA de factor simple para evaluar el efecto del humidificador en la actividad de lacasa

RESUMEN					
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>	
CDS 2%	2	2778.127	1389.063	82096.22	
900	2	2386.88	1193.44	25339.51	
600	2	1723.68	861.84	23941.1	
1300	2	958.8542	479.4271	1818.799	
1900	2	447.76	223.88	503.7138	

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Fuente de variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Media de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>P- valor</i>	<i>F crit</i>
Entre grupos	1871872	4	467968	17.50076	0.003825	5.192168
Dentro de los grupos	133699.3	5	26739.87			
Total	2005571	9				

Prueba de rangos múltiples de DUNCAN

Error estándar de cada promedio= 73.12984
 n: número de muestras= 5
 N: número de observaciones= 2
 p= 3.635
 s= 265.827

CDS
 2% 1 1389.063
 900v 2 1193.44
 670v 3 861.84
 1300v 4 479.4271
 1900v 5 223.88

	CDS 2%	900v	670v	1300v	1900v
CDS 2%		195.62	527.22	909.64	1165.18
900v			331.60	714.01	969.56
670v				382.41	637.96
1300v					255.55
1900v					

A: no hay diferencia significativa	B: existe diferencia significativa
CDS2%-900V	670v-CDS 2% 670v-900v 1300-CDS2% 1300v-900v 1300v-670v 1900v-CDS2% 1900v-900v 1900v-670v 1900v-1300v

ANEXO A

A-1. Especificaciones para la determinación de sulfatos y fosfatos (**Método 8051 y 8048 HACH^{MR}**)

Parámetro	Intervalo	Longitud (nm)	Método (#)	Reactivo	Reposo (minutos)
Fosfatos	0 a 2.50 mg/L PO ₄ ³⁻	890	490	PhosVer Phosphate	3 2
Sulfatos	0 a 70 mg/L SO ₄ ²⁻	450	680	SulfaVer Sulfate	4 5

A-2. Parámetros para la determinación de metales mediante espectroscopia de absorción atómica (Manual GBC)

Elemento	Longitud de onda (nm)	Gases de la flama	Sensibilidad (mg/L)	Rango de concentración óptimo (mg/L)
Ca	422.7	A-Ac	0.02	1- 4
Cu	324.7	A-Ac	0.025	1- 5
Fe	248.3	A-Ac	0.05	2- 9
K	766.5	A-Ac	0.008	0.4- 1.5
Mg	285.2	A-Ac	0.003	0.1- 0.4
Na	589.0	A-Ac	0.004	0.18- 0.7
Zinc	213.9	A-Ac	0.008	0.4- 1.5
Cd	228.8	A-Ac	0.009	0.2- 1.8
Ni	232.0	A- Ac	0.04	1.8- 8

Notas. A: aire; Ac: acetileno; ON: óxido nitroso. GBC Scientific equipment PTY LDT.

A-3. Composición del gel de acrilamida 7.5%

Reactivo	Gel separador	Gel concentrador
Acrilamida 30%- Bis acrilamida 0.8%	1.25 mL	0.4 mL
Buffer Tris- HCl 1.5 M, pH 8.8	1.25 mL	-----
Buffer Tris- HCl 0.5M, pH 6.8	-----	0.75 mL
H ₂ O destilada	2.1 mL	1.52 mL
SDS10% (dodecil sulfato de sodio)	0.1 mL	0.03 mL
Persulfato de amonio 10%	0.035 mL	0.015 mL
TEMED(N,N,N',N'- tetrametiletilendiamina)	0.005 mL	0.010 mL

A-4. Composición del gel nativo (concentrador y separador)

Reactivo	Gel separador (7%)	Gel concentrador (4%)
Acrilamida 30%- Bis acrilamida 0.8%	1.25 mL	0.446 mL
Buffer Tris- HCl 1.5 M, pH 8.8	1.25 mL	-----
Buffer Tris- HCl 0.5M, pH 6.8	-----	0.833 mL
H ₂ O destilada	2.1 mL	2.033mL
Persulfato de amonio 10%	0.033 mL	0.0166 mL
TEMED(N,N,N',N'- tetrametiletilendiamina)	0.005 mL	0.033 mL