

Resumen

Las vinazas de azúcar de caña son efluentes agresivos con el medio ambiente por su alto contenido de fenoles tóxicos y otros contaminantes recalcitrantes. El objetivo de este trabajo fue inmovilizar lacasas de *Trametes hirsuta* Bm-2 en esferas de alginato de cobre para oxidar fenoles y decolorar vinazas. La metodología de superficie de respuesta (RSM) fue utilizada para evaluar la concentración de enzima y $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en la inmovilización. La variable de respuesta fue la actividad de lacasa retenida en las esferas. La actividad enzimática en las esferas se incrementó un 30 % y la mayor eficiencia en la inmovilización fue 95 % con 300 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 150 U/mL de lacasas. La caracterización de las EL y EI mostró ligeras variaciones en su pH óptimo, así como la estabilidad a pH y temperatura. Sin embargo, las EI fueron más resistentes a los iones metálicos, EDTA y SDS que inhibieron la actividad de las EL. El tratamiento de vinazas (10 % v/v) con lacasas libres redujo 40 % de fenoles y con la adición de mediadores naturales aumentó a 60 %. Las EI eliminaron hasta 68 % de fenoles totales y la adición de los mediadores naturales y químico en la inmovilización, no mejoró significativamente la remoción de fenoles. Las EI fueron capaz de remover fenoles durante cuatro ciclos de tratamiento y la máxima decoloración fue 75 % a escala matraz. Mediante el uso de las EI en el biorreactor de columna de burbujeo, se logró una reducción de 80 % tanto del contenido de fenoles totales como el color en las vinazas al 10 % v/v, la DQO disminuyó en un 43 %, además, las EI pudieron reutilizarse durante 4 ciclos consecutivos. Es importante señalar la aparición de precipitados oscuros después de los tratamientos que fueron atribuidos a la actividad polimerizante de las enzimas. La microscopía de las esferas reveló la conservación de su estructura después de los tratamientos consecutivos. Los espectros FT-IR de los sedimentos detectados con las EI durante el reuso, mostraron una reducción de los picos de las regiones $3300\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ y $1600\text{ a }1400\text{ cm}^{-1}$ relacionado con los grupos hidroxilos (OH) y los dobles enlaces carbono-carbono (C=C) del anillo aromático de los fenoles, indicando la biotransformación de componentes de la vinaza. Por último, por cromatografía de gases-masas se identificaron los compuestos que permanecieron después del tratamiento. Estos resultados revelan una alta eficiencia

en la inmovilización y la actividad de las lacasas inmovilizadas en alginato de cobre. Este sistema podría ser una alternativa para el tratamiento de vinazas de la caña de azúcar.

Abstract.

Sugarcane vinasses are aggressive effluents to the environment due the high content of toxic phenols and other recalcitrant pollutants. The aim of this work was to immobilize laccases from *Trametes hirsute* Bm-2 in copper alginate spheres in order to oxidize phenols and decolorize vinasses. The response surface methodology (RSM) was used to evaluate the concentration of enzyme and $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in the immobilization. The response variable was the laccase activity retained in the spheres. The enzymatic activity in the spheres increased 30 % and the highest efficiency in immobilization was 95 % with 300 mM $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ and 150 U/mL of laccases. The characterization of the EL and EI showed slight variations in their optimal pH, as well as stability at pH and temperature, however, the EI were more resistant to metallic ions, EDTA and SDS that inhibited the activity of the EL. The treatment of vinasses (10 % v/v) with free laccases reduced 40 % of phenols and with the addition of natural mediators it increased to 60 %. The IE eliminated up to 68 % of total phenols and the addition of natural and chemical mediators in the immobilization did not significantly improve the removal of phenols. The biocatalyst was able to remove phenols during four treatment cycles and the maximum decolorization was 75 % at flask scale. Using the EI in the bubble column bioreactor, an 80 % reduction in both the total phenolic content and the color in the vinasse was achieved at 10 % v/v, the COD decreased by 43 %, in addition, the EI could be reused for 4 consecutive cycles. It is important to note the appearance of dark precipitates after the treatments and which were attributed to the polymerizing activity of the enzymes. Microscopy of the spheres revealed the conservation of their structure after consecutive treatments. The FT-IR spectra of the sediments detected with the EI showed a reduction of the peaks in the regions $3300\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ and $1600\text{ to }1400\text{ cm}^{-1}$ related to hydroxyl groups (OH) and carbon-carbon double bonds. (C=C) of the aromatic ring of the phenols, indicating the biotransformation of vinasse components. Finally, the compounds that remained after treatment were identified by gas-mass chromatography. These results indicate higher efficiency of immobilization and activity of laccase immobilized in copper alginate. This system could be an alternative for the treatment of sugarcane vinasses.

Índice general

Contenido	
Índice de figuras	v
Índice de tablas	vii
Resumen	viii
Abstract	x
1. Introducción	1
2. Marco teórico	4
2.1. Producción de vinazas	4
2.2. Caracterización de vinaza	4
2.3. Tratamientos fisicoquímicos de vinazas	7
2.3.1. Biocomposteo	7
2.3.2. Ferti-irrigación	7
2.3.3. Tanques de sedimentación	7
2.3.4. Fenton	8
2.3.5. Coagulación química	8
2.4. Tratamientos biológicos anaerobios de efluentes de vinazas	9
2.5. Tratamientos biológicos aerobios de efluentes de vinazas	9
2.6. Aplicación de los hongos de la podedumbre blanca (HPB) en la remediación de vinazas	10
2.7. Enzimas lacasas y su actividad catalítica	13
2.8. Inmovilización de enzimas	17
2.8.1. Inmovilización por absorción física	18
2.8.2. Inmovilización por unión covalente	19

2.8.3. Autoinmovilización.....	20
2.8.4. Inmovilización por atrapamiento.....	20
2.9. Biorreactores enzimáticos y escalamiento.....	23
2.10. <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2	28
3. Hipótesis.....	30
4. Justificación.....	31
5. Objetivos	32
5.1. General.....	32
5.2. Específicos	32
6. Estrategia experimental.....	33
7. Metodología.....	34
7.1. Vinazas de la industria azucarera	34
7.2. Microorganismo	34
7.3. Producción de lacasas y fenoles naturales con <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2.....	34
7.3.1. Preparación del inóculo	34
7.3.2. Producción de lacasas y fenoles naturales por <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 en salvado de trigo.....	35
7.3.3. Obtención del extracto crudo de lacasas y fenoles naturales	35
7.4. Actividad enzimática de lacasas	35
7.5. Fenoles totales	36
7.6. Inmovilización de enzimas (EI) lacasas de <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 en alginato de cobre.....	36
7.6.1. Metodología de superficie de respuesta.....	37
7.7. Caracterización enzimática de las lacasas libres (EL) y EI.....	37
7.7.1. Efecto del pH, temperatura y estabilidad de la actividad de lacasas.....	37

7.7.2. Efecto de la adición de iones metálicos, EDTA y SDS en la actividad de lacasas.....	38
7.8. Tratamiento de vinazas a escala matraz con EL y EI	38
7.8.1. Decoloración	38
7.9. Tratamientos de vinazas con EI con mediadores naturales y grado reactivo (4-hidroxibenzaldehído)	39
7.10. Ciclos de reúso del biocatalizador en matraz	39
7.11. Escalamiento	39
7.11.1. Tratamiento de la vinaza en un biorreactor aireado con EL y EI	39
7.11.2. Medición de DQO	40
7.11.3. Análisis FT-IR del sedimento generado después de los tratamientos....	40
7.11.4. Análisis estructural por MEB de las esferas de alginato de Cu^{2+} antes y después del tratamiento	40
7.11.5. Identificación molecular por GC-MS del efluente tratado en el biorreactor	41
7.11.5.1. Liofilización del efluente tratado.....	41
7.11.5.2. Derivatización de las muestras liofilizadas	41
7.12. Análisis estadístico	42
8. Resultados	43
8.1. Cinética de la producción de lacasas por <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2	43
8.2. Tratamiento de vinazas con enzimas libres	47
8.2.1. Efecto de la concentración de vinazas en las EL	47
8.3. Establecimiento de las condiciones de inmovilización por la metodología de superficie de respuesta.....	49
8.3.1. Diseño central compuesto.....	49

8.4. Caracterización de las enzimas inmovilizadas en alginato de cobre	52
8.5 Tratamiento de vinazas con enzimas inmovilizadas	53
8.6. Ciclos de reuso de lacasas inmovilizadas en matraz.....	57
8.6.1. Decoloración de vinazas a escala matraz	58
8.7. Tratamiento de vinazas en un biorreactor de columna de burbujeo	60
8.7.1. Análisis estructural por MEB de las esferas antes y después de los tratamientos de vinazas en biorreactor	64
8.7.2. Reducción de fenoles y decoloración por ciclos de reuso en el biorreactor	67
8.7.3. Análisis FT-IR de la vinaza antes y después del tratamiento	69
8.7.4. Identificación molecular por GC-MS del efluente después del tratamiento enzimático	71
9. Conclusiones.....	77
10. Bibliografía	78
11. Anexo 1	104
Determinación de la actividad enzimática.....	104
12. Anexo 2	107
Determinación de fenoles totales.....	107
13. Anexo 3	109
Preparación de muestras para Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)	109
14. Anexo 4	111
Derivatización de muestras para cromografía de gases-masas	111