



Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C.
Posgrado en Ciencias en Energía Renovable

**OBTENCIÓN DE EXTRACTO ENZIMÁTICO A PARTIR
DE LA HARINA DE RAMÓN (*Brosimum alicastrum*) Y
SU APLICACIÓN EN LA BIOCONVERSIÓN DE
BIOMASA PARA PRODUCCIÓN DE BIOENERGÍA**

Tesis que presenta
I.E. Cindy Ailed Pérez Zavala

En opción al título de
MAESTRA EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE

Mérida, Yucatán, México
2024

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de: Materiales y Métodos, Resultados y Discusión de este documento, proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que, a razón de lo anterior, y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y se registrarán, en todo caso, por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Firma: _____

Nombre: Cindy Ailed Pérez Zavala



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Cindy Ailed Pérez Zavala titulado **Obtención de extracto enzimático a partir de la harina deramón (*Brosimum alicastrum*) y su aplicación en la bioconversión de biomasa para producción de bioenergía**, fue realizado en la Unidad de Energía Renovable, en la línea de investigación de Bioenergía, en los laboratorios ERU 19 y 20 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Raúl Tapia Tussell y la codirección del Dr. Edgar Olguin Maciel , perteneciente al Programa de Posgrado en Energía Renovable de este Centro.

Atentamente



Dr. José Luis Hernández Stefanoni
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 09 de diciembre de 2024

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT), por la beca no. 823010 otorgada para la realización de esta investigación.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), a la Unidad de Energía Renovable y los laboratorios UER 19 y 20, por aceptarme y otorgar el espacio, equipos e instrumentos necesarios para llevar a cabo esta investigación en sus instalaciones.

Al Dr. Raúl Tapia Tussell por la oportunidad de participar en su línea de investigación con la dirección en esta tesis y sus enseñanzas brindadas.

Al Dr. Edgar Olguin Maciel por su codirección en esta tesis, su guía, paciencia y apoyo durante todo el proceso de investigación. Su conocimiento y experiencia han sido fundamentales para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Juan Carlos Chavaría por sus valiosas aportaciones en este trabajo con las observaciones y sugerencias realizadas.

A la Dra. Sara Elena Solís Pereira por recibirme en su laboratorio para la realización de pruebas experimentales, su conocimiento y guía en el desarrollo del proyecto.

A la Dra. Elda Isaura España Gamboa por su apoyo técnico en la realización del análisis elemental, así como la enseñanza del uso de equipos y ayuda brindada en el laboratorio ERU 19.

A la técnica, Q.I. Tanit Toledano Thompson por su apoyo técnico y conocimiento brindado en el manejo y utilización de los equipos en el laboratorio ERU 20.

A mi familia, que siempre han creído en mí y me han brindado su apoyo incondicional. En especial a mis padres, Jany y Raúl, gracias por su amor incondicional y por enseñarme el valor del esfuerzo y perseverancia.

A mi novio, Uriel, cuya presencia y apoyo incondicional han sido pilar fundamental en mi vida. Gracias por estar siempre a mi lado, motivarme y celebrar cada pequeño logro. Tu paciencia infinita y amor constante han sido mi mayor fuerza.

A mis suegros por quererme como una hija más y por todo el apoyo incondicional que nos han brindado desde el día uno.

A mis mejores amigos, Adriana y Brayant, que siempre han estado al pendiente de mi e interesados en mis avances en el desarrollo de este proyecto aún a la distancia.

A mis compañeros y amigas de la unidad, Alheli, Eréndira, Alicia, Roberto, Andrés, Vania, María y Cristina, gracias por su compañerismo, por ser una fuente constante de motivación y ánimo y por todos los momentos de distracción compartidos, necesarios para mantener el equilibrio.

DEDICATORIA

Este proyecto está dedicado a mis padres, Jany y Raúl como muestra de agradecimiento por su infinito amor, apoyo y motivación constante.

Esto es por ustedes.

Este logro también es suyo.

ÍNDICE

RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	4
1. <i>Brosimum alicastrum</i> Swartz.....	4
1.1.1 Usos	4
1.1.2 Características y composición.....	5
1.1.3 Distribución geográfica.....	6
1.1.4 Productividad	7
1.2 Biomasa.....	8
1.2.1 Tipos de Biomasa	8
1.2.2 Amilolítica.	8
Almidón.....	8
Hidrólisis de almidón.....	9
1.2.3 Lignocelulósica.....	10
1.3 Bioconversión.....	11
1.4 Biorrefinerías	12
1.4.1 Tipos de Biorrefinerías.....	13
Biorrefinerías de primera generación.....	13
Biorrefinerías de segunda generación.....	13
Biorrefinerías de tercera generación.....	13
Biorrefinerías de residuos.....	14
1.5 Organismos productores de enzimas.....	14
1.5.1 <i>Trametes hirsuta</i>	15
1.5.2 Extracto enzimático.....	15
1.5.3 Hidrólisis.....	16
1.5.4 Hidrólisis Enzimática.....	16
1.6 Economía Circular	17
1.6.1 Economía Verde	18
1.6.2 Bioeconomía.....	19
1.6.3 Bioeconomía y Enzimas.....	19
1.6.4 Sostenibilidad Económica	20
JUSTIFICACIÓN	21

HIPÓTESIS	21
OBJETIVO GENERAL.....	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	23
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y METODOLOGÍA	24
2.1 Materia prima.....	24
2.1.1 Harina secada en horno (HSR).....	24
2.1.2 Harina liofilizada (HRL).....	24
2.2 Caracterización de la materia prima.....	24
2.3 Producción de extracto enzimático.....	25
2.3.1 Material biológico	25
2.3.2 Condiciones para producir el extracto enzimático.....	25
2.3.3 Ensayos enzimáticos	26
2.2.3.1 Actividad α -amilasa	26
2.2.3.2 Actividad lacasa	27
2.2.3.3 Actividad celulasa	27
2.4 Producción y caracterización parcial del extracto enzimático	28
2.4.1 Efecto del pH en la actividad enzimática del extracto crudo	28
2.4.2 Efecto de la temperatura en la actividad enzimática del extracto crudo	28
2.4.3 Efecto de inhibidores	28
2.4.4 Estabilidad en el tiempo de almacenamiento	29
2.5 Caracterización parcial de Residuo Sólido	29
2.6 Evaluación de efectividad del extracto enzimático	29
2.6.1 Prueba de decoloración con el tinte índigo carmín.....	29
2.6.2 Prueba de hidrólisis en harina de yuca.....	30
2.6.3 Prueba como pretratamiento en vinaza.....	31
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
3.1 Harinas de semillas de Ramón	32
3.2 Caracterización de harinas.....	32
3.3 Producción de extracto enzimático en fermentación sumergida en matraz agitado.....	33
3.3.1 Ensayos cualitativos para actividad enzimática	35
3.3.2 Ensayos cuantitativos para actividad enzimática	36
Actividad α -amilasa	36

Actividad lacasa	37
Actividad celulasa	38
3.4 Caracterización de extracto enzimático.....	38
3.4.1 Efecto del pH en la actividad enzimática del extracto crudo.....	38
3.4.2 Efecto de la temperatura en la actividad enzimática del extracto crudo.....	41
3.4.3 Efecto de inhibidores.....	43
3.4.4 Estabilidad en el tiempo de almacenamiento.....	48
3.5 Caracterización parcial de Residuo Sólido	50
3.6 Evaluación del extracto enzimático en diversos sustratos.....	51
3.6.1 Prueba de decoloración con el tinte Índigo Carmín.....	51
3.6.2 Prueba de hidrólisis en harina de yuca.....	52
3.6.3 Prueba como pretratamiento en vinaza.....	54
CONCLUSIONES.....	56
BIBLIOGRAFÍA	57
ANEXOS.....	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Composición química de la semilla del árbol de Ramón, <i>B. alicastrum</i>	5
Tabla 2.1 Soluciones amortiguadoras utilizadas para evaluar el pH óptimo para la actividad enzimática de α -amilasa y lacasa.....	28
Tabla 3.1 Caracterización de harina de Ramón seca y liofilizada.....	33
Tabla 3.2 Caracterización parcial de Residuo Sólido	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. 1 Distribución del árbol de Ramón (<i>Brosimum alicastrum</i>).....	7
Figura 1. 2 Usos y mercados de enzimas en 2012	20
Figura 3.1 Harina de Ramón seca (HRS) y Harina de Ramón liofilizada (HRL)	32
Figura 3.2 Actividad α -amilasa en harina de Ramón seca (HRS, cuadros negros), liofilizada (HRL, círculos rojos) y medio sintético adicionado con almidón de papa soluble (MSA, triángulos verdes).....	34

Figura 3.3 Actividad lacasa en harina de Ramón seca (HRS, cuadros negros), liofilizada (HRL, círculos rojos) y almidón de papa soluble (A, triángulos verdes).....	34
Figura 3.4 Actividad amilolítica en placa de medio ELAA incubada a 32 °C por 96 h, teñida con Lugol	35
Figura 3.5 Actividad lacasa en placa de medio EMA (extracto de malta-agar), incubada a 32 °C por 96 h, en la que se observa la oxidación del reactivo ABTS.....	35
Figura 3.6 Actividad celulolítica en placa de medio Mandels & Weber (adicionado con Carboximetil celulosa) incubada a 32 °C por 72 h, teñida con Rojo Congo.....	36
Figura 3.7 Efecto del pH sobre la enzima α -amilasa presente en el extracto enzimático crudo producido por <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 en HRL. (Soluciones amortiguadoras: Ácido cítrico-Fosfato (AF, pH 4 y 4.5), Acetato de sodio-Ácido acético (AA, pH 4.5 y 5), Ácido cítrico-Citrato de sodio (AC, pH 5 y 5.5), Fosfatos (F, pH 5.5 y 6)).....	39
Figura 3.8 Efecto del pH sobre la enzima lacasa presente en el extracto enzimático crudo producido por <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 en HRL. (Soluciones amortiguadoras: Ácido cítrico-Fosfato (AF, pH 4 y 4.5), Acetato de sodio-Ácido acético (AA, pH 4.5 y 5), Ácido cítrico-Citrato de sodio (AC, pH 5 y 5.5), Fosfatos (F, pH 5.5 y 6)).....	40
Figura 3.9 Efecto de la temperatura sobre la enzima amilasa presente en el extracto enzimático crudo producido por <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 en HRL.....	42
Figura 3.10 Efecto de la temperatura sobre la enzima lacasa presente en el extracto enzimático crudo producido por <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 en HRL.....	43
Figura 3.11 Efecto de inhibidores en concentración 5 mM sobre la enzima α -amilasa presente en el extracto enzimático crudo producido por <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 en HRL.....	45
Figura 3.12 Efecto de inhibidores en concentración 10 mM sobre la enzima α -amilasa presente en el extracto enzimático crudo producido por <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 en HRL.....	46
Figura 3.13 Efecto de inhibidores en concentración 5 mM sobre la enzima lacasa presente en el extracto enzimático crudo producido por <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 en HRL.....	47
Figura 3.14 Efecto de inhibidores en concentración 10 mM sobre la enzima lacasa presente en el extracto enzimático crudo producido por <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 en HRL.....	48
Figura 3.15 Estabilidad en el tiempo de almacenamiento de la enzima α -amilasa presente en el extracto enzimático crudo producido por <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 en HRL.....	49

Figura 3.16 Estabilidad en el tiempo de almacenamiento de la enzima lacasa presente en el extracto enzimático crudo producido por <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 en HRL.....	50
Figura 3.17 Prueba de decoloración utilizando el extracto enzimático crudo (producido por <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 en HRL) en tinte índigo carmín. (Control (cuadros negros), Carga enzimática: 150 U (círculos rojos), 300 U (triángulos verdes), 450 U (triángulos azules)).....	52
Figura 3.18 Prueba de hidrólisis utilizando el extracto enzimático crudo (producido por <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 en HRL) en harina de yuca. (Control (cuadros negros), Carga enzimática: 25 U (círculos rojos), 50 U (triángulos verdes), 75 U (triángulos azules)).....	54
Figura 3.19 Prueba de contenido de fenoles utilizando el extracto enzimático crudo (producido por <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 en HRL) en vinazas. (Vinaza al 25%; carga enzimática de 9,000 U (cuadros negros), 18,000 (círculos rojos), Vinaza al 50%; carga enzimática de 9,000 U (triángulos verdes), 18,000 (triángulos azules)).....	55

RESUMEN

Durante las últimas décadas las enzimas microbianas han acaparado el interés en diversas industrias, reemplazando muchas enzimas vegetales y animales gracias a su amplia disponibilidad, medios de cultivo económicos, procesos ambientales más limpios y la reducción de costos en su producción en general. Uno de los principales desafíos en la actualidad se centra en lograr un desarrollo sostenible implementando un modelo de economía circular con el propósito de alcanzar un equilibrio entre economía, medio ambiente y sociedad. En este estudio se valorizaron las semillas del árbol de Ramón (*Brosimum alicastrum*) extendiendo su vida útil como un sustrato, el cual, en conjunto con la cepa *Trametes hirsuta* Bm-2, produjeron extractos enzimáticos por medio del proceso de fermentación sumergida en matraz agitado. Se seleccionó el extracto obtenido a partir de harina de Ramón liofilizada (HRL) para su caracterización y evaluación por su mayor actividad enzimática (152 U/mL de enzima α -amilasa y 18,993 U/mL de enzima lacasa) en las pruebas preliminares. Las condiciones más efectivas en la actividad enzimática se obtuvieron a pH 4.5 con buffer ácido cítrico-fosfato (225 U/mL α -amilasa y 12,972 U/mL lacasa) y a una temperatura de 50 °C (117 U/mL α -amilasa y 4,283 U/mL lacasa) considerando que el extracto HRL contenía inicialmente 50 U/mL de enzima α -amilasa y 7,700 U/mL de lacasa. Respecto a las soluciones amortiguadoras, el cloruro de zinc [5 mM] inhibió en un 58 % la actividad α -amilasa y el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) [10 mM] en un 25%, mientras que para la enzima lacasa solo el ABTS [10 mM] inhibió la actividad enzimática en un 83%. El extracto HRL fue evaluado mediante su aplicación en tres residuos y se obtuvieron resultados positivos en la decoloración del tinte índigo carmín y la remoción de fenoles en vinazas diluidas, permitiendo también una mayor producción de azúcares reductores al romper enlaces glucosídicos α -1,4 del almidón de yuca. La posibilidad de aplicar este extracto enzimático en tratamientos biológicos para la transformación a bioenergía es una alternativa importante y amigable con el ambiente, lo cual es esencial para lograr un impacto positivo en la economía y evitar la contaminación.

ABSTRACT

Over the last decades, microbial enzymes have attracted the attention of various industries, replacing many plant and animal enzymes thanks to their wide availability, economical culture media, cleaner environmental processes and the reduction of costs in their production in general. One of the main challenges today is to achieve sustainable development by implementing a circular economy model with the purpose of achieving a balance between economy, environment and society. In this study, the seeds of the Ramón tree (*Brosimum alicastrum*) were valorized by extending their useful life as a substrate, which, together with the *Trametes hirsuta* Bm-2 strain, produced enzymatic extracts through the process of submerged fermentation in a shaken flask. The extract obtained from freeze-dried Ramón flour (HRL) was selected for characterization and evaluation due to its higher enzymatic activity (152 U/mL of α -amylase enzyme and 18,993 U/mL of laccase enzyme) in preliminary tests. The most effective conditions for enzymatic activity were obtained at pH 4.5 with citric acid-phosphate buffer (225 U/mL α -amylase and 12,972 U/mL laccase) and at a temperature of 50 °C (117 U/mL α -amylase and 4,283 U/mL laccase) considering that the HRL extract initially contained 50 U/mL of α -amylase enzyme and 7,700 U/mL of laccase. Regarding the buffer solutions, zinc chloride [5 mM] inhibited α -amylase activity by 58% and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) [10 mM] by 25%, while for the laccase enzyme only ABTS [10 mM] inhibited the enzymatic activity by 83%. The HRL extract was evaluated by its application in three residues and positive results were obtained in the decolorization of the indigo-carmin dye and the removal of phenols in diluted vinasses, also allowing a greater production of reducing sugars by breaking α -1,4 glucosidic bonds of cassava starch. The possibility of applying this enzymatic extract in biological treatments for the transformation to bioenergy is an important and environmentally friendly alternative, which is essential to achieve a positive impact on the economy and avoid pollution.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas representan el grupo más grande de proteínas ampliamente distribuidas en la naturaleza, cumpliendo con la función de un biocatalizador, al aumentar significativamente la velocidad de reacción, razón por lo que en el presente son el producto industrial más importante de la biotecnología. Las enzimas han adquirido cada vez mayor atención debido a la necesidad de producir energía renovable, mediante procesos ecológicos, para evitar que su contraparte fósil genere más contaminación [1,2].

Estas proteínas catalíticas, con millones de años de ajuste evolutivo, tienen un papel importante en diversas industrias como: la alimentaria, farmacéutica, textil y en la producción de bioenergía. Teniendo aplicaciones biotecnológicas en el pretratamiento de los residuos, la extracción de compuestos e incluso en la modificación y síntesis de nuevas moléculas a partir de los compuestos bioactivos [2, 3, 4, 5]

La bioenergía ve reflejada su importancia directamente en la producción de biocombustibles como el etanol, el cual además de reducir emisiones de carbono, es producido mayormente a partir de almidón, mismo que requiere de enzimas amilolíticas para su despolimerización. En el caso de Estados Unidos, por ejemplo, el etanol producido a partir de maíz ayudó a proteger su independencia energética al desplazar más de 600 millones de barriles de petróleo crudo con una producción anual de 15,620 millones de galones en el año 2023, representando el 53% de la producción total anual de este biocombustible [4, 5, 6].

Actualmente el mercado de las enzimas industriales ha crecido alrededor de un 7% anual, reportándose un mercado global de 13,300 millones de dólares en el año 2023 y esperando alcanzar los 21,400 millones de dólares para el 2032, exhibiendo una tendencia en la tasa de crecimiento de 5.3% durante el periodo 2024-2032. Gracias a su relación costo-beneficio, bajo consumo energético, tiempos de procesamiento más cortos y características ecológicas, los procesos enzimáticos están incorporándose rápidamente en diversas industrias. [7, 8, 9].

Microorganismos como bacterias, hongos y levaduras se han utilizado extensamente para producir enzimas específicas para aplicaciones comerciales. Por ejemplo, se han producido celulasas de varias especies de hongos como *Aspergillus*, *Basidiomycetes*, *Pleurotus* y *Trichoderma*, lipasas a partir de *Aspergillus* sp., *Candida* sp. (levaduras), *Penicillium* sp., *Rhizopus* y *Mucor*, así como xilanasas por cepas de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma*. Siendo los organismos más reconocibles en la industria la bacteria *Bacillus subtilis* y el hongo

Aspergillus oryzae, con los cuales se producen las principales enzimas utilizadas en el mercado industrial; la amilasa, lacasa, lipasa, proteasa, ligasa, fitasa, celulasa y xilanasas [4, 9,10 ,11].

Estudios han demostrado la eficiencia del uso de enzimas y desechos orgánicos en la producción de bioenergía, dejando en evidencia su rendimiento en comparación de enzimas comerciales y/o medios sintéticos. Por ejemplo, Ibarra Díaz (2020) estableció las mejores condiciones para cultivo a partir de grano y paja de cebada con el uso de enzimas comerciales Amilex 4T, Diazyme SSF, Cellic CTec 3, Cellic HTec 3 y levaduras autóctonas *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 y *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875, logrando una mayor deslignificación con la hidrólisis enzimática en comparación del pretratamiento peróxido-alkalino, lo cual demuestra que además de ser más costosas las enzimas comerciales, obtuvieron un menor rendimiento. Mientras que Danovich (2019) obtuvo un extracto enzimático con cultivo *Wickerhamomyces anomalus*, en un medio de cultivo sintético compuesto por glucosa, pectina de citrus, sulfato de amonio, otras sales, aminoácidos y vitaminas, el cual le permitió comparar el rendimiento del proceso extractivo por vía enzimática con el método de extracción química, obteniendo mayores rendimientos empleando el primer método, confirmando la bondad del proceso enzimático utilizado.

Actualmente la tendencia es producir enzimas o extractos enzimáticos a partir de sustratos asequibles provenientes de residuos agrícolas o desechos de producción. Por lo que estudios recientes han evaluado esta producción caracterizando a su vez la cinética enzimática. Tal es el caso de Figueroa *et al.* (2020) quienes determinaron la capacidad de producción de α -amilasas de 20 cepas nativas de hongos anamorfos a través de fermentación en estado sólido, utilizando como sustrato cáscara de arroz, y de Washington (2020) que utilizó desechos de caña de azúcar en el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* para el desarrollo enzimático lignocelulósico de lacasas, lignina peroxidases y manganeso peroxidases.

Por ello se propone en esta tesis el uso de las semillas del árbol de Ramón (*Brosimum alicastrum*) como sustrato para la producción de extractos enzimáticos. El Ramón es una especie forestal que crece abundantemente, contribuye a la restauración de los suelos degradados y a su vez es considerado un reservorio de carbono. A pesar de ser un gran aportador de forraje para el ganado, no es empleado como base de la alimentación humana ni utilizado masivamente para el mismo destino, por lo que representa una materia prima abundante, disponible y de bajo costo [16, 17, 23].

Para la producción de las enzimas, se propone el uso de un hongo nativo de la región norteamericana; *Trametes hirsuta* Bm-2 debido a que se ha reportado como fácilmente adaptable

a diversas condiciones y de fácil manejo, por lo que comúnmente es conocido como seguro, que carece de esporas y es capaz de generar múltiples enzimas [18, 19].

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue producir un extracto enzimático con la cepa fúngica *T. hirsuta* Bm-2 utilizando harina de semillas de Ramón como sustrato. Además, se evaluó el extracto con los parámetros de pH, temperatura, inhibidores enzimáticos y su efecto en diversas materias primas potenciales para la producción de bioenergía. Con el fin de contribuir con la sustentabilidad en la producción energética al disminuir el uso de enzimas comerciales.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1. *Brosimum alicastrum* Swartz

Brosimum alicastrum Sw. conocido comúnmente como Ramón, es un árbol característico de las zonas tropicales, originario de Mesoamérica y el Caribe, con amplia distribución en México que va desde el sur de Sinaloa a Chiapas y del sur de Tamaulipas a la Península de Yucatán. Es apreciado por poseer follaje con alto contenido nutritivo, principalmente para el ganado vacuno y caprino y también por su disponibilidad durante la época de sequía. Ramón representa un elemento ecológicamente importante en la composición florística de la selva baja y mediana del sur de México [16, 20, 21].

El Ramón es un árbol común en casi todos los bosques tropicales del sureste de México, tanto de la región del Golfo de México como del Pacífico Mexicano, y se le conoce por varios nombres comunes, entre los que destacan ash, capomo, talcoite, osthé, ojoche, uje o mojo. Puede adaptarse a climas húmedos y áridos por su capacidad de aprovechar la humedad almacenada en el suelo desde sus raíces profundas, y retiene un forraje verde aún durante la época de secas [20, 21, 22].

La abundancia de estos árboles en los alrededores de las ruinas mayas ha llevado a arqueólogos y antropólogos a sugerir que fueron cultivados en áreas residenciales en el pasado [22].

Las áreas de cultivo se han incrementado en los últimos años debido a su gran variedad de usos (madera, forraje, alimento, medicinas) y su aprovechamiento para la producción de materiales biodegradables [22, 23].

1.1.1 Usos

Es un árbol de importancia ecológica y económica que tiene una amplia variedad de usos humanos, tales como:

- La madera se utiliza para la construcción en general y como entarimado, material de artesanías, mangos de herramientas, fabricación de artículos torneados y como pulpa para papel.
- La pulpa del fruto es comestible. Las semillas hervidas o tostadas tienen sabor parecido a las castañas y son muy nutritivas, se comen solas o con maíz, miel y plátanos.
- Las semillas tostadas y molidas se usan como sustituto del café y para una harina negra utilizada en la elaboración de pan o tortilla.

- Las hojas, tallo joven, fruto y semillas; constituyen un excelente forraje para el ganado bovino, caprino, equino y porcino.
- Y finalmente, presenta usos medicinales; el látex, las hojas en infusión presentan uso antitusivo, asma, balsámico, contra la diabetes, diaforético, emenagogo, contra la tuberculosis y la bronquitis.
- La infusión de corteza se usa como tónico.
- Otro uso importante en la región es como árbol de sombra y ornato [17, 23].

1.1.2 Características y composición

Este árbol perennifolio y subperennifolio puede llegar a medir de entre 20 a 45 m de altura, con un diámetro de hasta 1.5m. Sus semillas miden alrededor de 9 a 13 mm de largo por 16 a 20 mm de ancho, son redondeadas y aplanadas en ambos extremos y están cubiertas de una testa papirácea de color moreno claro. La semilla fresca tiene de 45 a 55% de humedad [17].

Los árboles producen frutos de marzo a abril y de agosto a septiembre cada año. Dependiendo de la talla del árbol, éstos pueden producir entre 75 y 95 kg de semilla al año, las cuales contienen aceite, grasa, azúcares y una gran cantidad de triptófano, un aminoácido deficiente en las dietas a base de maíz. Su composición (Tabla 1.1) incluye principalmente materia seca, seguida por almidón y azúcares (extracto libre de nitrógeno) y proteína cruda, y en menor medida extracto etéreo, cenizas y fibra cruda. En la alimentación humana, la semilla de Ramón ha demostrado ser un alimento alto en proteína (11.5%) y fibra dietética (13%) mientras que el forraje tiene 14% de proteína cruda, 3.9% de extracto etéreo o grasas, 13% de cenizas o minerales y 39% de fibra cruda [16, 20].

Tabla 1.1 Composición química de la semilla del árbol de Ramón, *B. alicastrum* [20]

Componente	Contenido
Materia seca (% base fresca)	92
Proteína cruda (% base seca)	12.8
Extracto etéreo (% base seca)	3.1
Cenizas (% base seca)	3.4
Fibra cruda (% base seca)	3.2
Extracto Libre de Nitrógeno (almidón y azúcares) (% base seca)	71.2
Energía Bruta (kcal/kg MS)	3760

1.1.3 Distribución geográfica

El Ramón se distribuye en el Neotrópico, desde el norte de México (con excepción de la Península de Baja California) hasta el sur de Brasil. También se encuentra en algunos estados de la Cuenca del Río Balsas, extendiéndose por Centroamérica y llegando hasta Colombia, Perú y Venezuela; además de Cuba, Jamaica y Trinidad y Tobago en el Caribe (Figura 1.1). Es un árbol dominante en los bosques tropicales y subtropicales que se pueden encontrar a lo largo de la vertiente del Pacífico de México, desde la planicie costera hasta las laderas y quebradas de la Sierra Madre Occidental, de 400 a 800 m de altitud. Por otro lado, a lo largo del talud continental del Golfo de México, se presenta mayormente a lo largo de la planicie costera, abarcando la mayor parte de la Península de Yucatán, la Sierra Madre Oriental y los Altos de Chiapas, alcanzando altitudes de 600 m [22, 24, 25].

En el estado de Yucatán, el Ramón tiene una distribución natural en la parte central, sur y oriente, ya que forma parte de la composición de la selva baja subcaducifolia y selva mediana subcaducifolia [23].

En la actualidad se pueden observar ejemplares en casi todo el territorio del estado, siendo parte importante de la estructura de los huertos familiares mayas en comunidades rurales y como árbol de ornato en parques, jardines y áreas verdes en las ciudades, por su follaje perenne [23].



Figura 1.1 Distribución del árbol de Ramón (*Brosimum alicastrum*) [24]

1.1.4 Productividad

Un estudio llevado a cabo en el estado de Yucatán estimó la producción media de diez árboles en un total de 163.3 kg de forraje por árbol al año. Esta productividad de biomasa es un reflejo del hecho de que los árboles sin manejo pueden producir un promedio de 13.60 kg hasta 18.9 kg de desechos biomásicos por mes en los árboles más grandes, y se encontró una alta correlación entre el diámetro y la producción de biomasa. En un año un árbol produce un total de 163.3 kg, lo que podría representar una productividad forrajera de 48.9 toneladas por año en una plantación comercial de 300 árboles por hectárea, o 36.6 toneladas con 200 árboles por hectárea, una cantidad significativa si se compara con la producción de pastos [25].

1.2 Biomasa

La Directiva (UE) 2018/2001 del Parlamento y Consejo Europeo define la biomasa como la fracción biodegradable de los productos, residuos y desechos de origen biológico procedentes de actividades agrarias, incluidas las sustancias de origen vegetal y de origen animal, de la silvicultura, la pesca y la acuicultura, así como la fracción biodegradable de los residuos industriales y municipales de origen biológico. Es, por lo tanto, materia orgánica utilizada como fuente energética (energía eléctrica, térmica, combustibles para vehículos y productos químicos valiosos) [26, 27, 28].

Estos recursos biomásicos pueden clasificarse de forma general en agrícolas y forestales. También se considera biomasa la materia orgánica de las aguas residuales y los lodos de las mismas, así como la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU), y otros residuos derivados de las industrias [26].

1.2.1 Tipos de Biomasa

1.2.1 Amilolítica

En función de los productos predominantes en la biomasa se establece una nueva clasificación, en la que se encuentra la biomasa amilolítica haciendo referencia a aquella materia prima en la que predominan los polisacáridos como el almidón, siendo esta rica en el mismo y que, debido a su acumulación, son una fuente potencial de glucosa. Dentro de los cereales encontramos alimentos como el maíz, cebada, malta, trigo, avena, arroz y centeno, mientras que en la clasificación de tubérculos predomina la papa como fuente de biomasa rica en almidón [29, 30].

Almidón

El almidón es un carbohidrato complejo o polisacárido de glucosa formado por dos tipos de cadenas de moléculas de esta (D-glucano), amilosa (fracción lineal α -1,4) y amilopetina (fracción ramificada α -1). El almidón puro se encuentra en forma de un polvo blanco, inodoro e insípido; y se extrae de las plantas. La mayoría de las plantas verdes lo producen para almacenar el exceso de glucosa que crean durante la fotosíntesis [52, 31].

En su forma nativa (natural) o mediante algún tipo de modificación, es el producto industrial más importante, debido a sus propiedades funcionales (solubilidad, poder de hinchamiento, claridad de las pastas y estabilidad a la refrigeración), que imparte a los productos donde se adicionan [31].

Recientemente, la semilla del árbol de Ramón ha cobrado importancia comercial por dos razones: primero, como una alternativa para la seguridad alimentaria, debido a sus propiedades nutricionales y, segundo, para la obtención de bioetanol. El almidón de semilla de Ramón se ha propuesto como ingrediente alimentario, así como para la fabricación de materiales biodegradables y para la producción de materiales termoplásticos, además de poder utilizarse como excipiente en la formulación de tabletas en la industria farmacéutica. La oxidación del almidón de semilla de Ramón resultó en un gel más claro, lo que potencializa su aplicación industrial. Del mismo modo, la semilla contiene una importante cantidad de compuestos fenólicos (ácido gálico, ácido clorogénico y ácido vanílico) con actividad antioxidante [32].

Hidrólisis de almidón

El almidón es la segunda fuente de carbohidratos (energía) más abundante e importante en el mercado debido a sus múltiples aplicaciones en la industria, desde productos valiosos en la industria de procesamiento de alimentos (maltosa, glucosa, fructosa, ácidos orgánicos, aminoácidos, jarabes de glucosa y fructosa), hasta servir como materia prima en la industria de la fermentación para la producción de etanol. Con este proceso se pueden producir también, moléculas de carbohidratos más pequeñas que sirven como bloques de partida para la síntesis química, e incluso producir materias primas a partir de fuentes renovables para la síntesis de moléculas orgánicas (33, 34, 53).

La hidrólisis del almidón es un proceso importante en la industria alimentaria, en el tratamiento de aguas residuales y en la producción de materiales de partida para la síntesis de moléculas orgánicas y producción de biocombustibles. Dicho proceso consta de tres etapas:

- Gelatinización: el agua y calor rompen los enlaces de hidrógeno, manteniendo unido los gránulos de almidón.
- Licuefacción: catalizada por la enzima α -amilasa, se producen moléculas más pequeñas llamadas oligosacáridos, las cuales se pueden degradar aún más. Esta enzima solo puede hidrolizar los enlaces glucosídicos α -1,4.
- Sacarificación: con la adición de la enzima amiloglucosidasa, las moléculas de oligosacáridos se degradan a glucosa y maltosa. Esta enzima puede hidrolizar tanto los enlaces glucosídicos α -1,4 como los α -1,6.

Dichas enzimas se obtienen principalmente de bacterias termo resistentes como *Bacillus licheniformis*, *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis* [34, 35].

Gracias a los avances biotecnológicos, existen enzimas que permiten producir de manera controlada y con alto rendimiento productos derivados de la hidrólisis del almidón. Un ejemplo son las maltodextrinas, las cuales se encuentran constituidas por una mezcla de carbohidratos con diferente grado de polimerización y, por ende, diferentes pesos moleculares. Su contenido de azúcares directos (ARD) es expresado en términos de dextrosa [32].

El proceso de hidrólisis se puede mejorar reduciendo el pH, calentando la mezcla de reacción o catalizando la reacción con enzimas. Sin embargo, las enzimas digestivas de almidón crudo pueden hidrolizar directamente a los gránulos de almidón crudo por debajo de la temperatura de gelatinización del almidón, reduciendo significativamente los grandes insumos de energía requeridos y simplificando el proceso de fabricación de productos a base de almidón. Dejando así a un lado la necesidad de los procesos de licuefacción y sacarificación, ya que estos representan alrededor del 30-40 % de la energía total utilizada durante la producción de etanol a base de almidón [33, 36].

Solo aproximadamente el 10% de las enzimas amilolíticas son capaces de digerir el almidón crudo debido al tamaño de las partículas y a la arquitectura policristalina densamente compacta de los gránulos de almidón natural. Diversos estudios han informado que una gran cantidad de microorganismos, incluidos hongos y bacterias, producen estas enzimas digestivas de almidón crudo [36].

1.2.2 Lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica representa más del 90% de toda la biomasa vegetal y es la fuente de carbono renovable más abundante que a su vez no compite con las reservas de alimentos. Además de las fuentes convencionales, como las plantas leñosas y herbáceas, la lignocelulosa también existe como subproducto en los flujos actuales de procesamiento agrícola y alimentario. Sin embargo, la mayoría de estos tipos de biomasa lignocelulósica residual se destinan a otros usos como fertilizantes, se queman para generar energía o son descartados como desechos [30, 37, 38].

La lignocelulosa es un biopolímero que consta de tres componentes principales; la celulosa, hemicelulosa y lignina. La celulosa y hemicelulosa son polímeros de

carbohidratos (polisacáridos) mientras que la glucosa es la unidad monomérica de la celulosa [30, 38].

La conversión de la biomasa lignocelulósica, derivada de residuos agrícolas, en compuestos de valor añadido se ha convertido en una estrategia sostenible para el desarrollo de muchas industrias, ya que puede ofrecer materias primas renovables para muchas áreas de aplicación, como la energía, la alimentación, la nutrición, la industria química, etc. Durante la degradación de estos materiales por parte de los microorganismos, se producen diversos compuestos, como proteínas, enzimas, ácidos orgánicos, metabolitos secundarios y oligosacáridos [39, 40].

Es por esto que actualmente se está investigando activamente el uso de esta biomasa para la producción de biocombustibles. Tal es el caso del desarrollo tecnológico enfocado a la producción de etanol, el cual se ha desplazado hacia la utilización de materiales lignocelulósicos residuales para reducir los costos de producción [40, 41].

Las biorrefinerías tradicionales de biomasa lignocelulósica se han centrado en los componentes de carbohidratos sin usos eficientes de la lignina, de la cual su valorización se encuentra en la producción de productos químicos de alto valor, en particular, monómeros aromáticos. Atrayendo mucho la atención debido a que la lignina es el recurso más abundante de la biomasa [41].

Diversos autores han destacado a los microorganismos lignocelulolíticos, en especial los hongos, de gran interés como degradadores de biomasa para aplicaciones a gran escala, gracias a su capacidad de producir grandes cantidades de enzimas lignocelulolíticas extracelulares. Teniendo buena eficiencia en el proceso de conversión enzimática de polisacáridos estructurales en la biomasa vegetal para romper polisacáridos cristalinos, permitiendo así el acceso a cadenas poliméricas individuales [40, 41]

Entre los hongos productores de enzimas lignocelulolíticas, se encuentran especies de ascomicetos como *Trichoderma reesei*, basidiomicetos como hongos de podredumbre blanca (por ejemplo, *Phanerochaete chrysosporium*), hongos de podredumbre parda como *Fomitopsis palustris* e incluso algunas especies anaeróbicas como *Orpinomyces* sp. Esta alternativa enzimática evita el uso de ácidos fuertes y da como resultado una corriente más limpia de azúcares para la fermentación con menos subproductos [40, 41].

1.3 Bioconversión

La bioconversión consiste en la transformación de una forma de energía en otra, o de una sustancia en otra, a través de la acción de seres vivos, por lo general microorganismos y de manera biológica [27, 42].

Las biotransformaciones que utilizan enzimas y células microbianas completas se han utilizado durante siglos para producir alimentos y bebidas. Sin embargo, solo en el último siglo se han desarrollado métodos para comprender y mejorar la estabilidad y productividad de los biocatalizadores. La ingeniería y la evolución dirigida de enzimas han mejorado la actividad enzimática y aumentado el número de productos que se pueden obtener por biotransformación [42, 43].

La bioconversión de celulosa en azúcares fermentables es un área de biorrefinación que ha invertido enormes esfuerzos de investigación, ya que es un requisito previo para la posterior producción de bioenergía. Los azúcares y el almidón constituyen la materia prima del 90 % del etanol producido hoy en día, pero las formas más frecuentes de azúcar en la naturaleza son la celulosa y la hemicelulosa [27, 42].

1.4 Biorrefinerías

En la búsqueda de un crecimiento económico sostenible, las biorrefinerías han surgido como alternativa potencial a las refinerías de petróleo. Cada vez se reconoce más a nivel mundial que las materias primas de origen vegetal (es decir, la biomasa) tienen el potencial de reemplazar una gran fracción de los recursos fósiles como materia prima para las producciones industriales, abordando tanto los sectores energéticos como los no energéticos (es decir, los productos químicos y los materiales) [43, 45].

El concepto de biorrefinería ha sido recientemente diseñado y utilizado para procesar varias materias primas de biomasa, como la lignocelulósica, algas y varios tipos de desechos. Abarca una amplia gama de tecnologías capaz de separar los recursos de biomasa (madera, pastos, maíz...) en sus componentes básicos (carbohidratos, proteínas, triglicéridos...) que pueden convertirse en productos de valor agregado, biocombustibles y productos químicos. Entre las diversas definiciones de biorrefinería, la más exhaustiva fue realizada por IEA Bioenergy Task 42 "Biorefineries"; "La biorrefinación es el procesamiento sostenible de biomasa en un espectro de productos comercializables y energía" [44, 45, 46].

1.4.1 Tipos de Biorrefinerías

Biorrefinería de primera generación

Las materias primas para las biorrefinerías de primera generación provienen de la caña de azúcar, trigo, maíz, cebada, sorgo, girasol, etc. (Azad *et al.* 2015). El bioetanol, biodiesel y biogás derivado del almidón son las primeras generaciones de biocombustibles y muy comunes en esta categoría, sin embargo, los aceites vegetales y el biometano también se pueden incluir dentro de esta generación de biorrefinerías (Cherubini, 2010). La principal ventaja de esta generación de biorrefinerías es la reducción neta de las emisiones de gases de efecto invernadero y del consumo de energía fósil, debido a que la mayor parte del transporte de estos están reemplazando efectivamente al diésel y a la gasolina convencionales. Sin embargo, su principal problema es la constante competencia con la industria alimenticia y uso de tierras agrícolas, lo cual plantea cuestiones éticas [47].

Biorrefinería de segunda generación

La biomasa lignocelulósica pertenece a las materias primas de biomasa de segunda generación y presenta una alternativa a las materias primas de biomasa de primera generación, que compiten con el requerimiento de tierra de cultivos alimenticios. Son una fuente práctica de materia prima de biomasa, considerando la alta disponibilidad de plantas en climas tropicales y la facilidad de procesar una amplia variedad de materias primas de bajo coste [44, 48].

Bhowmick *et al.* (2018) propusieron el uso de esta biorrefinería como plataforma para abordar la sostenibilidad con el desarrollo de bioproductos de alto valor junto con la producción de biocombustibles ya que estas se consideran más ecológicas, rentable y más factibles para la sociedad. [44, 47].

Biorrefinería de tercera generación

La biomasa acuática en forma de algas, se considera materia prima de biomasa avanzada, la cual proporciona beneficios como un menor requerimiento de tierra y una mayor productividad de biomasa y rendimiento a comparación de la lignocelulósica. Esta biomasa se puede clasificar en tres principales categorías; microalgas, cianobacterias y macroalgas y los componentes presentes en ellas son aceites, proteínas y carbohidratos encontrados en alta concentraciones. La biorrefinería de tercera generación tiene varias ventajas: no depende del crecimiento estacional por lo que se tiene una mayor productividad en comparación con los cultivos de semillas oleaginosas, alta tolerancia al dióxido de carbono,

menor tasa de consumo de agua, no se requiere de herbicidas o pesticidas, la tasa de crecimiento de las algas es más alta en comparación con otras, entre otras más [47, 48].

Biorrefinería de residuos

Es aquella que utiliza residuos como materias primas no comestibles y residuos biogénicos. Ha surgido como una alternativa sensata para la producción de bioproductos como biopolímeros, biocombustibles y bioquímicos. Los desechos son un componente clave para las oportunidades de reutilización, reciclaje logrando así la producción sostenible de bioenergía a partir de este concepto [48].

1.5 Organismos productores de enzimas

A lo largo de la historia, las enzimas se han aislado de fuentes naturales (vegetal, animal y microbiana) para su empleo en diferentes procesos químicos y bioquímicos. Sin embargo, a partir de la década de los 60 del siglo pasado, las enzimas microbianas, principalmente amilasas y proteasas, empezaron a reemplazar gran parte de las enzimas de origen vegetal y animal. Mientras que en la década de los 70 del siglo XX, con la introducción de la ingeniería genética y la biología molecular, se lograron obtener microorganismos recombinantes, los cuales aumentaron la productividad, disminuyendo a su vez, los costos de los biocatalizadores microbianos [49].

Los microorganismos más empleados para la producción de enzimas microbianas son los hongos filamentosos, levaduras y bacterias. La industria de estas enzimas en la actualidad representa el 90% del mercado de biocatalizadores. Por ejemplo, con el hongo filamentoso *Trichoderma* sp. se pueden producir enzimas endoquitinasas, proteasas, exoglucan- β -1,3 glucosidasas y endoglucan- β -1,6 glucosidasas, con el hongo *Cyathus striatus* enzimas que degradan la lignina, las cuales pueden ser útiles en la biorremediación, como la especie *Chroicocephalus bulleri* que contiene lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa. Microorganismos productores de enzimas lacasas como las diferentes cepas de hongos *Ganoderma* sp, *Trametes* sp, *Fusarium* sp, *Aspergillus* sp, destacándose la cepa *Trichoderma* sp. y para la producción de lipasas se reportan los microorganismos provenientes de las cepas *Bacillus* sp, *Moraxella* sp, *Pseudomonas* sp, *Aneurinibacillus*, *B. subtilis*, entre otras [49, 50, 51].

El auge de estas enzimas es gracias a las propiedades de los microorganismos que los diferencian de las demás fuentes naturales como las plantas y animales, por ejemplo, tienen un metabolismo muy vigoroso, son versátiles y fáciles de propagar a gran escala, son fácilmente

manipulables tanto genéticamente como mediante cambios en su medio ambiente, sus requerimientos nutricionales son simples y no estacionales, etc. [49].

Teniendo en cuenta que los procesos biológicos son los más efectivos y menos costoso, así como todas las características anteriormente mencionadas, hace que la producción de enzimas a partir de microorganismos sea relativamente simple, barata y confiable, generando a su vez alternativas que reducen el impacto ambiental [49, 51].

1.5.1 *Trametes hirsuta*

Hongo de pudrición blanca altamente celulósico el cual tiene la capacidad natural de descomponer la madera de los hongos de pudrición blanca, parda y blanda, motivo por el que allanó el camino para identificarlos como grupos potenciales de agentes de pretratamiento biológico eficientes para materias primas lignocelulósicas [46].

Este género de hongos comprende los microorganismos degradadores de lignina más efectivos en la naturaleza, transformándola en dióxido de carbono. Sin embargo, las capacidades de deslignificación de los hongos de pudrición blanca difieren entre géneros, especies e incluso cepas [17, 19].

Un hongo ideal para el pretratamiento biológico debería degradar la lignina más rápido que los componentes de carbohidratos, especialmente los componentes de celulosa. Sin embargo, la mayoría de los hongos de pudrición blanca degradan simultáneamente la lignina y la celulosa, lo que resulta en una baja recuperación de azúcar [17, 19].

1.5.2 Extracto enzimático

El interés en el desarrollo de técnicas de extracción de biomoléculas de diversas fuentes naturales ha aumentado en los últimos años debido a sus aplicaciones potenciales, particularmente para fines alimentarios y nutracéuticos. La presencia de polisacáridos como hemicelulosas, almidón, pectina dentro de la pared celular, reduce la eficiencia de extracción de las técnicas de extracción convencionales [19, 52].

Se han destacado las aplicaciones de enzimas en la recuperación de varias biomoléculas como polifenoles, aceites, polisacáridos, entre otros. La extracción asistida por enzimas de biomoléculas de plantas es una alternativa potencial que va ganando cada vez más atención debido a que resulta ser una tecnología de extracción eficiente, inocua, sostenible y ecológica [19, 52].

El principio básico de la extracción asistida por enzimas es la ruptura de la pared celular de la planta mediante su hidrólisis utilizando enzimas como catalizadores en condiciones experimentales óptimas, con el fin de liberar los componentes intracelulares. La pared celular de la planta se une al sitio activo de la enzima haciendo que la enzima cambie su forma para que el sustrato encaje en su sitio activo provocando así la máxima interacción entre ambos [19, 52].

Estos métodos verdes de extracción no solo reducen la necesidad de disolventes peligrosos, sino también requieren de un tiempo de extracción corto [19].

1.5.3 Hidrólisis

El objetivo de la hidrólisis es la conversión de la celulosa en glucosa. Para ello se utilizan tanto procesos químicos (ácidos diluidos o concentrados) como enzimáticos. Otra opción considerada en la actualidad es el desarrollo de nuevos microorganismos capaces de hidrolizar la celulosa y fermentar la glucosa a etanol. La hidrólisis ácida puede realizarse empleando ácidos concentrados. Un conjunto de inconvenientes, tales como la gran cantidad de ácido empleado, lo costoso de su recuperación, la necesaria neutralización del medio antes de la fermentación, unido a los efectos corrosivos de los ácidos, hacen que este proceso no sea económicamente rentable. Si se emplean ácidos diluidos, se requieren temperaturas relativamente altas que provocan una mayor corrosión de los equipos y mayor degradación de los azúcares hemicelulósicos. Es por ello, que los procesos de producción de etanol basados en hidrólisis enzimática son los que se muestran como la alternativa más prometedora [44].

1.5.4 Hidrólisis enzimática

El material insoluble, obtenido tras el pretratamiento de explosión de vapor, está formado principalmente por celulosa y lignina, ya que gran parte de los azúcares hemicelulósicos son solubilizados durante el mismo. Con el fin de romper las cadenas de celulosa en monómeros de glucosa se emplea la hidrólisis enzimática. Las principales dificultades al realizar la hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica están relacionadas con la baja actividad específica de las enzimas actualmente disponibles, lo que conlleva el empleo de altas dosis de celulasa. Por otro lado, la propia naturaleza de la lignocelulosa, donde las microfibrillas de celulosa se encuentran embebidas en la hemicelulosa y la lignina, hace del pretratamiento una etapa crucial en los procesos de producción de etanol cuando es empleada la hidrólisis enzimática [44, 53].

La hidrólisis enzimática es un proceso catalizado por el grupo de enzimas denominado genéricamente celulasas, que son en realidad, una mezcla de distintas actividades enzimáticas cuya acción conjunta produce la degradación de la celulosa [43].

Factores como la porosidad (área superficial accesible), la cristalinidad de la celulosa, el grado de polimerización y el contenido en lignina y hemicelulosa dificultan la accesibilidad de las celulasas reduciendo la eficiencia de la hidrólisis. Por todos estos factores es necesaria una etapa de pretratamiento, previa a la hidrólisis de la celulosa, que altere la estructura del material lignocelulósico, facilitando la acción de las enzimas [44].

1.6 Economía Circular

Una economía circular se basa en que el valor de los recursos se maximiza indefinidamente, lo que requiere que prácticamente no se produzcan residuos irre recuperables. Se define por dos principios rectores: maximizar el servicio proporcionado por los materiales integrados en los productos; y minimizar la pérdida de servicio con el tiempo. La biomasa es muy importante en una economía circular en términos de productos materiales y suministro de energía. Para establecer una bioeconomía circular, las partes interesadas deben apreciar las implicaciones prácticas del uso de la biomasa a lo largo de la cadena de valor, desde el diseño del producto hasta la gestión de residuos [37].

La digestión anaerobia de los residuos de alimentos se utiliza como estudio de caso para representar los tratamientos de residuos apropiados. Los desafíos cruciales son:

- 1) Desvincular la industria petroquímica y la producción de biomasa con fertilizantes renovables;
- 2) Proporcionar biomasa abundante para productos de base biológica al priorizar otras fuentes de energía renovables;
- 3) Los desechos derivados de la alimentación y la agricultura deben minimizarse y devolverse a la economía;
- 4) Mejorar la cooperación de las partes interesadas en las cadenas de valor [37].

Es necesario evitar el consumo insostenible de recursos, la redundancia de productos, el desperdicio y la contaminación. Las políticas que promueven la energía renovable y los productos de base biológica han elevado la importancia de las materias primas de biomasa en la Unión Europea (UE). Esto ayuda a crear las condiciones que permiten una economía circular mediante el uso de materiales renovables [37].

1.6.1 Economía Verde

La economía verde es, de acuerdo con el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, aquella que mejora el bienestar del ser humano y la equidad social, a la vez que reduce significativamente los riesgos ambientales y las escaseces ecológicas, tiene bajas emisiones de carbono, utiliza los recursos de forma eficiente y es socialmente incluyente. Por su parte, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) define el crecimiento verde como aquel que busca fomentar el crecimiento y el desarrollo económico y al mismo tiempo, asegurar que bienes naturales continúen proporcionando los recursos y servicios ambientales de los cuales depende nuestro bienestar [54, 55].

Organizaciones internacionales como las Naciones Unidas (ONU) y la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), reconocen la importancia de impulsar la economía verde para dar solución a estas problemáticas. A su vez, organismos públicos como la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) y el Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC), también han abordado el tema, refiriéndose al estudio de la economía verde en México como un elemento clave que se suma a la iniciativa de responder a una serie de retos económicos, sociales y ambientales, mediante la transición a una economía verde, que permita la armonía entre el crecimiento económico, el abatimiento de la pobreza y el aprovechamiento sustentable de los recursos naturales [55].

El país con empresas de economía verde de más impacto en América Latina es Brasil, con el Banco de Brasil S.A, considerada la institución financiera más sostenible del mundo. Mientras que en México se tienen empresas como América Móvil sustituyendo generadores por paneles solares, Coca Cola FEMSA con su parque eólico que provee energía limpia a 85% de las operaciones y Grupo Bimbo quienes cuentan con el parque eólico más grande de la industria de los alimentos en México [54].

En lo que respecta al continente americano, países como Canadá y Estados Unidos son los que cuentan con un mayor número de ciudades verdes; entre las que destacan Vancouver (Canadá) y San Francisco (EUA) por las acciones que han tomado respecto a la gestión de los residuos sólidos urbanos. En Latinoamérica, la ciudad brasileña de Curitiba es una de las ciudades verdes más representativas, debido a su implementación de medidas de movilidad, reflejadas en el aumento de calles peatonales. Por su parte, la Comisión Europea se ha fijado el objetivo a largo plazo de desarrollar una economía

competitiva, eficiente en el uso de los recursos y baja en carbono para 2050 y el concepto de economía verde se incorporó al marco general en diferentes niveles de la política de la UE [54, 56].

1.6.2 Bioeconomía

En el marco del concepto más amplio de economía verde, la visión de la bioeconomía se centra en el uso de materias primas renovables y la aplicación de investigación, desarrollo e innovación y biotecnología industrial para la producción de biocombustibles. Una forma de mitigar la huella de carbono de las actividades humanas es reducir al menos una parte de la economía basada en recursos fósiles [56, 58].

En comparación con el énfasis ambiental de la economía verde, el enfoque de la bioeconomía está en las nuevas oportunidades de crecimiento en los sectores de base biológica, al tiempo que considera los desafíos globales (por ejemplo, la inseguridad en el suministro de materias primas) y las limitaciones ambientales y de recursos. La bioeconomía puede definirse como una economía basada en la producción y conversión de recursos biológicos renovables para producir alimentos, energía y bienes, implicando el uso de la biotecnología a gran escala [57, 58].

1.6.3 Bioeconomía y Enzimas

La bioeconomía puede definirse como una economía que se basa en la producción y conversión de recursos biológicos renovables para producir alimentos, energía y bienes. El uso de soluciones biotecnológicas (microorganismos y enzimas) desempeñan un papel cada vez más importante, ya que han sido adaptadas por la evolución para degradar y modificar biopolímeros y sintetizar moléculas biológicas eficientemente [58].

El mercado de enzimas industriales se ha expandido últimamente con los avances en biotecnología, especialmente en el área de la genética y la ingeniería de proteínas, lo que abrió nuevas áreas de aplicación de enzimas, nuevos productos y mejora de procesos. El mercado global se encontró valuado en 10 mil millones de dólares en 2019 existiendo más de 3000 enzimas conocidas, de las cuales solo unas 150 se utilizan comercialmente [56].

Las enzimas son proteínas producidas biológicamente que catalizan procesos químicos y aceleran las reacciones químicas (hasta millones de veces más rápido), con muchas aplicaciones en alimentos y bebidas, detergentes, alimentación animal, pulpa y papel, química fina, farmacéutica, biocombustibles, etc. (figura 1.2) [56].



Figura 1.1 Usos y mercados de enzimas en 2012 [56]

Se están desarrollando procesos biotecnológicos industriales mejorados que facilitan la conversión de biomasa en biocombustible, por ejemplo, en la industria la mayoría de los cocteles de enzimas utilizados en las denominadas biotecnologías “blancas” son de origen fúngico y se espera que se expanda el mercado de enzimas para la producción los mismos [56, 58].

1.6.4 Sostenibilidad Económica

La idea de la sostenibilidad económica es promover el uso de los recursos disponibles de una manera eficiente, responsable y beneficioso a largo plazo. Además, una materia prima alternativa puede reducir el riesgo de interrupción de un mercado correlacionado altamente concentrado. En el caso del diseño y operación de una cadena de suministro de biocombustibles, exige el uso inteligente de los recursos (p. ej., capital, tierra, mano de obra, investigación) para que el negocio continúe funcionando de manera saludable durante varios años, al mismo tiempo que obtiene un rendimiento ajustado al riesgo. Al mismo tiempo resulta ser una alternativa renovable con la eficiencia del uso de energía y los recursos en las cadenas de suministro [57].

JUSTIFICACIÓN

El cambio climático, los problemas de contaminación a los que nos enfrentamos y la naturaleza finita de los combustibles fósiles, han llevado a buscar fuentes de energía alternativas más limpias con el fin de reducir las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), y al mismo tiempo se tiene como meta que los procesos de producción de bioenergía sean sostenibles.

Una de las premisas en la producción de bioenergía es que los recursos utilizados no compitan con la alimentación como, por ejemplo, el maíz y la caña de azúcar que son usados para la producción de bioetanol. Por tal motivo se ha planteado el uso de residuos agrícolas, urbanos o industriales, así como cultivos energéticos. Para transformar estos sustratos en bioenergía se requiere de procesos hidrolíticos mediante el uso de enzimas [57].

Motivo por el cual se propone trabajar con las semillas del árbol de Ramón (*Brosimum alicastrum*) como materia prima utilizando el hongo *T. hirsuta* Bm-2 para la obtención de un extracto enzimático crudo que permita la bioconversión de diversas biomásas en bioenergía.

El uso de un extracto crudo en lugar de la enzima pura permitirá una producción de bioenergía más sostenible.

HIPÓTESIS

- La harina de Ramón (*Brosimum alicastrum*) es un sustrato con potencial para la obtención de extracto enzimático crudo que puede ser utilizado en la bioconversión de biomasa.

OBJETIVO GENERAL

- ❖ Producir extracto enzimático a partir de harina de semillas de Ramón (*Brosimum alicastrum*) utilizando el hongo *Trametes hirsuta* Bm-2, y evaluar su efecto en la bioconversión de biomasa.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Obtener extractos enzimáticos con la cepa *Trametes hirsuta* Bm-2 utilizando dos tipos de harina de Ramón como sustrato.
- ❖ Caracterizar parcialmente el extracto enzimático obtenido a partir de la harina de Ramón bajo parámetros determinados de temperatura, pH, tiempo de almacenamiento e inhibidores.
- ❖ Evaluar el efecto del extracto enzimático sobre la bioconversión del tinte índigo carmín, la harina de yuca y el pretratamiento de vinazas.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CAPÍTULO 2

MATERIALES Y METODOLOGÍA

2.1 Materia prima

La materia prima utilizada en este estudio fue la harina de semillas del árbol de Ramón (*Brosimum alicastrum*). Las semillas se colectaron en Oxkutzcab, Yucatán en septiembre del año 2022, se colocaron en un contenedor de plástico y fueron trasladadas al laboratorio para su utilización. La elaboración de las harinas constó de un proceso de limpieza de las semillas, en el cual se retiraron impurezas y se separó de los restos de fruto (pericarpio), seguidamente se enjuagaron, se extendieron sobre una malla de alambre (0.5 mm) y se dejaron escurrir durante 24 horas. Una vez realizada la limpieza, las semillas se sometieron a dos procesos para la obtención de las harinas.

2.1.1 Harina secada en horno (HRS)

En el primer proceso 1 kg de semillas fue secado en un horno marca Binder (modelo Fed 115® Tüttlingen, Alemania) a 60 °C durante 72 horas (Olguin Maciel 2020) extendiéndolas en charolas de aluminio y revolviéndolas cada 24 horas para lograr un secado uniforme. Al finalizar el tiempo de secado se retiró la testa de las semillas.

2.1.2 Harina liofilizada (HRL)

En el segundo, 1kg de semillas, estas fueron cortadas por la mitad y se les retiró la testa de forma manual, para luego ser llevadas a congelación a -80°C durante 24 horas para posteriormente deshidratarlas en una liofilizadora marca Labconco durante 72 horas.

Al término de cada proceso, ambos lotes de semillas fueron molidos en una licuadora comercial (Oster®) por períodos de 10 a 20 segundos y descansos de 3 minutos para evitar el calentamiento de las cuchillas y a su vez de las semillas.

Finalmente, las harinas se pasaron por dos tamices, primero por uno #35 y después por #50, obteniendo un tamaño de partícula de entre 300 y 500 µm.

2.2 Caracterización de la materia prima

Humedad: El análisis de humedad se realizó en muestras de las dos harinas por triplicado con aproximadamente 1.5 g empleando una termobalanza marca Citizon.

Contenido de compuestos fenólicos totales: La concentración de compuesto fenólicos totales se determinó mediante el método Folin-Ciocalteu a una longitud de onda de 740 nm, en el equipo

Eppendorf BioSpectrometer® basic. La concentración fue expresada como mg/mL de ácido gálico equivalente [60, 61].

Concentración de azúcares reductores: Los azúcares reductores se cuantificaron mediante el método de Miller con ligeras modificaciones, el cual consiste en adicionar en un tubo de vidrio 1 mL de muestra (con las diluciones adecuadas para cada proceso) y luego se añadieron 1.5 mL de ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS). Esta mezcla se hirvió a baño maría (100°C) por 5 minutos y enseguida se cortó la reacción, disminuyendo la temperatura en un baño de agua fría durante 5 minutos, finalizado el tiempo se le añadieron 7.5 mL de agua destilada. Las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro marca Jenway, modelo 6405 UV/VIS a 550nm. La concentración se determinó calculando los valores con una curva estándar de glucosa [59, 62].

Análisis elemental (CHNS): Ambas harinas fueron sometidas al analizador elemental CHNS tomando 10mg de cada muestra por duplicado para leerlos y obtener el contenido de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre en cada una. Este análisis se llevó a cabo en un equipo Thermo Scientific Elemental Analyzer Flash 2000 (Thermo Scientific, Waltham, EUA) el cual de manera automatizada convierte los elementos en gases simples (CO₂, N₂, H₂O y SO₂) permitiendo así su determinación cuantitativa.

2.3 Producción de extracto enzimático

2.3.1 Material biológico

La cepa utilizada fue el hongo *T. hirsuta* Bm-2, la cual fue extraída de un medio líquido producto de un bioproceso consolidado (CBP) y se preservó por medio de resiembras cada 7 días en medio PDA (papa-dextrosa-agar, ver anexo 1) observando que al recuperar su actividad el micelio llegó a extenderse ocupando por completo el diámetro de la placa Petri a los 5 días [59, 60].

2.3.2 Condiciones para producir el extracto enzimático

En la producción de extractos enzimáticos de ambas harinas se utilizaron los mejores parámetros obtenidos por Olguin Maciel (2020) (32°C, pH 5.5, carga de harina al 5% y agitación a 150 rpm) por triplicado.

Se prepararon en matraces Erlenmeyer de 250mL para cada harina (HRS y HRL) soluciones por triplicado con agua destilada con un volumen final de 100 mL y por otra parte con medio sintético YMPG que consiste en glucosa (sustituido por almidón), extracto de malta, peptona de carne, fosfato de potasio monobásico, sulfato de magnesio

heptahidratado, tiamina, levadura y agar, mismo que sirvió como control comparativo a los dos tipos de harinas (ver anexo 2).

Estas soluciones se ajustaron a un pH de 5.5, con una solución de HCl a 1M y los matraces se cubrieron con torundas de algodón y hoja de papel aluminio para posteriormente ser esterilizados a presión constante de 0.1 MPa, 121°C por 20 minutos. Finalizado el tiempo de esterilización se enfriaron a temperatura ambiente (25 °C) y se inocularon con dos discos de micelio de 1 cm de diámetro de la cepa *T.hirsuta* Bm-2 crecida 5 días en cajas Petri con medio PDA, en una campana de flujo laminar horizontal marca Novatech.

La incubación se llevó a cabo con una temperatura de 32°C y agitación de 150 rpm en una incubadora marca Corning modelo LSE™ y se tomaron muestras de 2 mL cada 24 horas durante 10 días. A estos extractos se les determinó la cinética de actividad α -amilasa y lacasa como se describe en el siguiente apartado de ensayos enzimáticos.

2.3.3 Ensayos enzimáticos

2.3.3.1 Actividad α -amilasa

Para identificar la capacidad de la cepa *T. hirsuta* Bm-2 de sintetizar y excretar enzimas hidrolíticas se realizó una prueba cualitativa. Se inocularon placas de medio de cultivo ELAA (extracto de levadura-almidón-agar, ver anexo 3) con un disco de micelio de 1 cm de diámetro obtenido de un cultivo de *T.hirsuta* Bm-2 crecido 5 días en cajas Petri con medio PDA. Las placas ya inoculadas se incubaron a 32 ± 2 °C y su actividad amilasa se evaluó a los 4 días de crecimiento. Las cajas se cubrieron con solución de Lugol (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA), con el fin de observar la presencia/ausencia de halos claros alrededor del micelio como resultado de la hidrólisis del almidón por la enzima α -amilasa [59].

Una vez identificada la actividad α -amilasa, esta fue cuantificada por el método descrito por Ahmed y colaboradores (2017), con ligeras modificaciones: la mezcla para el análisis consistió en 0.5 mL de almidón soluble de papa (1% p/v) (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA) en buffer de acetato de sodio 0.1 M (pH 5) y 0.5 mL de muestra (extracto crudo). Las mezclas fueron incubadas a 40 °C durante 20 min, deteniendo la reacción al sumergir las muestras en agua fría. La hidrólisis del almidón fue determinada a través de la cuantificación de glucosa liberada por la enzima, utilizando el método de DNS de Miller. Calculando así la actividad α -amilasa [62, 63].

La cantidad de enzima producida fue expresada como U/mL, definiendo una unidad enzimática como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de azúcares reductores, equivalente a glucosa, por minuto bajo las condiciones del ensayo [59].

2.3.3.2 Actividad lacasa

Para identificar la capacidad de *T. hirsuta* Bm-2 de sintetizar y excretar enzimas lacasas se inocularon placas de medio de cultivo EMA (extracto de malta-agar al 2%, ver anexo 4) adicionado con reactivo ABTS a 5 μ M, al cual se le agregó un disco de micelio de 1 cm de diámetro, con 5 días de crecimiento previo, obtenido de un cultivo de *T. hirsuta* Bm-2 crecido en medio PDA y se incubaron a $32 \pm 2^\circ\text{C}$ por 4 días. Un resultado positivo a esta prueba cualitativa está dado por la formación de un halo verde alrededor del micelio por acción de la enzima lacasa oxidando el reactivo ABTS [63].

La actividad lacasa se midió por medio de oxidación de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6 sulfónico)). La mezcla de reacción contenía 100 μ L de buffer de acetato de sodio 1 M (pH 4.5), 700 μ L de agua destilada y 100 μ L de ABTS (5 mM) y se preincubó durante 5 minutos a 40°C en un baño seco marca Labnet®. Posteriormente, se le agregó una dilución de extracto crudo con agua destilada dependiente al día de muestreo (1:2, 1:5, 1:100, 1:500) para un volumen total de 1 mL. La mezcla se incubó nuevamente en un baño seco a 40°C durante 20 minutos y se midió el incremento de la absorbancia en un espectrofotómetro marca Eppendorf a 420 nm [59].

Una unidad enzimática (U) fue definida como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μ mol de ABTS por minuto bajo las condiciones del ensayo. La cantidad de enzima producida fue expresada como U/mL [59].

2.3.3.3 Actividad celulasa

Para identificar la capacidad de *T. hirsuta* Bm-2 de sintetizar y excretar enzimas celulasas, los microorganismos se evaluaron en medio de cultivo Mandels & Weber, que contenía Carboximetil celulosa (CMC) (ver anexo 5). Se inoculó un disco de crecimiento microbiano de 1 cm de diámetro, en la parte central de una caja Petri y se incubó a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 72 h. Posteriormente, al crecimiento microbiano se le agregaron 15 mL de colorante rojo Congo 1% (v/v) hasta cubrir toda la superficie de la placa dejándola reposar durante 15 minutos, dicho colorante sirvió como indicador de la degradación de la celulosa debido a la sensibilidad de los microorganismos celulolíticos al mismo. Seguido, se retiró el colorante que no fue absorbido en el medio y se enjuagó tres veces con aproximadamente

15 mL de NaCl 1M, para eliminar el excedente del colorante. Se consideró positivo a la presencia de celulasa extracelulares, la presencia de halos incoloros alrededor del crecimiento microbiano, mientras que una tinción bien definida se consideraría negativa a la prueba [64, 65].

2.4 Producción y caracterización parcial del extracto enzimático

Una vez determinadas las capacidades de producción enzimática de *T. hirsuta* Bm-2, se obtuvo el extracto enzimático HRL para ser caracterizado.

2.4.1 Efecto del pH en la actividad enzimática del extracto crudo

Para determinar el pH óptimo para la actividad de las enzimas α -amilasa y lacasa se evaluaron valores en un rango de 4 a 6. Se mezcló 1 mL de extracto enzimático con 1 mL de las diferentes soluciones amortiguadoras en concentración 0.1M, mostradas en la tabla 2.1 (ver anexo 6), y se mantuvieron a una temperatura ambiente de 25 °C durante 4 h, al término del tiempo fueron evaluadas las actividades enzimáticas como se describe en el apartado de ensayos enzimáticos [59].

Tabla 2.1 Soluciones amortiguadoras utilizadas para evaluar el pH óptimo para la actividad enzimática de α -amilasa y lacasa

Solución amortiguadora	pH				
	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
Ácido cítrico – Fosfato (AF)	4.0	4.5			
Acetato de sodio – Ácido acético (AA)		4.5	5.0		
Ácido cítrico – Citrato de sodio (AC)			5.0	5.5	
Fosfatos (F)				5.5	6.0

2.4.2 Efecto de la temperatura en la actividad enzimática del extracto crudo

Para investigar el efecto de la temperatura y determinar las mejores condiciones de operación para ambas enzimas, se incubó una mezcla de 1 mL de extracto crudo y 1 mL solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M (pH 7) a diferentes temperaturas (25, 30, 35, 40, 45, 50 y 65 °C) durante 4 h. Al finalizar el tiempo de incubación se determinaron las actividades α -amilasa y lacasa como se describe en la sección de ensayos enzimáticos [66, 67].

2.4.3 Efecto de inhibidores

El efecto de los inhibidores en la actividad enzimática se llevó a cabo con iones metálicos: cloruro de manganeso ($MnCl_2$), cloruro de calcio ($CaCl_2$), sulfato de cobre ($CuSO_4$), cloruro de zinc ($ZnCl_2$), bromuro de potasio (KBr), Tween 80, ácido 2,2'-azino-bis 3-

etilbenzotiazolina-6 sulfónico (ABTS), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y dodecil sulfato de sodio (SDS) que fueron evaluados en dos concentraciones distintas ([5 mM] y [10 mM]) [68].

Se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente (25°C) una mezcla de 1 mL de extracto enzimático y 1 mL de cada inhibidor. La actividad residual se determinó utilizando el ensayo ABTS para lacasa y DNS para determinar la actividad amilasa tal y como se describe en la sección de ensayos enzimáticos [68, 69].

2.4.4 Estabilidad en el tiempo de almacenamiento

Se evaluó la estabilidad del extracto enzimático obtenido sometándolo a almacenamiento a una temperatura de 4 °C, para determinar el tiempo de efectividad de éste. Se tomaron muestras periódicas (semanales, quincenales y mensuales) las cuales ensayaron de nuevo y se compararon con la actividad inicial.

2.5 Caracterización parcial de Residuo Sólido

Del extracto enzimático (HRL) utilizado en las pruebas de caracterización y evaluación, se separó la fracción sólida. Dicha fracción fue sometida al analizador elemental CHNS tomando 10mg de la muestra seca y pulverizada previamente, por duplicado, y se leyeron en el analizador para obtener el contenido de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre. Este análisis se realizó en un equipo Thermo Scientific Elemental Analyzer Flash 2000 (Thermo Scientific, Waltham, EUA) y se reportó el promedio de las lecturas.

2.6 Evaluación de efectividad del extracto enzimático

Una vez determinadas las mejores condiciones de producción del extracto enzimático, así como las mejores condiciones para su actividad, se evaluó su eficiencia en cuanto a capacidad de decoloración (índigo carmín), hidrolítica (almidón de yuca) y su capacidad de actuar sobre compuestos fenólicos (vinaza).

2.6.1 Prueba de decoloración con el tinte índigo carmín

Para probar la efectividad del extracto enzimático como decolorante de tintes se siguió la metodología descrita por Díaz y Pereira *et al.* con algunas modificaciones [70, 71].

Como primera prueba preliminar se preparó un stock de tinte índigo carmín disuelto en agua destilada, con una concentración de 20 mg/L, del cual se tomaron 2mL para añadir en matraces de 50mL junto con 15,990, 32,000 y 48,000 U de enzima lacasa respectivamente y se aforaron a 20mL con buffer ácido cítrico-fosfatos (pH 4.5). A la par

se preparó un blanco que consistió en tinte diluido en buffer con ausencia de extracto enzimático. Todos los matraces se colocaron en agitación a 120 rpm y una temperatura de 50°C durante 48 horas. Todas las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro a la máxima absorbancia del tinte (600 nm) cada hora durante 10 horas y a las 24, 36 y 48 horas.

Como prueba final se preparó un stock de tinte índigo carmín disuelto en buffer ácido cítrico-fosfatos (pH 4.5) con una concentración de 20 mg/L del cual se tomaron 10 mL en matraces de 50 mL. A cada matraz se le adicionaron 150, 300 y 450 U de enzima lacasa respectivamente y se tomaron 10 mL del stock en ausencia de extracto enzimático como un control. Todos los matraces se colocaron en agitación a 120 rpm y una temperatura de 50 °C durante 10 horas.

Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado y se midieron en un espectrofotómetro a 600 nm cada hora, durante 10 horas, la máxima absorbancia del tinte fue tomado como el 100% de coloración.

La decoloración se expresó en términos del porcentaje calculado de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Decoloración} = \left[\frac{A_0 - A_t}{A_0} \right] \times 100$$

Donde A_0 es la absorbancia a la λ_{max} del tinte diluido en buffer y A_t es la absorbancia después de cada intervalo de tiempo [71].

2.6.2 Prueba de hidrólisis en harina de yuca

La eficiencia del extracto enzimático en la harina de yuca fue medida por la capacidad de liberar azúcares fermentables, que fue determinado por el método DNS de Miller [62].

En matraces de 125 mL se agregaron 5 g de harina de yuca en un volumen final de 50 mL de buffer ácido cítrico-fosfatos con pH de 4.5 (harina 10% p/v). Los matraces fueron cubiertos con torundas de algodón y hoja de papel aluminio, y se colocaron en baño María a 100 °C, durante 30 minutos en una placa de calentamiento. Finalizado el tiempo, se dejaron enfriar a temperatura ambiente (25 °C) para posteriormente agregar 25, 50 y 75 U de enzima α -amilasa respectivamente. Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado y se prepararon matraces de harina al 10% en buffer en ausencia de extracto enzimático como control.

Los matraces fueron puestos en agitación a 150 rpm con una temperatura de 50 °C, en una incubadora marca Corning y se tomaron muestras cada 3 horas, durante 2 días, a las cuales se les cuantificaron los azúcares reductores por medio del método DNS de Miller [62].

2.6.3 Prueba como pretratamiento en vinaza

Para probar la eficiencia del extracto enzimático como pretratamiento en vinazas se evaluó el contenido de fenoles en dos concentraciones diferentes de vinaza.

Se prepararon matraces de 50 mL con un volumen final de 20 mL de vinaza diluida al 25 y 50% en buffer ácido cítrico-fosfatos (pH 4.5) a los cuales se le añadieron 9,000 (25a, 50a) y 18,000 U (25b, 50b) de extracto enzimático y se colocaron en agitación a 150 rpm con una temperatura de 50 °C, junto con matraces al 25 y 50% en ausencia de extracto enzimático, los cuales sirvieron como control. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

Se tomaron muestras cada 24 horas, durante 8 días, a las cuales se les determinó la concentración de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu, el cual se basa en la reacción de los compuestos fenólicos con el reactivo Folin, que contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico, que a pH básico muestra una coloración azul que es susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm [73, 74].

Para cuantificar por espectrofotometría fue necesario realizar una curva de calibración, para tener una recta patrón de ácido gálico, con concentraciones de 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.1 mg/mL [72, 74].

Para la reacción se utilizaron microtubos eppendorf® con capacidad de 2 mL, en los que se agregaron 50 µL de muestra junto con 1550 µL de agua destilada y 100 µL de reactivo Folin al 10% (v/v) y se dejaron reposar a temperatura ambiente (25°C) durante 5 minutos en completa oscuridad. Después se agregaron 300 µL de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 7.5% (p/v) y se agitó suavemente para incubar nuevamente en oscuridad durante 30 minutos a una temperatura de 40°C en una incubadora marca Labnet. Finalizado el tiempo se leyó la absorbancia utilizando un espectrofotómetro "BioSpectrometer Eppendorf" a 765 nm [72].

Los resultados obtenidos se analizaron con la curva de calibración con ácido gálico como estándar y se expresaron en mg de ácido gálico / mL de muestra [64].

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Harinas de semillas de Ramón

A partir de 1 kg de semillas secadas en horno (HRS) se obtuvieron 0.353 kg de harina y 0.022 kg de testa como residuo y de 1 kg de semillas liofilizadas (HRL); 0.375 kg de harina HRL y 0.023 kg de testa residual. Ambas con un tamaño de partícula $\leq 300 \mu\text{m}$ (figura 3.1).



Figura 3.1 Harina de Ramón seca (HRS) y Harina de Ramón liofilizada (HRL)

3.2 Caracterización de harinas

En la tabla 3.1 se puede observar la caracterización realizada a ambas harinas, mostrando que la harina seca tuvo un 9.75 % de humedad y la liofilizada un 10.57 %. Siendo menos del 1% (0.82%) de diferencia de humedad contenida entre una y otra, lo cual se reporta como aceptable por Wolfgang *et al.* (1999) ya que comercialmente se permite hasta un 20% de humedad en almidón como materia prima.

Guilherme y col. (2014) obtuvieron una humedad final de 5% secando bagazo de caña de azúcar en una estufa de secado circulante a 40°C, la cual inicialmente contenía 50% (p/p) de humedad. Mientras que Melnichuk y col. (2020) utilizaron dos residuos para producir enzima α -amilasa; la cáscara de soja con un contenido de humedad del 8.06% y residuo de molino harinero con 8.89% de humedad mediante fermentación en estado sólido utilizando el hongo *Aspergillus oryzae*, los cuales coincidieron con nuestras harinas. Caso similar ocurrió con Pérez Pacheco y col. (2014) quien reportó una humedad de 7.49 ± 2.26 % en la harina obtenida de las semillas de Ramón secadas en horno de convección a 70°C durante 72 horas [76, 77, 78].

En otros estudios se lograron producir enzimas amilasas empleando el hongo *Aspergillus* y desechos de pan como sustrato, en condiciones óptimas de proceso, donde la humedad fue del 60%, así como la producción de glucoamilasas utilizando como sustratos desechos de arroz,

salvado de trigo, semillas de algodón, sólidos macerados de maíz y bagazo de caña de azúcar, en un proceso de fermentación en estado sólido. La mayor actividad enzimática se encontró con un contenido de humedad del 50%. Estos porcentajes de humedad fueron determinados durante el proceso de producción enzimática. A pesar de ello, coincide con lo reportado por Chan González (2023) quien menciona que la semilla de Ramón tiene un contenido de humedad inicial del 61.05% [79, 80, 81].

Tabla 3.1 Caracterización de harina de Ramón seca y liofilizada

Parámetro	HRS	HRL
% humedad	9.75	10.57
Carbono (%)	39.99	39.97
Hidrógeno (%)	6.29	6.16
Nitrógeno (%)	2.23	2.37
Azufre (%)	0.00	0.00

En la tabla 3.1 se puede observar la mínima variación en los porcentajes obtenidos entre cada tipo de harina como parte de la caracterización.

Los porcentajes de cada parámetro obtenidos en ambas harinas son similares a lo reportado por Chan González (2023) quien con harina de Ramón seca obtuvo 43.63 ± 0.09 % de carbono, 6.37 ± 0.01 % de hidrógeno, 2.20 ± 0.02 % de nitrógeno y ausencia total de azufre.

3.3 Producción de extracto enzimático en fermentación sumergida en matraz agitado

En las figuras 3.2 y 3.3 se observa que en los tres casos propuestos se obtuvo actividad enzimática, sin embargo, es notable la diferencia entre los valores con la harina liofilizada en la actividad lacasa y con la harina seca en la actividad α -amilasa, quedando a su vez por debajo en ambos casos el medio sintético, lo cual demuestra que nuestra materia prima en cualquiera de sus dos presentaciones es más efectiva que el medio sintético.

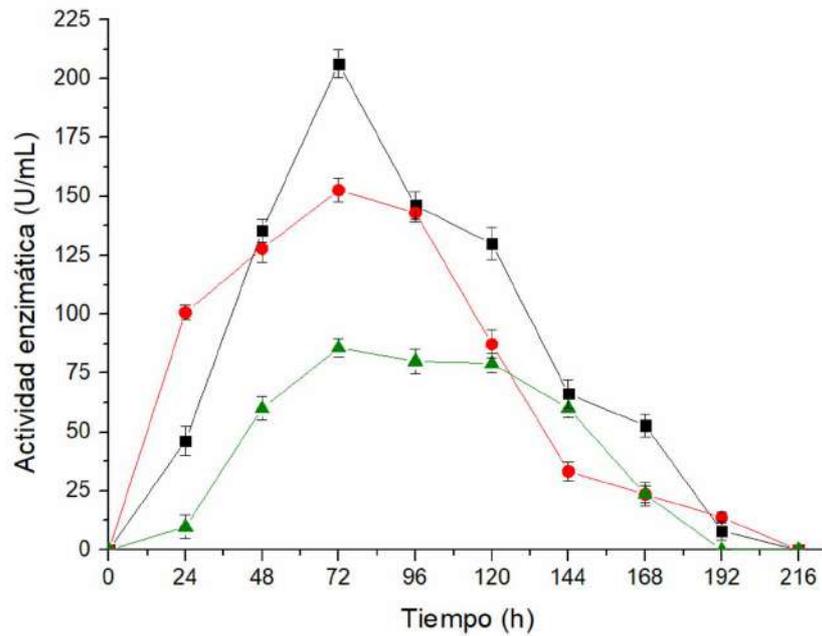


Figura 3.2 Actividad α -amilasa en harina de Ramón seca (HRS, cuadros negros), liofilizada (HRL, círculos rojos) y medio sintético adicionado con almidón de papa soluble (MSA, triángulos verdes).

Los datos reportados por Olguin Maciel (2020) muestran una actividad enzimática de 210 U/mL para la enzima amilasa y 20 U/mL para la enzima lacasa utilizando harina de Ramón secada en horno a las mismas condiciones de producción.

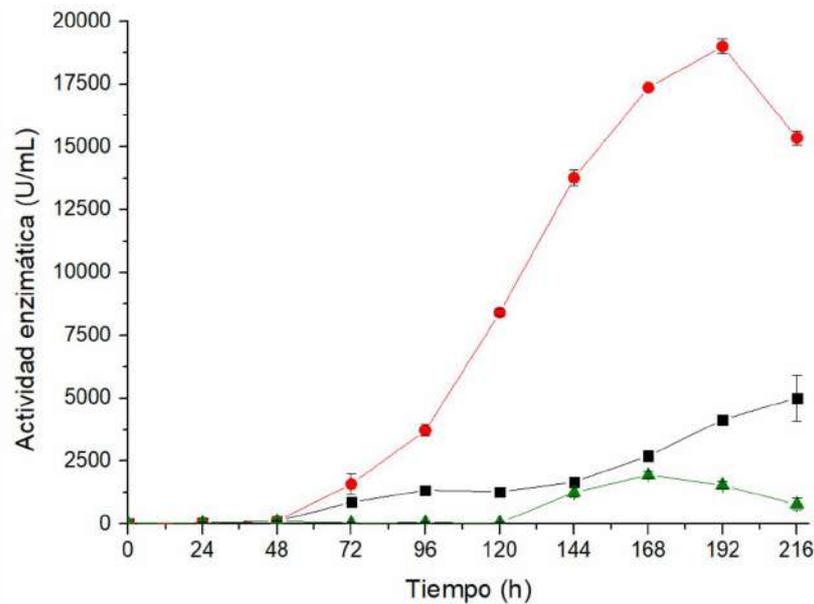


Figura 3.3 Actividad lacasa en harina de Ramón seca (HRS, cuadros negros), liofilizada (HRL, círculos rojos) y almidón de papa soluble (A, triángulos verdes)

3.3.1 Ensayos cualitativos para actividad enzimática

En primera instancia se corroboró la capacidad de la cepa *T. hirsuta* Bm-2 de producir enzimas α -amilasa, lacasa y celulasa por medio de pruebas colorimétricas en placas Petri.

Al inundar las placas con 4 días de crecimiento en medio ELAA de la solución de Lugol, se observaron halos claros alrededor del micelio de *T. hirsuta* Bm-2, percibiéndose la zona de hidrólisis del almidón contenido en el medio en acción a la α -amilasa secretada (figura 3.4).



Figura 3.4 Actividad amilolítica en placa de medio ELAA incubada a 32 °C por 96 h, teñida con Lugol

Para corroborar la capacidad de la cepa de producir enzimas lacasas, se realizó una prueba en placa Petri, en la cual se puede observar un halo verde oscuro alrededor del micelio como resultado de la oxidación del indicador ABTS. La coloración alrededor del micelio mostrada en la figura 3.5 indica la excreción y actividad de la enzima lacasa, lo cual concuerda con lo mencionado en investigaciones pasadas donde se utilizó la misma cepa [61, 64].

Esta enzima está asociada a los basidiomicetos, grupo de hongos reconocido como el más relevante en la producción de esta enzima [59, 70].

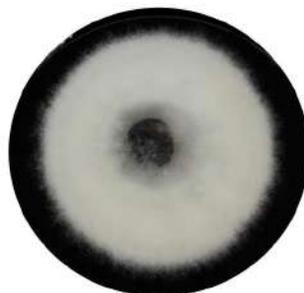


Figura 3.5 Actividad lacasa en placa de medio EMA (extracto de malta-agar), incubada a 32 °C por 96 h, en la que se observa la oxidación del reactivo ABTS

Para finalizar las pruebas cualitativas, en la figura 3.6 se reveló la producción positiva de enzimas celulasas gracias a la aparición de un halo pálido color naranja alrededor del micelio, lo cual indica las áreas hidrolizadas del medio debido a la acción de la enzima celulasa.



Figura 3.6 Actividad celulolítica en placa de medio Mandels & Weber (adicionado con Carboximetil celulosa) incubada a 32 °C por 72 h, teñida con Rojo Congo.

3.3.2 Ensayos cuantitativos para actividad enzimática

Actividad α -amilasa

Debido a la visible presencia de enzimas producidas en cada una de las pruebas cualitativas se procedió a cuantificar la actividad enzimática de cada enzima. Teniendo como primer resultado la actividad de la enzima α -amilasa en la figura 3.2 donde se observa que a las 72 horas coincide la mayor producción de enzima para los tres casos; la harina de Ramón liofilizada (HRL) con 152 U/mL, la harina seca (HRS) con 206 U/mL y para el medio sintético adicionado con almidón de papa soluble 85 U/mL.

En otros estudios, González Colunga y col. (2021) evaluaron el impacto de varios sustratos en la cinética enzimática del hongo *P. ostreatus* durante su fase de cultivo (cada 7 días durante 35 días) obteniendo la mayor actividad con una mezcla del 50% de yuca y 50% de paja de trigo con 3,896 U/L, a pesar de ello cada uno de los sustratos combinados con olote de maíz fue similar, reportando el sustrato con el 50% del mismo una actividad de 3,572 U/L y 3,650 U/L los sustratos al 30 y 40%.

Mouna Sahnoun *et al.* (2015) lograron una actividad enzimática de 4,447 U utilizando harina de soja como fuente de nitrógeno (494.13 U/g de sustrato seco), 3,190 U con residuos de gluten de trigo y 2,851 U con residuos de atún en polvo, cada uno con el propósito de sustituir el extracto de levadura. A su vez utilizando residuos de una fábrica de sémola que procesaba trigo duro y

suero en polvo como fuentes de carbono obtuvieron 2,635 y 2,235 U respectivamente. Todas las pruebas se llevaron a cabo con la cepa *Aspergillus oryzae* S2 por medio de fermentación en estado sólido al buscar optimizar las condiciones de cultivo.

Todos los resultados mencionados anteriormente se pueden atribuir principalmente al efecto inductor que tiene el almidón en la producción de amilasas [84].

Actividad lacasa

La actividad lacasa fue determinada a través de oxidación por ABTS y se puede observar en la figura 3.3, en la cual se muestra que a las 192 horas la actividad lacasa en la harina de Ramón liofilizada (HRL) fue de 18,993 U/mL, para la harina seca (HRS) de 5,013 U/mL a las 216 horas y para el almidón de papa soluble 1,944 U/mL a las 168 horas. Sobresaliendo notoriamente el extracto enzimático HRL, motivo por el cual se decidió trabajar únicamente con esta harina en las pruebas consecuentes de caracterización y evaluación.

En otros estudios, Sharma *et al.* (2020) evaluaron la actividad de la enzima cruda lacasa producida por dos cepas de *B. licheniformis* (TPNR1 y TPNR6) obteniendo 3.1 U/mL y 7.1 U/mL respectivamente. Mientras que Umar *et al.* (2022) encontraron que a los 7 días de incubación la secreción de esta enzima se incrementó a 522.2 U/L con la cepa *Ganoderma leucocontextum*. Zhongyang Ding *et al.* (2014) logró optimizar la producción de lacasa de *Pleurotus ferulae* obteniendo la mayor actividad enzimática de 6,832.86 U/L.

Lo obtenido en este estudio resulta superior a lo reportado por Tapia Tussell *et al.* (2015) y Olguín Maciel (2020) quienes lograron una producción enzimática de 2,543.7 U/mL y 4115 U/mL respectivamente, ambos utilizando la cepa *T. hirsuta* Bm-2 y en el primer caso coincidiendo con la materia prima (harina seca de semillas de Ramón).

Es importante destacar que la producción de enzimas depende inicialmente de las condiciones de cultivo, como el pH, la temperatura, la aireación, el tiempo de fermentación y la composición del medio. Motivo por el cual los rendimientos obtenidos en cada uno de los estudios resultaron inferiores a lo obtenido en este estudio, considerando como principal motivo que la cepa y sustrato utilizados en cada uno difiere.

Entre los diversos factores que son importantes para el crecimiento microbiano y la producción de enzimas utilizando un sustrato particular; el tamaño de partícula, el nivel de humedad inicial y la actividad del agua también se consideran importantes a considerar. De igual manera el tipo de

fuentes de carbono y nitrógeno, así como la proporción óptima entre estos, favorece la producción de lacasa en distintos basidiomicetos.

Actividad celulasa

A pesar de tener presencia positiva de la enzima celulasa en la prueba cualitativa, de manera cuantitativa no se obtuvieron resultados positivos de esta producción. Esto seguramente debido a que nuestra cepa no puede despolimerizar directamente la celulosa en azúcares reductores, por lo que el consumo de este biopolímero como fuente de carbono es bajo [65].

Sin embargo, Vega Muñoz (2014) reportó la cinética de producción de celulasas utilizando el hongo *Trametes versicolor* cultivado en carboximetilcelulosa (CMC) como fuente de carbono, presentando una actividad máxima de 225 U/L al sexto día de crecimiento y en cuanto a la actividad sobre Avicel, ésta incrementó hasta el quinto día de crecimiento, alcanzando un valor de actividad enzimática de 7 U/L aproximadamente. A su vez, Linares Ramírez *et. al.* (2013) utilizaron extractos enzimáticos de *Trametes trogii* cultivado en medios de cultivo con extractos de salvado de trigo y plantas completas de maíz y obtuvieron la mayor actividad enzimática a los 9 días con 769 μM glucosa/mL/min, mientras que para los extractos enzimáticos de medios sin maíz hallaron dos picos similares al tercer y duodécimo día (567 y 548 μM glucosa/mL/min respectivamente).

Por el contrario, en un estudio realizado por García Espejo *et. al.* (2016) se evaluó la actividad celulolítica de la cepa *Trichoderma inhamatum* (BOL-12 QD) durante su crecimiento, donde la mayor actividad se observó al día 8 de incubación en agitación con 99.23 UI/L y disminuyó al décimo día a 35.53 UI/L.

3.4 Caracterización del extracto enzimático

La producción de enzimas se ve fuertemente influenciada por diversos parámetros como temperatura, pH y los componentes del sustrato. Debido a esto y en vista de los resultados obtenidos en las cinéticas de actividades enzimáticas y al excelente comportamiento de las enzimas en la harina de Ramón liofilizada (HRL) se tomó la decisión de trabajar únicamente con esta harina en el proceso de su caracterización y evaluación por lo que todo lo reportado a continuación es específicamente del extracto enzimático HRL.

3.4.1 Efecto del pH en la actividad enzimática del extracto crudo

En la figura 3.7 se puede observar que con la solución amortiguadora de ácido cítrico-fosfatos a un pH de 4,5 se obtuvo mayor actividad enzimática para la enzima α -amilasa con una producción de 225 U/mL mientras que para la actividad enzimática de la enzima lacasa (figura 3.8) se

obtuvieron 13,923 U/mL con el buffer ácido cítrico a un pH de 5.5, sin embargo, no se observa mucha diferencia en presencia del buffer ácido cítrico-fosfatos a un pH de 4.5 ya que se obtuvo una producción de 12,972 U/mL. Cabe recalcar que el extracto utilizado para esta prueba contenía inicialmente 50 U/mL de enzima α -amilasa y 7,700 U/mL de enzima lacasa. Esto permitió elegir la solución ácido cítrico-fosfatos (pH 4.5) como el buffer que mayor rendimiento tuvo en ambas enzimas por lo que las pruebas consecuentes fueron realizadas con el mismo.

En otros estudios, la α -amilasa de la cepa *Aspergillus awamuri* mostró un pH óptimo entre 4.8 y 5 mientras que con *Penicillium chrysogenum* fue de 5 y con *Penicillium griseofulvum* de 5.5 con la enzima inmovilizada, esto difiere ligeramente con lo obtenido en este estudio, sin embargo, la mayoría de las α -amilasa microbianas tienen su pH óptimo en el rango moderadamente ácido a neutro como reportan Bhella y Altosaar (1985) quienes en un rango de pH 3.5 a 6.5 encontraron una actividad estable para esta enzima, coincidiendo así con el pH óptimo de la α -amilasa obtenida con la cepa *T. hirsuta* [90, 91, 92].

Con la cepa *Bacillus* sp. BBM1, Quintero Moreno *et al.* (2009) produjeron y caracterizaron α -amilasa mostrando un pH óptimo de entre 5 y 7, mientras que con la cepa *Penicillium chrysogenum*, Balkan *et al.* (2005) alcanzaron la mayor producción de enzimas a un pH de entre 4 y 5. Esto depende del tipo de almidón, microorganismo y propiedades mismas de la enzima, siendo que para la mayoría de las α -amilasa provenientes de bacterias y hongos el pH óptimo tiende a variar de entre 2 a 12 [93, 94].

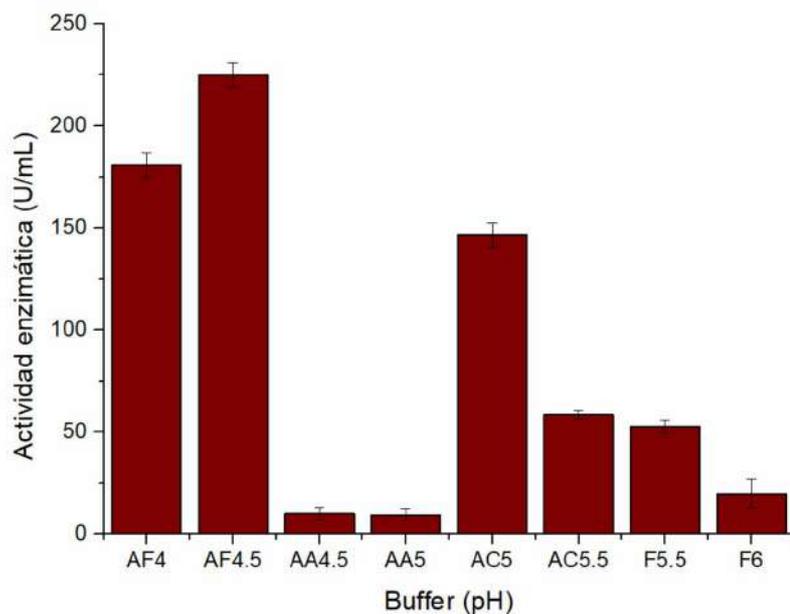


Figura 3.7 Efecto del pH sobre la enzima α -amilasa presente en el extracto enzimático crudo producido por *Trametes hirsuta* Bm-2 en HRL. (Soluciones amortiguadoras: Ácido cítrico-Fosfato (AF, pH 4 y 4.5), Acetato de sodio-Ácido acético (AA, pH 4.5 y 5), Ácido cítrico-Citrato de sodio (AC, pH 5 y 5.5), Fosfatos (F, pH 5.5 y 6)).

En el caso de la enzima lacasa, lo obtenido en este estudio coincide con Shrestha *et al.* (2016) quienes a un pH de 5 obtuvieron los niveles más altos de esta enzima en presencia de la cepa *Ganoderma lucidum*-CDBT1 mientras que difiere con lo reportado por Abdullah *et al.* (2020) quienes a un pH de 8 encontraron la mayor producción de enzima a través de la cepa *Phoma betae* y con Xiao *et al.* (2004) donde la enzima mostró un pH óptimo de 4.7 en su producción a partir de *Trametes* sp. utilizando guayacol como sustrato.

En otros estudios se han reportado actividad enzimática utilizando la cepa *T. versicolor* HBB 7328, con un pH óptimo de 5 en lacasa purificada, coincidiendo con un estudio realizado por Hamed *et al.* (2024) en el cual utilizando la cepa *Curvularia lunata* MY3, la enzima tuvo un pH óptimo de 5 y mostrando una alta estabilidad en un rango ácido de 4.5 a 5.5, lo que a su vez coincide con lo obtenido en este estudio con la cepa *T. hirsuta* [97, 98].

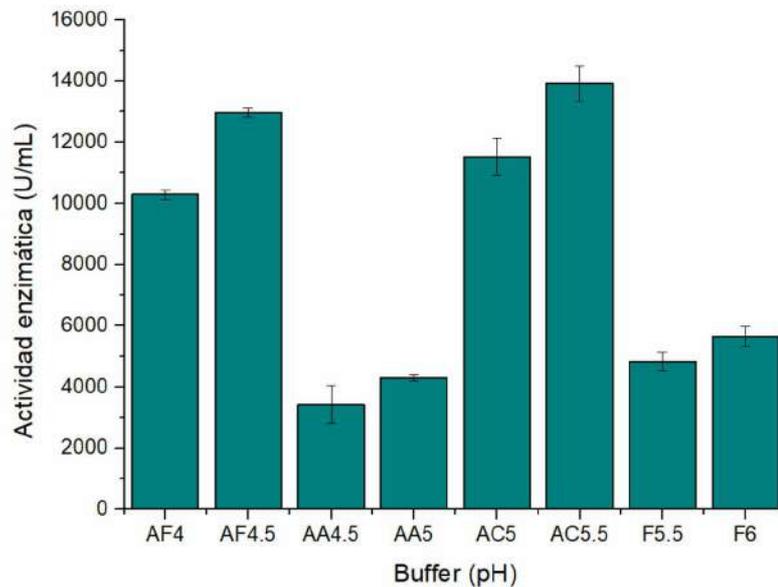


Figura 3.8 Efecto del pH sobre la enzima lacasa presente en el extracto enzimático crudo producido por *Trametes hirsuta* Bm-2 en HRL. (Soluciones amortiguadoras: Ácido cítrico-Fosfato (AF, pH 4 y 4.5), Acetato de sodio-Ácido acético (AA, pH 4.5 y 5), Ácido cítrico-Citrato de sodio (AC, pH 5 y 5.5), Fosfatos (F, pH 5.5 y 6)).

3.4.2 Efecto de la temperatura en la actividad enzimática del extracto crudo

Al realizar las pruebas con diversas temperaturas se obtuvieron las figuras 3.9 y 3.10, en las que se muestran los efectos de cada una de las temperaturas en ambas enzimas (amilasa y lacasa) producidas por la cepa *T. hirsuta* Bm-2.

Como se puede observar, para la enzima α -amilasa se reporta mayor actividad enzimática (117.68 U/mL) a una temperatura de 50°C, teniendo un rango de 40 a 50°C, el cual a pesar de no coincidir con la mejor temperatura para la actividad lacasa, ya que esta fue de 35 °C (5,075 U/mL), se puede observar en la gráfica 9 una actividad enzimática muy similar a los 40 y 50°C (4,892.59 y 4,283 U/mL respectivamente) como ocurrió con la amilasa, motivo por el cual se decidió realizar las pruebas subsecuentes a una temperatura de 50°C.

Con esto se puede considerar el empleo del extracto enzimático HRL para cualquiera de las dos enzimas, confiando en su efectividad a un rango de temperatura similar.

De acuerdo con lo reportado en otros estudios, las α -amilasas tanto de la cepa *Aspergillus awamuri* como de *Bacillus subtilis* KIBGE HAS presentaron su actividad óptima a una temperatura de 50°C, coincidiendo con este estudio, mientras que con *Penicillium chrysogenum* el rango fluctuó entre 30 a 40 °C. Con las cepas *Penicillium griseofulvum* a 40 °C y *Streptomyces gulbargensis* a 45°C, se obtuvieron las mayores actividades enzimáticas, coincidiendo en la inestabilidad a temperaturas más altas hasta llegar a una inactivación completa a los 80°C [91, 92, 94, 99, 100]

La inactivación progresiva de la enzima se puede producir debido a varios motivos, por inactivación térmica de las proteínas en su estructura, por una incorrecta conformación de la proteína, por la hidrólisis de la cadena peptídica y/o por la destrucción de aminoácidos o agregación de esta [100].

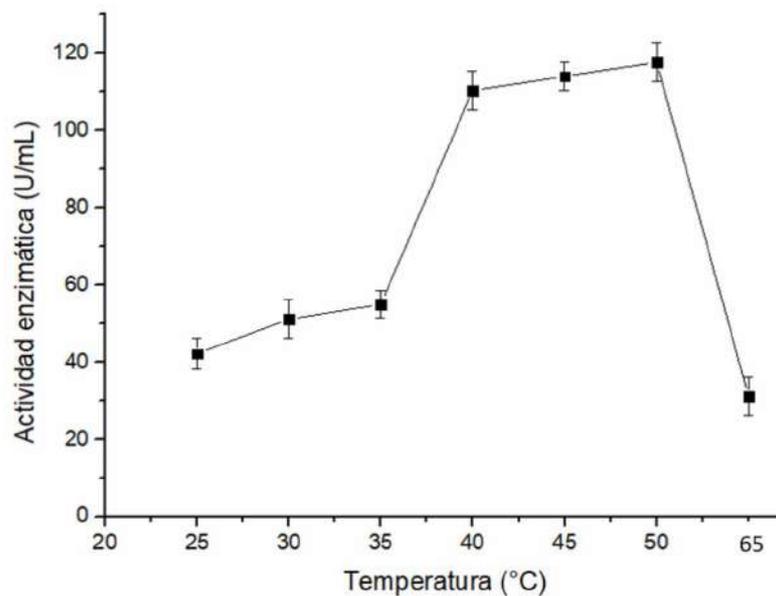


Figura 3.9 Efecto de la temperatura sobre la enzima amilasa presente en el extracto enzimático crudo producido por *Trametes hirsuta* Bm-2 en HRL.

En el caso de la enzima lacasa, se encuentra en el rango de lo reportado por Shrestha *et al.* (2016) y Abdullah *et al.* (2020) quienes a una temperatura de 30 °C encontraron los niveles más altos de actividad lacasa, disminuyendo drásticamente a medida que la temperatura aumentaba hacia 50 °C, esto debido al hecho de que *G. lucidum* (cepa utilizada en el primer estudio) es un hongo mesófilo del cual se ha demostrado que secreta lacasas a una temperatura máxima de 25 °C, mientras que en el segundo estudio fue con ayuda del hongo *Phoma betae* en adición de algunos activadores de lacasa como el ácido ferúlico, alcohol vertrílico y CuSO_4 . Se estimó así que la producción de lacasa depende en gran medida del medio de cultivo y del hongo utilizado.

En otros estudios, la mayor actividad enzimática de la lacasa MY3 de *Curvularia lunata* se obtuvo a los 40°C contando con un rango estable entre los 30 y 50°C y observándose una drástica disminución a partir de 60 °C, mientras que para la enzima obtenida a partir de *Bacillus aerius* SP3 la temperatura óptima resultó ser 35°C demostrando a su vez estabilidad a los 40°C y coincidiendo con lo obtenido en este estudio [101, 102].

La temperatura ideal para la producción de lacasa se ha reportado entre 20 y 50°C, coincidiendo con este estudio y con Goyat Nikita *et al.* (2024) quienes reportaron que la lacasa cruda se produjo en un rango de temperatura de 20 a 40°C obteniendo la mayor producción de 52.76 U/mL a 35°C con la cepa *T. versicolor* HBB 7328. Sin embargo, las lacasas producidas por *T. hirsuta* tuvieron temperaturas óptimas de 60°C y 40°C utilizando ABTS y DMP (2,6-dimetoxifenol) como sustrato respectivamente de acuerdo a lo reportado por Peng Wang *et al.* (2024). Mientras que Moreira

Braga *et al.* (2024) reportaron que tanto las lacasas libres como las producidas por monocultivo de *Trametes villosa* y en cocultivo con *Pycnoporus sanguineus* inmovilizadas con el método de agregados de enzimas reticulados (Lac-CLEA) fueron ligeramente más activas a 20 y 30°C y menos activas por encima de 60°C. Por lo tanto, el proceso de inmovilización pudo haber causado cambios en el microambiente enzimático afectando negativamente la actividad catalítica por encima de 60°C.

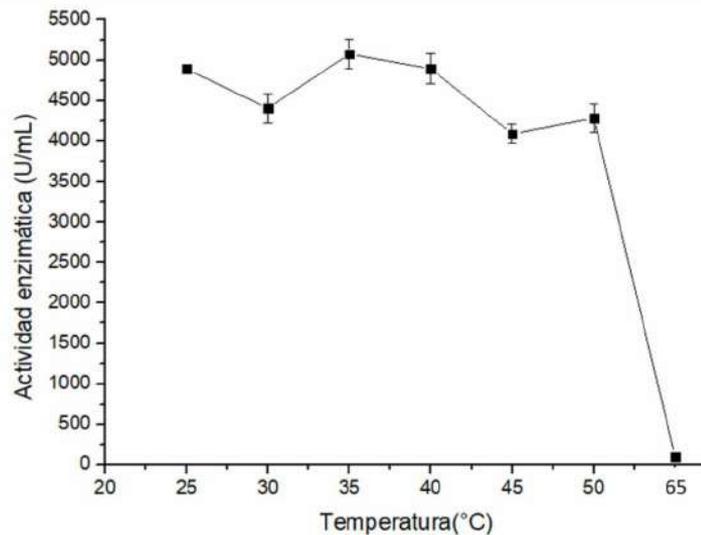


Figura 3.10 Efecto de la temperatura sobre la enzima lacasa presente en el extracto enzimático crudo producido por *Trametes hirsuta* Bm-2 en HRL

Es importante destacar que la actividad enzimática inicial en cada una de las pruebas realizadas fueron variables. Esto debido a que cada una de las pruebas fueron realizadas en distinta semana, por lo que las unidades enzimáticas contenidas inicialmente en el extracto crudo se vieron disminuidas por efecto de la estabilidad en el tiempo de almacenamiento.

3.4.3 Efecto de inhibidores

El efecto de los iones metálicos se muestra de la figura 3.11 a la 3.14. Se midió la actividad residual de la enzima α -amilasa dado que existe una relación inversa entre la actividad enzimática y la actividad inhibidora, por lo que sirvió como medida de la actividad inhibidora.

En las figuras 3.11 y 3.12 se muestra la actividad inhibitoria para la enzima α -amilasa con las soluciones preparadas a una concentración de 5 y 10 mM respectivamente. En ellas se puede observar que en ambas concentraciones el cloruro de manganeso presentó un porcentaje elevado de actividad enzimática lo cual indica que cumplió la función inversa de un inhibidor al potenciar la producción de esta enzima a más de un mil por ciento. A su vez se puede observar

en la figura 3.11 al cloruro de zinc (ZnCl_2), bromuro de potasio (KBr), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y dodecil sulfato de sodio (SDS), todos en concentración de 5 mM, cumplir la función de inhibidor al disminuir hasta en un 58% la actividad enzimática en el caso del cloruro de zinc.

Muchos iones metálicos con frecuencia influyen en la actividad de las enzimas, como es el caso de un estudio en el cual la actividad de la α -amilasa se incrementó en un 48% en presencia de Ca^{2+} en concentración de 1 mM a partir de un aislado de *Streptomyces gulbargensis*, recuperando el 100% de actividad con Ni^{2+} y Cu^{2+} e inhibiendo alrededor del 50% de la actividad enzimática con Mg^{2+} , Mn^{2+} , Sr^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cs^{2+} , Fe^{2+} y Hg^{2+} . Por su parte en un estudio realizado por Abdul Manas *et al.* (2014) la actividad catalítica de MAG1 (amilasa maltogénica clonada) se vio fuertemente potenciada por Mn^{2+} con una actividad relativa del 162% coincidiendo así con este estudio. Se ha demostrado la estimulación de este ion para las α -amilasa debido a su función protectora contra la oxidación [106, 107].

La actividad de MAG1 no se vio afectada por el EDTA, lo que sugiere que no se requieren iones metálicos para su actividad, pero si difiere con la enzima del extracto enzimático HRL, donde a ambas concentraciones probadas se tuvo un efecto inhibitorio con este ácido. Mientras que la actividad enzimática en ambos casos fue inhibida por el ion de metal pesado Zn^{2+} a excepción de este estudio con concentración de 10 mM donde se observó un aumento en la actividad enzimática. En cuanto al SDS la actividad MAG1 también fue inhibida de manera similar a la amilasa de HRL con concentración de 5 mM [107].

Oquist Phillips (2017) realizó pruebas con iones metálicos y surfactantes no iónicos a una concentración de 1 mM en la enzima α -amilasa maltogénica de *Lactobacillus plantarum* WCFS1, teniendo como resultados que los aditivos CuCl_2 , MnCl_2 , CaCl_2 y ZnCl_2 disminuyeron hasta el 27, 75, 89 y 83% su actividad relativa respectivamente. La drástica inhibición del ion Cu^{2+} en este estudio indica el rol de los grupos tiol, carboxilo e indol en la función y catálisis enzimática, sin embargo, con la enzima del extracto enzimático HRL se observa que a ambas concentraciones este ion cumplió la función opuesta activando la enzima, pero en el caso del ion Mn^{2+} coincide con Abdul Manas *et al.* (2014) donde aumenta la actividad enzimática y con el detergente no iónico Tween 80 discrepa al reportar por Oquist Phillips (2017) una inhibición mientras que en este estudio funcionó como un activador.

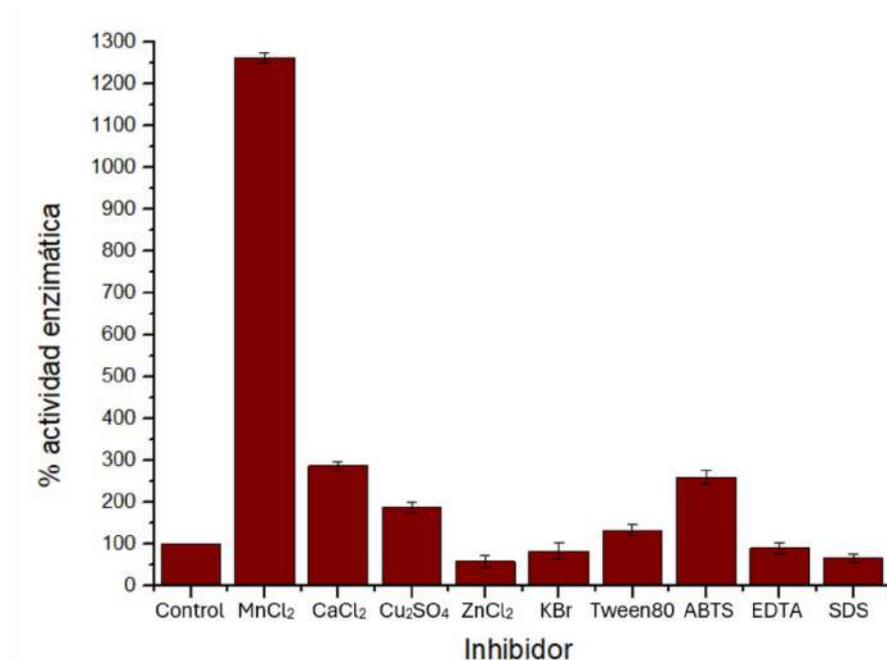


Figura 3.11 Efecto de inhibidores en concentración 5 mM sobre la enzima α -amilasa presente en el extracto enzimático crudo producido por *Trametes hirsuta* Bm-2 en HRL

Con los inhibidores a una concentración de 10 mM podemos observar en la figura 3.12 que únicamente el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) cumplió esta función al disminuir en un 25% la actividad enzimática de la enzima α -amilasa. Muy probablemente esto se deba a que la actividad enzimática depende de la concentración del ion.

En el estudio realizado por Fatoki *et al.* (2022) midieron la actividad residual de la enzima α -amilasa con tres concentraciones de iones metálicos (5, 10 y 20 mM) reportando que la actividad enzimática fue mayor en presencia de cobre, manganeso y calcio (los tres a 20 mM) y en presencia de una concentración de 5 mM con calcio, cobalto y cobre. Mientras que en presencia de sodio, potasio, magnesio y zinc la actividad inhibidora se retrasó en comparación con el control.

Se ha encontrado que los iones metálicos facilitan las actividades enzimáticas ayudando en la unión del sustrato a la enzima, estabilizando las cargas y el estado de transición, y en el intercambio de cargas. Así los iones metálicos estabilizan, activan o inhiben las enzimas [109].

Entre los iones metálicos probados por Mehta (2013), K^+ mostró una ligera inhibición de Gt-amy en altas concentraciones (5 y 10 mM) mientras que Mn^{2+} y Cu^{2+} inhibieron fuertemente la actividad. A pesar de ello se sabe que Mn^{2+} estimula la actividad de la α -amilasa y se comprueba

con nuestro estudio donde a ambas concentraciones se puede notar la activación obtenida en la enzima.

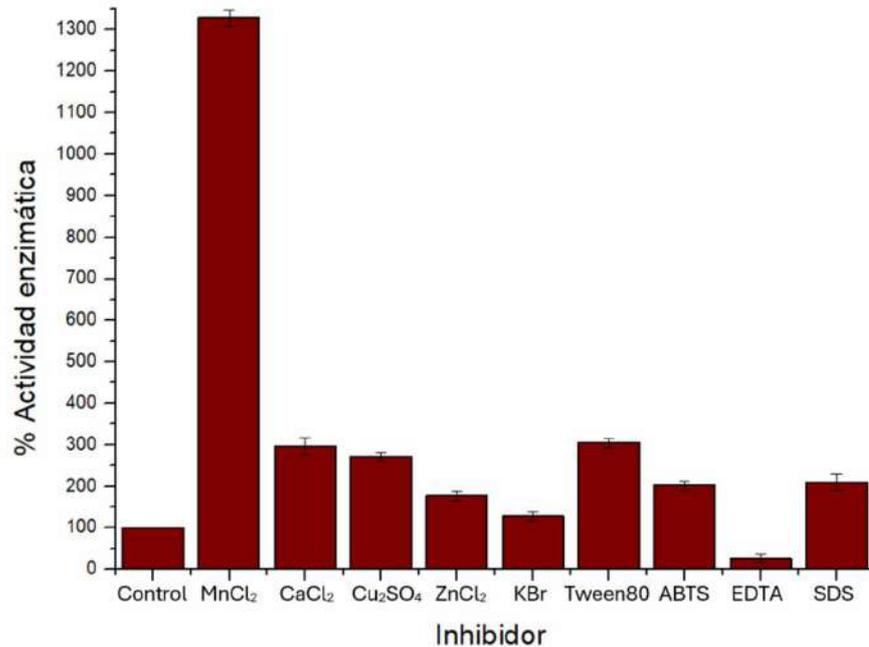


Figura 3.12 Efecto de inhibidores en concentración 10 mM sobre la enzima α -amilasa presente en el extracto enzimático crudo producido por *Trametes hirsuta* Bm-2 en HRL

Respecto a la enzima lacasa se puede observar en las figuras 3.13 y 3.14 la actividad inhibitoria y efecto de los iones metálicos en concentraciones de 5 y 10 mM respectivamente. Mostrando en la primera que la mayoría de las soluciones no tuvieron actividad inhibitoria, por el contrario, lograron una producción enzimática mayor al control comparativo (en ausencia de inhibidores), con la única excepción del ABTS que se mantuvo a la par con el control.

Es importante evaluar la estabilidad de la enzima lacasa, a distintas concentraciones de iones metálicos, para determinar su potencial en aplicaciones biotecnológicas, por lo que Navada *et al.* (2022) reportaron una pérdida mínima de actividad enzimática con los iones Zn^{2+} y Ca^{2+} , pero a mayor concentración (10 mM) los mismos mostraron una inhibición moderada, esto con lacasas purificadas de la cepa *T. hirsuta*, razón por la que probablemente difiera de los resultados obtenidos con el extracto enzimático HRL, sin embargo, coincide en la efectividad de los inhibidores a concentraciones más altas.

Las dos isoenzimas lacasas de *Trichoderma harzianum* S7113 reportadas por Elsayed *et al.* (2023) resultaron en un incremento gradual de su actividad enzimática al aumentar la concentración de los iones metálicos Zn^{2+} , Mg^{2+} y Ni^{2+} e inhibición en presencia de Cu^{2+} , EDTA y

SDS disminuyendo aún más al aumentar su concentración. A su vez, Tao Li *et al.* (2020) encontraron que la concentración de Ca^{2+} , K^+ , Cu^{2+} y Zn^{2+} no influyó notablemente en la actividad de la lacasa recombinante (rLAC) de la cepa *B. licheniformis* ya que se retuvo más del 81.6% de la actividad inicial. Por el contrario, la actividad de la enzima fue inhibida significativamente por Mn^{2+} a concentración de 5 mM y seriamente por SDS a 1 y 5 mM.

Debido a la poca o nula inhibición obtenida con los iones metálicos e inhibidores a una concentración de 5 mM, se podría considerar a la enzima como adecuada para ciertos procesos que involucran metales pesados, como en la industria del papel y la pulpa, así como en el tratamiento de aguas residuales [112].

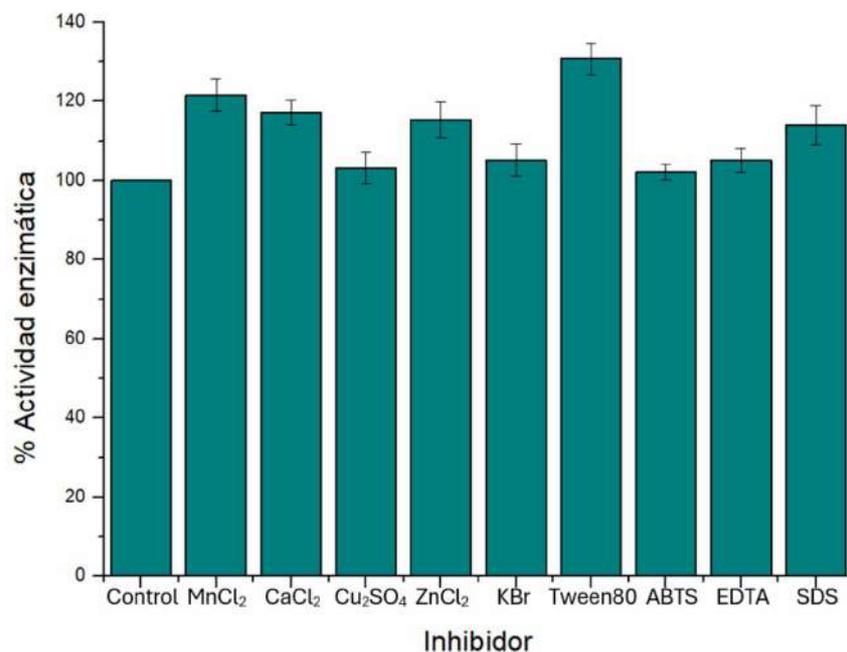


Figura 3.13 Efecto de inhibidores en concentración 5 mM sobre la enzima lacasa presente en el extracto enzimático crudo producido por *Trametes hirsuta* Bm-2 en HRL

Con los iones a una concentración de 10 mM se puede observar en la figura 3.14 que la mayoría cumplió con la función de inhibir, siendo el ABTS el mayor de ellos con una actividad enzimática del 83% y el Tween 80 por el contrario, alcanzando una actividad enzimática del 110% cumpliendo así la función inversa de un inhibidor.

En otros estudios se evaluó el efecto de iones CuSO_4 , ZnSO_4 y CaSO_4 sobre la actividad purificada de *G. leucocontextum* Glacc110 teniendo un mayor porcentaje de actividad enzimática relativa en concentraciones más altas (9 mM) para el primer y tercer caso, mientras que para el

segundo caso se observó a una concentración de 6 mM. De igual manera se evaluó el efecto del EDTA y SDS en diferentes concentraciones, mostrando que en ambos casos presenta una mayor inhibición a mayor concentración de cada ácido como lo reportado en este estudio [114].

Con la lacasa fúngica de *Pleutorus* sp., Sunil *et al.* (2011) reportaron una inhibición similar a la de este estudio con el ion CuSO_4 al obtener el 90% de la actividad relativa, sin embargo, con los iones MnCl_2 y ZnCl_2 y con el ácido EDTA obtuvieron una inhibición más significativa hasta llegar a la inhibición total con SDS.

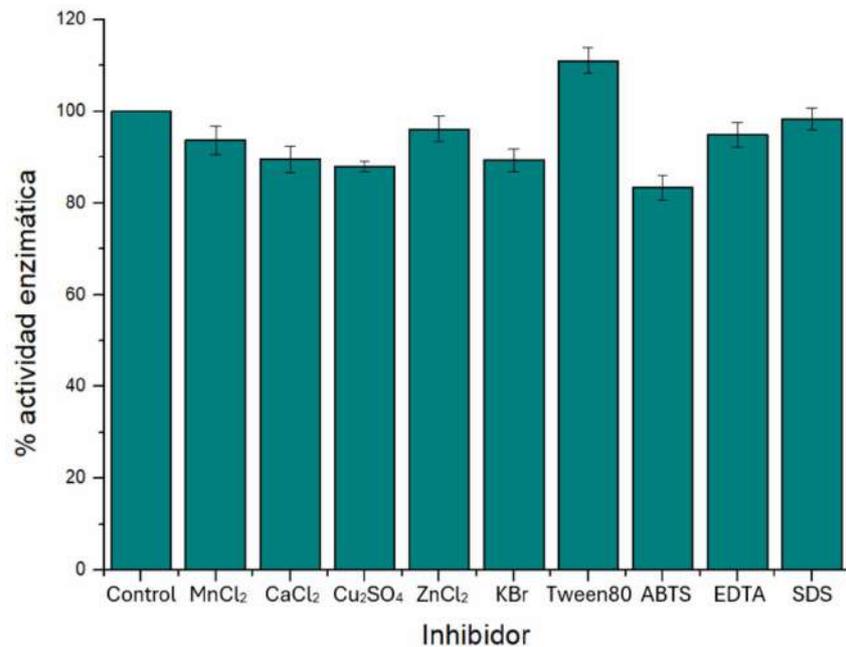


Figura 3.14 Efecto de inhibidores en concentración 10 mM sobre la enzima lacasa presente en el extracto enzimático crudo producido por *Trametes hirsuta* Bm-2 en HRL

3.4.4 Estabilidad en el tiempo de almacenamiento

El tiempo de vida útil de un extracto enzimático en almacenamiento varía, dependiendo de varios factores, como la fuente de las enzimas, la forma en que se obtuvieron y las condiciones de almacenamiento. En este estudio podemos observar en las figuras 3.15 y 3.16 la estabilidad que ha conservado cada una de las enzimas contenidas en el extracto enzimático HRL.

El extracto HRL inicialmente contenía 70 U/mL de enzima α -amilasa y 13,713 U/mL de enzima lacasa y se puede observar en las gráficas, que para la semana 20, la enzima α -amilasa aún conserva el 57% de actividad enzimática con 56 U/mL mientras que para la enzima lacasa el 27%

con 3,795 U/mL, a pesar de ello se sigue contando con una buena actividad enzimática para emplear en diversos procesos.

Por ejemplo, Sandoval Sánchez *et al.* (2024) reporta que las enzimas secretadas por *T. versicolor* tienen potencial para la biorremediación de suelos contaminados con boscalid (un fungicida utilizado para controlar diversas actividades fúngicas en plantas y frutos), con tan solo 0.9 y 0.75 U/mL de actividad lacasa, evaluando dos concentraciones de boscalid (100 y 220 ppm). Y Valdés S. *et al.* (2020) evaluaron el potencial degradador de enzimas lacasas en residuos agroindustriales de caña, piña y banano, mostrando que, con 43.8×10^{-6} U/mL de enzima obtenida a partir del hongo *G. applanatum* y con 32.8×10^{-6} U/mL a partir de *T. harzianum* se redujo la concentración de lignina en los residuos en lapsos de entre 15 y 45 días.

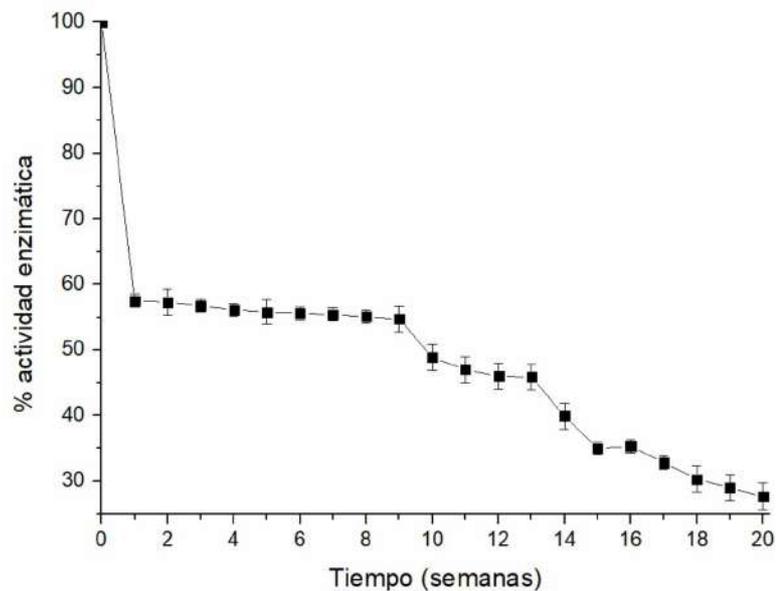


Figura 3.15 Estabilidad en el tiempo de almacenamiento de la enzima lacasa presente en el extracto enzimático crudo producido por *Trametes hirsuta* Bm-2 en HRL

A su vez, Wang *et al.* (2018) informaron que la adición de 12.6 U/mL de Amy175 (gen de α -amilasa obtenido a partir de la bacteria *Pseudoalteromonas* sp.) a detergentes mostró un mejor rendimiento de lavado que el detergente único, mejorando la eficiencia de eliminación de manchas, lo cual demuestra su potencial como aditivo en detergentes. Mientras que, Karimi M. & Biria D. (2016) reportaron que la amilasa producida por *B. subtilis* TB1 puede degradar los alcanos presentes en hidrocarburos, obteniendo el mismo resultado utilizando una muestra

comercial de α -amilasa, eliminando completamente las n-parafinas después de 3 días con ambas enzimas.

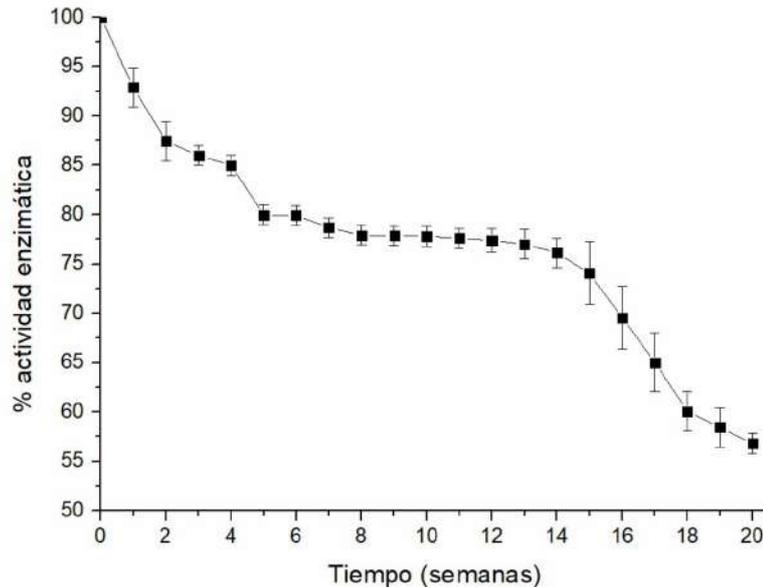


Figura 3.16 Estabilidad en el tiempo de almacenamiento de la enzima α -amilasa presente en el extracto enzimático crudo producido por *Trametes hirsuta* Bm-2 en HRL

Mostrando así, la efectividad de las enzimas con valores bajos de actividad enzimática, por lo que el extracto crudo obtenido en este estudio puede ser utilizado aún después de las 20 semanas de almacenamiento y obtener buenos rendimientos en diversos procesos.

3.5 Caracterización parcial de Residuo Sólido

En la tabla 3.2 se presentan los resultados obtenidos en el análisis elemental realizado al residuo sólido resultante de la producción del extracto enzimático HRL. Se muestra un porcentaje similar a lo reportado por Chan González (2023), quien reportó 43.63% de carbono y 6.37% de hidrógeno contenido en la fracción sólida residual de la harina de semillas de Ramón en ausencia de extracto enzimático, 43.40 % de carbono y 6.34 % de hidrógeno después de una primera extracción acuosa y 43.36 % de carbono y 6.47 % de hidrógeno después de una segunda extracción, mientras que en este estudio se obtuvo 49.27 % de carbono y 6.91 % de hidrógeno.

No obstante, difiere en el contenido de nitrógeno, ya que Chan González (2023) reporta 2.20% en la fracción sólida residual en ausencia de extracto enzimático, 1.41% después de la primera extracción y 1.11% después de la segunda extracción. Mientras que en este estudio se obtuvo 5.87% de nitrógeno, lo cual se puede atribuir a la masa micelial del hongo generado en cada uno de los estudios.

Tabla 3.2 Caracterización parcial de Residuo Sólido

Parámetro	Porcentaje
Carbono	49.27
Hidrógeno	6.91
Nitrógeno	5.87
Azufre	0.21

3.6 Evaluación del extracto enzimático en diversos sustratos

3.6.1 Prueba de decoloración con el tinte Índigo Carmín

La enzima lacasa contenida en el extracto crudo fue capaz de decolorar el tinte índigo carmín hasta quedar en un 8% del color inicial al añadirle 150U de enzima, 6% con 300U y 9% con 450U (figura 3.17), esto sin la necesidad de añadir mediadores, lo cual vuelve al extracto crudo muy adecuado para su aplicación como decolorante de este tinte. Cabe recalcar que esto se logró a tan solo 8 horas de haber iniciado la prueba y como se observa en la figura, el control (tinte sin extracto enzimático) no presenta decoloración significativa ya que quedó con un 97% de color al finalizar el tiempo total de la prueba.

La lacasa reportada por León Yanez (2018) y producida por la cepa *T. hirsuta* Bm-2 en salvado de trigo, por sí sola no logró decolorar los tintes de una manera efectiva ya que solo alcanzó del 5 al 20% de decoloración en un total de 50 horas de reacción, sin embargo, cuando la evaluó en un sistema lacasa-mediador (CDL, compuestos derivados de la lignina) mejoró la decoloración en el tinte índigo carmín logrando una decoloración del 77%. Esta mejora probablemente se deba a un efecto sinérgico entre la enzima y los fenoles presentes, ya que, durante la biotransformación del tinte con la lacasa sola, se acumuló isatina (intermediario tóxico en la degradación del tinte por lacasas), mientras que, en el tratamiento con el sistema lacasa-mediador no estuvo presente, lo que sugiere una mayor eficiencia en el proceso [120].

Sin embargo, aunque las cepas *T. hirsuta* reportada por León Yanez (2018) y la reportada en este estudio compartían similitudes al ser de la misma especie, difieren en el hábitat de recolección y el sustrato utilizado en la producción del extracto crudo. Al ser hongos ligninolíticos, se ha asociado con la actividad de las lacasas extracelulares, las cuales difieren entre cada cepa utilizada, por lo que la diferencia en las tasas de decoloración es notable.

Por su parte, Chopra *et al.* (2022) determinó la máxima degradación del tinte índigo carmín utilizando enzima lacasa de *B. licheniformis* en dosis de 10 U/mL a un pH alcalino de 8 y una

temperatura de reacción de 50°C durante 6 horas, obteniendo así un $96.79 \pm 1.06\%$ de decoloración en ausencia de cualquier mediador o inductor. Mientras que Bialowas *et al.* (2024) logró decolorar el mismo tinte con una eficiencia del 92.5% a los 40 días con lacasa obtenida de la cepa *T. versicolor* inmovilizada sobre un soporte de perlas de alginato de sodio en una dosis enzimática de 320 mg E/mg de IC (mg de índigo carmín), siendo 30-40 °C el rango de temperatura óptima para este proceso.

Las lacasas son enzimas con baja especificidad por el sustrato, lo que les permite actuar sobre una amplia variedad de moléculas fenólicas y aromáticas. No obstante, su efectividad en la degradación de tintes industriales puede variar según su potencial redox y la estructura del tinte, incluso si estos tintes contienen el mismo grupo cromóforo, es por esto por lo que se ha reportado una mejor efectividad al añadirle mediadores que potencien su función [120, 121, 129].

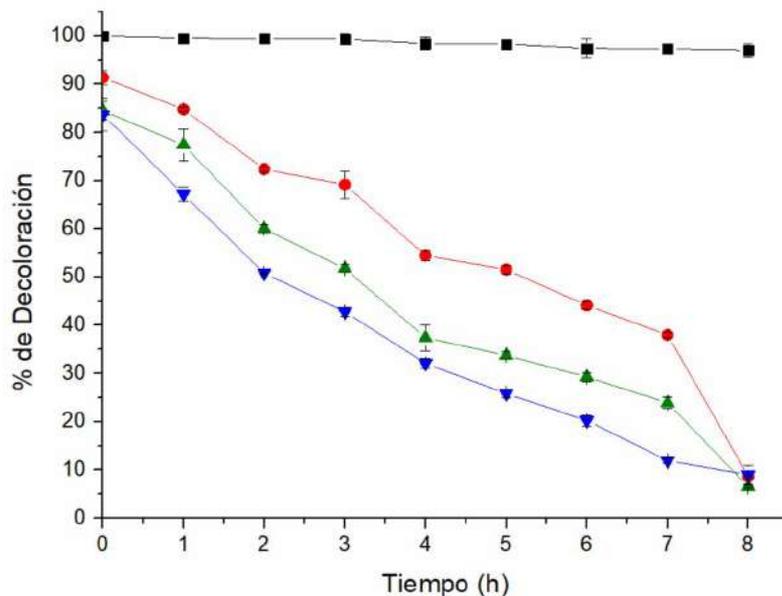


Figura 3.17 Prueba de decoloración utilizando el extracto enzimático crudo (producido por *Trametes hirsuta* Bm-2 en HRL) en tinte índigo carmín. (Control (cuadros negros), Carga enzimática: 150 U (círculos rojos), 300 U (triángulos verdes), 450 U (triángulos azules)).

3.6.2 Prueba de hidrólisis en harina de yuca

Los resultados de esta prueba proporcionan evidencia de que el extracto enzimático HRL es capaz de romper los enlaces glucosídicos α -1,4 del almidón de yuca, lo cual es de suma importancia e interés en la producción de biocombustibles y por lo tanto se comprueba la efectividad del extracto crudo para lograrlo.

En la figura 3.18 se puede observar que con el extracto enzimático y a tres cargas enzimáticas diferentes, la producción de azúcares reductores fue en aumento, logrando finalizar con 1.4 g/L al añadir 25U de enzima amilasa, 1.3 g/L con 50U y 1.8 g/L con 75U luego de haber iniciado con 0.45 g/L aproximadamente cada carga, lo cual representa un aumento del 311, 288 y 400% respectivamente. Mientras que el control se mantuvo constante durante las 48 horas de ensayo.

En otros estudios se han utilizado amilasas de malta de cebada para hidrolizar el almidón de yuca, hasta llegar a la fermentación alcohólica, cuantificando los azúcares reductores obtenidos con tres concentraciones diferentes de extracto de malta, se reportó una producción de 2.52 ± 0.261 g/L a una concentración del 5% (p/p), 3.09 ± 0.891 g/L al 10% y 3.01 ± 1.22 g/L al 15%. Por otra parte, se ha evaluado la cinética enzimática de la hidrólisis de la harina de yuca de modo que la concentración de glucosa más alta obtenida en ese estudio fue con un pretratamiento a 50°C después de 48 horas con 87 g/L, 258.7 g/L con una concentración inicial de almidón del 30% a una temperatura de 50°C y de 102 g/L al utilizar un pretratamiento enzimático con Viscozima L 0.1% p/p [123, 124].

Castaño Peláez (2020) logró producir etanol a partir de yuca utilizando enzimas reductoras de viscosidad por medio de hidrólisis enzimática y fermentación simultánea. Inicialmente contenía 29 g/L de azúcares reductores y reporta 45 ± 2.5 g/L en el proceso de prelicuado.

Una posible explicación para el rendimiento superior del extracto enzimático en la reacción de hidrólisis podría deberse a la distribución más uniforme de las amilasas y el mayor contacto de estas enzimas con el sustrato [123].

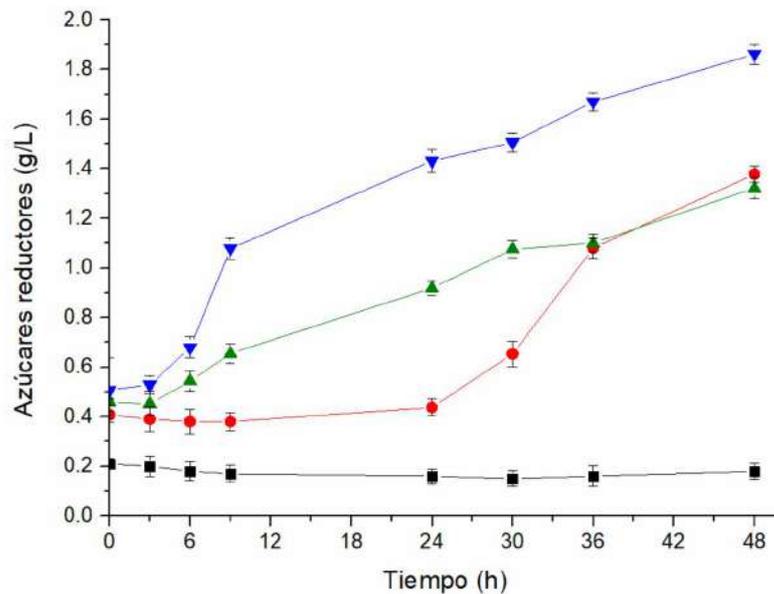


Figura 3.18 Prueba de hidrólisis utilizando el extracto enzimático crudo (producido por *Trametes hirsuta* Bm-2 en HRL) en harina de yuca. (Control (cuadros negros), Carga enzimática: 25 U (círculos rojos), 50 U (triángulos verdes), 75 U (triángulos azules)).

3.6.3 Prueba como pretratamiento en vinaza

En la figura 3.19 se puede observar que en todos los casos la tendencia en la producción de fenoles al paso del tiempo fue en decadencia, lo cual representa un resultado positivo en la prueba. A una concentración de vinaza al 25% se logró disminuir un 27% del contenido de fenoles al añadirle 9,000 U y un 11% al añadirle 18,000 U. Mientras que, con vinaza al 50% disminuyó un 27% el contenido de fenoles al añadirle 9,000 U y un 33% al añadirle 18,000 U de enzima lacasa contenida en el extracto enzimático HRL.

Canul Santiago (2021) reporta una elevada remoción de fenoles. En vinaza diluida al 25% y con acción de lacasas libres logró disminuir en un 70% la concentración de fenoles en 72 horas y el 39.67% a las 96 horas con acción de lacasas inmovilizadas, de la misma manera la mayor remoción en vinaza diluida al 50% ocurrió a las 72 horas con un 63%.

En un estudio realizado por Caballero *et al.* (2021) observaron una reducción de fenoles del 73.98% en vinaza de caña de azúcar tratada con ayuda de lacasa de *T. villosa*, mientras que Estrada Sperber (2017) evaluó la capacidad de degradación de compuestos fenólicos del complejo enzimático producido por *P. ostreatus* obteniendo que en el día 25 de cultivo a una temperatura de 42 °C se presentó en un porcentaje de 29.4.

Se ha establecido que las lacasas producidas por el hongo *T. hirsuta* Bm-2 se inhiben por altas concentraciones de fenoles. Pero a su vez se ha reportado la eficiencia del uso de extractos crudos del hongo *Trametes* donde se ha determinado la capacidad para remover fenoles de vinazas, tal es el caso de Tapia Tussell *et al.* (2015) quienes con la cepa *T. hirsuta* obtuvieron el 80% de disminución de concentración de fenoles con una vinaza al 10% a las 48 horas y una remoción del 60% a las 192 horas utilizando una vinaza al 20% (p/v). Por su parte, España Gamboa (2015) obtuvo un 67 ± 19 % de remoción en vinaza esterilizada y un 64 ± 0.21 % en vinaza no esterilizada que contenía 1.122 ± 0.059 mg/mL de fenoles, ambos casos al sexto día y utilizando la cepa *T. versicolor* [129, 130].

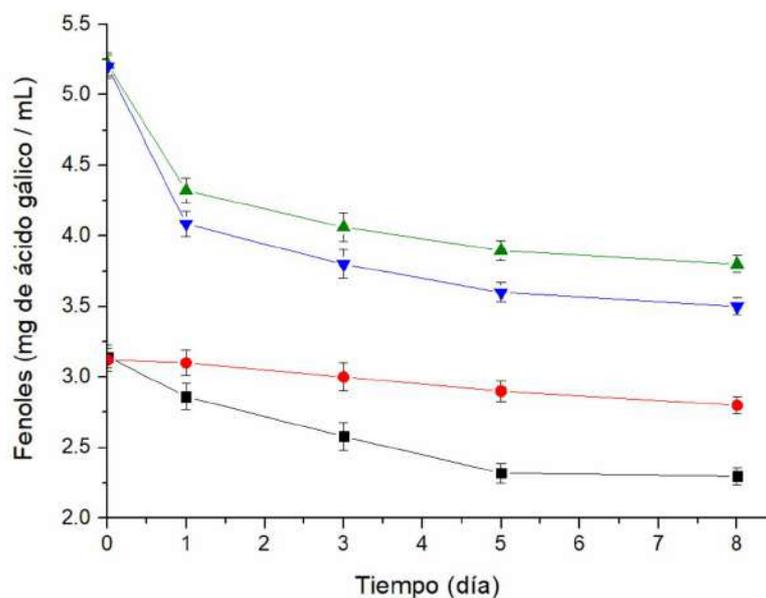


Figura 3.19 Prueba de contenido de fenoles utilizando el extracto enzimático crudo (producido por *Trametes hirsuta* Bm-2 en HRL) en vinazas. (Vinaza al 25%; carga enzimática de 9,000 U (cuadros negros), 18,000 (círculos rojos), Vinaza al 50%; carga enzimática de 9,000 U (triángulos verdes), 18,000 (triángulos azules)).

CONCLUSIONES

- La enzima α -amilasa de *T. hirsuta* se produce en las primeras 48 horas en harina de Ramón, mientras la enzima lacasa empieza a producirse a las 72 horas, alcanzando el máximo pico de producción a los 8 días.
- La harina obtenida de semilla de Ramón mediante la metodología de liofilización (HRL) produce un 44% más de enzimas α -amilasa, con respecto al medio sintético enriquecido con almidón de papa soluble (MSA) y 74% más enzimas lacasa con respecto a la harina seca (HRS) y 90% con respecto a MSA.
- Las mejores condiciones para la actividad enzimática del extracto crudo se obtuvieron con la solución amortiguadora de ácido cítrico-fosfatos a pH 4.5 y a una temperatura de 50°C para la enzima α -amilasa, y con el buffer ácido cítrico a pH 5.5 y 35°C para la enzima lacasa.
- La solución de cloruro de zinc a una concentración de 5 mM inhibió la actividad enzimática hasta un 58% para la enzima α -amilasa, por el contrario, el cloruro de manganeso potencializó su actividad cumpliendo la función inversa de un inhibidor. Mientras que, a una concentración de 10 mM, la solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) inhibió su actividad enzimática en un 25%.
- La actividad de la enzima lacasa no fue inhibida en presencia de ninguna de las soluciones amortiguadoras a una concentración de 5 mM. Mientras que, a una concentración de 10 mM, la solución ABTS la inhibió un 17%.
- A pesar de almacenar el extracto enzimático obtenido con la harina de ramón liofilizada durante 20 semanas sin añadirle solución amortiguadora, la actividad enzimática de α -amilasa y lacasa se mantienen con 56 U/mL y 3,795 U/mL respectivamente. Lo cual representa el 57% de actividad α -amilasa y el 27% de lacasa.
- El extracto crudo HRL fue capaz de decolorar el tinte índigo carmín en un máximo de 94% con una concentración de 300 U de enzima lacasa y de disminuir el contenido de fenoles en una vinaza diluida al 25% añadiendo 9,000U de lacasa (27% de fenoles finales) y en una vinaza diluida al 50% añadiendo 18,000 U (32% de fenoles finales). Mientras que, la mejor concentración para desdoblar el almidón presente en la harina de yuca fue la de 75U obteniendo 1.8 g/L de azúcares reductores.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Porto de Souza Vandenberghe L, Grace Karp S, Binder Pagnoncelli M.G, Linsingen Tavares M.V, Libardi Junior N, Valladares Diestra K, Aparecida Viesser J & Soccol C.R. (2020). Classification of enzymes and catalytic properties. Biomass, Biofuels, Biochemicals. Advances in enzyme catalysis and technologies. Chapter 2. Pages 11-30. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819820-9.00002-8>
- [2] Godoy Espinoza V. (2017). Obtención y evaluación de extractos enzimáticos con actividad celulítica y lignolítica a partir del hongo *pleurotus ostreatus* cultivados en tuza de maíz.
- [3] Escalona Morales I. J. (2022). "Producción de enzimas a partir de residuos agroindustriales. Análisis bibliográfico". Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.
- [4] Arroyo M., Acebal C. & de la Mata I. (2014). "Biocatálisis y Biotecnología". Arbor, 190 (768): a156. doi: <http://dx.doi.org/10.3989/arbor.2014.768n4010>
- [5] Drout R. J., Robison L. & Farha O. K. (2019). Catalytic applications of enzymes encapsulated in metal–organic frameworks. Coordination Chemistry Reviews, Volume 381, Pages 151-160, ISSN 0010-8545, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.11.009>.
- [6] Renewable fuels association. Annual ethanol production. National ethanol conference. Recuperado de Annual Ethanol Production (ethanolrfa.org)
- [7] Cavalcante F. T. T., Cavalcante A. L. G., de Sousa I. G., Neto F. S. & dos Santos J. C. S. (2021). Current status and future perspectives of supports and protocols for enzyme immobilization. <https://doi.org/10.3390/catal11101222>
- [8] IMARC Transforming ideas into impact. Informe de mercado de enzimas por tipo (proteasa, carbohidrasa, lipasa, polimerasa y nucleasa, y otros), fuente (microorganismos, plantas, animales), tipo de reacción (hidrolasa, oxidorreductasa, transferasa, liasa y otros), aplicación (alimentos y bebidas, Cuidado del Hogar, Bioenergía, Farmacéutica y Biotecnología, Piensos y Otros) y Región 2024-2032. Report ID: SR112024A17607. Recuperado de: Tamaño y Participación del Mercado de Enzimas | Informe [2024-2032] (imarcgroup.com)
- [9] Patel A. K., Dong C. D., Chen C. W., Pandey A. & Singhania R. R. (2023). Production, purification, and application of microbial enzymes. Biotechnology of microbial enzymes (second edition), Production, Biocatalysis and Industrial Application, pages 25-57. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-19059-9.00019-0>
- [10] Sarrouh B., Santos T. M., Miyoshi A., Dias R. & Azevedo V. (2012). Up-to-date insight on industrial enzymes applications and global market. Bioprocessing & Biotechniques. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9821.S4-002>

- [11] Sharma A., Gupta G., Ahmad T., Mansoor S. & Kaur B. (2019). Enzyme engineering: Current trends and future perspectives. *Food reviews international*. Volume 37. ISSN: 8755-9129. <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1695835>
- [12] Ibarra Díaz N. (2020). Estudio del aprovechamiento integral del cultivo de cebada (*Hordeum vulgare* L.) para la producción de etanol. Instituto tecnológico de Veracruz.
- [13] Danovich C. L. (2019). Extracción de pectina de albedo de limón mediante enzimas pécticas producidas por una levadura autóctona. Universidad Nacional de Misiones.
- [14] Figueroa Ceballos R., Bran González M. del C., Morales Esquivel O. & Álvarez Valenzuela G. A. (2020). Potencial de los hongos anamorfos de Guatemala para la producción de α -amilasas utilizando como sustrato cascarilla de arroz. *Revista Científica* vol 29. Núm. 2. ISSN-e: 2224-5545. DOI: <http://doi.org/10.54495/Rev.Cientifica.v29i2.39>
- [15] Cabadiana Tipan W. D. (2020). Evaluación de la actividad de enzimas lignolíticas producidas por el hongo (*Pleurotus ostreatus*) cultivado en residuos de caña de azúcar. Universidad Politécnica Salesiana.
- [16] Santillán Fernández A., Santiago Santes O. V., Espinosa Grande E., Huicab Pech Z. G., Larqué Saavedra F. A. & Bautista Ortega J. (2021). Propagación sexual y asexual de *Brosimum alicastrum* swartz en Campeche, México. *La granja. Revista de Ciencias de la Vida*, 34(2), 105-116. <https://doi.org/10.17163/lgr.n34.2021.07>
- [17] CONABIO. (2005). *Brosimum alicastrum*: distribución potencial. Recuperado de: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/47-morac1m.pdf
- [18] Feng Hui S., Jiang L., Yue Xiang Y., Zhi Ying Y., & Xiao Feng L. (2011). Effect of biological pretreatment with *Trametes hirsuta* yj9 on enzymatic hydrolysis of corn stover. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Volume 65, Issue 7, Pages 931-938, ISSN 0964-8305, <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.07.001>.
- [19] Shamraja S. N., Priyanka Rao & Virendra K. R. (2018). Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review, *Food Research International*, Volume 108, Pages 309-330, ISSN 0963-9969, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.006>.
- [20] Sarmiento Franco L., Montfort Grajales S. y Sandoval Castro C. (2019). La semilla del árbol Ramón (*Brosimum alicastrum* Swartz): alternativa alimentaria energética para animales de producción y seres humanos. Recuperado de *Bioagrociencias*. Volumen 15, Número 1.
- [21] Vega López A., Valdez Hernández J. I. y Cetina Alcalá V. M. (2003). Zonas ecológicas de *Brosimum alicastrum* Sw. en la costa del pacífico mexicano maderas y bosques. Vol. 9, núm. 1, primavera, pp. 27-53 Instituto de Ecología, A.C.

- [22] López Barrera G., Ochoa Zavala M., Quesada M., Harvey N., Núñez Farfán J., González Rodríguez A., Rocha Ramírez V. & Oyama K. (2021) Genetic imprints of *Brosimum alicastrum* Sw. in Mexico. American Journal of Botany. Volume 108, Issue 9 p. 1793-1807. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1725>
- [23] Morales Ortiz E. R. & Herrera Tuz L. G. (2009). Ramón (*Brosimum alicastrum* Swartz.) Protocolo para su colecta, beneficio y almacenaje. Recuperado de: [http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/19/1301RAMON%20\(Brosimum%20alicastrum%20Swartz.\)%20Yucat%C3%A1n.pdf](http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/19/1301RAMON%20(Brosimum%20alicastrum%20Swartz.)%20Yucat%C3%A1n.pdf)
- [24] Larqué Saavedra A. Árbol de Ramón (*Brosimum Alicastrum*). Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Recuperado de: <https://www.cicy.mx/sitios/arbol-de-ramon#:~:text=DISTRIBUCI%C3%93N%2C%20ORIGEN%20Y%20EXTENSI%C3%93N&text=Tambi%C3%A9n%20se%20encuentra%20en%20algunos,y%20Tobago%20en%20el%20Caribe.>
- [25] Hernández González O., Vergara Yoisura S. & Larqué Saavedra A., (2015). Studies on the productivity of *Brosimum alicastrum* a tropical tree used for animal feed in the Yucatan Peninsula, Wulfenia Journal, Vol 22, No. 7
- [26] Asociación de empresas de energías renovables (APPA) (2022). ¿Qué es la biomasa? Recuperado de: <https://www.appa.es/appa-biomasa/que-es-la-biomasa/>
- [27] Kumar R., Singh S. & Singh O. V (2008). Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. Volume 35, Issue 5, Pages 377–391, <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0327-8>
- [28] Alper K., Tekin K., Selhan K. & Ragauskas A. J. (2020). Sustainable energy and fuels from biomass: a review focusing on hydrothermal biomass processing. The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/D0SE00784F>
- [29] Fernandes de Souza M., Almenara Rodrigues M., Pereira Freitas S. & Pinto da Silva Bon E. (2020). Effect of milling and enzymatic hydrolysis in the production of glucose from starch-rich *Chlorella sorokiniana* biomass. Algal Research, Volume 50,101961, ISSN 2211-9264, <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101961>.
- [30] Morales Calvo G. (2008). Los residuos biomásicos: algunos ejemplos de aprovechamiento integral. Sevilla: Universidad Internacional de Andalucía. ISBN: 978-84-7993-048-6. URI: <http://hdl.handle.net/10334/2522>
- [31] Moo Huchin V. M., Sauri Duch E., Canto Pinto J. C., Canul Garrido D. M. & Moo Huchin M. I. (2019). Producción enzimática de maltodextrinas a partir de almidón de *Brosimum alicastrum*. Progressio: perspectivas científicas del poniente de Yucatán. Recuperado de:

https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=5ikXEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA129&dq=almid%C3%B3n+de+brosimum+alicastrum&ots=Z6GU3MyJik&sig=rUz_hSgj0givTaMCAUCu9eaf3c#v=onepage&q=almid%C3%B3n%20de%20brosimum%20alicastrum&f=false

- [32] Domínguez Zárate P. A., García Martínez I., Güemes Vera N., Totosaus A. & Pássaro Carvalho C. P. (2019). Textura, color y aceptación sensorial de tortillas y pan producidos con harina de Ramón (*Brosimum alicastrum*) para incrementar la fibra dietética total. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 20(3), 699-719. <https://doi.org/10.21930/rcta.vol20num3art:1590>
- [33] Qiang Sheng X., Yu Si Y. & Jia Xun F. (2016). Efficient hydrolysis of raw starch and ethanol fermentation: a novel raw starch-digesting glucoamylase from *Penicillium oxalicum*. *Biotechnology for biofuels* 9, 216. DOI: [10.1186/s13068-016-0636-5](https://doi.org/10.1186/s13068-016-0636-5)
- [34] Jiménez Villarreal I. A. (2019). "Efecto del ultrasonido en el proceso de sacarificación para la producción de bioetanol a partir de harina de Ramón" Tesis maestría, CICY, México.
- [35] Gaquere Parker A., Taylor T., Hutson R., Rizzo A., Folds A., Crittenden S., Zahoor N., Hussein B. & Arruda A. (2018). Low frequency ultrasonic-assisted hydrolysis of starch in the presence of α -amylase, *Ultrasonics sonochemistry*, Volume 41, Pages 404-409, ISSN 1350-4177, <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.10.007>.
- [36] Sheng Xu Q, Sun H, Zhao P, Ge X, Xia Y, Hao Z, Liu J & Peng M. (2010). Recent advances in microbial raw starch degrading enzymes. *Applied Biochemistry Biotechnology*; 160:988–1003.
- [37] Sherwood J. (2020). The significance of biomass in a circular economy. *Bioresource Technology*. Mar; 300:122755. PMID: 31956060. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122755>
- [38] Wu X., Luo N., Xie S., Zhang H., Zhang Q., Wang F. & Wang Y. (2020). Photocatalytic transformations of lignocellulosic biomass into chemicals. *Chemical Society reviews*. doi:10.1039/d0cs00314j
- [39] Matos Trujillo M., Pérez Hernández Y., Valdivia Avila A., Ranilla M. J., Rodríguez Alonso Z., Rubio Fontanills Y., Díaz Rey A., Jardines González S & Camacho Campos C (2020). Use of agroindustrial residues for producing enzymes by *Bacillus subtilis* E 44. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 54(1), 35-44. Recuperado en http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2079-34802020000100035&lng=es&tlng=en
- [40] Mujtaba M., Fernandes Faceto L., Fazeli M., Mukherjee S., Savassa S. M., Araujo de Medeiros G., do Espírito Santo Pereira A., Donnini Mancini S., Lipponen J. & Vilaplana F.

- (2023). Lignocellulosic biomass from agricultural waste to the circular economy: a review with focus on biofuels, biocomposites and bioplastics. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.136815>
- [41] Sarrouh B., Santos T. M., Miyoshi A., Dias R. & Azevedo V. (2012). Up-to-date insight on industrial enzymes applications and global market. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9821.S4-002>
- [42] De Carvalho C.C.C.R. & da Fonseca M.M.R. (2011). Biotransformations, Editor(s): Murray Moo Young, Comprehensive Biotechnology (Second edition) Academic Press, Pages 451-460, ISBN 9780080885049, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00109-4>.
- [43] Aresta M., Dibenedetto A. & Dumeignil F. (Eds.). (2012). Biorefinery: from biomass to chemicals and fuels. Walter de Gruyter.
- [44] Almenares Verdecía J. F., Ngoma Presline F. & Serrat Díaz M. de J. (2011). Aspectos tecnológicos generales para la conversión a etanol de la biomasa lignocelulosica II. Tecnología Química, 31(3), 392-407. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852011000300012&lng=es&tlng=es
- [45] Cherubini F. (2010). The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals, Energy Conversion and Management, Volume 51, Issue 7, Pages 1412-1421, ISSN 0196-8904, <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.01.015>.
- [46] Çağrı Akyol, Orhan Ince, Mahir Bozan, E. Gozde Ozbayram & Bahar Ince (2019). Biological pretreatment with *Trametes versicolor* to enhance methane production from lignocellulosic biomass: A metagenomic Approach, Industrial crops and Croducts, Volume 140, 111659, ISSN 0926-6690, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111659>.
- [47] Singh A., Rodríguez Jasso R. M., Gonzalez Gloria K. D., Rosales M., Belmares Cerda R., Aguilar C. N., Singhania R. R. & Ruiz H. A. (2019). The enzyme biorefinery platform for advanced biofuels production, Bioresource Technology Reports, Volume 7, 100257, ISSN 2589-014X, <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100257>.
- [48] Ubando A. T., Felix C. B. & Chen W. H. (2019). Biorefineries in circular bioeconomy: A comprehensive review. Bioresource Technology, 122585. doi: 10.1016/j.biortech.2019.122585
- [49] Castañeda M. T. (2019). Enzimas de interés biotecnológico. Universidad Tecnológica Nacional – Facultad Regional La Plata.
- [50] Valdez Díaz S. (2018). Aislamiento y purificación parcial de enzimas microbianas de tipo lacasa, para la degradación de desechos de piña; banano y caña. Universidad de Costa Rica.
- [51] Ramirez Hoyos M. L. (2021). Aplicación de lipasas microbianas en la biorremediación de ecosistemas contaminados con aceites residuales. Revista Agricolae & Habitat.

- [52] Comunale J., Reed D. & Cena C. (2021) What is starch? Polysaccharide formulas, structures, and functions. Received from <https://study.com/learn/lesson/starch-structure-function-chemical-formula.html>
- [53] Tasić M. B. & Veljković V. B. (2011). Simulation of fuel ethanol production from potato tubers. *Computers & Chemical Engineering*, Volume 35, Issue 11, Pages 2284-2293, ISSN 0098-1354, <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2010.11.003>.
- [54] Domínguez J. A., Vega Duarte J. F., Rodríguez Fonseca F. & Espitia S. A. La economía verde en el desarrollo empresarial del siglo XXI. *Revista de Investigación Transdisciplinaria en Educación, Empresa y Sociedad –ITEES -Diálogos y Transformaciones Sociales -ISSN: 2711-1857*
- [55] Medina, S. (2019). *Economía verde en México: Transformación económica, desarrollo social incluyente y cuidado del medio ambiente*. LID editorial mexicana SA de CV.
- [56] Scarlat N., Dallemand J. F., Monforti Ferrario F. & Nita V. (2015). The role of biomass and bioenergy in a future bioeconomy: Policies and Facts. *Environmental Development*, 15, 3-34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envdev.2015.03.006>
- [57] Yue D., You F. & Snyder S. W. (2014). Biomass to bioenergy and biofuel supply chain optimization: Overview, key issues and challenges. *Computers & Chemical Engineering*, 66, 36-56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.compchemeng.2013.11.016>
- [58] Filiatrault Chastel C., Heiss Blanquet S., Margeot A. & Guy Berrin J. (2021). From fungal secretomes to enzymes cocktails: The Path Forward to Bioeconomy. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107833>
- [59] Olguin Maciel E. (2020). "Bioproceso consolidado para la producción de bioetanol a partir de harina de semillas de Ramón (*Brosimum alicastrum*), utilizando el aislado nativo *Trametes hirsuta* Bm-2" Tesis doctorado, CICY, México.
- [60] Tapia Tussell R., Pérez Brito D., Torres Calzada C., Cortés Velázquez A., Alzate Gaviria L., Chablé Villacís R. & Solís Pereira S. (2015). Laccase gene expression and vinasse biodegradation by *Trametes hirsuta* strain Bm-2, *Molecules*, 20(8) 15147– 15157.
- [61] Folin O. & Denis W. (1912). On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *Journal of Biological Chemistry*, 12(2), 239–243. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)88697-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)88697-5)
- [62] Miller G. L. (1959). "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar," *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.

- [63] Tapia Tussell R., Pérez Brito D., Rojas Herrera R., Cortes Velazquez A., Rivera Muñoz G. & Solis Pereira S. (2011), New laccase-producing fungi isolates with biotechnological potential in dye decolorization, *African Journal of Biotechnology*, 10(50).
- [64] Chable Villacis R. del R. (2021). Producción de bioetanol de segunda generación a partir de residuos agroindustriales de piña (*Ananas comosus L.*).
- [65] Orencio Trejo M., Torres Granados J., Rangel Lara A., Beltrán Guerrero E., García Aguilar S., Moss Acosta C., Valenzuela Soto H., De la Torre Zavala S., Gastelum Arellanez A., Martínez A., Tiessen A. Díaz Mireles E. & Lozoya Gloria E. (2016). Cellulase and xylanase production by the mexican strain *Talaromyces stollii* LV186 and its application in the saccharification of pretreated corn and sorghum stover. *Bioenergy Research* 9, 1034–1045.
- [66] Shahryari Z., Fazaelpoor M. H., Ghasemi Y., Lennartsson P. R. & Taherzadeh M. J. (2019). Amylase and xylanase from edible fungus *neurospora intermedia*: Production and characterization. *Molecules*, 24(4), 1–14.
- [67] Guillaume A., Thorigné A., Carré Y., Vinh J. & Levavasseur L. (2019). Contribution of proteases and cellulases produced by solid - state fermentation to the improvement of corn ethanol production, *Bioresour. Bioprocess.* 6(1), 7.
- [68] Zapata Castillo P., Villalonga Santana M. de L, Tamayo Cortés J., Riversa Muñoz G., & Solis Pereira S. (2011). Purification and characterization of laccase from *Trametes hirsuta* Bm-2 and its contribution to dye and effluent decolorization. *African Journal of Biotechnology* Vol. 11(15), pp. 3603-3611. DOI: 10.5897/AJB11.2050
- [69] Hammami A., Fakhfakh N, Abdelhedi O, Nasri M. & Bayouhd A. (2017). Proteolytic and amylolytic enzymes from a newly isolated *Bacillus mojavensis* SA: Characterization and applications as laundry detergent additive and in leather processing. *International Journal of Biological Macromolecules* 108, 56-68. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.148>
- [70] Díaz de Leon Yanez S. (2018). Estudio del sistema lacasa-mediador producido por *Trametes hirsuta* Bm2 en la decoloración de tintes industriales. Tesis maestría Instituto Tecnológico de Mérida, México.
- [71] Tapia Tussell R., Pereira Patrón A., Alzate Gaviria L., Lizama Uc G., Pérez Brito D. & Solis Pereira S. (2020). Decolorization of textile effluent by *Trametes hirsuta* Bm-2 and *lac-T* as possible main laccase-contributing gene. *Current Microbiology* 77, 3953-3961. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02188-9>
- [72] Azcorra May K. J. (2021). Desarrollo de un proceso de deslignificación de *sargassum* spp. Para la obtención de compuestos con potencial en la producción de biocombustibles. Tesis Maestría CICY, México.

- [73] Singleton V. L. & Rossi J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- [74] Ozer H. K. (2017). Phenolic compositions and antioxidant activities of maya nut (*Brosimum alicastrum*): Comparison with comercial nuts. *International Journal of Food Properties*, 20(11), 2772-2781. <https://doi.org/10.10942912.2016.1252389>
- [75] Wolfgang B., Detmold W. & Hans Peter G (1999). Potato starch technology. *Starch*, 51, 235–242
- [76] Guilherme A. A., Dantas P. V. F., Santos E. S., Fernandes F. A. N & Macedo G. R. (2014). Evaluation of composition, characterization and enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 32(1), 23-33. [dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20150321s00003146](https://doi.org/10.1590/0104-6632.20150321s00003146)
- [77] Melnichuk N, Braia M. J., Anselmi P. A., Meini M. R., Romanini D. (2020). Valorization of two agroindustrial wastes to produce alpha-amylase enzyme from *Aspergillus oryzae* by solid-state fermentation. *Waste Management*, Vol. 106, 155-161. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.03.025>
- [78] Pérez Pacheco E., Moo Huchin V. M., Estrada León R. J., Ortiz Fernández A., May Hernández L.H., Ríos Soberanis C.R., Betancur Ancona D. (2014). Isolation and characterization of starch obtained from *Brosimum alicastrum* Swartz seeds. *Carbohydrate Polymers*, 101(), 920–927. doi:10.1016/j.carbpol.2013.10.012
- [79] Melikoglu M., Lin C. & Webb C. (2013). Stepwise optimisation of enzyme production in solid state fermentation of waste bread pieces. *Food and Bioproducts Processing*. Vol. 91, Issue 4, 638-646. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.04.008>.
- [80] Zambare V. (2010). Solid state fermentation of *Aspergillus oryzae* for glucoamylase production on agro residues. *International Journal of Life Science*, 4, 16-25.
- [81] Chan González E. J. (2023). Valorización integral de la semilla de Ramón (*Brosimum alicastrum*) bajo el concepto de biorrefinería. Tesis maestría, CICY
- [82] González Colunga A. A., Sigala Laguna S. S., Tapia Solis M., Cruz M., Rodríguez Jasso R. M., Loredó A., Contreras Esquivel J. C. & Belmares R. (2021). Efecto de diferentes sustratos sobre la cinética enzimática de *Pleurotus ostreatus*. *Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica*. Vol. 9, No.49.
- [83] Sahnoun M., Kriaa M., Elgharbi F., Zouari Ayadi D., Bejar S. & Kammoun R. (2015). *Aspergillus oryzae* S2 alpha-amylase production under solid state fermentation: Optimization of culture conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*. Vol. 75, 73-80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.026>

- [84] Sharma V., Upadhyay L.S. & Vasanth D. (2020). Extracellular thermostable laccase-like enzymes from *Bacillus licheniformis* strains: Production, purification and characterization. *Applied Biochemistry Microbiology* 56, 420–432 <https://doi.org/10.1134/S0003683820040146>
- [85] Umar A. & Ahmed S. (2022). Optimization, purification and characterization of laccase from *Ganoderma leucocontextum* along with its phylogenetic relationship. *Scientific Reports* 12, 2416 <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06111-z>
- [86] Ding Z., Chen Y., Xu Z. Peng L., Xu G., Gu Z., Zhang L., Shi G. & Zhang K. (2014). Production and characterization of laccase from *Pleurotus ferulae* in submerged fermentation. *Annals of Microbiology* 64, 121–129 <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0640-y>
- [87] Vega Muñoz M. N. (2014). Expresión recombinante de una endoglucanasa del hongo *trametes versicolor* en *pichia pastoris*.
- [88] Linares Ramírez J. M., Luengas Barroso G., Mejía Campos J., Carrillo Díaz M. I., Tirado González D. N. & Miranda Romero L. A. (2013). Producción de celulasas por *trametes trogii* en rastrojo de maíz con y sin mazorca.
- [89] García Espejo C. M., Mamani Mamani M. M., Chávez Lizárraga G. A. & Álvare Aliaga, M. T. (2016). Evaluación de la actividad enzimática del *Trichoderma inhamatum* (BOL-12 QD) como posible biocontrolador. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 7(1), 20-32.
- [90] Balkan B. & Ertan F. (2005). Production and properties of α -amylase from *Penicillium chrysogenum* and its application in starchhydrolysis. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. Doi:10.1081/PB-200054740
- [91] Ertan F., Yagar H. & Balkan B. (2006) Some properties of free and immobilized α -amylase from *Penicillium griseofulvum* by solid state fermentation. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. Doi: 10.1080/10826060500388553.
- [92] Bhella R. S. & Altosaar I. (1985) Purification and some properties of the extracellular α -amylase from *Aspergillus awamori*. *Canadian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1139/m85-029>
- [93] Quintero Moreno M., Montoya Campuzano O. I. & Gutiérrez Sánchez P. A. (2009). Purification and characterization of α -amylase produced by *Bacillus* sp. BBM1.
- [94] Balkan B. & Ertan F. (2005). Production and properties of α -amylase from *penicillium chrysogenum* and its application in starch hydrolysis. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. Vol. 35, 169-78. DOI: 10.1081/PB-200054740
- [95] Shrestha P., Joshi B., Joshi J., Malla R. & Sreerama L. (2016). Isolation and physicochemical characterization of laccase from *ganoderma lucidum*-cdbl1 isolated from its native habitat in nepal. *Biomed Research International*. Vol. 2016, Issue 1, 3238909 <http://dx.doi.org/10.1155/2016/3238909>

- [96] Abdullah M. Ali E., Abd Ellafit & Abdel Razik E. (2020). Production, purification, characterization and immobilization of laccase from *phoma betae* and its application in synthetic dyes decolorization. Egyptian Journal of Botany. Vol. 60, Issue 1, 301-312. DOI: 10.21608/ejbo.2019.19226.1381
- [97] Goyat N., Kapoor R.K., Saharan B.S., Kapoor P., Kumari K. & Singh N. (2024). Production, purification and immobilization of laccase from *trametes versicolor* hbb 7328 for its role in decolorization of textile dyes. Indian Journal Microbiology. <https://doi.org/10.1007/s12088-024-01260-3>
- [98] Hamed A. A., Abd Elaziz A. M., Ghanem M. M. E., ElAwady M. E. & Abdel Aziz M. S. (2024). Production of laccase enzyme from *Curvularia lunata* MY3: purification and characterization. Folia Microbiologica 69, 221–234 <https://doi.org/10.1007/s12223-023-01088-2>
- [99] Bano S., Qader S. A. U., Aman A. Noman Syed M. & Azhar A. (2011). Purification and characterization of novel α -amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. AAPS PharmSciTech 12, 255–261 <https://doi.org/10.1208/s12249-011-9586-1>
- [100] Syed D. G., Agasar D. & Pandey A. (2009). Production and partial purification of α -amylase from a novel isolate *Streptomyces gulbargensis*. Journal of Industrial Microbiology Biotechnology 36, 189–194 <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0484-9>
- [101] Hamed A. A., Abd Elaziz A. M., Ghanem M. M. E. Elawady M. E. & Abdel Aziz M. S. (2024). Production of laccase enzyme from *Curvularia lunata* MY3: purification and characterization. <https://doi.org/10.1007/s12223-023-01088-2>
- [102] Saranya P., Jayanthi S. & Nagappan S. (2024). Production and characterization of extracellular laccase from *Bacillus aerius* SP3 and its application in dye decolorization. Biologia, Vol. 79, 1497-1511. <https://doi.org/10.1007/s11756-024-01619-3>
- [103] Goyat N., Kapoor R. K., Saharan B. S., Kapoor P., Kumari K. & Singh N. (2024). Production, purification and immobilization of laccase from *Trametes versicolor* HBB 7328 for its role in decolorization of textile dyes. Indian Journal of Microbiology. <https://doi.org/10.1007/s12088-024-01260-3>
- [104] Peng Wang C., Jia Y., Luo J., Chen B. & Pan C. (2024). Characterization of thermostable recombinant laccase F from *Trametes hirsuta* and its application in delignification of rice straw. Bioresource Technology, Volume 395, 130382. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130382>.
- [105] Moreira Braga D, Brugnari T., Isidoro Haminiuk C. W., Maciel G. M. (2024). Production and immobilization of laccases from monoculture and co-culture of *Trametes villosa* and

- Pycnoporus sanguineus* for sustainable biodegradation of ciprofloxacin. *Process Biochemistry*, Vol. 141, 132-143. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2024.03.012>.
- [106] Syed D. G., Agasar D. & Pandey A. (2009) Production and partial purification of α -amylase from a novel isolate *Streptomyces gulbargensis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, Vol. 36, 189-194 <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0484-9>
- [107] Abdul Manas N. H., Pachelles S, Mahadi N. M.& Illias R. M. (2014). The characterization of an alkali-stable maltogenic amylase from *Bacillus lehensis* G1 and improved malto-oligosaccharide production by hydrolysis suppression. *PLoS ONE* 9 (9): e106481. DOI: 10.1371/journal.pone.0106481.
- [108] Oquist Phillips M. P. (2017) Producción heteróloga y caracterización bioquímica de una α -amilasa maltogénica de *Lactobacillus plantarum* WCFS1. Universidad Complutense Madrid.
- [109] Fatoki A. & Onilude A. (2022). Characterization of alpha-amylase inhibitor from *Streptomyces xinghaiensis* AAI2 in solid substrate. *Scientific African*, Vol. 15(20):e01086. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2021.e01086>.
- [110] Mehta D. & Satyanarayana T. (2013). Biochemical and molecular characterization of recombinant acidic and thermostable raw-starch hydrolysing α -amylase from an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Volumes 85–86, Pages 229-238, ISSN 1381-1177, <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.08.017>.
- [111] Navada K.K. & Kulal A. (2022) Kinetic characterization of purified laccase from *Trametes hirsuta*: a study on laccase catalyzed biotransformation of 1,4-dioxane. *Biotechnology Letters*, Vol. 43(3), 613-626. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-03038-1>
- [112] Elsayed A. M., Mahmoud M., Abdel Karim G. S. A., Abdelraof M. & Othman A. M. (2023) Purification and biochemical characterization of two laccase isoenzymes isolated from *Trichoderma harzianum* S7113 and its application for bisphenol a degradation. *Microbial Cell Factories*, Vol 2,22(1):1. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-02011-z>
- [113] Li T., Wang H., Li J., Jiang L., Kang H., Guo Z., Wang C., Yang W, Liu F., Lu F. & Liu Y. (2020). Enzymatic characterization, molecular dynamics simulation, and application of a novel *Bacillus licheniformis* laccase. *International Journal of Biological Macromolecules*. Vol. 167, 1393-1405. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.093>
- [114] Umar A. & Ahmed S. (2022). Optimization, purification and characterization of laccase from *Ganoderma leucocontextum* along with its phylogenetic relationship. *Scientific Reports*, Vol. 12, 2416. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06111-z>

- [115] Sunil S. More, Renuka P. S., Pruthvi K., Swetha M., S. Malini & Veena S. M. (2011). Isolation, purification, and characterization of fungal laccase from *Pleurotus* sp. *Enzyme Research*, 248735. doi:10.4061/2011/248735. PMID: 21977312; PMCID: PMC3184503.
- [116] Sandoval Sánchez M. L., Reynoso López M. L., Fernández Villanueva I., Badillo Valencia J. M., Fuentes Estrada L. P. T., Camarena Martínez S. & Ruiz Aguilar G. M. (2024). Degradación de Boscalid mediante la actividad enzimática de lacasa por *Trametes versicolor*. Departamento de Ciencias Ambientales, DICIVA, CIS, Universidad de Guanajuato.
- [117] Valdés S., Garita C., Esquivel C. & Villegas L. R. (2020). Aislamiento y purificación de la enzima lacasa: evaluación de su potencial biodegradador en residuos agrícolas. *BioTecnología*, Vol. 24 No. 2.
- [118] Wang X., Kan G., Ren X., Yu G., Shi C., Xie Q., Wen H. & Betenbaugh M. (2018). Molecular cloning and characterization of a novel α -amylase from antarctic sea ice bacterium *Pseudoalteromonas* sp. M175 and its primary application in detergent. *BioMed Research International*, Issue 1 3258383. <https://doi.org/10.1155/2018/3258383>
- [119] Karimi M. & Biria D. (2016). The synergetic effect of starch and alpha amylase on the biodegradation of n-alkanes. *Chemosphere*, 152(), 166–172. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.02
- [120] Diaz de León Yanez S. (2018). Estudio del sistema lacasa-mediador producido por *trametes hirsuta* Bm2 en la decoloración de tintes industriales.
- [121] Kaur Chopra N. & Sondhi S. (2022). Biodegradation of indigo carmine dye by laccase from *Bacillus licheniformis* NS2324. *Defence Life Science Journal*, Vol. 7, No. 4. pp. 276-281, DOI:10.14429/dlsj.7.18040
- [122] Bialowas M., Kończak B., Chalupnik S., Kalka J. & Cempa M. (2024). Alginate-laccase beads in the decolourization of indigo carmine. *Archives of Environmental Protection* Vol. 50 no. 1 pp. 45–55. DOI:10.24425/aep.2024.149431
- [123] Staciaki da Luz F., Ferreira Bueno A., Nascimento Caetano R., Pinto Rodrigues P. R. & do Prado Banczek E. (2021). Enzymatic hydrolysis of cassava starch using barley malt amylases. *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry*, 13(3), 205-211. <http://dx.doi.org/10.17807/orbital.v13i3.1525>
- [124] Cuong Nguyen T., Chu Ky S., Nga Luong H. & Van Nguyen H. (2020). Effect of pretreatment methods on enzymatic kinetics of ungelatinized cassava flour hydrolysis. *Catalysts*, Vol. 10, 760. DOI:10.3390/catal10070760
- [125] Castaño Peláez H. I. (2020). Producción de etanol a partir de yuca fresca utilizando la estrategia de proceso HEFS (hidrólisis enzimática y fermentación simultáneas) usando

enzimas reductoras de viscosidad, Revista Politécnica, vol.16, no.31 pp.19-28. DOI: 10.33571/rpolitec.v16n31a2

- [126] Canul Santiago S. J. (2021). Tratamiento de una vinaza utilizando lacasas de *Trametes hirsuta* bm2 inmovilizadas en alginato de calcio y dióxido de silicio.
- [127] Caballero R. E., Jiménez V., Miranda M., Rovira D., González P. & Ramos Chue de Pérez J. (2021). Optimización de condiciones para la producción de lacasa por *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel y su aplicación en el biotratamiento de vinazas de caña de azúcar. Anales de Biología, (43), 27-37. <http://dx.doi.org/10.6018/analesbio.43.03>
- [128] Estrada Sperber N. (2017). Capacidad de degradación de compuestos fenólicos del complejo enzimático producido por *Pleurotus ostreatus*.
- [129] Tapia Tussell R., Pérez Brito D., Torres Calzada C., Cortés Velázquez A., Alzate Gaviria L., Chablé Villacís R. & Solís Pereira S. (2015). Laccase gene expression and vinasse biodegradation by *Trametes hirsuta* strain Bm-2. Molecules, Aug 19;20(8):15147-57. <https://doi.org/10.3390/molecules200815147>
- [130] España Gamboa E., Vicent T., Font X., Dominguez Maldonado J., Canto Canché B. & Alzate Gaviria L. (2017). Pretreatment of vinasse from the sugar refinery industry under non-sterile conditions by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor and its effect when coupled to an UASB 80 reactor. Journal of Biological Engineering, 11, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13036-016-0042-3>

ANEXOS
MEDIOS DE CULTIVO

Anexo 1. Papa-dextrosa-agar (PDA)

39 g del medio 1000 ml

Suspender 39 g del medio en 1 litro de agua destilada.

Disolver en agitación suave hasta homogenizar.

Esterilizar en autoclave en matraz con el doble de la capacidad del volumen realizado.

Enfriar a temperatura ambiente.

Vaciar en placas petri estériles.

*Siguiendo instrucciones del recipiente del medio

O en su defecto seguir las siguientes proporciones:

Reactivo	Cantidad
Almidón de papa soluble	4 g
Dextrosa	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Esterilizar en autoclave a 121 °C y 1 Kg/cm² durante 20 min y dosificar en cajas Petri bajo condiciones estériles dentro de campana con flujo laminar.

Anexo 2. YMPG

Reactivo	Cantidad
Almidón	10 g
Extracto de malta	10 g
Peptona de carne	2 g
<i>KH₂PO₄</i> (fosfato de potasio monobásico)	2 g
<i>MgSO₄·7H₂O</i> (sulfato de magnesio heptahidratado)	1 g
Tiamina	1 mg

Levadura	2 gr
Agar	20 gr
Agua destilada	1000 mL

Esterilizar en autoclave a 121 °C y 1 Kg/cm² durante 20 min y dosificar en cajas Petri bajo condiciones estériles dentro de campana con flujo laminar.

Anexo 3. Extracto de levadura-almidón-agar (ELAA)

Reactivo	Cantidad
Extracto de levadura	4 g
MgSO₄7H₂O (sulfato de magnesio heptahidratado)	0.5 g
K₄HPO₄ (hidrógeno-fosfato de potasio)	1 g
Agar	20 g
Almidón soluble	15 g
Agua destilada	1000 mL

Esterilizar en autoclave a 121 °C y 1 Kg/cm² durante 20 min y dosificar en cajas Petri bajo condiciones estériles dentro de campana con flujo laminar.

Anexo 4. Extracto de malta-agar (EMA)

Reactivo	Cantidad
Extracto de malta	20 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL

Esterilizar en autoclave a 121 °C y 1 Kg/cm² durante 20 min y dosificar en cajas Petri bajo condiciones estériles dentro de campana con flujo laminar.

Anexo 5. Mandels & Weber con Carboximetil celulosa (CMC)

Reactivo	Cantidad
KH_2PO_4 (fosfato de potasio monobásico)	2 g
CaCl_2 (cloruro de calcio)	0.3 g
Urea	0.3 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (sulfato de amonio)	1.4 g
FeSO_4 (sulfato de hierro)	5 mg
MgSO_4 (sulfato de magnesio)	0.3 g
MnSO_4 (sulfato de manganeso)	1.6 g
ZnSO_4 (sulfato de zinc)	1.4 mg
CoCl_4 (cloruro de cobalto)	2 mg
Glucosa	2 g
Carboximetil celulosa (cmc)	10 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL

Esterilizar en autoclave a 121 °C y 1 Kg/cm² durante 20 min y dosificar en cajas Petri bajo condiciones estériles dentro de campana con flujo laminar.

Anexo 6. Soluciones Amortiguadoras

➤ Ácido cítrico – Fosfato 0.1M (pH 4 y 4.5)

Para 1 litro

Reactivo	Cantidad
Fosfato de sodio dibásico heptahidratado (PM: 268.07 g/mol)	1.307 g
Fosfato de sodio monobásico monohidratado (PM: 137.99 g/mol)	13.13 g

Ajustar pH con ácido cítrico.

➤ **Acetato de sodio – Ácido acético 0.1M (pH 4.5 y 5)**

- Pesar 82.04 gr de acetato de sodio (o 136.08 gr si es trihidratado)
- Disolver el acetato de sodio en un vaso de precipitado en 500 mL de agua destilada
- Titular con ácido acético glacial hasta llegar al pH deseado (4.5 y 5 respectivamente)
- Aforar a volumen final de 1 litro.

Debido a que la solución realizada se encuentra a concentración 1M se procede a realizar una dilución 1:10 con agua destilada para obtener la solución a 0.1M.

➤ **Ácido cítrico – Citrato de sodio 0.1M (pH 5 y 5.5)**

pH 5 (para 1 litro)

Reactivo	Cantidad
Ácido cítrico monohidratado	350 mL
Citrato de trisodio dihidratado	650 mL

pH 5.5 (para 1 litro)

Reactivo	Cantidad
Ácido cítrico monohidratado	232.5 mL
Citrato de trisodio dihidratado	767.5 mL

Ajustar pH con HCl o NaOH.

➤ **Fosfatos 0.1M (pH 5.5 y 6)**

pH 5.5 y 6 (para 1 litro)

Reactivo	Cantidad
Cloruro de sodio (PM: 58.44 g/mol)	8 g
Cloruro de potasio (PM: 74.55 g/mol)	0.2 g
Fosfato de sodio dibásico (PM: 141.94 g/mol)	1.44 g
Fosfato de potasio monobásico (PM: 136.09 g/mol)	0.249

Ajustar al pH deseado con HCl o NaOH.