

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS DEPARTAMENTO DE INGENIERIA BIOQUÍMICA

TESIS "TRATAMIENTO FISICOQUÍMICO Y BIOLÓGICO DEL NEJAYOTE"

PRESENTA

M en I. Karina Jannet Vacio Muro

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

CO -TUTOR

Dr. Juan Jáuregui Rincón

CO-TUTOR

Dr. Juan Antonio Lozano Álvarez

ASESORA

Dra. Mónica Noel Sánchez González

Aguascalientes, Ags., noviembre de 2020.



CARTA DE VOTO APROBATORIO
INDIVIDUAL

M. EN C. JORGE MARTÍN ALFEREZ CHÁVEZ DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS BASICAS

PRESENTE

Por medio del presente como COTUTOR designado del estudiante KARINA JANNET VACIO MURO con ID 55778 quien realizó el trabajo tesis titulado: TRATAMIENTO FISICOQUÍMICO Y BIOLÓGICO DEL NEJAYOTE, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 19 de noviembre de 2020.

Juan Journal Rincon

c.c.p.- interesado

c.c.p.- Secretaria Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Agoya al Paugrado. Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad. Aprobado por: Depto. Control Escolar/Depto. Apoyo al Paugrado. Cádigo: 00-SEE-FO-67 Actualización: 01 Emisión: 17/85/19



M. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ

DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BASICAS

PRESENTE

Por medio del presente como COTUTOR designado de la estudiante KARINA JANNET VACIO MURO con ID 55778, quien realizó el trabajo de tesis titulado: TRATAMIENTO FISICOQUÍMICO Y BIOLÓGICO DEL NEJAYOTE, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones recomendadas han sido atendidas adecuadamente. Por lo que me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que ella pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Sin más por el momento, me pongo a sus órdenes y aprovecho para enviarle un cordial saludo.

Atentamente

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags. a 20 de noviembre de 2020.

Dr. Juan Antonio Lozano Álvarez.

I let Joyn G

Co-tutor de tesis

c.c.p. Interesado

c.c.p. Coordinación del Doctorado en Ciencias Biológicas.



CARTA DE VOTO APROBATORIO INDIVIDUAL

M. EN C. JORGE MARTÍN ALFEREZ CHÁVEZ DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS BASICAS

PRESENTE

Por medio del presente como COTUTOR designado del estudiante KARINA JANNET VACIO MURO con ID 55778 quien realizó el trabajo tesis titulado: TRATAMIENTO FISICOQUÍMICO Y BIOLÓGICO DEL NEJAYOTE, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 19 de noviembre de 2020.

Dra. Mónica Noel Sánchez González ASESORA DE TESIS

c.c.p.- Interesado c.c.p.- Secretaria Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Poegrada. Revisado por: Depto. Control Socalar/Depto. Gestión de Calidad. Aprobado por: Depto. Control Socalar/ Depto. Apoyo al Poegrado. Código: DO-SEE FO-67 Actualización: ÓS Emissión: 17/05/19



Campus de Ingenierias y Ciencias Exactas

Periférico Nte. Km. 33.5, Tablaje Catastral 13615, Col. Chabumá de Hidalgo Inn, Mérida, Yuc., Méx.

C.P. 97203, Telx. 946-09-83, 946-09-89, Fax. (999) 946-09-94.

http://www.ingquimica.uady.mx





TESIS TESIS TES





DICTAMEN DE LIBERACION ACADEMICA PARA INICIAR LOS TRAMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aa:

NOMBRE:	KARINA JANNET VACIO MURO						55778
PROGRAMA:			RADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS	LGAC (del posgrado):	QUÍMICA Y BIORREMEDIACIÓN		
TIPO DE TRAI	BAJO:	(X) Tesis		() Trabajo práctico		
TITULO:		(//	,	"TRATAMIENTO	FISICOQUÍMICO Y BIOLÓGICO DEL NEJAYOTE"		
	CIAL (señalar el im	pacto	logrado):				
				nixtamalización del maíz, pr	tratamiento de aguas residuales provenier roceso que puede ser aplicable a recuperar sumo humano en actividades agrícolas		uas
INDICAR SI/	NO SEGÚN CORRE	SPONE	DA:				
Elementos para	la revisión académica	a del tra	abajo de tesis o trabajo práctico:				
SI			is LGAC del programa de posgrado				
SI			desde un enfoque multidisciplinario				
SI	_		y orden lógico del tema central con o				
SI SI			respuesta a las preguntas de investig				
SI			el trabajo son de gran relevancia cie		un ei area		
SI			ına aportación original al conocimient los problemas prioritarios del país	to de su area			
NA NA	Generó transferecia de						
El egresado cui	- mple con lo siguiente.						
SI			Reglamento General de Docencia				
SI	-			curriculares ontativos actividades	complementarias, estancia, predoctoral, etc)		
	-		rios del comité tutoral, en caso de los				
SI NA	Cuenta con la carta de			posgrados proresionales si dene sor	o tatorpodra liberar solo el tator		
SI	Coincide con el título y						
SI	Tiene congruencia con						
SI	Tiene el CVU del Conac						
SI	Tiene el artículo acepta	ado o pu	ıblicado y cumple con los requisit <mark>os ir</mark>	stitucionales (en caso que proceda)			
En caso de Tes	- is por artículos científi	icos pui	blicados:				
SI			s articulos según el nivel del program	a			
SI	El estudiante es el prin	ner auto	r				
SI	El autor de correspond	encia es	s el Tutor del Núcleo Académico <mark>Básic</mark>	0			
SI	En los artículos se ven	reflejado	os los objetivos de la tesis, ya que so	n prod <mark>ucto de este trabao</mark> de investig	gación.		
SI			ulos de la tesis y se presentan en el ic				
SI	La aceptación o publica	ición de	los artículos en revistas indexadas de	e alto impacto		-	
Con base a esto	s criterios, se autoriz	a se cor	ntinúen con los trámites de titul	ación y programación del exame	en de grado	Sí SI	
				(-1	A au	No	
				FIRMAS	T CB		
Elaboró:				204 1100	NCC ICACITATION A		
* NOMBRE Y FIRI	MA DEL CONSEJERO SE	GUN LA	LGAC DE ADSCRIPCION:	DRA. NORIMA AP	NGÉ ICA CHÁVEZ VELA		
NOMBRE Y FIRM	A DEL SECRETARIO TÉC	NICO:			No.		
				DRA. ALMA LILIÁI	N SUERBARO BARRERA		
* En caso de conflicto	o de intereses, firmará un re	visor mier	mbro del NAB de la LGAC correspondiente di	stinto al tutor o miembro del comité tutora	il, asignado por el Decemo.		
Revisó:				A	() ()		
NOMBRE Y FIRMA	A DEL SECRETARIO DE INV	/ESTIGAC	CIÓN Y POSGRADO:	DO DRA MA	YDEE MARTINEZ RUVALCABA		
Autorizó:							
NOMBRE Y FIRM	A DEL DECANO:			M. en C. JORGE M.	ARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ		
En cumplimiento con	el trámite para el De el Art. 105C del Reglamento uimiento de los alumnos.			unciones del Consejo Académico: Cuidar l	a eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F	las funciones	del Secretario

Rev. Int. Contam. Ambie. 36 (3) 497-515, 2020 https://doi.org/10.20937/RICA.53185

REMOCIÓN DE CONTAMINANTES DEL NEJAYOTE CON ALGINATO Y QUITOSANO

Removal of nejayote contaminants with alginate and chitosan

Karina Jannet VACIO-MURO¹, Juan Antonio LOZANO-ÁLVAREZ¹, Mónica Noel SÁNCHEZ-GONZÁLEZ², Norma Angélica CHÁVEZ VELA¹, Eduardo TORRES-RAMÍREZ³ y Juan JÁUREGUI-RINCÓN¹*

¹ Departamento de Ingeniería Bioquímica, Universidad Autónoma de Aguascalientes. Av. Universidad 940 Cd. Universitaria, C.P. 20131 Aguascalientes, Aguascalientes México

² Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Periférico Norte, kilómetro 33.5 Tablaje Catastral 13615, Chuburná de Hidalgo Inn, C.P. 97203 Mérida, Yucatán

³ Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Edificio 103-E, Ciudad Universitaria, colonia San Manuel, C.P. 72570 Puebla, México

*Autor para correspondencia: jjaureg@correo.uaa.mx

(Recibido marzo 2018, aceptado noviembre 2019)

Palabras clave: nixtamalización, biopolímeros, tratamiento de aguas, materia orgánica

RESUMEN

El nejayote es el agua residual proveniente del proceso de nixtamalización que se caracteriza por poseer un pH alcalino (pH > 10) así como altas concentraciones de materia orgánica disuelta y suspendida (DQO > 10 200 mg/L), por lo que se considera uno de los efluentes más contaminantes vertidos a diferentes cuerpos de agua. Se probó la efectividad del alginato de sodio y el quitosano para disminuir los contaminantes del nejayote. La aplicación de alginato de sodio involucró la adsorción y gelificación con la que se atrapó material suspendido y disuelto, y el uso del quitosano implicó adsorción y precipitación. Se realizó la aplicación de estos polímeros de manera separada y secuencial. En el tratamiento independiente, el alginato resultó más eficiente que el quitosano, obteniéndose una remoción de DQO de 61.43 ± 0.24 % y de 59.74 ± 0.36 %, respectivamente. En el tratamiento secuencial, la eficiencia de remoción de la DQO con el tratamiento alginato-quitosano resultó ser mayor (70.19 ± 0.85 %) que la del tratamiento quitosano-alginato (67.21 \pm 0.24 %). Por su parte, la cantidad de sólidos totales presentes después del procesamiento se encuentra dentro del límite máximo permisible establecido en las normas oficiales mexicanas NOM-002-SEMARNAT-1996 y NOM-001-SEMARNAT-1996, permitiendo su descarga al sistema de alcantarillado urbano o municipal e incluso puede ser utilizada en suelo para riego agrícola. El uso de estos polímeros biodegradables es una opción viable que tiene potencial para escalarse a nivel industrial, contribuyendo a la depuración de descargas de la industria de la nixtamalización y en beneficio del ambiente.

Key words: nixtamalization, biopolymers, water treatment, organic material

ABSTRACT

Nejayote is the residual water from the nixtamalization process characterized by an alkaline pH (pH > 10) as well as high concentrations of dissolved and suspended



AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo para realizar los estudios de posgrado, a través del otorgamiento de la beca No. 97268.

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes por su apoyo económico para la realización de la tesis.

Al Doctor Juan Jáuregui Rincón, quién me dio la oportunidad de trabajar con él, siempre dispuesto a enseñarme con paciencia y amor al trabajo.

Al Doctor Juan Antonio Lozano Álvarez, quién siempre estuvo presente en mi formación.

A la Doctora Mónica Noel Sánchez González, por sus consejos que me ayudaron a crecer profesionalmente.

A la Doctora Magdalena Samanta Ramos Gómez, por su apoyo técnico que evitó retrasos en la realización de los experimentos.

A la Doctora Norma Angélica Chávez Vela por sus consejos y por animarme siempre a seguir adelante.

A mis papás que siempre me dieron aliento a seguir adelante.

A mi hermana Wee por no dejarme sola nunca, por apoyarme en el trabajo experimental.

A mi hermana Claudia, quién siempre contagia el carácter y la fuerza para hacer las cosas y nunca desistir.

A mis abuelos que en paz descansen.

Chicas del Doctorado, gracias por inspirarme

Luis, gracias por motivarme.

DEDICATORIA

A mis hijos: Karina Yunuen, Enrique y Jesús Abel, quienes aguantaron mis múltiples ausencias.

A mis padres y a mis hermanas quienes estuvieron apoyándome y motivándome SIEMPRE.



TESIS TESIS TESIS TESIS

INDICE GENERAL

		Página
IN	DICE DE FIGURAS	4
IN	DICE DE TABLAS	6
RE	ESUMEN	7
ΑE	BSTRACT	9
1.	INTRODUCCIÓN	11
	1.1. Composición química del maíz.	11
	1.2. Nixtamalización.	13
	1.3. Problemática ambiental.	16
	1.4. Alginato.	18
	1.4.1. Capacidad de gelifica <mark>ción del alginato.</mark>	18
	1.4.2. Remoción de conta <mark>minantes por alginat</mark> o.	20
	1.5. Quitosano.	21
	1.5.1. Remoción de contaminantes por quitosano.	22
	1.6. Biorremediación.	23
	1.6.1. Lignocelulosa.	24
	1.6.2. Hongos utilizados en biorremediación.	25
	1.6.3. Mecanismos de degradación por hongos ligninolíticos.	27
	1.6.3.1. Ciclo catalítico de las peroxidasas.	28
	1.6.3.2. Lignino peroxidasa (LiP).	30
	1.6.3.3. Manganeso peroxidasa (MnP).	32
	1.6.3.4. Lacasa.	34
	1.6.3.5. Celulasas.	36

	1.6.3.6. Xilanasas.	39
	1.6.4. Uso de hongos ligninolíticos en biorremediación.	40
2.	JUSTIFICACIÓN	43
3.	HIPÓTESIS	43
4.	OBJETIVOS	43
	4.1. Objetivo general.	43
	4.2. Objetivos particulares	44
5.	METODOLOGÍA	44
	5.1. Obtención de la muestra de nejayote.	44
	5.2. Caracterización del nejayote.	45
	5.3. Tratamiento fisicoquímico.	45
	5.3.1. Remoción de contaminantes con alginato de sodio soluble.	45
	5.3.2. Remoción de contaminantes con quitosano.	45
	5.3.2.1. Tratamiento <mark>con quitosano en polv</mark> o (insoluble).	46
	5.3.2.2. Tratamiento <mark>con quitosano solu</mark> ble.	46
	5.3.3. Tratamiento combinado.	46
	5.4. Tratamiento biológico.	47
	5.4.1. Prueba de crecimiento en agar-nejayote	47
	5.4.2. Preparación del inóculo.	47
	5.4.3. Inoculación del nejayote.	48
	5.4.4. Condiciones de tratamiento biológico del nejayote.	48
	5.4.4.1. Efecto de la cantidad de inóculo y la cepa de hongo ligninolítico.	48
	5.4.5. Biodegradación del nejayote completo no estéril por Bjerkandera adusta (4312).	49
	5.4.6. Tratamiento biológico posterior al fisicoguímico.	49

	5.5. Análisis Estadístico.	50
	5.6. Medición de actividad enzimática.	50
	5.6.1. Actividad lacasa.	50
	5.6.2. Actividad Lignino peroxidasa (LiP).	51
	5.6.3. Actividad Manganeso peroxidasa (MnP).	51
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
	6.1. Caracterización del nejayote.	52
	6.2. Tratamiento fisicoquímico.	54
	6.2.1. Remoción de contaminantes con alginato de sodio (ALG).	54
	6.2.2. Tratamiento con QUIT soluble.	57
	6.2.3. Tratamiento con QUIT en pol <mark>vo (in</mark> soluble).	59
	6.2.4. Tratamiento secuencial.	62
	6.3. Tratamiento Biológico.	65
	6.3.1. Efecto del pH en el crecimiento de hongos ligninolíticos	65
	6.3.2. Efecto de la cantida <mark>d de inóculo y la ce</mark> pa de hongo ligninolítico.	67
	6.3.3. Biodegradación de nejayote completo no estéril por <i>Bjerkandera</i> adusta 4312.	70
	6.4. Tratamiento biológico posterior al fisicoquímico.	78
7.	CONCLUSIONES	80
8.	REFERENCIAS	82
9.	APÉNDICE .	102

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Grano de maíz y sus partes.	12
Figura 2. Monómeros que conforman el alginato (Donati et al. 2005).	19
Figura 3. Modelo de egg box (Donati y Paoletti 2009).	20
Figura 4. Diagrama de obtención del quitosano por desacetilación química de la quitina (Escorcia et al. 2009).	22
Figura 5. Estructura de la lignocelulosa. La celulosa, la hemicelulosa y la lignina forman estructuras llamadas microfibrillas, organizadas en macrofibras que regulan la estabilidad de la pared celular de las plantas (Gurdo 2016).	25
Figura 6. Ciclo catalítico de hemoenzimas en presencia de peróxido de hidrógeno (Sánchez 2009).	29
Figura 7. Forma de acción del AV como mediador en la transferencia de carga	
en la catálisis de la lignino peroxidasa (Modificado de Wong 2009).	32
Figura 8. Ciclo catalítico de la MnP (Hofrichter 2002).	33
Figura 9. Sitios activos de la Lacasa (Morozova et al. 2007).	35
Figura 10. Mecanismo del ciclo catalítico de la lacasa propuesto por Torres et al. 2003.	36
Figura 11. Organización de las fibrillas de celulosa conformadas por dos	
regiones diferentes: ordenadas (región cristalina) y desordenadas (región	
amorfa) (Martínez-Anaya et al. 2008).	37
Figura 12. Mecanismo de acción de las celulasas (Montoya-Barreto 2008).	38
Figura 13. Estructura del xilano y enzimas involucradas en su degradación.	39
Figura 14. Porcentaje de remoción de DQO (a), fenoles (b), azúcares reductores (c) y sólidos totales (d) en función de la concentración de ALG y del pH (p \leq 0.05).	55
Figura. 15. Porcentaje de remoción de contaminantes en función de la concentración de OLUT soluble (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 v. 1, % (p/v); a) DOO b)	

Fenoles, c) Azúcares reductores y d) Sólidos Totales (<i>p</i> ≤ 0.05).	58
Figura 16. Porcentaje de remoción de: DQO(a), Fenoles (b), Azúcares reductores (c) y Sólidos Totales (d) en función de la concentración de QUIT en polvo $(0.1, 0.5, 1.0 \text{ y } 1.5 \text{ % (p/v)})$ y el pH $(4, 8 \text{ y } 12)$ $(p \le 0.05)$.	61
Figura 17. Prueba de crecimiento en agar-nejayote. Lado izquierdo agar-nejayote completo, a la derecha agar-nejayote filtrado.	66
Figura 18 . Remoción de la DQO en cultivo sumergido de nejayote completo no estéril con pH 4.5. Tratamiento con <i>Bjerkandera adusta</i> 4312. Tratamiento por 30 días. Nejayote control (muestra de nejayote completo no estéril sin inocular) ($p \le 0.05$).	72
Figura 19 . Remoción de la cantidad de azucares reductores en cultivo sumergido de nejayote completo no estéril con pH 4.5. Tratamiento con <i>Bjerkandera adusta</i> 4312. Tratamiento por 30 días. Nejayote control (muestra de nejayote completo no estéril sin inocular) ($p \le 0.05$)	73
Figura 20. Cantidad de fenoles totales durante el tratamiento con el hongo <i>Bjerkandera adusta</i> 4312 en muestras de nejayote completo no estéril (<i>p</i> ≤ 0.05).	74
Figura 21. Cantidad de sólidos totales remanente durante el tiempo de tratamiento con el hongo <i>Bjerkandera adusta</i> 4312 en muestras de nejayote completo no estéril ($p \le 0.05$).	75
Figura 22. Variación de la dureza del nejayote con respecto al tiempo. Nejayote completo no estéril tratado con <i>Bjerkandera adusta</i> 4312 ($p \le 0.05$).	76
Figura 23. Concentración de proteína soluble en tratamiento con el hongo <i>Bjerkandera adusta</i> 4312 en muestras de nejayote completo no estéril ($p \le 0.05$).	77

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Composición fisicoquímica del nejayote (Valderrama-Bravo et al. 2012).	18
Tabla 2. Cantidad de reactivos para medir actividad lacasa.	50
Tabla 3. Cantidad de reactivos para medir actividad LiP.	51
Tabla 4. Cantidad de reactivos para medir actividad MnP.	52
Tabla 5. Resultado de la caracterización de la muestra de nejayote.	53
Tabla 6. Porcentaje de remoción de contaminantes en tratamiento con QUIT soluble, ALG y tratamiento secuencial.	63
Tabla 7. Crecimiento de diferentes microorganismos en diferentes valores de pH en medio agar-nejayote.	65
Tabla 8. Efecto de la cantidad de inóculo y tipo de hongo (<i>Trametes troggi</i> 8156 y <i>Bjerkander adusta</i> 4312) en la remoción de contaminantes en muestras de nejayote estéril y no estéril, en un tiempo de tratamiento de 27 días a 28°C (<i>n</i> =3).	
Tabla 9. Porcentaje de remoción de contaminantes en tratamiento biológico, fisicoquímico secuencial y tratamiento combinado.	79

RESUMEN

El nejayote es el agua residual proveniente del proceso de nixtamalización que se caracteriza por poseer un pH alcalino, así como valores elevados de concentración de materia orgánica disuelta y suspendida. Es por ello que se considera dentro de los efluentes líquidos más contaminantes vertidos en diferentes cuerpos de agua. El uso de biopolímeros ha demostrado su efectividad en el tratamiento de distintos tipos de aguas residuales, como las generadas en las empresas agroindustriales y de las industrias del petróleo y textil. En este trabajo se realizaron tres tipos de tratamiento: fisicoquímico, biológico y combinado (fisicoquímico-biológico).

El tratamiento fisicoquímico consistió en la utilización de dos polisacáridos, el alginato y el quitosano, de manera independiente y secuencial, para disminuir la carga de contaminantes en el nejayote. El alginato (ALG) resultó ser más eficiente en la remoción de la carga orgánica que el quitosano (QUIT). Por otro lado, el tratamiento secuencial ALG-QUIT resultó más efectivo en la disminución de los contaminantes contenidos en el nejayote comparados con el tratamiento QUIT-ALG. Ambos biopolímeros son completamente biodegradables, por lo que se consideran una tecnología ambientalmente amigable que se podría aplicar a nivel industrial.

Para el tratamiento biológico se usaron las cepas fúngicas Bjerkandera adusta 4312, Trametes versicolor 8272, Phanerochaete chrysosporium 4521 y Trametes trogii 8156. La muestra de nejayote a tratar se ajustó a las condiciones óptimas de pH para el crecimiento del hongo y se mantuvo la temperatura constante (28 °C) en una cámara bioclimática. La cepa que removió con mayor eficiencia la DQO fue Bjerkandera adusta 4312. El tratamiento se realizó en matraces Erlenmeyer de 2,000 mL y las condiciones donde se observó un mejor desempeño por parte del hongo fueron las siguientes: pH 4.5 tamaño del inóculo del 10 % (p/v) de biomasa (base húmeda) y nejayote sin esterilizar. La presencia de agentes antioxidantes disueltos en el nejayote como el ácido ferúlico, ácido cinámico, aminoácidos como la lisina, metionina, cisteína, limitaron la medición de la actividad enzimática de la lacasa, manganeso peroxidasa y lignino peroxidasa. La eficiencia del tratamiento biológico en cultivo sumergido resultó mostrar una diferencia significativa en la disminución de la DQO hasta el onceavo día y se logró disminuir hasta un 52 % de la DQO en el nejayote completo inoculado con Bjerkandera adusta 4312. Por otro lado, en el nejayote control se removió 29.8 ±01.71 % de la DQO. La presencia de organismos alcalinófilos propios del nejayote, si bien remueven materia orgánica del

nejayote, el tratamiento con el hongo disminuye el tiempo de tratamiento y aumenta la remoción de la DQO.

El tratamiento combinado (biológico seguido del fisicoquímico y viceversa) mejoró la eficiencia de remoción de la DQO, concentración de fenoles totales, azúcares reductores y de sólidos totales. Sin embargo, resultó más eficiente aplicar primero un tratamiento fisicoquímico (ALG-QUIT) seguido del tratamiento biológico con *Bjerkandera adusta* 4312, que removió el 86 % de la DQO, mientras que al realizar primero el tratamiento biológico, seguido del tratamiento fisicoquímico, se alcanzó una remoción menor de la DQO (79.45 %).

ABSTRACT

The nejayote is the residual water coming from the nixtamalization process that is characterized by having alkaline pH as well as high concentration values of dissolved and suspended organic matter. Consequently, it is considered within the most polluting liquid effluents discharged to different water bodies. The use of biopolymers has proven its effectiveness in the treatment of different types of wastewater, such as agroindustry, oil and textile industries. In this work three types of treatment, physicochemical, biological and combined (physicochemical-biological), were performed.

For the physicochemical treatment, two polysaccharides, alginate and chitosan, were used to reduce the pollutant load of the nejayote. The application of both polymers was performed independently and in a sequential manner. Alginate (ALG) proved to be more efficient in removing organic matter than chitosan (QUIT) and sequential treatment ALG-QUIT was more effective in reducing contaminants contained in nejayote compared to QUIT-ALG treatment. Both biopolymers are completely biodegradable, so their application is considered as an environmentally friendly technology, in such a manner that it can be applied at industrial level.

Bjerkandera adusta 4312, Trametes versicolor 8272, Phanerochaete chrysosporium 4521 y Trametes trogii 8156 fungal strains were used for biological treatment. B. adusta was more effective for the treatment, also showed growth in a wider range of pH. The sample of nejayote to be treated was adjusted to the optimum pH value for fungus growth and the constant temperature (28 °C) was maintained in a bioclimatic chamber. It was observed that the amount of inoculum was less significant than the pH value. Treatment was given in 2000 mL Erlenmeyer flasks and the conditions applied to nejayote without any filtration treatment were the following: pH 4.5, inoculum size: 10 % p/v of biomass (wet base), and unsterilized nejayote. The presence of antioxidant agents dissolved in nejayote such as ferulic acid, cinnamic acid, amino acids such as lysine, methionine, and cysteine, limited the measurement of the enzymatic activity of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase. The efficiency of the biological treatment in submerged culture resulted with a significant difference in the decrease of COD value until the eleventh day and it was possible to decrease up to 52% of the COD in the complete nejayote inoculated with Bjerkandera adusta 4312. While in the control nejayote, it was removed only 29.8 ± 01.71% from original COD value. Although the alkalinophil organisms typical of the nejayote residue reduce the organic matter in a considerable manner, the treatment with this fungus decreases the treatment time and increases the COD removal.

Combined treatment (biological followed by physicochemical and vice versa) improved the efficiency of COD removal, concentration of total phenols, reducing sugars and total solids. However, it was more efficient to apply first a physicochemical treatment (ALG-QUIT) followed by biological treatment with *Bjerkandera adusta* 4312, which removed 86 % from the original COD value. While when the physicochemical process followed the biological treatment, a lower COD removal value (79.45 %) was achieved.



1. INTRODUCCIÓN

El maíz es un producto del campo mexicano, históricamente asociado al desarrollo de las culturas mesoamericanas y es la base de su supervivencia desde hace más de 3,500 años (Paredes-López et al. 2008). En la actualidad forma parte primordial de la dieta de los mexicanos, aproximadamente el 75% del consumo es en forma de tortilla (Gutiérrez-Cortez et al. 2010; Paredes López et al. 1998). Debido al fenómeno de la globalización, la popularidad de la tortilla se ha ampliado de manera considerable en nuestros días. Por ejemplo, en Estados Unidos y España (Durán-de Bazúa et al. 2007), China, Australia, Malasia e Inglaterra (GRUMA 2018).

Existen dos tipos de establecimientos que producen la masa para hacer productos derivados del maíz para consumo humano, estos son: los molinos tradicionales de nixtamal que producen de 500 a 2000 kg/día y las fábricas de harina de maíz nixtamalizado que producen de 200 a 600 ton/día.

En los últimos años ha aumentado el consumo de maíz para la producción de tortillas y botanas, ya que son consumidas en todo el mundo (Rodríguez *et al.* 2008).

El INEGI (2004) reportó un total de 63,459 establecimientos dedicados a la elaboración de tortillas y molienda de nixtamal, de las cuales 518 son de mayor escala ya que producen más de 1500 kg/día. Por otro lado, para la elaboración de harina de maíz se reportan 48 industrias de las cuales 30 son de gran escala (producen de 500-600 ton/día).

Actualmente GRUMA es el mayor productor de maíz nixtamalizado en México y en 112 países en donde ha sido notable su expansión en América, Europa, Asia y Oceanía, a través de sus marcas globales Maseca y Misssion (GRUMA 2018).

1.1. Composición química del grano del maíz.

El genotipo de la variedad, el ambiente y las condiciones de siembra del maíz, varían la composición química y por consiguiente el valor nutritivo que presenta este grano (Paredes *et al.* 2009). Las partes principales del grano de maíz difieren considerablemente en su composición química. La cubierta seminal o pericarpio (figura 1) se caracteriza por un elevado contenido de fibra cruda, aproximadamente el 87%, la que a su vez está formada fundamentalmente por hemicelulosa (67%), celulosa (23%) y lignina (0,15%). El endospermo, en cambio, contiene un nivel elevado de almidón (87%)

TESIS TESIS TESIS

(Bartolo-Pérez et al. 1999; FAO, 1993). En un maíz normal, el gránulo de almidón contiene aproximadamente 27% de amilosa y 73% de amilopectina. En promedio, el contenido de proteína del maíz es de 10% y una buena parte se encuentra en el germen del grano. No obstante, tanto el endospermo como el pedicelo llegan a tener hasta un 9% de proteínas, clasificadas en cuatro tipos de acuerdo a su solubilidad en agua: albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en soluciones salinas), prolaminas, (solubles en soluciones alcohólicas) y glutelinas (solubles en soluciones alcalinas o ácidas diluidas).

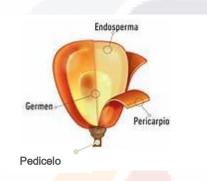


Figura 1. Grano de maíz y sus partes.

En el maíz, las prolaminas se encuentran principalmente en el endospermo que también son llamadas ceínas, mientras que las glutelinas se encuentran en la matriz proteínica de esta misma estructura; ambas proteínas constituyen cerca del 90% de las proteínas del grano completo. Por el contrario, las del germen son casi en su totalidad albúminas y globulinas.

La calidad nutritiva del maíz está definida en buena medida por la calidad de sus proteínas y ésta a su vez, la establece el contenido de los llamados aminoácidos esenciales. Se ha encontrado que la ceína como la glutelina son deficientes en lisina y triptófano (Paredes *et al.* 2009).

En cuanto a la presencia de lípidos, se encuentran principalmente en el germen del grano de maíz y representan alrededor del 3-18 % del peso total del grano. Dichos lípidos están compuestos por ácidos grasos insaturados (82 %), entre ellos destacan poliinsaturados como el ácido oleico, alcanzando un valor medio del 24% y en menor medida el ácido linoléico. Por su parte los ácidos grasos saturados (18% de los lípidos) como el palmítico

y esteárico se encuentran en un 11% y 2%, respectivamente (Retes-Mantilla *et al.* 2015; Salazar *et al.* 2014; Alezones *et al.* 2010).

Las vitaminas presentes en el maíz amarillo, contienen principalmente dos que son solubles en grasa, el β -caroteno o provitamina A y α -tocoferol o vitamina E. Las vitaminas solubles en agua como tiamina y riboflavina se encuentran sobre todo en la capa de aleurona del grano de maíz, y en menor medida en el germen y el endospermo.

Los minerales se encuentran en un 78% en el germen del grano, de los cuales los componentes inorgánicos más abundantes son el fósforo, el azufre y en menor medida el zinc y el hierro que dependen del tipo de maíz. La cantidad de calcio es de apenas 30 ppm, esta cantidad es baja comparada con los requisitos mínimos necesarios para una alimentación adecuada (800 mg en niños y 1, 200 mg en adultos) (Paredes *et al.* 2009).

1.2. Nixtamalización.

La nixtamalización procede del náhuatl *nixtli*-cenizas y *tamalli*-masa, es la preparación alcalina de pulpa de maíz. Este proceso se da en tres pasos: primero se pone en contacto al maíz con una solución saturada de hidróxido de calcio, luego se cuece de 50 a 90 min. Posteriormente el maíz se somete a un proceso de remojo durante 12-18 h (Argun y Argun 2018). En esta etapa se lleva a cabo la difusión del agua y el calcio en el grano (Ruiz-Gutiérrez *et al.* 2008). Posteriormente el agua de remojo, conocida como nejayote (del náhuatl: "nextli, cenizas de cal; "áyoh", caldo o cosa aguada y "atl", agua), se retira y el maíz se lava dos o tres veces con agua para remover el exceso de calcio y materia orgánica obtenida en el proceso, sin retirar el pericarpio ni el germen del maíz. De ésta manera se obtiene el llamado maíz nixtamalizado o nixtamal, que llega a tener hasta 45% de humedad, factor importante para la calidad de productos obtenidos con la masa.

Paredes et al. (2009) mencionan que el porcentaje de humedad óptimo para producir tortillas de alta calidad y con buena vida de anaquel, es de 50 a 55%. La temperatura relativamente alta y el pH alcalino durante la preparación, facilita la transformación de diferentes componentes del grano como proteínas, lípidos y almidón. Esta transformación incluye la degradación del pericarpio, pérdida de proteínas solubles como globulina y albúmina principalmente de bajo peso molecular que están contenidas en el germen (Janve et al. 2012). Por otro lado, se han reportado que ocurren pérdidas importantes de

tiamina, niacina, riboflavina, grasas y fibra en el grano de maíz durante el proceso de nixtamalización (Díaz-Montes *et al.* 2016).

En este mismo tenor, parte del pericarpio, germen y fracciones del endospermo, se pierden inevitablemente en el agua de desecho (Valderrama-Bravo *et al.* 2012). Gutiérrez-Cortés *et al.* (2010) mencionan que es trascendente que en el proceso se mantenga un equilibrio entre la cantidad de pericarpio que se pierde y del que se queda en el grano, ya que se ha visto que durante el cocimiento alcalino del maíz, la mayor parte del calcio es retenido en el pericarpio (Díaz-Motes *et al.* 2016; Bartolo-Pérez *et al.* 1999).

Gutiérrez-Uribe et al. (2010) señalan que la temperatura de cocción y el tiempo de reposo son variables que afectan las propiedades microestructurales y morfológicas del germen, favoreciendo la difusión de agua y calcio a éste. Así, el germen fija una considerable cantidad de calcio, ya que durante el proceso se saponifican las grasas presentes en el germen para formar sales de calcio de ácidos alifáticos que determinan la especificidad del calcio en las propiedades de la masa y la tortilla. Con los cambios estructurales que ocurren en el grano, se adquieren propiedades reológicas que determinan la aceptabilidad del producto final (Ruiz-Gutiérrez, et al. 2010).

La transformación de grandes cantidades de maíz, efectuada mediante el proceso de nixtamalización y molienda requiere de grandes cantidades de agua. En el método tradicional, el consumo en la etapa de la cocción y lavado del maíz es de tres partes de agua por una de maíz, agua que aproximadamente es absorbida en un 14-48% por el maíz durante la hidrólisis alcalina del pericarpio del grano (Gutiérrez-Uribe 2010). En consecuencia, este proceso genera grandes cantidades de nejayote que se caracterizan por poseer altos valores de pH, temperatura y concentración de materia orgánica disuelta y suspendida, proveniente del propio maíz (Rojas-García et al. 2012; Durán de Buzúa et al. 2007; Pulido et al. 1987).

Valderrama-Bravo *et al.* (2012) mencionan que durante la nixtamalización se ocupan 75 L para procesar 50 kg de maíz y por lo menos estos mismos 75 L se producen de agua residual. Salmerón-Alcocer *et al.* (2003) calcularon que una planta con capacidad de 600 ton de maíz al día genera entre 1500 y 2000 m³ de nejayote. Rojas-García *et al.* (2012) estimaron que el volumen anual de nejayote en México era alrededor de 14.4 millones de m³. Esta cantidad de aguas residuales, coloca a la industria del maíz nixtamalizado para

consumo humano dentro de los cinco principales líquidos contaminantes que se presentan en el país (Monroy-Rivera 2008).

Actualmente en México, la regulación en el tratamiento del nejayote y su disposición se aplica solamente a la producción industrial de productos nixtamalizados. La Norma oficial mexicana (NOM-001-ECOL-1996), que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales, en aguas y bienes nacionales; y la Norma oficial mexicana (NOM-002-ECOL-1996), que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal, según corresponda. Por lo tanto, no existe regulación de los procesos de nixtamalización en pequeños molinos, los cuales descargan sus aguas residuales sin tratar al sistema de alcantarillado (Valderrama-Bravo *et al.* 2012).

Los desechos de la nixtamalización del maíz poseen características que pueden ser muy útiles para producción de biomasa, debido al potencial que presentan por su abundancia, disponibilidad y bajo costo, y que mediante su explotación se pueden obtener compuestos y productos con rendimiento industrial (de valor agregado). Estos desechos pueden ser utilizados como fuente de carbono para el crecimiento de hongos y bacterias, y en la producción de enzimas de importancia industrial como xilanasas, feruloil esterasas, amilasas y glucoamilasas (Quiñones-Pérez et al. 2008).

El nejayote está compuesto principalmente por pericarpio del maíz, sólidos en solución entre los que se incluyen arabinoxilanos, almidones, proteínas, dextrinas, calcio y compuestos fenólicos antioxidantes, como el ácido *p*-cumárico y el ácido ferúlico, por citar algunos (Ramírez-Romero *et al.* 2013). Además, presenta un rango de temperatura que oscila entre 40-70°C y un pH que se encuentra entre 12 y 14, razón que hace al nejayote un agua residual con un alto grado de dificultad para su tratamiento (Orozco *et al.* 2008). Por su parte Valderrama-Bravo *et al.* (2012) mencionan que el nejayote es un efluente altamente contaminante debido a la carga de materia orgánica e inorgánica que genera una DBO₅ de 190-7,875 mg/L, una DQO con valores entre 1,670 – 21,280 mg/L y una alcalinidad total de 180 – 3,260 mg de CaCO₃/L.

TESIS TESIS TESIS

1.3. Problemática ambiental.

En México se ha tratado de instrumentar legislaciones para la regulación de la disposición y tratamiento del nejayote, ya que solo se aplica a la elaboración de productos nixtamalizados. Por lo tanto, no hay regulación en los procesos tradicionales de nixtamalización de pequeños molinos, lo que muestra que este proceso es una importante fuente de contaminación del agua (Valderrama-Bravo et al. 2012; Ramírez-Romero et al. 2007). Estas descargas provocan que la turbiedad de los ecosistemas acuáticos receptores de dichas descargas, disminuya la entrada de los rayos solares necesarios para los procesos fotosintéticos. Por otro lado, el aumento de nutrientes convierte a los ecosistemas acuáticos en sistemas altamente eutróficos, lo que provoca la disminución del oxígeno disuelto en el cuerpo de agua haciendo difícil la supervivencia de los organismos presentes (Wetzel 1995).

La problemática ambiental que se genera de este proceso, es difícil de resolver debido a la complejidad de estos efluentes. El problema del tratamiento del nejayote se ha abordado desde el punto de vista de la disminución de la contaminación ambiental. Al respecto se han estudiado diferentes procesos para el tratamiento del nejayote. Pulido et al. (1987) realizaron pruebas durante ocho años a nivel laboratorio con los sistemas tradicionales de tratamiento biológico empleados en ingeniería sanitaria, entre ellos los de lodos activados, reactores empacados aerobios y anaerobios y reactores biológicos rotatorios, resultando este último el sistema más eficaz para su depuración. Este grupo de investigadores mostró que los reactores biológicos rotatorios de 15 y 50 litros podrían ser usados con éxito, por lo que hicieron comparaciones con un reactor de 250 litros para tratar de modelar matemáticamente el proceso. Posteriormente, se escalaron estos reactores a nivel planta piloto (2,500 litros) con el objetivo de encontrar un modelo que permitiera un proceso a nivel semi-industrial y para construir equipos de tratamiento de aguas residuales, tanto para molinos de nixtamal como para las fábricas de harina. Al inicio del estudio el nejayote tenía valores de la DQO de 25,000 mg/L, sólidos suspendidos totales (SST) de 20,000 mg/L y pH de 11.5. La eficiencia en la disminución de la materia orgánica expresada como DQO fue del 54.62% en el reactor de 15 litros y de 70.97% en el reactor de 50 litros.

Por otra parte, se han generado tecnologías alternas a la nixtamalización tradicional en las que se reduce la producción de nejayote y el consumo de agua. Un ejemplo es el estudio realzado por Durán de Buzúa *et al.* (2007) donde proponen un sistema de

tratamiento anaeróbico-aeróbico del nejayote, compacto y de fácil operación, con el que se obtienen bioproductos que pueden utilizarse como fuente de energía para el proceso de nixtamalización o bien alimento para peces, dándole así un valor agregado a este tratamiento. El sistema consiste en aplicar un tratamiento anaerobio después de un tratamiento primario (filtración, sedimentación), en donde se transforma la mayor cantidad de la materia biodegradable disuelta en biogás (metano y CO₂). Después de este procedimiento se emplea un tratamiento aerobio con el cual se logra remover trazas de sulfitos y otros compuestos indeseables en el agua tratada y convierte la materia orgánica remanente en biomasa rica en proteínas. Esta propuesta logra transformar el 80% de material biodegradable disuelto en biogás rico en metano para ser utilizado como fuente de energía en el proceso.

En otro estudio realizado por Valderrama-Bravo *et al.* (2012), se establecieron las mejores condiciones de operación de membranas de filtración intermitente a presión constante para el nejayote, con el fin de reducir el contenido de sólidos totales y dar una alternativa de reusar el líquido residual. Los resultados muestran que la filtración permite reducir casi el 50 % de la materia orgánica del nejayote (remoción de la DQO= 45 %). En la Tabla 1 se muestra la caracterización de agua de nejayote antes y después de la filtración.

En la recuperación de componentes útiles para la industria, ha llamado la atención el nejayote. Castro-Muñoz *et al.* (2015) realizaron estudios a nivel laboratorio con mecanismos de ultrafiltración, usaron membranas de 100 kDa para recuperar carbohidratos logrando una recuperación de 46.6 % de carbohidratos totales. Este procedimiento permitió disminuir de manera considerable la turbidez (95.3 %), la cantidad de sólidos totales (22 %), de calcio (14.7 %) y de carbono orgánico total (29.3 %). Una de las desventajas de esta metodología, es que se ocluye totalmente la membrana con el primer tratamiento del nejayote, sin embargo, puede ser parte del tratamiento y disminuir contaminantes en el efluente.

Tabla 1. Composición fisicoquímica del nejayote (Valderrama-Bravo *et al.* 2012)

	Nejayote	Filtrado	
рН	11.39 ± 0.49	10.53 ± 0.32	
Humedad (%)	97.72 ± 0.26	98.90 ± 0.21	
Proteína cruda (%)	0.113 ± 0.007	0.112 ± 0.027	
Fibra (%)	0.581 ± 0.013	0.271 ± 0.014	
Carbohidratos (%)	0.862 ± 0.016	0.379 ± 0.031	
Calcio (mg/L)	1, 526.21 ± 26.53	712.40 ± 11.53	
Dureza (mg/L)	6, 768.67 ± 0.46	3, 847.48 ± 15.20	
Cenizas (%)	0.767 ± 0.014	0.3345 ± 0.0182	
Conductividad eléctrica (µS/cm)	4, 510.12 ± 14.14	4, 030.23 ± 11.10	
DBO ₅ (mg/L)	14, <mark>218</mark> .75 ± 309.36	6, 212.25 ± 123.74	
DQO (mg/L)	4 <mark>0, 058.</mark> 14 ± 82,22	21, 783.68 ± 115.35	
Sólidos sedimentables (mL/L)	> 100.00	< 100.00	
Sólidos suspendidos tot (mg/L)	8, 342.25 ± 25.3	140.6 ± 8.7	

1.4. Alginato.

El alginato es un biopolímero que se obtiene de las algas pardas marinas de la familia de las feofíceas. Es un componente de la pared celular que forma un gel conteniendo iones de sodio, calcio, magnesio, estroncio y bario. La función principal de este biopolímero es proporcionar fuerza y flexibilidad al alga (Alistar *et al.* 2006).

1.4.1. Capacidad de gelificación del alginato.

El alginato es la sal de ácido algínico, un polisacárido aniónico natural formado por largas cadenas de bloques con enlace homopolimérico β (1 \rightarrow 4) de β -D-manuronato (M) y cadenas lineales de enlaces α (1 \rightarrow 4) de residuos de α -L-guluronato (G). Las fórmulas de las dos unidades constituyentes se muestran en la Figura 2.

Acido α -(1 \rightarrow 4)-L-Guluronico

Acido β-(1 → 4)-D-Manurónico

Figura 2. Monómeros que conforman el alginato (Donati et al. 2005).

La composición del ácido algínico es variable y puede estar formada por bloques homopoliméricos de residuos de G o M (poli G y poli M, respectivamente) y bloques heteropoliméricos de M y G alternados (M-G-M-G). El contenido relativo de cada uno de estos bloques depende del tipo de alga y, en menor medida, de las condiciones de su crecimiento (Jáuregui-Rincón et al. 2009). Los grupos funcionales con los que se forman puentes de hidrógeno al momento de entrelazarse las cadenas del polímero son los grupos carboxilo e hidroxilo. Las cadenas entrecruzadas permiten la captación de iones metálicos. Los estudios de carga superficial han demostrado que la disponibilidad de estos lugares depende del pH (Díaz de Apodaca et al. 2007). La estructura que forman dos cadenas de alginato con los iones calcio en el eje no es plana, sino que adquiere una forma helicoidal, que se asemeja a una "caja de huevos", donde los iones divalentes "son representados por los huevos" y los residuos de guluronato forman la "caja" que contiene a dichos iones, de ahí el nombre propuesto por Rees (1969) del "egg box" para describir la formación del gel de alginato de algún ion divalente (Figura 3). Inicialmente se creía que solo con cadenas de G se lograba la interacción Ca+2-alginato para formar geles, llenando los espacios entre grupos carboxílicos y grupos hidroxilo con este ion. Recientemente se ha visto que no solo los bloques de G, sino también los bloques MG pueden tener interacciones entre Ca+2- alginato (Alistar et al. 2005).

La forma que adopta la macromolécula depende de su composición, así se ha demostrado que los bloques de M originan zonas casi planas, con estructura semejante a una cinta, mientras que las de G presentan una estructura con entrantes y salientes (Alistar et al. 2005).

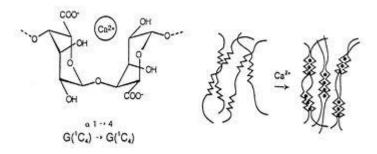


Figura 3. Modelo de egg box (Donati y Paoletti 2009).

Las propiedades físicas del alginato dependen de la proporción relativa de los diferentes tipos de bloques, el que contiene una alta proporción de G, produce geles muy rígidos que se forman muy rápido. Por el contrario, cuando el alginato está formados por residuos de manuronato, se forma un gel más suave y elástico (Alistar *et al.* 2005).

Las sales de cationes monovalentes como el Na⁺, K⁺, NH₄⁺ del ácido algínico son solubles en soluciones acuosas a pH mayor de 3.5. También son solubles en mezclas de agua y solventes orgánicos. Por el contrario, el ácido algínico y sus sales con cationes polivalentes como el aluminio, bario, estroncio, calcio, son insolubles en agua (Alistar *et al.* 2006; González 2009; Jáuregui-Rincón *et al.* 2009). Debido a los valores de pKa de los residuos de manuronato (pK_{a(M)} = 3.38) y del guluronato (pK_{a(G)} = 3.65), la carga y estabilidad de este polisacárido pueden variar según el pH de la disolución en que se encuentre (Jáuregui-Rincón *et al.* 2009). Si se reduce rápidamente el pH de 6 a 2 se produce un precipitado gelatinoso de ácido algínico (Jáuregui-Rincón *et al.* 2009). Sin embargo, valores de pH bajos y muy elevados, promueven la hidrólisis de este biopolímero y en consecuencia la disminución en su peso molecular, disminuyendo la viscosidad de la disolución.

1.4.2. Remoción de contaminantes por alginato.

El estudio para la mejora de los tratamientos de aguas residuales ha estado en constante desarrollo para encontrar cada vez mejores alternativas de tratamiento. Recientemente Lozano-Alvarez *et al.* (2009) y Jáuregui-Rincón *et al.* (2009) han encontrado que el uso de biopolímeros como la xantana y el alginato arroja porcentajes aceptables de remoción de colorantes, en el que el valor de la remoción dependerá del tipo de colorante y el biopolímero utilizado. El estudio que realizaron fue sobre la adsorción de amarillo disperso

54 (DY54) con estos biopolímeros. Encontraron que el sistema alginato-DY54 logró una mayor remoción de colorante cuando disminuyó el pH a valores menores de 10.8, éste sistema logró una remoción del 83.9 %. En colorantes tipo azo Lozano-Alvarez *et al.* (2019) encontraron que moléculas de alto peso molecular cargadas positivamente son removidos con mayor eficiencia, esto permite predecir el tipo de colorante con estructura azo que puede ser removido con alginato de forma eficiente.

Thripathy et al. (2001) sintetizaron un polímero de alginato injertado con poliacrilamida el cual se utilizó como floculante para disminuir la turbiedad de aguas residuales provenientes de las minas de carbón. El estudio se realizó en cinco minas de la India, compararon su eficiencia con la de cinco polímeros comerciales y encontraron que este polímero es un floculante efectivo para disminuir la turbiedad en este tipo de aguas residuales.

En otros estudios, el alginato se ha utilizado para inmovilizar agentes adsorbentes presentes en cascaras de naranja y plátano para eliminar metales pesados, facilitando así su separación. Este método resultó efectivo para eliminar plomo, cobre y zinc presentes en aguas residuales de la industria de manufactura y metal-mecánica (Y-Ling *et al.* 2010). Estudios similares fueron realizados por Park y Chee (2004), quienes utilizaron alginato modificado, éste en forma ramificada formando cápsulas y películas con capacidad de adsorber metales pesados de aguas residuales, resultando útil ya que fue eficiente en 10 ciclos de adsorción-desorción.

Retes-Pruneda *et al.* (2014) encontraron que el uso de alginato de sodio resultó efectivo en el tratamiento fisicoquímico de vinazas tequileras para la remoción de sólidos totales, DBO_5 y DQO, observándose que con una concentración al 3% de alginato y a un valor de pH = 9 se obtuvo una mayor capacidad de remoción de contaminantes.

Debido a la capacidad de adsorción y de atrapamiento entre las moléculas entrelazadas de alginato, es posible su utilización para la remoción de contaminantes en el agua de desecho de la industria del nixtamal (nejayote).

1.5. Quitosano.

La quitina se encuentra distribuida ampliamente en la naturaleza, después de la celulosa, es el polímero natural más abundante. Tiene una tasa de reposición tan alta en la biosfera que permite suponer que representa un recurso renovable importante. Las principales

fuentes de quitina son: exoesqueletos de crustáceos, alas de insectos y paredes celulares de hongos y algas (Hernández Cocoletzi *et al.* 2009; Lárez-Velázquez 2006). Al desacetilar la quitina (figura 4) de forma química o enzimática se obtiene el quito sano tal como se muestra en la figura siguiente (Suarez-Meraz *et al.* 2016; Escorcia *et al.* 2009;

Guibal y Roussy 2007).

Figura 4. Diagrama de obtención del quitosano por desacetilación química de la quitina (Escorcia et al. 2009).

El quitosano es un polisacárido lineal que se compone por dos tipos de unidades estructurales que se distribuyen de manera aleatoria a lo largo de la cadena polimérica, que son la N-acetil-D-glucosamina y la D-glucosamina, las cuales se encuentran unidas entre sí por enlaces del tipo β (1→4) glicosídicos (Rodríguez-Pedrozo *et al.* 2009; Bolto y Gregory 2007; No y Meyers 1989). Las propiedades fisicoquímicas como el carácter ácido-base, solubilidad y cationicidad, están relacionadas con los grupos amino presentes en la estructura del quitosano, esto le permite formar enlaces con cationes metálicos en soluciones cercanas a la neutralidad y también interactuar con soluciones aniónicas en condiciones ácidas (Guibal y Roussy 2007).

1.5.1. Remoción de contaminantes por quitosano.

El quitosano ha sido ampliamente utilizado como coagulante-floculante en el tratamiento de aguas residuales que contienen tinta generada del proceso de elaboración de envases (Roussy *et al.* 2005), en el tratamiento de aguas residuales de la industria del petróleo (Caldera *et al.* 2011) y en la remoción de colorantes y de iones metálicos tóxicos (Ríos-Donato *et al.* 2013; Perju y Dragan 2010; Cheung *et al.* 2009; Guibal *et al.* 2006; Annanduray 2002).

Campo-Vera *et al.* (2018) Probaron quitosano de bajo peso molecular solo y combinado con extracto acuoso de cáscara de naranja para remover materia orgánica de aguas residuales, logrando disminuir la turbiedad en un 79 %.

En otros estudios, para el tratamiento de aguas residuales, Budnyak *et al.* (2014) probaron que el quitosano inmovilizado sobre superficie de sílice mejora su capacidad de adsorción para micro cantidades de iones de: Zn (II), Cd (II), Pb (II), Cu (II), Fe (III), Mo (VI) y V (V) en medio acuoso y en un rango de pH 1 a pH 8; además obtuvieron resultados de alta adsorción en poco tiempo de contacto.

Como agente coagulante-floculante, Caldera *et al.* (2015) probaron su eficiencia en el tratamiento de aguas residuales de la industria avícola y petrolera que poseen una alta turbidez, también lo hicieron de forma artificial, es decir, prepararon un agua residual en el laboratorio. Por medio de un proceso de coagulación con quitosano en muestras de agua residual de la industria avícola lograron una eficiencia en la remoción de la DQO de 71 – 81 % y de la turbidez del 77-87 %, mientras que en aguas de la industria petrolera removieron solo el 60 % de la DQO y 90-95 % de turbidez.

Suárez-Meraz *et al.* (2016) realizaron procesos de coagulación-floculación en aguas de desecho de la industria de la nixtamalización (nejayote) y lograron remover hasta un 80 % de la turbidez. El potencial z de coloides del nejayote y las propiedades del quitosano, como el peso molecular, el grado de desacetilación, puentes de hidrógeno y fuerzas de vander Waals explicaron el proceso de coagulación y por consiguiente la eficiencia de dicho proceso. Utilizaron la carga positiva del quitosano para neutralizar las fuerzas negativas del nejayote; encontraron que a pH 6 el quitosano de bajo peso molecular presentó un valor del potencial zeta de +9.8 con capacidad de neutralizar la superficie cargada de los coloides del nejayote de potencial zeta igual a -6.71. Estas condiciones cambiaron con quitosano de mayor peso molecular y se ajustó disminuyendo el pH.

1.6. Biorremediación.

La capacidad de los microorganismos de convertir compuestos complejos a sustancias elementales y los contaminantes a compuestos no tóxicos se refiere a la biodegradación, que de este modo permite restablece el flujo en los ciclos biogeoquímicos (Sodhi 2000).

La biorremediación es un método eficaz para eliminar o neutralizar contaminantes del agua o del suelo (Kahraman 2003; Reddy y Matew 2001). En ella se involucran diversos

organismos, sin embargo, los hongos a diferencia de las bacterias, han demostrado mayor tolerancia a concentraciones altas de contaminantes. Específicamente los hongos de la podredumbre blanca de la madera, son microorganismos que desempeñan un papel clave como reguladores del ciclo del carbono. Además, toleran valores de pH más bajos que las bacterias, razón por la que han sido muy estudiados bajo condiciones de laboratorio (Evans y Hedge 2001).

1.6.1. Lignocelulosa.

La pared celular de las plantas está formada por lignocelulosa que es el principal y más abundante componente de la biomasa producida por la fotosíntesis. Está conformada por celulosa, hemicelulosa y lignina, la composición y porcentajes de los polímeros varían entre las especies de plantas, incluso entre la edad y la etapa de crecimiento.

La celulosa es el biopolímero más abundante de la naturaleza, ya que forma parte de la estructura biológica de los vegetales. Está formada por monómeros de glucosa que están unidos por enlaces glucosídicos β-1,4, forman grandes cadenas lineales llamadas microfibrillas que se unen entre sí, por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals intramoleculares, esto forma una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática (Medina-Morales *et al.* 2011; Cuervo *et al.* 2009).

La hemicelulosa es un polímero complejo de heteropolisacáridos conformado por diferentes polímeros tales como: pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (glucosa, manosa y galactosa) y ácidos urónicos como 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico. El componente hemicelulósico principal de algunos materiales vegetales como maderas duras son los xilanos y en maderas suaves el glucomanano. Este polímero posee un peso molecular más bajo que la celulosa y contiene ramificaciones con cadenas laterales cortas de azúcares diferentes fácilmente hidrolizables (Medina-Morales *et al.* 2011; Martínez *et al.* 2005).

La lignina es un polímero aromático, heterogéneo, ramificado, amorfo y tridimensional donde definitivamente no existe ninguna unidad repetida (Basaure 2005). Está formada por alcoholes aromáticos (alcohol *p*-cumarílico, alcohol *p*-coniferílico y alcohol sinapílico) que dan soporte, rigidez, impermeabilidad y protección a los polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa) y es altamente resistente a la degradación química y biológica,

dando como resultado su baja biodisponibilidad (Cuervo 2009; Arora *et al.* 2005; Pérez 2002). En la figura 5 se muestra la estructura de la lignocelulosa, es decir, la asociación que existe entre la celulosa y la hemicelulosa con la lignina.

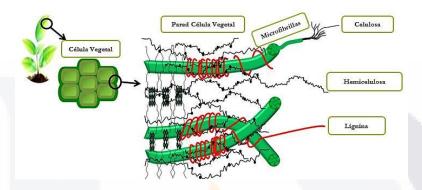


Figura 5. Estructura de la lignocelulosa. La celulosa, la hemicelulosa y la lignina forman estructuras llamadas microfibrillas, organizadas en macrofibras que regulan la estabilidad de la pared celular de las plantas (Gurdo 2016).

Existen dos tipos de sistemas enzimáticos extracelulares: los que producen hidrolasas que degradan la celulosa y la hemicelulosa (celulasas y hemicelulasas), y los que despolimerizan la lignina por reacciones de oxidación (peroxidasas y lacasas) (Pérez *et al.* 2002).

1.6.2. Hongos utilizados en biorremediación.

La principal relevancia de los hongos de la podredumbre blanca, está en su habilidad por degradar una gran variedad de compuestos como hidrocarburos aromáticos poliaromáticos (PAHs), benceno/tolueno/etilbenceno/xileno (BTEX) y sustancias aromáticas sintéticas como los clorofenoles (Quintero *et al.* 2011; Torres *et al.* 2003; Harvey y Thurston 2001).

Además, gracias a la extensión de sus hifas, pueden alcanzar contaminantes que no están biodisponibles para otros organismos. Estos hongos requieren de sustratos lignocelulósicos para su crecimiento. Existen tres grupos de hongos que tienen la capacidad de degradar o modificar la lignina, éstos son: los hongos de la podredumbre

café, hongos de la podredumbre blanda y hongos de la podredumbre blanca de la madera (Arora 2004).

Los hongos de la podredumbre café pertenecen a la subdivisión de los basidiomicetos, éstos solamente modifican la lignina por desmetilación, degradan la celulosa y hemicelulosa. El sistema principal de oxidación es la generación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y iones Fe⁺². Estos hongos están limitados a la generación de iones oxhidrilo que oxidan la celulosa y hemicelulosa, oxidando muy poco a la lignina, únicamente contribuyen a la hidroxilación aromática y al rompimiento de los anillos. Tienen preferencia por sustratos de coníferas (gimnospermas) que son de madera blanda y dejan una madera residual de color café y quebradiza a menudo en piezas secas. Un ejemplo de este grupo, es *Serpula lacrymans*, que se propaga rápidamente y es uno de los organismos más destructivos de este tipo de sustratos.

Los hongos de la podredumbre blanda pertenecen a las subdivisiones de los *Ascomicetes* y *Deuteromicetes*, aunque son capaces de degradar inmediatamente la celulosa y la hemicelulosa, solo modifican la lignina. Estos penetran la pared secundaria de la madera formando cavidades en las cuales pueden propagarse. Sin embargo, a través de la madera no lo hacen tan fácilmente ya que sus enzimas no se difunden libremente a través de ésta. Ejemplos de estos organismos son: *Chaetomium sp., Ceratocystis sp., y Phialophora sp.*

Los hongos de la podredumbre blanca también son llamados hongos ligninolíticos (HL), ya que son los únicos que se conoce que pueden descomponer la lignina, aunque ésta no es su única fuente de carbono y energía. La degradación de la lignina los habilita para tener acceso a la celulosa y hemicelulosa, su principal fuente de carbono y energía (Arora 2004; Pérez et al. 2002). Poseen un alto poder de degradación de la lignocelulosa con la liberación de enzimas no específicas que les provee de habilidades para degradar una amplia variedad de contaminantes.

En la naturaleza, los HL son basidiomicetos comunes en bosques de pino y encino. Su nominación procede de su capacidad de mineralización de la lignina en CO₂ y H₂O y sus derivados que le da a la madera un aspecto blanquecino (Dávila 2006; Arora 2001). Estos hongos realizan una función natural esencial en la conversión de lignina, la cual es un polímero polifenólico heterogéneo que es degradado por oxidación. El reciclaje de lignina por hongos de la pudrición blanca, es un factor fundamental del ciclo del carbono en los

bosques, una de las mayores reservas de carbono orgánico del suelo. Estos hongos tienen capacidad de producir una o más enzimas ligninolíticas extracelulares que son la lignina peroxidasa (LiP), Manganeso peroxidasa (MnP) y Lacasa (Lac), enzimas responsables de la degradación de la lignina y con mayor importancia y aplicación industrial (Pant y Adholeya 2007; Pérez et al. 2002; Gadd 2001).

1.6.3. Mecanismos de degradación por hongos ligninolíticos.

Estudios realizados en los años setenta con HL, comprobaron que con la degradación de la lignina se obtenían productos que provenían de la ruptura oxidativa de anillos aromáticos (Kirk y Chang 1975), por lo que se pensó que las oxigenasas extracelulares podían estar involucradas en la transformación de la lignina. Posteriormente descubrieron una ligninasa capaz de oxidar y despolimerizar la lignina y compuestos modelo, cuya actividad enzimática dependía del peróxido de hidrógeno (H₂O₂), además compartía algunas características con las hemoproteínas transportadoras de oxígeno y que era en realidad una peroxidasa. A esta enzima se le denomina ahora como lignino peroxidasa (LiP) (Glenn y Gold 1985). A partir de este hallazgo, se encontró la producción de dos hemoperoxidasas más; la manganeso peroxidasa (MnP) que oxida el Mn+2 a la especie oxidante Mn+3 (Glenn y Gold 1985) y a la peroxidasa versátil (PV) que se ha encontrado en los géneros *Pleurotus y Bjerkandera*. Esta enzima conjuga las propiedades catalíticas de LiP y MnP (Heinfling *et al.* 1998; Mester y Field 1998).

Como ya se ha mencionado, los hongos de la podredumbre blanca de la madera degradan la lignina para acceder a la hemicelulosa y a la celulosa, los cuales son sus verdaderos sustratos primarios. Estos sustratos también les permiten mantener una adecuada producción de enzimas en procesos de biorremediación (Quintero *et al.* 2006). El metabolismo ligninolítico generalmente denominado "sistema de degradación de lignina" es inducido por deficiencia o limitación de nutrientes, principalmente nitrógeno y carbono (Quintero 2011). La acción de este sistema es estrictamente extracelular y en él intervienen un grupo de hemoproteinas extracelulares denominadas enzimas peroxidasas (Tirado-González *et al.* 2015; Smith y Veitch 1998).

Además de estas peroxidasas, se detectó la producción de una fenol oxidasa denominada lacasa (Lac). Esta enzima reduce el oxígeno molecular a agua, y a través de la utilización de ciertos compuestos redox puede ser capaz de ampliar su espectro de sustratos,

logrando así la oxidación de porciones no fenólicas de la lignina (Bourbonnais y Paice 1990).

El patrón de actividad de estas enzimas es específico del género y especie de hongo de la pudrición blanca involucrado, algunos excretan la LiP, la MnP y no la Lac, ó la MnP, la Lac y no la LiP, etc. Estos hongos también producen otras enzimas extracelulares que están indirectamente asociadas con la mineralización de lignina: como la glioxal oxidasa y la superóxido dismutasa que cataliza la disminución del superóxido en oxígeno y peróxido que es necesario para la actividad de la LiP y la MnP; mientras, otras enzimas fúngicas funcionan como enlace entre las rutas de mineralización de la lignocelulosa, como la glucosa oxidasa, la aril alcohol oxidasa, la celobiosa quinona oxidorreductasa y la celobiosa deshidrogenasa, según se reporta en la literatura (Pointing 2001; Leonowicz *et al.*1991).

La síntesis fúngica de la Lacasa, LiP y la MnP se realiza bajo una alta tensión de oxígeno, en agitación o cuando los hongos de la podredumbre blanca se cultivan en medio sólido. Estas enzimas son inespecíficas y se inducen en condición limitante de nutrientes, como la fuente de nitrógeno (Bertrant *et al.* 2013; Christian *et al.* 2005). Este complejo enzimático inespecífico fúngico extracelular, tiene potencial en la eliminación de xenobióticos con estructura química similar a la lignina (Pointing 2001) tales como: aromáticos, nitroaromáticos, aromáticos policíclicos, herbicidas, pesticidas, detergentes, clorofenoles y colorantes (D´Annibale *et al.* 2005; Demir 2004; Moldes *et al.* 2003; Scheel *et al.* 2000).

Actualmente los hongos de la podredumbre blanca, así como sus enzimas se utilizan en la eliminación de contaminantes xenobióticos solubles e insolubles, con resultados mejores que con bacterias (Chan-Cupul *et al.* 2016; Shah y Nerud 2002; Cameron *et al.* 2000).

1.6.3.1. Ciclo catalítico de las peroxidasas.

Las enzimas peroxidasas como la lignino peroxidasas (LiP) y la manganeso peroxidasa (MnP), contienen un grupo prostético (hemo), siendo este, su sitio activo. Esta es la razón por la que también son llamadas hemoenzimas. Éstas utilizan el peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones para catalizar la transformación de una amplia variedad de sustratos.

TESIS TESIS TESIS TESIS

El ciclo catalítico de estas enzimas en presencia de peróxido de hidrógeno se muestra en la figura 6. El grupo hemo reacciona primero con una molécula de peróxido de hidrógeno la cual quita dos electrones al sitio catalítico, uno oxida el Fe(III) a Fe(IV) y el otro electrón es sustraído de la porfirina y el hueco generado es estabilizado por su deslocalización en el anillo porfirínico. Durante esta reacción el peróxido de hidrógeno se reduce a agua mientras la enzima es oxidada y se forma el compuesto I.

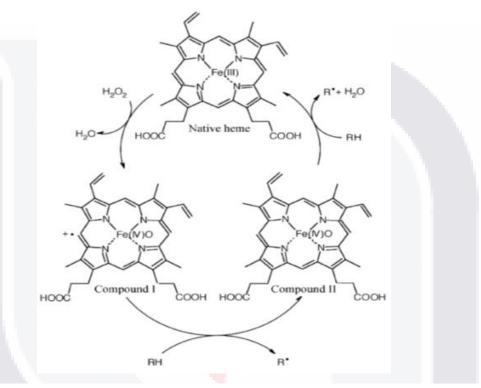


Figura 6. Ciclo catalítico de hemoenzimas en presencia de peróxido de hidrógeno (Sánchez 2009).

Así el compuesto I requiere ser oxidado al necesitar recuperar los electrones perdidos, reacciona con una molécula de sustrato (RH), extrayendo un electrón. De ésta manera es oxidado el sustrato y se transforma en un radical (R*) y el anillo porfirínico recupera el electrón, de ésta forma se reduce formando el compuesto II, al que aún le falta al Fe(IV) recuperar un electrón y poder regresar a su estado nativo. Es por eso que reacciona con otra molécula de sustrato y le sustrae un electrón, lo cual permite pasar de Fe(IV) a Fe(III). Como resultado de la reducción del compuesto II, la enzima regresa al estado férrico correspondiente (a la forma nativa de la enzima), con una concomitante oxidación de otra molécula del sustrato y producción de agua (Arora 2004; Torres *et al.* 2003).

ESIS TESIS TESIS TESIS

1.6.3.2. Lignino peroxidasa (LiP).

La LiP (1.11.1.14) es una glicoproteína de peso molecular de 38 - 43 kDa, oxida compuestos fenólicos y aromáticos no fenólicos. Son hemoproteinas secretadas por el metabolismo secundario de los hongos ligninolíticos. Se pueden generar isoenzimas con similares pesos moleculares, tiene 1 mol de hierro protoporfirínico IX por mol de enzima, su punto isoeléctrico se encuentra entre 3.2 - 4.0 (Edwards *et al.* 1993; Poulos *et al.* 1993).

La actividad de la LiP es dependiente del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para poder llevar a cabo reacciones de oxidación, la reacción que cataliza es 1,2-bis (3,4-dimetoxifenil) propano-1,3-diol + $H_2O_2 \rightarrow 3$,4-dimetoxibenzaldehido (veratraldehido) + 1-(3,4-dimetoxifenil) etano-1,2diol + H_2O . Es capaz de oxidar compuestos fenólicos generando radicales fenoxi. Sin embargo, debido a su alto potencial redox y pH bajo óptimo, es capaz de oxidar sustratos aromáticos no fenólicos que no pueden ser oxidados por otras peroxidasas (Pérez *et al.* 2002).

El centro catalítico de esta enzima es similar a otras peroxidasas (Arora 2004; Cai y Tien 1991). Los diferentes estados de oxidación del hierro a lo largo del ciclo catalítico se encuentran localizados por encima y por debajo del plano que ocupa el grupo hemo, en los denominados respectivamente lados distal y proximal en referencia a las dos histidinas axiales, una de las cuales actúa como quinto ligando del hierro (Wariishi y Gold 1990). Los residuos de aminoácidos del sitio activo de la LiP son homólogos a los de otras peroxidasas; sin embargo, a diferencia de otras, no se observa dependencia del pH para la reacción de la enzima con H₂O₂ para formar el Compuesto I que es altamente oxidante.

El mecanismo de reacción que sigue la LiP es la siguiente:

$$\label{eq:LiP} \begin{split} \text{LiP}(\text{Fe}^{+3})\text{P} + &\text{H}_2\text{O}_2 \ \to \ \text{LiP-I}(\text{Fe}^{+4} = \text{O})\text{P}^\circ + \text{H}_2\text{O} \\ \\ \text{LiP-I}(\text{Fe}^{+4} = \text{O})\text{P}^\circ + \text{R} \to \ \text{LiP-II}(\text{Fe}^{+4} = \text{O})\text{P} + \text{R}^\circ \\ \\ \text{LiP-II}(\text{Fe}^{+4} = \text{O})\text{P} + \text{R} + 2\text{H} \ \to \ \text{LiP}(\text{Fe}^{+3})\text{P} + \text{H}_2\text{O}_2 \end{split}$$

En esta reacción, R es el sustrato y P es la porfirina. El peróxido reacciona con la enzima nativa (LiP(Fe⁺³)P) y le sustrae dos electrones, uno oxida al Fe⁺³ y el otro deja un hueco

en el anillo porfirínico dejándolo en forma iónica, esto da lugar al Compuesto I (LiP-I(Fe⁺⁴ =O)P°) que tiene un complejo de valencia alto (Fe⁺⁴=O), y un radical catiónico porfirínico (P°). Luego, el Compuesto I oxida una molécula de sustrato (R) al extraerle un electrón y se forma un radical catiónico (R°) y estabiliza el anillo porfirínico (LiP-II(Fe⁺⁴ =O)P) siendo éste el Compuesto II. En seguida, reacciona con otra molécula de sustrato (R) que reduce el Fe de complejo (Fe⁺⁴=O)P a LiP(Fe⁺³)P, es decir a su forma nativa (Arora 2004; Tien y Ma 1997; Edwards *et al.* 1993; Poulos *et al.* 1993).

Por otra parte, en la ausencia de un sustrato no oxidado, o bien, alta concentración de H_2O_2 , el Compuesto II (LiP-II (Fe⁺⁴=O)P) es fuertemente oxidado por el H_2O_2 a un compuesto III [LiPIII(Fe⁺³= O_2 -)P], que representa una forma catalítica de actividad limitada.

LiP-II (Fe⁺⁴=O)P +
$$H_2O_2$$
 \longrightarrow LiPIII(Fe⁺³= O_2 -)P+ H_2O

Cuando se forma el compuesto III de la LiP, regresa inmediatamente a su estado nativo con la presencia de peróxido de hidrógeno y alcohol veratrílico (3, 4-dimetoxibencil alcohol; AV). El AV protege de la inactivación a la enzima con el peróxido de hidrógeno, y así poder pasar a su estado nativo. La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:

LiP-III (Fe⁺³=O₂)P + VA + H₂O₂
$$\longrightarrow$$
 LiP(Fe⁺³⁻)P

Muchos de los sustratos oxidados por la LiP se caracterizan por tener un potencial Redox menor que el de la enzima, lo que le permite extraer un electrón directamente desde el anillo aromático, produciendo radicales catiónicos, es así que puede degradar una gran variedad de contaminantes aromáticos (Tirado-González *et al.* 2015; Poulos *et al.* 1993).

Por otro lado, el alcohol veratrílico (AV); que proviene de la degradación de la lignina; interviene en el ciclo catalítico de a LiP como mediador en la transferencia de carga de la catálisis de la LiP (Figura 7), esto debido a que tiene un potencial redox menor que el de la enzima por lo que puede ser oxidado y reducido por ésta. Específicamente es oxidado por el Compuesto I y por el compuesto II, formándose un radical catiónico (AV+) capaz de oxidar una molécula de sustrato provocando la reducción del AV, y nuevamente será oxidado por el Compuesto I.

El AV también es una especie de protector de la enzima, ya que al haber exceso de peróxido se forma el Compuesto III que representa un estado inactivo de la enzima. En

TESIS TESIS TESIS

este caso, el papel del AV es reducir este Compuesto III, permitiendo que la enzima logre estar en estado nativo, como se mencionó anteriormente.

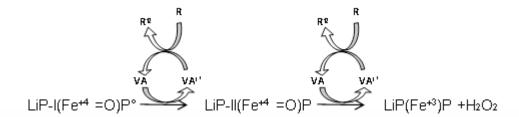


Figura 7. Forma de acción del AV como mediador en la transferencia de carga en la catálisis de la lignino peroxidasa (Modificado de Wong 2009).

El AV, es un metabolito aromático de bajo peso molecular, secretado durante el metabolismo secundario de los hongos ligninolíticos, posibilita la oxidación de ciertos sustratos de potencial redox alto y de la lignina polimérica, por ello se ha admitido que actúa como mediador redox, ya que la LiP necesita de un mediador para poder oxidar compuestos a los que no puede acceder directamente; sin embargo hay estudios que sugieren que la función principal del AV es el cierre del ciclo catalítico (Wong 2009; Ruiz-Dueñas 1998)

1.6.3.3. Manganeso peroxidasa (MnP).

La MnP es una hemoperoxidasa que utiliza el H₂O₂ para la oxidación del Mn⁺² a Mn⁺³. El nombre sistémico de esta isoenzima es: Mn(II):peróxido de hidrógeno oxidoreductasa. Su punto isoeléctrico es de 3.6 a 5 y su masa molecular es de 40-46 kDa. Actúa exclusivamente sobre sustratos fenólicos y no oxida al AV. La parte estructural de esta enzima, al igual que la LiP, es una glicoproteína que en su centro catalítico involucra dos electrones de oxidación del grupo hemo por el peróxido de hidrógeno, pero además tiene un sitio de unión del Mn⁺² que está hexacoordinado al oxígeno del grupo COO⁻ de los aminoácidos Glu 35 y Glu 39, del Asp 179 y del propionato del grupo hemo. La estructura de este sitio de acción adquiere una forma octaédrica alrededor del Mn⁺², ya que también interaccionan con dos moléculas de agua. Este sitio de unión de Mn⁺² es lo que caracteriza a esta isoenzima (Arora 2004; Wesenberg *et al.* 2003).

El ciclo catalítico de esta enzima es similar al descrito para la LiP como se muestra en la Figura 8. El H₂O₂ entra en contacto con el grupo hemo de la enzima, los residuos de

ESIS TESIS TESIS TESIS

Histidina 46 y Arginina 42 proximal catalizan la ruptura de la molécula de peróxido y forman agua. Para ello, el átomo de oxígeno que se une al átomo de hierro, sustrae dos electrones de la enzima en estado nativo y se produce una oxidación de la proteína férrica a un intermediario. Este intermediario posee dos equivalentes oxidantes: un centro oxiferril (Fe⁺⁴) y un radical catiónico localizado en el grupo hemo. A esta forma química de la LiP se le conoce como Compuesto I. Luego se coordina el Mn⁺² en el sitio de unión de este ion metálico y es oxidado a Mn⁺³ por el Compuesto I y el electrón es transferido al grupo Hemo y el radical catiónico desaparece y se forma el Compuesto II. El Mn⁺³ al tener un radio iónico menor que el Mn⁺² sale del sitio de unión y reacciona con grupos carboxílicos de los aniones malonato, oxalato, malato, etc., para formar un compuesto quelado (por ejemplo [Malonato₂(Mn⁺²)]). De esta manera, este complejo de Mn (II) se difunde más fácilmente de la enzima al sustrato que va a ser oxidado. Posteriormente, otro Mn⁺² regresa al sitio de unión de este ión en la enzima, para ser oxidado nuevamente a Mn⁺³ por el Compuesto II. Esta acción permite que la forma quelada de Mn⁺³ sea un agente activo en la oxidación de compuestos fenólicos.

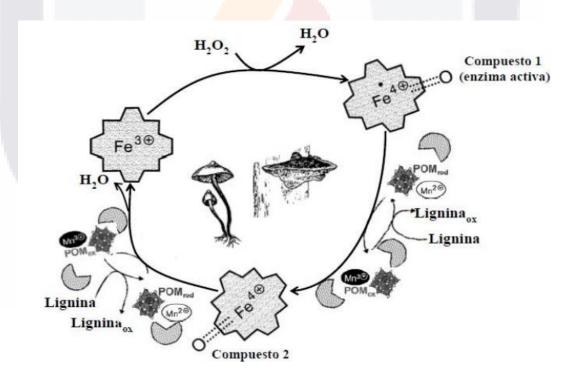


Figura 8. Ciclo catalítico de la MnP (Hofrichter 2002).

El Compuesto II es reducido por un Mn⁺² permitiendo llegar al estado nativo de la enzima, es decir que el Fe⁺⁴ se reduce a Fe⁺³. Por otro lado, el Mn⁺² que reduce al grupo hemo,

también es quelado como ya se mencionó anteriormente, y el complejo formado con cualquiera de los ácidos orgánicos mencionados anteriormente, es el que sustrae un electrón de los compuestos fenólicos con los que tenga contacto.

Cabe mencionar que la generación de diferentes radicales a partir del quelato de Mn⁺³ aumenta la capacidad de oxidación de diferentes compuestos, por ejemplo al oxidar ácidos grasos insaturados se producen diferentes peróxidos (de hidrógeno y orgánicos), lo que le permite aumentar la eficiencia de degradación (Wesenberg *et al.* 2003; Hofrichter 2002).

1.6.3.4. Lacasa.

La Lacasa es una *p*-difenol: oxígeno oxidoreductasa (E.C. 1.10.3.2). Es una enzima multicobre oxidasa (Leonowitz *et al.* 2001), que actúa sobre los anillos de la lignina (Pérez *et al.* 2002). Pertenece a la familia de las enzimas azul-oxidasas, las cuales pueden oxidar una gran variedad de compuestos aromáticos. Esta enzima cataliza la reducción del oxígeno para producir agua y de forma simultánea oxida una molécula de sustrato. Dado que para producir dos moléculas de agua, es necesario reducir una molécula de oxígeno, para ello se necesitan cuatro electrones, éstos son extraídos del sustrato (un electrón por molécula de sustrato) por lo tanto, se requiere oxidar cuatro moléculas de sustrato.

La lacasa tiene un peso molecular aproximado de 60-70 kDa, su punto isoeléctrico se encuentra alrededor de pH 4, y su temperatura óptima entre 50° y 70°C. Es una glicoproteína que puede ser monomérica u oligomérica. Los carbohidratos que la complementan le dan mayor estabilidad, ya que la protege contra proteólisis e inactivación por radicales libres (Román *et al.* 2010; Vite-Vallejo *et al.* 2009).

Generalmente la lacasa es una enzima monomérica que tiene cuatro átomos de Cobre unidos a tres sitios Redox que se definen por sus características espectroscópicas (Battistuzzi *et al*, 2005). En la figura 9 se muestra este sitio activo, en donde el sitio tipo 1 (T₁) que le da el color azul a la enzima en solución, es mononuclear y se caracteriza por una banda de absorción a 600 nm (Piontek *et al.* 2002). El sitio tipo 2 (T₂) es también mononuclear y presenta una geometría metálica trigonal y propiedades de resonancia paramagnética nuclear (EPR) comparables con los complejos tetragonales de Cu (II). Por último, el sitio tipo 3 (T₃) es binuclear y tiene una banda de absorción a 330 nm, no detectable en EPR. Los dos iones de Cu (II) están conectados por un puente μ-hidroxo

FESIS TESIS TESIS TESIS

(Román *et al.* 2010), generalmente están coordinados por residuos de histidina, leucina y cisteína. Los sitios T₂ y T₃ se agrupan formando un clúster trinuclear de cobre, en el cual se involucra la reducción de oxígeno para producir agua.

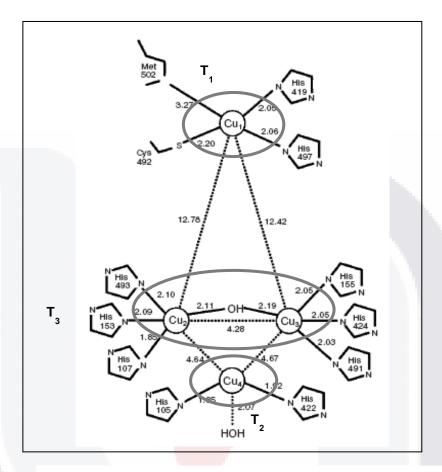


Figura 9. Sitios activos de la Lacasa (Morozova et al. 2007).

El centro T₁ de cobre está involucrado en la oxidación del sustrato reducido y los electrones generados son transferidos al clúster trinuclear T2 y T3.

El ciclo catalítico de esta enzima (Figura 10), propuesto por Torres $et\,al.$ (2003), comienza por el estado nativo de la enzima donde una molécula del sustrato reduce el sitio T_1 , De este punto, se pueden dar dos caminos: A) El sitio T_1 transfiere el electrón al sitio T_2 y de nuevo es reducido el sitio T_1 por una segunda molécula de sustrato; el sitio T_1 y T_2 transfieren sus electrones al sitio T_3 . El sitio T_1 es reducido por una tercera molécula de sustrato y el electrón es nuevamente transferido al sitio T_2 . Este proceso reoxida al sitio T_1 , que después será reducido por una cuarta molécula de sustrato. Como resultado se tiene a la enzima completamente reducida. B) El clúster trinuclear es secuencialmente

TESIS TESIS TESIS

reducido durante la transferencia de tres electrones desde el sitio T_1 , el cual es secuencialmente reducido por una molécula de sustrato, finalizando en la misma forma reducida de la enzima. Conforme los electrones recibidos en el sitio del clúster T_2 y T_3 son nuevamente transferidos al oxígeno, se va formando agua (Torres *et al.* 2003).

El potencial redox de la lacasa depende del organismo que la produzca, varía entre 0.5 y 0.8 V. Piontek *et al.* (2002) sugieren que la longitud del enlace entre una de las histidinas que coordinan al cobre del sitio T₁ modula el potencial redox. La gama de sustratos oxidados por la enzima se puede ampliar a través de un mediador (por ejemplo, la siringaldazina). Los mediadores son compuestos de bajo peso molecular y mayor potencial redox que al entrar en contacto con el sitio T₁ es oxidado, ya que la enzima le sustrae un electrón, formando un radical catiónico que se difunde fácilmente y le permite oxidar sustratos complejos. Así la enzima puede volver a su forma nativa y finalmente el electrón tomado por la lacasa es regresado al oxígeno para formar agua (Torres *et al.* 2003).

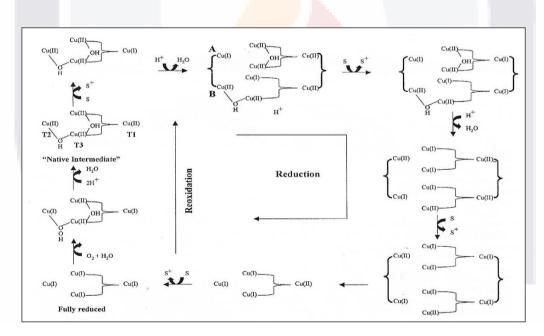


Figura 10. Mecanismo del ciclo catalítico de la lacasa, propuesto por Torres et al. 2003.

1.6.3.5. Celulasas.

Los hongos producen tanto enzimas ligninolíticas como celulasas capaces de degradar todos los componentes de la lignina, que es un heteropolímero fenólico sin una

composición estereoquímica regular, con una función protectora de los otros dos componentes, la celulosa y la hemicelulosa. La celulosa es un biopolímero lineal compuesto por moléculas de glucosa unidas entre sí por enlaces glucosídicos tipo $\beta(1-4)$. Dentro de las fibras de celulosa se distinguen diferentes regiones que van desde las más organizadas (región cristalina) y hasta las desordenadas (región amorfa) (Figura 11).

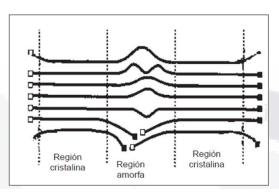


Figura 11. Organización de las fibrillas de celulosa conformadas por dos regiones diferentes: ordenadas (región cristalina) y desordenadas (región amorfa) (Martínez-Anaya *et al.* 2008).

La característica cristalina de la celulosa se debe a que los componentes moleculares de las microfibrillas están organizados muy compactamente mediante puentes de hidrógeno. Las regiones menos ordenadas se conocen como celulosa para-cristalina, y las regiones amorfas están compuestas de estructuras secundarias, que se encuentran en menor proporción dentro del arreglo molecular de la celulosa, tales como microfibrillas en formas de rosca o vueltas, o regiones vacías que dan forma a microporos superficiales, grandes hoyos y capilares (Martínez-Anaya et al. 2008).

La hemicelulosa no tiene una estructura homogénea, está formada de pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (glucosa, galactosa y manosa) y compuestos fenólicos (como el ácido ferúlico y p-cumárico) (Pérez *et al.* 2002).

El conjunto de enzimas celulolíticas de los hongos ligninolíticos consiste de tres enzimas hidrolíticas: Endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasas, las cuales trabajan sinérgicamente.

Endoglucanasas $(1,4-\beta-D-glucan 4-glucanohidrolasas)$ (EC 3.2.1.4). Estas enzimas producen una disminución en el grado de polimerización de la celulosa, por cortes al azar de la cadena glucosídica, produciendo glucosa, celobiosa (disacárido) y celotriosa (trisacárido). Los sustratos sobre los que actúan las endoglucanasas incluyen

TESIS TESIS TESIS TESIS

carboximetilcelulosa, celulosa amorfa, celooligosaridos, no atacando en forma significativa a la celulosa cristalina.

Las exoglucanasas producen principalmente rupturas secuenciales en la molécula de celulosa a partir de un extremo no reductor liberado y están representadas por dos enzimas: exocelobiohidrolasas o celobiohidrolasas (1,4- β -D-glucan celobiohidrolasas) (EC 3.2.1.9) que liberan unidades de celobiosa a partir del extremo no reductor liberado e incluyen también actividad de las celobiohidrolasas produciendo celobiosa por ataque en el extremo no reductor del polímero.

β-glucosidasas (1,4-β-D-glucósido glucohidrolasas) (EC 3.2.1.21). Estas enzimas hidrolizan celobiosa y otros β-1,4-oligoglucósidos de cadena corta como las celodextrinas, para liberar dos moléculas de glucosa como producto final de la degradación celulolítica (Cuervo *et al.* 2009).

La celulosa es atacada inicialmente por la endoglucanasa, la cual se liga al azar sobre las microfibrillas de celulosa en regiones amorfas, produciendo hidrólisis de los enlaces β -1,4 glucosidicos, generando múltiples sitios de ataque para la exo-1,4- β -D-glucanasas, las cuales actúan sobre los extremos no reductores de la cadena, liberando una unidad de celobiosa. Existe una cooperación entre ambas enzimas y de la β -glucosidasa, la cual actúa sobre la celobiosa o también sobre pequeños oligómeros produciéndose así moléculas de glucosa. El resultado de la acción de estas tres actividades enzimáticas es la degradación sinérgica de la celulosa como se muestra en la Figura 12.

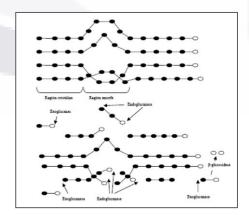


Figura 12. Mecanismo de acción de las celulasas. (= glucosa) (Montoya-Barreto 2008).

TESIS TESIS TESIS

La síntesis de celulasas está sujeta a inducción por el sustrato adecuado y represión por una fuente hidrocarbonada fácilmente utilizable como la glucosa. El inductor más efectivo es el sustrato natural: la celulosa cristalina, sin embargo, éste es un polímero de gran tamaño y no puede penetrar en la célula e inducir la síntesis de celulasas a nivel transcripcional. Existen sin embargo niveles basales de celulasas constitutivas que a partir de un bajo nivel de hidrólisis de la celulosa, producirían algún producto soluble capaz de penetrar en la célula induciendo la síntesis enzimática (Pérez *et al.*2002).

1.6.3.6. Xilanasas.

Las D-xilanasas son similares a las celulasas, se componen básicamente de dos grupos de enzimas: endo 1,4- β -D-xilanasas (E.C. 3.2.1.8) y la 1,4- β -D-xilosidasa (E.C. 3.2.1.37), que están presentes en forma de distintas isoenzimas.

El componente más abundante de la hemicelulosa es el xilano. La hidrólisis de estas moléculas complejas, requiere la interacción de numerosas enzimas que corten la cadena principal y también las laterales. La endo-1,4- β -D-xilanasa actúa sobre la cadena de xilano al azar, disminuyendo el grado de polimerización con liberación de xilooligosacáridos, xilobiosa y xilosa. La 1,4- β -xilosidasa interviene luego de la endoxilanasa, actuando sobre los xilooligosacáridos (a partir de los extremos reductores) o sobre la xilobiosa, dando como producto xilosa (Figura 13).

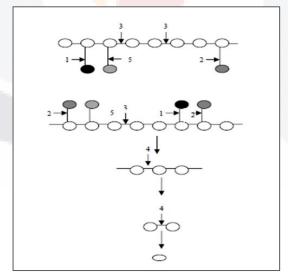


Figura 13. Estructura de xilano y enzimas involucradas en su degradación.

Xilosa \bigcirc Ácido acético \bigcirc Arabionofuranosa \bigcirc Ácido glucurónico o 4-*O*-metilglucurónico \bigcirc 1-acetilxilanoestearasa, 2-arabinofuranosidasa, 3-endoxilanasa, 4- β -xilosidasa, 5- α -glucuronoidasa

Sin embargo, un sistema xilanolítico completo requiere de las enzimas que actúan sobre sus ramificaciones α -arabinofuranosidasas (que remueven cadenas laterales de L-arabinosa), α -glucuronidasas, que liberan ácido glucurónico de las cadenas laterales y acetilxilano-esterasas, que remueven los grupos sustituyentes acetílicos de la xilosa.

1.6.4. Uso de hongos ligninolíticos en biorremediación.

Bumpus et al. (1985) mencionan que *Phanerochaete chrysosporium* puede degradar un amplio espectro de contaminantes, razón que ha impulsado las investigaciones del potencial que tienen estos hongos para procesos de biorremediación.

Eichlerova *et al.* (2006) encontraron que *Bjerkandera adusta* es capaz de biodegradar diferentes tipos de colorantes artificiales a concentraciones relativamente altas, además de que presentó buena producción de biomasa en estas condiciones.

En la degradación de polímeros artificiales se han hecho estudios para su biodegradación. Nwogu *et al.* (2012) mostraron evidencias de *que Pleurotus tuber-regium y Pleurotus pulmonarius* tienen la capacidad de degradar películas de polietileno, lo cual tuvo evidencia en la pérdida de peso y el cambio en la estructura química de la película de este polímero.

Ponce et al. (2012) estudiaron la degradación de resinas fenólicas con hongos ligninolíticos y observaron que a pesar de que las resinas fenólicas son polímeros muy resistentes y estables, los hongos provocaron cambios en la estructura de éstas. Los hongos que mostraron mayor cambio fueron *Bjerkandera adusta 7308, Pleurotus ostreatus 7992,* y *Phanerochaete chrysosporium 4521.* La capacidad de biodegradar estos materiales se debe a que incluye a las enzimas del sistema enzimático extracelular inespecífico como: lacasa, manganeso peroxidasa y lignino peroxidasa (Quintero *et al.* 2006).

Domínguez-Espinoza et al. (2002) realizaron un estudio con los desechos sólidos de la extracción del gluten de trigo para su aprovechamiento como materia prima para la síntesis de agentes cromóforos termoestables y resistentes a cambios de acidez a través de fermentación con el hongo filamentoso *Monascus purpureus*. Un segundo estudio se hizo con residuos de la industria del nixtamal (nejayote) que se utilizó para la producción de amilasas utilizando *Aspergillus awamori*. Se encontró que además de la producción de

amilasas estables, ocurrió una disminución en la DBO₅ hasta del 21% y un 42% de los sólidos solubles del nejayote.

Chavan *et al.* (2013) hicieron un estudio para la degradación de melanoidinas contenidas en el agua de desecho de las destilerías. Contrastaron la eficiencia de remoción con *Aspergillus oryzae* MTCC 7691 libre (en medio sumergido) e inmovilizado en bagazo de caña (biorreactor de columna empacada). Observaron mayor eficiencia con el hongo inmovilizado, con este tratamiento lograron una remoción del 86.19 % de la DQO y el 51% de la DBO₅, Mientras que con el hongo libre lograron remover solo del 76.21% de la DQO y el 27.76 % de la DBO₅.

Keharia y Madamwar (2002) investigaron la degradación de colorantes por *Trametes versicolor* cultivo sumergido. Los resultados indicaron que el amarillo dorado R, el violeta 5, el azul 28 y el rojo ponceau 4R a concentración de 80 ppm se mineralizaron en 72 h de incubación, mientras que el negro 5 a 40 ppm se mineralizó en 5 días. El rojo 152 ppm y el azul novatito BC S/D no fueron degradados.

Del mismo modo Rodríguez et al. (1999) analizaron el efecto de extractos fúngicos enzimáticos extracelulares crudos de *Trametes hispida*, *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium* en la eliminación de 23 colorantes. Los resultados mostraron una alta actividad de la Manganeso peroxidasa y de la lacasa de *Pleurotus ostreatus* asociada con la degradación de los colorantes. La decoloración del cristal violeta (70 %) y la oxidación del poli R-478 (30 %) se favorece por la adición intermitente de la manganeso peroxidasa de *Phanerochaete chrysosporium* (Moldes *et al.* 2003). Esto demuestra el potencial de estos extractos fúngicos extracelulares para eliminar colorantes.

Rodríguez *et al.* (2003) hicieron estudios en la decoloración de vinazas y extracto líquido de pulpa de café, mediante el cultivo en medio líquido del hongo *Pleurotus spp.* y midieron la producción de lacasa durante el proceso. Encontraron buena producción de biomasa y producción de enzimas a los diez días de tratamiento (14.8 g/L de biomasa para la vinaza y 5.4 g/L para el extracto de café, respectivamente). De la misma manera, observaron que la remoción de color a los diez días de tratamiento fue del 39 % para la vinaza y 44 % para el extracto líquido de café. La DQO total logró disminuirse en un 55%, la eficiencia de remoción se alcanzó con la mayor producción de enzima con actividad de 14.1 U/mL en vinaza y 3.0 U/ml para el extracto líquido de café.

En la biorremediación de ambientes contaminados como agua o suelo contaminados con xenobioticos aromáticos, se recomienda aplicar hongos de la podredumbre blanca de la madera. Demir (2004) investigó el efecto de *Trametes versicolor* sobre la mineralización de benceno y tolueno a concentración de 50, 100, 200, 250 y 300 mg/L en medio de cultivo líquido a pH 5 a 28° C y con agitación. Los resultados indicaron que este hongo consumió el tolueno y el benceno en concentración de 50 mg/L en 4 h y 300 mg/L en 36 h respectivamente.

Jáuregui et al (2003) hicieron un estudio con varios hongos de la podredumbre blanca de la madera para la biotransformación de pesticidas organofosforados que son utilizados en la agricultura. Encontraron que los hongos ligninoliticos pudieron degradar *in vivo* varios compuestos organfosforados, incluidos los fosfoditioatos y fosfotritioatos que no pueden ser degradados por bacterias. Demostraron también que estos compuestos no son degradados por las enzimas extracelulares como las peroxidasas ni lacasas. Descubrieron que la fracción microsomal redujo significativamente los organofosforados *in vitro* en una reacción dependiente de NADPH, por lo que sugirieron la participación del sistema enzimático citocromo P450.

La eficiencia de *Phanerochaete chrysosporium* y *Pleurotus pulmonaris* para la mineralización de mezclas de aromáticos se evaluó en un suelo no estéril contaminado. Se observó que ambos hongos degradaron naftaleno, tetraclorobenceno e isómeros de dicloroanilina en 30 días (D´Annibale *et al.* 2005).

Las aguas residuales producidas por la agroindustria es un problema para los ecosistemas acuáticos, ya que estos desechos tienen cargas orgánicas altas y en algunos casos con una turbiedad alta que impiden que los cuerpos de agua receptores se autopurifiquen. En el caso de las molasas existen estudios para su biorremediación utilizando hongos de la podredumbre blanca. Karhrman y Yesilda (2003) realizaron estudios de laboratorio, utilizando medio semisólido con 10, 20 y 30 % de vinazas tequileras en presencia y ausencia de tallo de algodón (como estimulante para el crecimiento fúngico) y encontraron que en cultivo semisólido, la vinaza fue decolorada y se redujo la DQO (58.8 %) con *Coriolus versicolor y Funalia trogii*. La estimulación con tallo de algodón permite que también *Pleurotus pulmonaris y Phanerochaete chrysosporium* decoloren y disminuyan la DQO, sin embargo el que presentó mayor porcentaje de remoción de DQO fue *Funalia trogii* (con 30 % de concentración de vinaza) que logró remover el 62 % con adición de tallo de algodón. Respecto al color, *Coriolus*

versicolor fue la cepa que produjo un porcentaje de remoción del 87% con vinaza diluida al 10 % (v/v).

2. JUSTIFICACIÓN

El cuidado de los ecosistemas acuáticos puede lograrse si se descargan las aguas residuales con baja carga orgánica para que el sistema natural de depuración pueda llevarse a cabo. El nejayote, que es el agua residual de procesos de nixtamalización, contiene gran cantidad de materia orgánica que ocasiona altos valores de DQO y DBO₅ (21-280 - 40,058 mg/L y 7875 - 14,218.75 mg/L, respectivamente) (Monroy 2008). Hasta la fecha no se ha encontrado una metodología adecuada para disminuir la carga orgánica y aquí se busca depurar este efluente mediante el uso de biopolímeros y hongos de la podredumbre blanca de la madera para disminuir el impacto que genera su descarga hacia cuerpos de agua naturales.

3. HIPÓTESIS

- 1.- Mediante el uso de biopolímeros como el alginato de sodio y el quitosano, utilizados de manera independiente y secuencial, se disminuirá la cantidad de sólidos y carga orgánica en el efluente industrial denominado nejayote.
- 2.- El uso de la capacidad de los siguientes hongos de la podredumbre blanca: Phanerochaete chrysosporium 4521, Trametes versicolor 8272, Trametes trogii 8156 y Bjerkandera adusta 4312, reducirá la cantidad de materia orgánica presente en el nejayote.
- 3.- La combinación de los tratamientos fisicoquímico y biológico de forma secuencial mejorará la eficiencia en la remoción de la carga orgánica del nejayote.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general.

SIS TESIS TESIS TESIS

Desarrollar un tratamiento fisicoquímico y biológico para disminuir la carga orgánica del nejayote.

- 4.2. Objetivos particulares.
- 4.2.1. Determinar la eficiencia del alginato y quitosano en la disminución de la carga orgánica del nejayote.
- 4.2.2 Determinar la eficiencia de procesos biológicos utilizando los hongos *Phanerochaete chrysosporium* 4521, *Trametes versicolor* 8272, *Trametes trogii* 8156 y *Bjerkandera adusta* 4312 en la disminución de la carga orgánica del nejayote.
- 4.2.3. Establecer un proceso fisicoquímico-biológico para disminuir la carga orgánica del nejayote.

5. MÉTODOLOGÍA

5.1. Obtención de la muestra de nejayote.

Para la obtención de la muestra de nejayote se utilizó maíz blanco de la región de Tamaulipas. Se utilizó el método tradicional de nixtamalización modificado de Salazar et al. (2014), que consiste en el siguiente procedimiento: Una suspensión al 1% (p/v) de Ca(OH)₂ grado comercial, se mezcló con los granos de maíz en una proporción maíz: suspensión de Ca(OH)₂ de 1:2. Posteriormente la mezcla se calentó a 97 °C durante 90 min (manteniendo el nivel del agua durante la cocción). Al finalizar este proceso, el producto del calentamiento se dejó reposar durante 12 h a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de reposo, se separó el maíz (nixtamal) del agua de remojo (nejayote) y se aplicaron dos enjuagues al nixtamal con agua purificada (cada uno con la misma cantidad de agua que se utilizó al inicio de la cocción). De este procedimiento se obtuvieron 18 L de nejayote por cada 3 kg de maíz nixtamalizado. Durante el enjuague, se frotaron los granos al mismo tiempo para desprender la cal y el pericarpio remanentes. El agua de enjugue y el nejayote se mezclaron y se conservaron en recipientes de diez litros a 4°C en ausencia de luz.

5.2. Caracterización del nejayote.

La muestra se caracterizó considerando los siguientes parámetros: Demanda química de oxígeno (DQO) por el método HACH, que está basado en la norma NMX-AA-030/1-SCFI-2012 (SCFI 2012); demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅) de acuerdo a la norma NMX-AA-028-SCFI-2001(SCFI 2001); pH; dureza mediante el procedimiento de acuerdo a la norma NMX-AA-072-SCFI-2001 (SCFI 2001b); calcio, metodología de acuerdo con el método 2111-APHA (1998); sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos totales (ST) de acuerdo con el método 2540-APHA, 1998; sólidos sedimentables (SSED), cuyo método lo establece la norma NMX-AA-004-SCFI-2000; cantidad de proteína (Bradford 1976); porcentaje de fibra cruda y concentración de fenoles totales de acuerdo a la norma oficial mexicana NMX-AA-050-SCFI-2001 (SCFI 2001a) y azúcares reductores (Miller 1959).

- 5.3. Tratamiento fisicoquímico.
- 5.3.1. Remoción de contaminantes con alginato de sodio soluble.

Se añadieron alícuotas de 10 mL de la solución acuosa de alginato (1, 2 y 3 % p/v) de sodio a 50 mL de nejayote, al cual se le habían añadido previamente 15 mg/mL de citrato de sodio como agente quelante de los iones divalentes (calcio y magnesio), esta cantidad se determinó por estequiometría, en la que se tomó como referencia la concentración de calcio en la muestra de nejayote. Después se mezcló para obtener una solución viscosa que posteriormente fue gelificada tras la adición de 10 mL de CaCl₂ al 5% (p/v). Se dejó reposar a temperatura ambiente (28 °C) durante 24 h. Finalmente, se separó el gel por filtración (papel Whatman No. 1) y al sobrenadante se le determinaron los parámetros de DQO, concentración de fenoles totales, cantidad de azucares reductores, ST y SST. Se realizó un blanco para determinar el efecto de la remoción por filtración. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

El diseño experimental fue de tipo factorial 2³, en el que los factores fueron la concentración de alginato (0.4, 0.6 y 0.8% p/v) y el pH (4, 8 y 12). Las variables de respuesta fueron el porcentaje de remoción de: DQO, fenoles totales, azucares reductores, ST y SST.

5.3.2. Remoción de contaminantes con quitosano.

Debido a la versatilidad del quitosano como agente adsorbente y floculante, se desarrollaron dos métodos de remoción de contaminantes, en la primera se utilizó este biopolímero en polvo (insoluble) y en el segundo se utilizó en forma de disolución acuosa a pH ácido.

5.3.2.1. Tratamiento con quitosano en polvo (insoluble).

Para el tratamiento de adsorción con quitosano en polvo se siguió un diseño factorial 3x3 en el que se evaluó la influencia del pH y de la concentración de quitosano. Las muestras de nejayote se ajustaron a diferentes niveles de pH (4, 8 y 12) mediante la adición de NaOH y HCl diluidos al 10 % (p/v) y 30 % (v/v), respectivamente. Posteriormente se añadió a la muestra el quitosano en polvo para ajustar su concentración al 0.4, 0.6 y 0.8 % (p/v). Se pusieron en agitación orbital durante 24 h. Para el análisis de las muestras éstas se filtraron y al sobrenadante se le realizaron las pruebas correspondientes. Cada uno de los tratamientos se hizo por triplicado. Se realizó un blanco para determinar algún efecto por el filtrado. Las variables de respuesta fueron las mismas que para el experimento anterior.

5.3.2.2. Tratamiento con quitosano soluble.

En este tratamiento se utilizó un diseño completamente aleatorizado debido a que el quitosano es soluble únicamente a pH ácido; por lo tanto, se evaluó la efectividad de remoción de contaminantes en función de la concentración del biopolímero (0.1, 0.25, 0.5, 0.75, y 1.0 % p/v), Se ajustó el pH del nejayote a 2.0 con HCl al 30 % y se añadió la cantidad necesaria de quitosano en polvo a 50 mL de muestra para obtener las concentraciones de (0.2, a 1.0 % p/v). Se dejó en reposo durante 12 h para hidratar al biopolímero en el nejayote. Posteriormente, se reajustó el pH de la solución de Nejayotequitosano a pH 2 y se elevó el pH abruptamente con 1 mL de hidróxido de sodio al 30 % para insolubilizar al polímero, el pH al final del tratamiento fue de 11. Después de reposar 30 min a temperatura ambiente se separó el residuo sólido por filtración (papel Whatman No. 1) y al sobrenadante se le determinaron las variables de respuesta mencionadas. Se hizo un blanco para ver la influencia de la filtración en los parámetros de respuesta. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

5.3.3 Tratamiento combinado.

En este tratamiento se utilizaron los procedimientos con alginato y quitosano de manera secuencial, pero con la variante de cambiar el orden de los polímeros utilizados. El orden del tratamiento fue: a) alginato de sodio soluble y al agua remanente se trató con quitosano soluble y b) quitosano soluble y al agua remanente se le aplicó el tratamiento con alginato de sodio soluble. Lo anterior a fin de probar la efectividad de combinar los tratamientos; por lo que cada uno de los tratamientos se hizo por triplicado y un blanco bajo las mismas condiciones que los tratamientos óptimos respectivos. Las variables de respuesta fueron el porcentaje de remoción de: DQO, fenoles totales, azucares reductores, ST y SST.

5.4. Tratamiento biológico.

Se utilizaron 4 hongos ligninolíticos de la colección perteneciente al laboratorio de biorremediación del Departamento de Ingeniería Bioquímica de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Estos hongos fueron amablemente donados por la Universidad de Alberta, del Mold Herbarium (Edmonton, Canadá). Las cepas elegidas al azar fueron: a) Bjerkandera adusta 4312; b) Phanerochaete chrysosporium 4521, c) Trametes versicolor 8272 y d) Trametes trogii 8156.

Para conservar las cepas, se resembraron cada tres meses en cajas Petri con 20 mL de medio agar papa dextrosa (PDA, BD Bioxon), tomando una porción de micelio de la caja de procedencia e inoculándola en el medio fresco por microcultivo y se incubó 28 °C durante 7-15 días. Posteriormente se almacenaron a 4 °C.

5.4.1. Prueba de crecimiento en agar-nejayote.

Se realizaron pruebas para determinar las mejores condiciones de crecimiento en el nejayote. Los hongos antes mencionados se inocularon en medios semi-sólidos que contenían nejayote (filtrado y completo) con agar-agar al 2 % p/v a diferentes valores de pH (4, 6, 8 y 12). Las cajas Petri se mantuvieron a temperatura constante (28 °C), en la oscuridad. Se midió el radio de crecimiento cada 24 h y se calculó el área de crecimiento con la fórmula $A=(\pi)(r^2)$. En los casos en que el crecimiento formaba un óvalo, se tomaron medidas del radio mayor (r_1) y radio menor (r_2) y se calculó el área de crecimiento con la fórmula $A=(\pi)(r_1)(r_2)$. Las pruebas se hicieron por duplicado.

5.4.2. Preparación de inóculo

Para el tratamiento biológico del nejayote en medio líquido, se prepararon pre-inóculos de los microorganismos seleccionados en medio glucosa, malta, extracto de levadura y pH 4.5 (GMY) (ver apéndice). Se colocaron 100 mL de medio GMY en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se esterilizaron a 15 lb/pulg² por 15 min. Bajo campana de flujo laminar y mechero de Fischer, se inoculó el medio GMY con un trozo de micelio previamente homogenizado con un omni-mixer a 18, 000 rpm durante 30 segundos. Posteriormente se dejó en agitación orbital con velocidad a 125 rpm a temperatura de 28-30 °C, durante 4 a 5 días, esto permitió el crecimiento de los hongos en forma de pellets, que no es más que una esfera de micelio, esta forma es importante para obtener la mayor producción de enzimas. Posteriormente se conservó a 4 °C.

5.4.3. Inoculación del nejayote.

El tratamiento de las muestras de nejayote completo se realizó en matraces Erlenmeyer de 2,000 mL (con 750 mL de nejayote completo). El pH del nejayote se ajustó a 4.5, y se adicionó una cantidad de biomasa homogenizada equivalente al 10 % (p/v) (base húmeda). Los matraces se incubaron en un agitador orbital (125 rpm) a 28 °C por 30 días y en ausencia de luz.

Como control se prepararon matraces con nejayote bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas pero sin inocular.

Las variables de respuesta fueron: DQO, concentración de fenoles, concentración de azucares reductores y ST. Se midió actividad enzimática de lacasa, LiP y MnP.

5.4.4. Condiciones de tratamiento del nejayote.

Para establecer las condiciones de crecimiento del hongo en el nejayote, se evaluaron diferentes parámetros: cantidad de inóculo y tipo de hongo.

5.4.4.1. Efecto de la cantidad de inóculo y cepa del hongo ligninolítco.

Para medir el efecto de la cantidad de inóculo y la variedad de dos hongos se realizó un diseño experimental factorial 3X2X2. Se ajustó el pH de la muestra de nejayote a 4.5, enseguida se distribuyó 150 mL en matraces Erlenmeyer de 250 mL y se inocularon con las cepas *Bjerkandera adusta* 4312 *y Trametes troggi* 8156 utilizando diferentes cantidades de inóculo (5, 10 y 15 %, base húmeda) y muestras de nejayote completo estéril y no estéril.

5.4.5. Biodegradación de nejayote completo no estéril por *Bjerkandera adusta* (4312).

La muestra de nejayote se ajustó a pH 4.5, utilizando HCl al 30 % y NaOH (1 %) y se separó en matraces de 2,000 mL con 750 mL de nejayote completo. Los cultivos se iniciaron inoculando 75 g (base húmeda) de micelio de *Bjerkandera adusta* 4312 e incubando a 125 rpm a 28 °C por 30 días. El muestreo se realizó diariamente y se ajustó el pH de las muestras de nejayote en caso de ser necesario. Las muestras obtenidas se centrifugaron a 17,000 rpm en tubos eppendorf de 2 mL durante 20 minutos. Las variables monitoreadas cada tercer día fueron: DQO, fenoles totales, cantidad de proteína soluble (Bradford 1976), actividad enzimática lacasa, MnP y LiP. Para el caso del pH, el monitoreo se realizó cada 24 h.

5.4.6. Tratamiento biológico posterior al fisicoquímico.

En este tratamiento se utilizó la metodología de tratamiento biológico (BIOL) y fisicoquímico mixto (FQ) en los que se obtuvo mejor remoción de la DQO, la cual ya fue descrita anteriormente en el apartado 5.2. En el tratamiento biológico (BIOL) se utilizó Bjerkandera adusta 4312, 10% (p/v) de inóculo, nejayote a pH 4.5, temperatura de 28 °C, el tratamiento se hizo en matraces Erlenmeyer de 2, 000 mL por 15 días. El tratamiento fisicoquímico mixto (FQ) fue con una solución de alginato de sodio al 2% (p/v) y quitosano soluble al 0.8% (p/v). Los tratamientos se hicieron de manera secuencial, pero con la variante de cambiar el orden de los tratamientos. El orden del tratamiento fue: a) BIOL y al agua remanente se le aplicó el tratamiento FQ y b) FQ y al agua remanente se le aplicó el tratamiento BIOL. Lo anterior a fin de probar la efectividad de combinar los procesos; por lo que cada uno de los tratamientos se hizo por triplicado y un control. Dicho control consistió en una muestra de nejayote con las mismas condiciones que los tratamientos pero sin inocular. Cabe mencionar que al terminar cada tratamiento se filtró la muestra para separar el gel formado o bien, la biomasa desarrollada en la muestra. Las variables de respuesta fueron el porcentaje de remoción de DQO, fenoles totales, azucares reductores y ST.

TESIS TESIS TESIS

5.5. Análisis estadístico.

Los datos obtenidos se analizaron en el programa estadístico R (Core, 2013). Se analizó la diferencia entre tratamientos aplicando un análisis de varianza (ANOVA) complementada con la prueba de Tukey ($p \le 0.05$).

5.6. Medición de actividad enzimática.

Se determinó la actividad enzimática de lacasa (Lac), lignino peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP). Las muestras se centrifugaron a 16,000 rpm, a 4°C por 25 min y los sobrenadantes obtenidos fueron almacenados en congelación hasta su uso. Para la determinación enzimática se descongelaron las muestras y se midió su actividad a 28°C.

5.6.1. Actividad Lacasa.

La actividad lacasa se midió por oxidación de la siringaldazina en un minuto. Primeramente, se prepararon 2 mL de mezcla como se muestra en la Tabla 2. El volumen del extracto enzimático utilizado en el primer ensayo enzimático fue de 1000 µL y esto permitió determinar el volumen de extracto a utilizar, es decir, si se produce color muy intenso, el espectrofotómetro no podrá medirlo, y se tendría que hacer una mayor dilución del extracto. Se eligió el volumen adecuado de extracto para que la ley de Beer se cumpla y el sustrato no se haya agotado.

Tabla 2. Cantidad de reactivos para medir actividad lacasa.

	Cantidad (µL)				
Buffer de acetatos	1800	1700	1600	1400	900
Siringaldazina	100	100	100	100	100
Extracto enzimático	100	200	300	500	1000

La mezcla se hizo directamente en la celdilla del espectrofotómetro, añadiendo al final el extracto enzimático. Una vez mezcladas las soluciones, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 525 nm durante un minuto. Con los valores de absorbancia se calcula la concentración de sustrato oxidado por minuto mediante el uso de la ley de Lambert-Beer y definiendo a una unidad de actividad enzimática como 1 µmol de siringaldazina

S TESIS TESIS TESIS TESIS

oxidada por minuto. El coeficiente de extinción de acuerdo a Jaszek *et al.* 2006, es de ε_{525} = 65 000 M⁻¹cm⁻¹.

5.6.2. Actividad Lignino peroxidasa (LiP).

La actividad de la LiP se midió por medio de la oxidación del alcohol veratrílico en un minuto, activando la reacción con peróxido de hidrógeno 0.4 mM. En la preparación de la muestra se siguió el mismo procedimiento que con la Lacasa. En la Tabla 3 se muestra la cantidad de reactivo que debe utilizarse para cada muestra. En este caso, el último reactivo que se añade es el peróxido de hidrógeno.

Tabla 3. Cantidad de reactivos para medir actividad LiP.

	Cantidad (µL)				
Buffer de succinatos 40 mM pH 4	1600	1500	1400	1200	700
alcohol veratrílico 40 mM	200	200	200	200	200
Extracto enzimático	100	200	300	500	1000
peróxido de hidrógeno 0.4 mM	100	100	100	100	100

La oxidación del alcohol veratrílico a veratril aldehído se midió a 310 nm. El coeficiente de extinción usado fue el reportado por Tien y Kirk (1988) con valor de: $\epsilon_{310} = 9,300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. En el caso de la LiP una unidad (1U) = 1 µmol de alcohol veratrílico oxidado por minuto.

5.6.3. Actividad Manganeso peroxidasa (MnP)

La actividad de la MnP se midió por la oxidación de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3 etilbenzo-thiazoline-6-sulfonico en forma de sal de amonio al 98 %). La muestra se preparó como se definió en los apartados anteriores. La Tabla 4 muestra la metodología para hacer la medición. Al final se añade el peróxido de hidrógeno.

TESIS TESIS TESIS

Tabla 4. Cantidad de reactivos para medir actividad MnP.

Sustancia	Cantidad (μL)				
Buffer de malonato de sodio -	1832	1732	1632	1432	932
ABTS – Mn pH 4.5	1002	1732	1002	1402	332
Extracto enzimático	100	200	300	500	1000
peróxido de hidrógeno 0.01%	68	68	68	68	68

Se midió la oxidación de ABTS a 420 nm. El coeficiente de extinción es de \mathcal{E}_{420} = 36,000 M^{-1} cm⁻¹ (Wolfenden y Willson, 1982). Omitiendo el peróxido de hidrógeno y el sulfato manganoso se midió la actividad lacasa que, por diferencia, resulta la actividad de la MnP. Se define que: 1U = 1 µmol de ABTS oxidado por un minuto.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Caracterización del nejayote.

Desde el punto de vista social y económico, los derivados del maíz son importantes; sin embargo, el efluente (nejayote) producido en el proceso de la nixtamalización es altamente contaminante (Paredes-López *et al.* 2009; Ferreira-Rolón *et al.* 2014). La composición del nejayote varía en función del tipo de maíz, cantidad por lote, agua utilizada, cantidad de cal, tiempo de cocción y de reposo (Campechano-Carrera *et al.* 2012; Díaz-Montes *et al.* 2016). En la tabla 5 se muestran los resultados de la caracterización del nejayote obtenido para este estudio. Como se puede observar, el exceso de Ca(OH)₂ genera valores elevados de parámetros como el pH (10.9 ±0.46), dureza (4, 800 ± 300 mg/L CaCO₃), cenizas (0.65 ± 0.16 %), alcalinidad total (3, 400 ± 104. 8 mg/L CaCO₃) y en la concentración de calcio total (1,073 ± 125 mg/L). Así, el proceso de cocción y lavado modifica los componentes del maíz, permite el desprendimiento del pericarpio y eleva la cantidad de SST (18,900 ± 900 mg/L) y SSED (410 ± 10 mL/L) en el nejayote.

Entre los principales componentes del nejayote se encuentran componentes del maíz como: sustancias que forman parte del pericarpio como compuestos antioxidantes (antocianinas) y arabinoxilanos; sustancias que conforman el endospermo como

ESIS TESIS TESIS TESIS

hemicelulosa y celulosa (fibra cruda = 20.21 ± 0.862 %), material disuelto como fenoles totales (326.85 ± 6.54 mg/L), azúcares reductores (39.48 ± 2.04 mg/L), proteínas (proteína cruda = 6.125 ± 0.671 %), así como carotenoides que le dan el color amarillo característico al nejayote. Dichos componentes lo hacen altamente contaminante (Valderrama-Bravo *et al.* 2012; Berlanga-Reyes *et al.* 2011).

La cantidad de SST y SSED supera por mucho los valores permitidos por las normas mexicanas para las descargas de estos efluentes, tanto a cuerpos de agua como al alcantarillado municipal (límite máximo permisible; promedio mensual: SSED = 5 mL/L y SST = 200 mg/L incluidos en las normas NOM-002-SEMARNAT-1996 y NOM-001-SEMARNAT-1996 respectivamente. No obstante, otros autores encontraron valores similares a los obtenidos en la muestra de estudio. Por ejemplo, Pulido *et al.* (1987) reportaron una concentración de SST de 20,000 mg/L y Durán-de Bazúa *et al.* (2007) encontraron una concentración de 2,400 mg/L de SST.

Tabla 5. Resultado de la caracterización de la muestra de nejayote.

	Media	Desv. Est.
pH	10.9	± 0.46
Alcalinidad total (mg/L CaCO ₃)	3, 400	± 104.8
Fenoles totales (mg/L)	326.85	± 6.54
Fibra cruda (%)	20.21	± 0.862
Proteína cruda (mg/L)	171.96	± 12.01
Azúcares reductores (mg/L)	39.48	± 2.04
Dureza (mg/L CaCO ₃)	4, 800	± 300
Cenizas (%)	0.65	± 0.16
Ca _{Tot} (mg/L)	1, 073	± 125
DQO (mg/L)	62, 500	± 864
ST (mg/L)	29, 006	± 839
SST (mg/L)*	18, 900	± 900
SSED (mL/L)*	410	± 10

^{*}Valores que sobrepasan los máximos permisibles establecidos por la norma oficial mexicana (NOM-002-SEMARNAT-1996 y NOM-001-SEMARNAT-1996)

Por otro lado, aunque no se ha establecido el límite máximo permisible para la DQO, diferentes grupos de investigación coinciden en que los rangos de DQO típicos del nejayote son elevados (10,200 - 22,200 mg/L) (Durán-de Buzúa *et al.* 2007; García-Zamora *et al.* 2015; Suárez-Meraz *et al.* 20165). A pesar de que la DQO no se considera en la NOM-002-SEMARNAT-1996, su determinación es importante en la caracterización del nejayote y en la evaluación de la eficiencia de los tratamientos aplicados en este trabajo.

- 6.2. Tratamiento fisicoquímico.
- 6.2.1. Remoción de contaminantes con alginato de sodio (ALG).

Con el objetivo de disminuir la carga orgánica del nejayote se estudió la influencia del pH y la concentración de ALG en la disminución de la DQO, concentración de fenoles, azúcares reductores y ST de este residuo. Las interacciones entre los tratamientos fueron significativas de acuerdo a la prueba ANOVA (p<0.05), En la comparación de medias se observó que el pH y la concentración de ALG influyen en la remoción de los contaminantes del nejayote. Se enc<mark>ontró que la con</mark>centración de ALG que produjo mejores resultados fue de 0.33 % (p/v) a un pH de 4 (Figura 14a) alcanzando una remoción de DQO del 61.2 %. La utilización de concentraciones menores a este valor implica también un menor número de sitios de interacción molecular, reflejado en un bajo nivel de remoción en la DQO. Por otro lado, el incremento en la concentración de ALG (0.5 %) disminuyó también los valores de remoción de DQO, debido a que el exceso de dicho polímero provoca su estabilización (Bolto y Gregory 2007). Se observó que valores de pH 4 permitieron una mayor remoción de contaminantes. Lo anterior puede ser debido a que a un pH 4 existe una mayor proporción de moléculas de ALG que están desprotonadas, pues los valores de pKa de los grupos carboxilo del G y M son de 3.65 y 3.38, respectivamente (Maurstad et al. 2003). Esto permite que el ALG interaccione con el Ca⁺² y forme un gel muy estable de alginato de calcio de fácil manejo para separarlo del sobrenadante.

Se ha reportado que valores de pH ácido favorecen el establecimiento de interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno entre el biopolímero y los diferentes componentes solubles e insolubles de la muestra (Ramírez-Romero *et al.* 2013; Valderrama-Bravo *et al.* 2012; Berlanga-Reyes *et al.* 2011). Cuando el gel de alginato de calcio se forma en presencia del nejayote, una fracción de los sólidos disueltos y suspendidos queda

TESIS TESIS TESIS TESIS

adsorbida y atrapada entre los espacios presentes entre los dímeros del ALG. La formación de dichos espacios se origina por la acción cohesiva del ion calcio al interactuar con el grupo carboxilo, hidroxilo y los átomos de oxígeno que forman el enlace glucosídico y el enlace hemiacetálico de los residuos de G de la cadena polimérica (Lin *et al.* 2012).

Con respecto a los fenoles (Figura 14b), se observó una variación del porcentaje de remoción de estos compuestos en función del pH. A pesar de la repulsión inicial ejercida

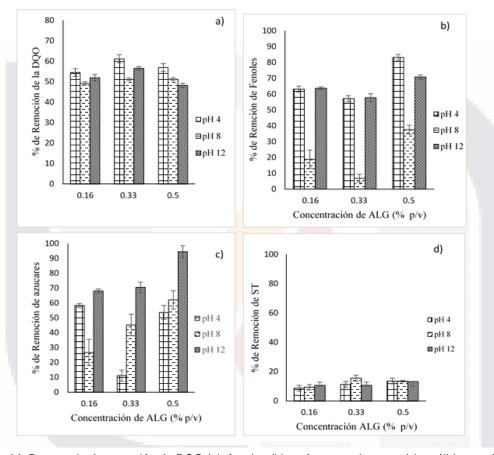


Figura 14. Porcentaje de remoción de DQO (a), fenoles (b), azúcares reductores (c) y sólidos totales (d) en función de la concentración de ALG y del pH ($p \le 0.05$).

por los grupos carboxilo ionizados presentes en los residuos de M y G, en condiciones ácidas, las interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno entre el biopolímero y los componentes solubles e insolubles de la muestra permitieron remover a pH 4 el 75 % de los fenoles. Por otro lado, la menor remoción fue del 63 % y se obtuvo a pH 8.

En el caso de la remoción de los azúcares (Figura 14c), se observó que al incrementarse el pH la eficiencia de remoción también aumentó, lo cual sugiere que las fuerzas de cohesión como fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno entre los grupos carboxilo del ALG y los azúcares del nejayote son lo suficientemente fuertes para

aumentar su remoción, como ya lo ha reportado Meng *et al.* (2015). La eficiencia de remoción máxima de azúcares por el ALG, fue del 94.5 % cuando el pH se mantuvo fijo (4, 8 y 12). De hecho, no se observaron diferencias significativas en la remoción de azúcares en los tres valores de pH, salvo a pH 4 y concentración de ALG de 0.33 %, donde una ligera turbidez de la solución subestimó la eficiencia de remoción observada.

La característica física más importante de las aguas residuales es el contenido de ST, los cuales comprenden: la materia en suspensión, sedimentable y disuelta (Sahu y Chaudhari 2013). De manera general se obtuvieron valores bajos de remoción debido a la presencia de iones Ca⁺², Cl⁻¹, citrato, Na⁺¹, etc., en el filtrado, que evita obtener valores reales de la remoción.

Para visualizar esta situación se aplicó la metodología propuesta a una muestra de agua destilada usada como testigo y se obtuvo un rango de ST de 6125 - 6537 mg/L independientemente del pH y la concentración de ALG. Se observa que al incrementar la concentración de ALG, se obtienen valores de remoción de ST mayores. Sin embargo, se encontró que el máximo de remoción fue del 15% a un valor de pH=8 con 0.33 % (p/v) de ALG (Figura 14d). Lo anterior puede deberse a varios efectos involucrados en la remoción de ST. Primero, a medida que el pH se incrementa, la repulsión entre el ALG, las moléculas y partículas presentes en el nejayote es mayor, por lo que un pH intermedio favorece una mayor remoción. Segundo, a este pH la concentración intermedia del ALG presenta una mayor remoción de ST, lo cual sugiere un comportamiento típico de un agente floculante como el ALG, donde concentraciones bajas del polímero dificultan una buena floculación y altas concentraciones del ALG sobre-estabilizan a las partículas que están contenidas en el nejayote (Sahu y Chaudhari 2013; Sing *et al.* 2000).

Por último, es importante mencionar que la cantidad adicionada de citrato de sodio, que se utilizó como agente secuestrante del Ca⁺²; se disolvió completamente en el nejayote y al realizar el proceso de gelificación y filtración en la separación del residuo sólido, los iones solubles (citrato, Na⁺ y Ca⁺²) terminaron en la fase acuosa, lo cual produjo un valor alto de ST y en consecuencia una baja eficiencia de remoción de los mismos. Más aún, el proceso de filtrado posterior a la gelificación permitió remover de SST con 0.016 % de ALG el 97.5 %, con 0.33 % de ALG removió el 98% y con el 0.50 % removió el 98.2 %. Sin embargo, este parámetro se sobreestima, ya que el nejayote tratado con este polímero se tiene que someter a un proceso de filtración para separar el gel de alginato de calcio-nejayote.

6.2.2. Tratamiento con QUIT soluble.

En este estudio, se analizó la capacidad de remoción basado en los principios de adsorción-precipitación del QUIT, a diferencia del proceso de coagulación-floculación reportado por Guibal y Roussy (2007) y Suárez-Meraz *et al.* (2016). De esta manera, el QUIT soluble adsorbe a los sólidos suspendidos y disueltos presentes en el nejayote y posteriormente una elevación abrupta en el pH precipita al "producto" QUIT-Nejayote. En la Figura 15 se muestra el porcentaje de remoción de DQO, fenoles totales, azúcares reductores y ST en función de la concentración de QUIT soluble. El tratamiento se llevó a cabo a pH ácido (pH 2) para lograr solubilizar el QUIT en el nejayote, luego, se incrementó drásticamente el pH (hasta pH 11) para insolubilizar al polímero con los contaminantes unidos a él.

El mayor porcentaje de remoción de la DQO fue del 60 % cuando se utilizó QUIT al 0.8 % (p/v). La mayor remoción de fenoles fue del 61 % con una concentración de 0.6 % (p/v) de QUIT. La prueba ANOVA mostró diferencia significativa entre los tratamientos de nejayote a diferentes concentraciones de QUIT (p<0.05). El QUIT posee diferentes mecanismos por los cuales interactúa con el material presente en solución acuosa, los cuales se describen a continuación. Al poseer el QUIT una carga positiva debido a los grupos amino protonados en soluciones con valores de pH ácido, neutraliza la carga de partículas coloidales con carga negativa y promueve la formación de grandes agregados (coloide-QUIT), debido a que las moléculas de este polímero actúan como agentes entrelazantes entre las partículas coloidales promoviendo la agregación y la sedimentación del material coloidal suspendido.

Adicionalmente, las moléculas de QUIT pueden adsorber moléculas disueltas en la fase acuosa y así removerlas de esta fase, en conjunto con las partículas coloidales mencionadas anteriormente por sedimentación o filtración. Renault *et al.* (2009) y, Guibal y Roussy (2007) han descrito que la remoción de diferentes materiales presentes en medio acuoso, se puede representar por una gráfica de eficiencia de remoción en función de la dosis de QUIT en forma de campana, debido a que cuando se añade al nejayote a bajas concentraciones, el material coloidal suspendido y disuelto es parcialmente neutralizado y adsorbido a este polímero, siendo insuficiente para lograr la sedimentación de todo el material presente en la fase acuosa. Por esta razón, la eficiencia de remoción es baja a dosis pequeñas de QUIT. Cuando se llega a la cantidad óptima de QUIT añadida, se dice que se llega al máximo de la campana y que todo el material coloidal y

TESIS TESIS TESIS TESIS

disuelto se encuentra unido a este biopolímero, y en consecuencia su separación es eficiente mediante sedimentación o filtración.

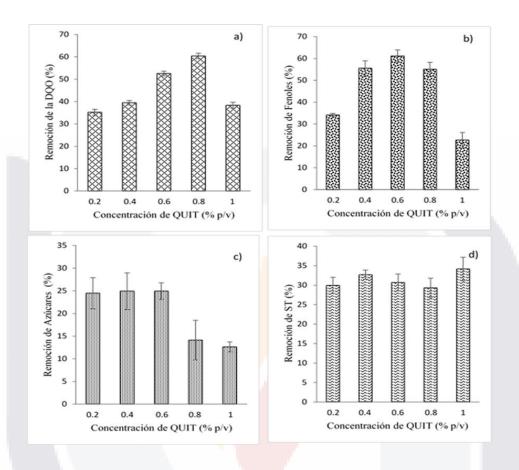


Figura 15. Porcentaje de remoción de contaminantes en función de la concentración de QUIT soluble (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 % (p/v): a) DQO, b) Fenoles, c) Azúcares y d) Sólidos Totales ($p \le 0.05$).

Sin embargo, si la cantidad de polímero está en exceso, las moléculas de QUIT sobre estabilizarán a los agregados formados por el polímero y el material coloidal y soluble. Lo anterior provocará que su separación sea difícil y la eficiencia de remoción se ve disminuida. Guibal y Roussy (2007) encontraron que para remover colorante la cantidad óptima de QUIT es de 43 mg/L, mientras que Suarez-Meraz *et al.* (2016) obtuvieron que la cantidad óptima de QUIT para remover material coloidal de nejayote fue de 47 mg/g de nejayote sólido removido. Se puede observar que los datos mostrados en las Figuras 15ª y 15b tienen esta tendencia de campana y resultó como dosis óptima de 0.8 % de QUIT. Estos resultados sugieren que el material coloidal interacciona con el QUIT de manera similar a una coagulación-floculación, pero no se deja el tiempo suficiente para sedimentar, si no que se precipita con un cambio abrupto de pH. En lo referente a los

azúcares reductores se alcanzó el 25 % de remoción a concentraciones de 0.2-0.6 % (p/v) de QUIT. En el caso de estos últimos (Figura 15c), no se observa el mismo perfil de remoción que en los casos anteriores, debido a que los azúcares "reductores" cuantificados en el nejayote después del tratamiento con QUIT son en su mayoría solubles y solo una fracción de ellos se une a este polisacárido, en consecuencia, se observa que se requiere entre 0.2-0.6 % para obtener una considerable remoción de azúcares (25 % en promedio). Se observó que, al incrementar la concentración del biopolímero, la remoción de azucares disminuye lo que sugiere que hay una hidrólisis del QUIT que libera azúcares que son reductores, por lo tanto, la eficiencia de remoción se ve afectada.

Por otra parte, los ST mostraron una eficiencia de remoción del 30-34 %. Estos resultados concuerdan con aquellos encontrados por Suárez-Meraz *et al.* (2016) donde se reporta que las interacciones electrostáticas entre coloides del nejayote y QUIT tienen un papel importante para la remoción de sólidos. La Figura 15d muestra que el porcentaje de remoción es poco dependiente de la cantidad de QUIT que se utilice. Lo anterior es consecuencia de la filtración empleada en la separación del residuo sólido después del tratamiento con QUIT, ya que después de esta operación solo quedan sólidos disueltos y rastros de sólidos suspendidos que son los que se cuantifican como ST. Suarez-Meraz *et al.* (2016) han reportado resultados eficientes en la remoción de la turbiedad (80 %) del nejayote con QUIT. Sin embargo, a diferencia de ellos que utilizaron nejayote centrifugado, en este estudio el tratamiento se aplicó a muestras de nejayote completo. El proceso propuesto en este trabajo disminuye el equipo y operaciones unitarias empleadas para su tratamiento, y en consecuencia su costo.

6.2.3. Tratamiento con QUIT en polvo (insoluble).

Para evaluar la eficiencia del QUIT en polvo, se midió la remoción de contaminantes en función de su concentración (0.1, 0.5, 1 y 1.5 % p/v) y el pH (4, 8 y 12). Dichas concentraciones fueron utilizadas teniendo en cuenta que, a valores inferiores de concentración, las eficiencias de remoción estuvieron por debajo de aquellas obtenidas con QUIT soluble ya que este tratamiento se midió la capacidad de remoción por el fenómeno de adsorción. Esto se observa en la Figura 16, donde al utilizar una concentración de QUIT al 0.1 %, se logró una remoción de la DQO entre 19 y 25 % en el intervalo de pH utilizado. Del mismo modo se removió entre un 15 y 29 % de fenoles y los azucares lograron removerse entre un 15 y 18 %. En la Figura 16a se muestra el

porcentaje de remoción de DQO en función de la concentración de QUIT insoluble y el pH. Al incrementar la concentración de QUIT no se afectó la eficiencia de remoción de la DQO en el intervalo de pH 8-12. Sin embargo, a pH 8 y concentración de QUIT del 1.5 % se observó un máximo en la DQO (48 %), lo que sugiere que este biopolímero está interaccionando de manera más eficiente con los materiales incluidos en el nejayote. El grado de desacetilación del QUIT (85 %), sugiere que, a este valor de pH, los grupos amino están parcialmente protonados, lo que les confiere una considerable carga positiva. Debido a que, las moléculas y partículas presentes en el nejayote poseen carga negativa, se genera una atracción de tipo electrostático que incrementa el valor de eficiencia en la remoción de DQO dada por los puentes de hidrógeno, además de que existen interacciones hidrofóbicas que favorecen la disminución de la DQO a valores superiores de pH (Bolto y Gregory 2007).

La Figura 16a muestra que un incremento posterior a pH 12, desprotona completamente al QUIT y la repulsión ejercida por las moléculas del QUIT hacia las moléculas y partículas presentes en el nejayote es lo suficientemente grande como para evitar un incremento importante en el porcentaje de remoción de la DQO. Por otro lado, se observó que a valores de pH 4, las eficiencias de remoción de DQO disminuyen y llegan a un mínimo cuando la concentración de QUIT es de 1.5 %.

Wang *et al.* (2006) encontraron que el pKa del QUIT se encuentra entre 6.17 a 6.51, lo cual sugiere que los grupos amino de las unidades estructurales de este polímero (glucosamina), se protonan y adquieren una carga positiva a pH 2, en consecuencia, la solubilidad de este polisacárido se ve incrementada. Lo anterior se ve traducida en un aumento en el valor de la DQO final y como resultado, la eficiencia de remoción disminuye de manera drástica.

Ozkorucuklu *et al.* (2009) han reportado que los valores de pKa para diferentes ácidos fenólicos se ubican entre 4.20-4.40 para el grupo carboxilo y 8.70-9.40 para el hidroxilo del grupo fenólico. En este sentido es de esperarse que al incrementarse el pH de la solución en que se encuentren los compuestos fenólicos presentes en el nejayote, tenderán a incrementar su carga negativa y en consecuencia a unirse a la superficie del QUIT por interacciones electrostáticas (Figura 16b). En la Figura 16b también se puede apreciar que la eficiencia de remoción de fenoles no varía de manera importante con la concentración de QUIT. Los niveles de remoción que se muestran en esta figura, sugiere

FESIS TESIS TESIS TESIS

que, el área de contacto con las moléculas del QUIT, tiene un efecto poco importante para la remoción de estos contaminantes presentes en el nejayote.

Respecto a la remoción de azúcares (Figura 16c), se observó un comportamiento similar al observado en los fenoles con dos pendientes definidas. La primera (pH 4-8) es menos pronunciada que la observada en los fenoles, debido a que no existen grupos ionizables en los azúcares del nejayote en este intervalo de pH y la remoción de estos compuestos varía ligeramente con el pH. En contraparte la última región (pH 8-12) es más pronunciada, debido a la ionización de los grupos hidroxilo de los azúcares que se adsorben al QUIT de manera semejante a como se observó en los fenoles (por interacciones iónicas).

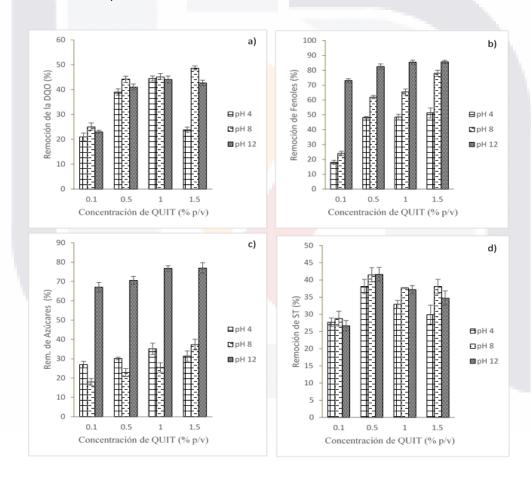


Figura. 16. Porcentaje de remoción de: DQO(a), Fenoles (b), Azúcares (c) y Sólidos Totales (d) en función de la concentración de QUIT en polvo (0.1, 0.5, 1.0 y 1.5 % (p/v)) y el pH $(4, 8 \text{ y } 12) \text{ (p} \le 0.05)$.

En relación a la remoción de ST, en la Figura 16d se muestra que hubo poca diferencia entre los tratamientos a pH 8 y pH 12 (la eficiencia de remoción de ST fue de 37-41 %).

Mientras que a pH 4 se tuvo una eficiencia de 28-38 %. Esto sugiere que a medida que disminuye el pH, la disolución del "polvo" de QUIT se favorece por la protonación de los grupos amino del QUIT incrementando la concentración de ST en el nejayote, lo cual se refleja en una disminución de la eficiencia de remoción de estos sólidos. Por otra parte, cuando se incrementó la concentración de QUIT en "polvo", la hidrólisis de este polisacárido incrementó el contenido de sólidos disueltos. Para comprobar lo antes mencionado, se realizó un testigo, es decir, se aplicó tratamiento a muestras de agua destilada bajo las mismas condiciones de tratamiento que al nejayote y se le midió la cantidad de ST remanente, se obtuvo que a valores de pH 4 el QUIT aporta 5.01 ±0.163 % en promedio, a pH 8, 4.35 ±0.114 % y a pH 12, 4.93 ±0.123 %. Esto afecta la eficiencia del QUIT para la remoción de contaminantes del nejayote.

6.2.4. Tratamiento secuencial.

Con el fin de probar la efectividad de la combinación de los polímeros empleados en los tratamientos anteriores, se realizó un tratamiento utilizando las condiciones que produjeran los mejores valores en la remoción de la DQO. Se utilizó este parámetro debido a que cualquier incremento en la cantidad de contaminantes orgánicos e inorgánicos se refleja en un aumento de esta medida. Así, en primera instancia se aplicó el tratamiento con QUIT soluble al 0.8 % al nejayote y posteriormente al efluente resultante de este procedimiento se le trató con solución de ALG al 0.33 % (p/v) (tratamiento QUIT-ALG). Del mismo modo, para determinar si el orden de la aplicación de ambos biopolímeros afectaba en la remoción de contaminantes del nejayote, se realizó el tratamiento a muestras de nejayote a pH 4 con solución de ALG al 0.33 % y enseguida se aplicó al efluente resultante la metodología previamente descrita utilizando QUIT soluble al 0.8 % (v/v) (tratamiento ALG-QUIT). Finalmente, se determinó la eficiencia de remoción de los mismos parámetros utilizados con ALG y QUIT de manera independiente (DQO, fenoles, azúcares y ST).

En la Tabla 6 se muestra la eficiencia de remoción de DQO, fenoles, azúcares y ST al aplicar los biopolímeros de manera independiente (tratamientos QUIT y ALG) y secuencial (QUIT-ALG y ALG-QUIT). Como puede observarse, el tratamiento con ALG tiene mayor eficiencia de remoción de DQO, fenoles y azúcares que el tratamiento con QUIT, pero pasa lo contrario con los ST. Como ya se mencionó anteriormente, el ALG adsorbe moléculas disueltas y atrapa sólidos suspendidos del nejayote, lo que resulta en una mayor remoción. La baja eficiencia en la remoción de ST podría deberse a que en el

pretratamiento de la muestra de nejayote se añade un agente secuestrante del Ca⁺² (citrato de sodio) y posteriormente, para el proceso de gelificación, se adiciona CaCl₂. Ambas sustancias disueltas en la muestra incrementan el contenido de ST y dan como

resultado una baja eficiencia de remoción de esta variable de respuesta.

Con respecto a los tratamientos secuenciales, se encontró que el tratamiento ALG-QUIT es más eficiente en la remoción de todos los parámetros de respuesta (% de remoción de DQO, de fenoles, de azúcares y de ST). Al añadir QUIT (polímero catiónico), de manera posterior al ALG (polímero aniónico), el material remanente soluble y coloidal con carga negativa es atraído por el QUIT a través de interacciones electrostáticas, incrementándose el porcentaje de remoción de los parámetros a excepción de los azúcares. Probablemente se ve afectada su remoción por la hidrólisis de ambos polímeros que están constituidos por azúcares.

Tabla 6. Porcentaje de remoción de contaminantes en tratamiento con QUIT soluble, ALG y tratamiento secuencial.

Tratamiento	DQO (%)	Fenoles (%)	Azúcares (%)	ST (%)
QUIT	59.74 ±0.36 ^a	46.56 ±2.11ª	55.51 ±1.71 ^a	30.51 ±0.85 ^a
ALG	61.43 ±0. <mark>24^b</mark>	83.46 ±1.76 ^b	60.78 ±0.33 ^a	15.08 ±1.95 ^b
QUIT-ALG	67.21 ±0.85 ^b	55.34 ±0.71 ^a	60.23 ±1.06 ^a	10.47 ±1.90°
ALG-QUIT	70.19 ±0.24°	88.12 ±8.82 ^b	61.37 ±0.02 ^a	46.11 ±2.61 ^d

QUIT: Tratamiento con quitosano soluble al 0.8 % (v/v)

ALG: Tratamiento con alginato de sodio al 0.33 % (p/v)

QUIT-ALG: Tratamiento secuencial con QUIT soluble al 0.8 % (p/v) seguido de ALG al 0.33 % (p/v)

ALG-QUIT: Tratamiento secuencial con ALG al 0.33 %(p/v) seguido de QUIT soluble al 0.8 % (p/v)

TESIS TESIS TESIS

Al tratar la muestra de nejayote con un solo polímero, resulta ser más eficiente el ALG (61.43% remoción de la DQO), pero si éste es seguido de un tratamiento con QUIT (ALG-QUIT) (70.19 % de la DQO), mejora la eficiencia en la remoción de contaminantes solo en un 10 %. Aunque la diferencia es estadísticamente significativa (p≤0.001) entre estos tratamientos, la aplicación a gran escala requiere de un número mayor de operaciones unitarias, además, queda con la misma calidad de agua residual de acuerdo a las normas ya señaladas, por lo que se sugiere dar tratamiento con el ALG solamente.

En otros estudios, como los reportados por Ferreira-Rollón et al. (2014), quienes proponen un tratamiento anaerobio en el que utilizaron un reactor de lodos de flujo ascendente (UASB) para dar tratamiento al nejayote diluido con agua residual municipal que ajustaron a una cantidad de 1-3 g/L de DQO y a temperatura de incubación de 32 °C, la eficiencia de remoción fue del 90%. En otro estudio, realizado por Suarez-Meraz et al. (2016), mostraron la utilidad de remover material coloidal del nejayote con un tratamiento de coagulación-floculación a muestras de nejayote centrifugado. Utilizaron QUIT de diferentes pesos moleculares y lograron remover más del 80% de la turbiedad lo que les permitió cumplir con la norma oficial mexicana (NOM-002-SEMARNAT-1996). En este estudio, a diferencia de los ya mencionados, se dio tratamiento a muestras de nejayote completo. Se utilizaron biopolímeros (ALG y QUIT) que, en primera instancia, no afectan al medio ambiente, ya que son fáciles de degradar. El biopolímero que dio mejores resultados fue el ALG a pH 4 con una concentración del 0.33%, ya que se logró remover el 61 % de la DQO. La remoción de SST mostró buena eficiencia (95%), cabe mencionar que la filtración favorece la remoción de los SST, sin embargo, estos biopolímeros facilitan mucho este proceso, ya que lo hacen más manejable, lo que permite que con este tratamiento se reduzcan las operaciones unitarias como el centrifugado previo al tratamiento o el mezclado con otro tipo de agua. El agua residual de este tratamiento, si bien no alcanza a cubrir con las especificaciones establecidas por las normas oficiales para descargarla en ríos, si permite las descargas al suelo para darle uso como riego agrícola o descargarla al alcantarillado urbano o municipal debido a que no supera las 500 partes por millón de sólidos totales, límite máximo establecido por la norma oficial mexicana (NOM-002-SEMARNAT-1996).

TESIS TESIS TESIS

- 6.3. Tratamiento Biológico.
- 6.3.1. Efecto del pH en el crecimiento de hongos ligninolíticos.

Una de las alternativas propuestas en este trabajo para disminuir los contaminantes del nejayote, fue el tratamiento biológico con hongos ligninolíticos. Este tratamiento se hizo en diferentes etapas para establecer las condiciones de mayor eficiencia. Primeramente, se determinó el efecto del pH sobre el crecimiento del microorganismo en el medio con nejayote filtrado (Tabla 7). Cabe mencionar que se hicieron las pruebas primeramente con nejayote filtrado para aprovechar la muestra del tratamiento fisicoquímico.

En esta prueba se observó que casi todos los hongos tuvieron mayor área de crecimiento a pH 4 ±0.5 siendo que, *Bjerkandera adusta* 4312 la cepa que obtuvo mayor área de crecimiento (49.30 ±1.632 cm²). Sin embargo, a pH 6 ±0.5 todas las cepas en estudio disminuyeron su crecimiento. A este valor de pH, *Bjerkandera adusta* 4312 presentó mayor área de crecimiento (38.093 ±1.036 cm²). Finalmente, a pH 12 ±0.5, *Bjerkandera adusta* 4312 mostró crecimiento en los tres niveles de pH, siendo el de menor crecimiento en pH 8 (12.26 ±0.476 cm²).

Tabla 7. Crecimiento de diferentes microorganismos en diferentes valores de pH en medio agar-nejayote.

	pH 4 ±0.5	pH 6 ±0.5	pH 8 ±0.5
Cepa	Área prom. (cm²)	Área prom. (cm²)	Área prom. (cm²)
Trametes troggi 8156	41.26 ± 1.608	36.286 ± 2.919	4.950 ± 0.317
Phanerochaete chrysosporium 4521	31.763 ± 2.919	36.616 ± 2.658	0.343 ± 0.050
Bjerkandera adusta 4312	49.306 ± 1.632	38.093 ± 1.036	12.260 ± 0.476
Trametes versicolor 8272	48.640 ± 0.768	34.970 ± 1.734	4.553 ± 0.550

Posteriormente, se comparó de forma cualitativa el crecimiento de las cepas en agarnejayote completo y agar-nejayote filtrado a pH 4 ±0.5 (Figura 17). De esta forma se seleccionó la cepa y el tipo de nejayote con mayor crecimiento.

Se observó que *Trametes versicolor* 8272 presentó un crecimiento más abundante, seguido de *Trametes troggi* 8156 *y Bjerkadera adusta* 4312. Los hongos como se

esperaba, tuvieron buena respuesta en el medio de cultivo con nejayote completo, debido a la presencia de sólidos del nejayote conformados por el pericarpio y germen del maíz.

Estos sólidos están compuestos por alto porcentaje de fibra cruda la cual posiblemente estimula la producción de enzimas ligninolíticas (Valderrama-Bravo 2012; Paredes 2009; Dominguez-Espinoza 2002). Dávila y Vázquez-Duhalt (2006) mencionan que *Bjerkandera adusta y Pleurotus eyngii* son capaces de degradar algunos colorantes sintéticos, en específico, por la MnP. Diversos autores han reportado la alta capacidad de *Bjerkandera adusta* para degradar sustratos complejos como colorantes sintéticos como el azul reactivo 4 y pesticidas como el toxofeno, por medio de su sistema enzimático inespecífico, incluso han mencionado que ha superado al hongo *Trametes versicolor* en la remoción de varios compuestos orgánicos recalcitrantes (Holguín-Múnera *et al.* 2017; Chávez *et al.* 2013).

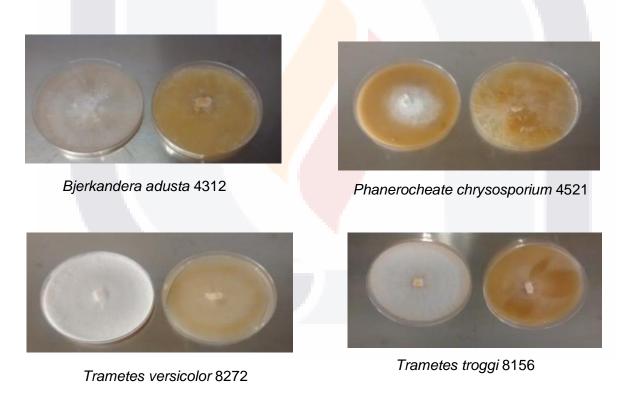


Figura 17. Prueba de crecimiento en agar-nejayote. Lado izquierdo agar-nejayote completo, a la derecha agar-nejayote filtrado.

En este estudio, como ya se ha mencionado, *Bjerkandera adusta* mostró capacidad de crecimiento en un rango mayor de pH fue la razón por la que se trabajó con este hongo. El uso de hongos ligninolíticos en el nejayote ha sido para la recuperación de sustancias

de valor agregado, como los oligómeros de arabinoxilanos. Guerrero *et al.* (2015) realizaron estudios con el nejayote como fuente de carbono, que en su mayoría son arabinoxilanos de cadena larga. Se empleó el nejayote como medio de cultivo para hongos filamentosos y se midió la capacidad de hidrolizar parcialmente dichos arabinoxilanos y obtener oligómeros de alto valor agregado. Del mismo modo, las enzimas extracelulares monitoreadas fueron: xilanasa, celulasa y feruloilesterasa. El empleo de *Bjerkandera adusta* en el nejayote tiene como objetivo principal la biorremediación (para disminuir la carga orgánica del nejayote), a diferencia del estudio antes mencionado.

6.3.2. Efecto de la cantidad de inóculo y la cepa de hongo ligninolítico.

Para medir el efecto de la cantidad de inóculo y determinar la cepa adecuada para tratar el nejayote en medio sumergido, se hizo un diseño factorial 2X2X3 en donde los factores de tratamiento fueron: tipo de muestra (nejayote completo estéril y no estéril) a pH 4.5, tipo de hongo (*Bjerkandera adusta* 4312 y *Trametes troggi* 8156) y cantidad de inóculo (5, 10 y 15 % p/v base húmeda). En tratamientos preliminares se hicieron pruebas para conocer las condiciones de pH para el desarrollo del hongo. Se observó que el pH inicial cambia inmediatamente, este fenómeno se debe a que el Ca(OH)₂ propio del nejayote al combinarse con el CO₂ introducido del medio ambiente, además del CO₂ liberado por el hongo forma bicarbonatos (HCO₃-) y carbonatos (CO₃-2) responsables del cambio del pH a valores hasta de 7.9.

Para evitar el aumento de pH, se eliminó el calcio utilizando citrato de sodio, el cual se utilizó a una concentración del 3 % y luego se reajustó a pH 4.5 para llevar a cabo el tratamiento.

Cabe mencionar que el tiempo de esterilización de las muestras fue más largo (30 min a 121°C) para eliminar todo organismo presente en la muestra y poder descartar alguna influencia en el cambio de pH, ya que se ha reportado la presencia de bacterias gram positivos con actividad catalítica (Díaz-Montes *et al.* 2016) y en otro estudio se aislaron dos cepas (NJY1 y NJY2) pertenecientes a *Bacillus flexus* que son productoras de enzimas feruloilesterasas y poseen características alcalófilas facultativas (Sánchez-González *et al.* 2011). El tiempo de tratamiento fue de 27 días, el muestreo se hizo cada tercer día; como variable de respuesta, se midió la DQO y la actividad enzimática de LiP,

MnP y lacasa. El resultado de la medición de las actividades de estas enzimas fue nulo posiblemente debido a que el nejayote tiene sustancias antioxidantes como lo son los polifenoles, y aunque no se midieron forman parte del grano de maíz, además de la presencia de aminoácidos azufrados como la cisteína (Paredes-López *et al.* 2009), metionina y lisina (Maestro-Durán y Borja-Padilla 1993b). Los compuestos antioxidantes al entrar en contacto con el sustrato oxidado por dichas enzimas lo reducen de forma inmediata. Para medir la presencia de enzimas extracelulares se hace con la oxidación de un sustrato que al hacerlo cambia de color y permite medir la capacidad de la enzima para oxidarlo. En el caso del nejayote no se logró medir dicha actividad debido a la probable acción de los agentes antioxidantes del nejayote antes mencionados. La disminución de la DQO del nejayote evidenció la actividad enzimática del hongo; sin embargo, es probable la presencia de otros organismos como bacterias alcalinófilas propias del nejayote que remueven parte de la materia orgánica presente en el nejayote (Sánchez-González *et al.* 2011).

El efecto de la esterilidad, como se muestra en la Tabla 8, no presenta diferencia significativa entre los tratamientos. Tampoco mostró diferencia significativa el hongo utilizado en condiciones estériles; sin embargo, con el nejayote no estéril *Trametes troggi* 8156 removió solo 5% más que *Bjerkandera adusta* 4312. En las condiciones no estériles como ya se mencionó anteriormente, la presencia de bacterias alcalinófilas es probable que también contribuyeron a la disminución de materia orgánica.

Por su parte, la cantidad de biomasa en el inóculo mostró diferencia significativa, siendo que la mayor remoción de DQO se obtuvo con el 10 % de biomasa (base húmeda). Con *Trametes troggi* 8156 logró remover hasta un 83.09 % con nejayote no estéril, mientras que *Bjerkandera adusta* 4312 logró remover 82.62 % de DQO en nejayote estéril.

Tabla 8. Efecto de la cantidad de inóculo y tipo de hongo (*Trametes troggi y Bjerkandera adusta* 4312) en la remoción de contaminantes en muestras de nejayote estéril y no estéril, en un tiempo de tratamiento de 27 días a 28° C (n = 3).

	Condiciones de tratamiento	Cantidad de inoculo (% p/v)	% DQO
Microorganismo			Removida al final de
			tratamiento
Trametes troggi		5	44.72 ±018
	Estéril	10	82.52 ±1.09
		15	74.15 ±0.91
rrametee a egg.		5	46.03 ±0.98
	No estéril	10	83.09 ±2.10
		15	65.30 ±1.20
	Estéril	5	66.41 ±0.99
Bjerkandera adusta Control		10	82.62 ±0.18
		15	77.86 ±2.06
	No estéril	5	75.65 ±0.87
		10	56.33 ±0.92
		15	79.33 ±1.07
	Estéril	-	52.75 ±1.18
	No Estéril	-	70.48 ±1.04

Cabe señalar que en este expe<mark>rimento el pH no se logró estabilizar a lo largo del tratamiento, probablemente debido a que no fue suficiente la disminución del calcio por el citrato de sodio, aún se observaron cambios en el sistema. Se inició con pH de 4.5 y al final se obtuvo pH 9 ±0.5.</mark>

Las muestras control se sellaron para evitar el contacto con el aire, y se observó que el pH se mantuvo hasta el final del tratamiento sin mucho cambio; sin embargo, en el nejayote inoculado no fue posible, ya que éstos son organismos aerobios (Young- Mi Kim y Hong-Guy, 2009). Se ajustó el pH cada 8 h los primeros dos días a 4.5, este pH permite que los carbonatos se eliminen en forma de CO₂ de esta manera se mantiene durante el tratamiento y así poder mantener el desarrollo del hongo (Bertrand *et al.* 2014; Gómez-Dorado 2005).

A pesar de que se mantuvo el pH estable en las muestras control, se observó una disminución en la DQO, tanto en muestras estériles como no estériles. La presencia de bacterias propias del maíz aisladas por Sánchez-González et al. (2011) podrían explicar esta disminución; sin embargo, en el control estéril, aunque en menor porcentaje, existe

disminución en la cantidad de la DQO. Esta disminución puede deberse a la oxidación por la luz, ya que los fotones de longitud de onda corta interaccionan con compuestos celulares, también hidroliza el peróxido (Maestro-Durán y Borja-Padilla 1993a), lo cual desencadena reacciones oxidativas que se ven reflejadas en la disminución de la DQO. Con base en esta observación el siguiente experimento se hizo en ausencia de luz.

6.3.3. Biodegradación de nejayote completo no estéril por *Bjerkandera adusta* 4312.

Para éste experimento se utilizó una muestra de nejayote completo no estéril a pH 4.5, como ya se mencionó en el apartado anterior, este valor de pH permite el control rápido del pH y las condiciones de esterilidad no mostró diferencia, por lo que se evitó dicho proceso de esterilización. En este experimento se evaluó la efectividad en la remoción de la DQO del nejayote tratado con Bjerkandera adusta 4312 debido a que mostró mayor resistencia a los cambios de pH como puede verse en la tabla 10. Los hongos de la podredumbre blanca, tienen la capacidad de biodegradar la lignina para obtener la energía necesaria para desarrollarse (Dávila 2006, Arora 2004), y aunque en poca cantidad, los sólidos del nejayote tienen material ligninocelulósico (pericarpio desprendido de la nixtamalización) para ser degradado (Rostro-Alanís 2014; Niño-Medina et al. 2006; Bartolo-Pérez et al. 1999). El tratamiento con el hongo Bjerkandera adusta 4312 fue por 30 días en matraces de 2000 mL con una agitación orbital de 125 rpm y el pH se reguló de manera constante para mantenerlo en 4.5. Como control se utilizó nejayote completo no estéril sin inocular. De manera general, se observó que los valores la DQO, los ST y azúcares totales disminuyen conforme pasa el tiempo (figura 17). Sin embargo, la prueba de significancia del tiempo de tratamiento mostró que solo hay cambios significativos en la remoción de la DQO hasta los once días de tratamiento, en este punto se logró una remoción del 52 %, por lo tanto, sería prudente detener el tratamiento biológico a los once días.

Respecto al nejayote control, se observa que la DQO en tiempo cero, es menor que en el nejayote inoculado, esto debido a que en el inóculo hay una parte de medio de cultivo que aumenta la cantidad de la DQO en el sistema. Sin embargo, se observó una disminución en la cantidad de DQO con el paso del tiempo, esto puede deberse a la presencia de bacterias propias del nejayote (bacilos alcalófios), las cuales son capaces de producir xilanasas y esterasas que degradan el pericarpio que conforma los sólidos del nejayote

(Sánchez-González *et al.* 2011). Esto podría explicar la disminución de la DQO del nejayote control. Otro factor que puede provocar la disminución de la DQO es la oxidación por la luz solar, ya que los fotones de longitud de onda más corta que la luz ultravioleta, interaccionan con compuestos celulares (Maestro-Durán y Borja-Padilla 1993; Avila–Zárraga 2009; Álvarez *et al.* 2013). Si bien en este estudio se tomaron las medidas para aislar las muestras de la luz solar, no se puede garantizar que se haya alcanzado por completo. En cambio, en el nejayote inoculado, además de ocurrir los procesos antes explicados, el uso del hongo aceleró la remoción de la DQO.

Se probó un modelo matemático para explicar el sistema de tratamiento (nejayote inoculado) para la disminución de la DQO. Se realizó un análisis de regresión lineal múltiple paso a paso para obtener el modelo que explique mejor la disminución de la DQO. El modelo obtenido fue el siguiente:

DQO = 23710 + 55.1 fenoles -705 tiempo de tratamiento

El valor de R² (ajustado) fue igual a 72 %. Si bien se esperaría un porcentaje de explicacion de la varianza en los datos igual o mayor al 90%, debe considerarse que en este caso se trata de un trataiento biológico, en cual no se puede tener un control extremo de otras variables que puedieran estar afectando la varianza. Por lo tanto se considera que el modelo encontrado es válido.

Se hizo una prueba de significancia paso a paso. El análisis mostró que la presencia de fenoles y el tiempo de tratamiento medido en días, tienen mayor influencia en los valores presentes de DQO.

El análisis del modelo mostró que a mayor concentración de fenoles en menor tiempo de tratamiento, mayor será la cantidad de la DQO. Este efecto es esperado puesto que en la medida en la que el nejayote se expone menos tiempo al hongo, el nivel de remoción es menor y por tanto los valores de la DQO y la concentración de fenoles son elevados. Es hasta que, se aumente el tiempo de tratamiento con el hongo y que las enzimas producidas degraden el material ligninocelulósico del nejayote, que se disminuye el valor de la DQO y concentración de fenoles. El modelo obtenido señala la importancia del tiempo de tratamiento para la remoción de la DQO. En la Figura 18 se muestra que la remoción de la DQO en el nejayote control, fue más lenta que en la muestra de nejayote inoculado.

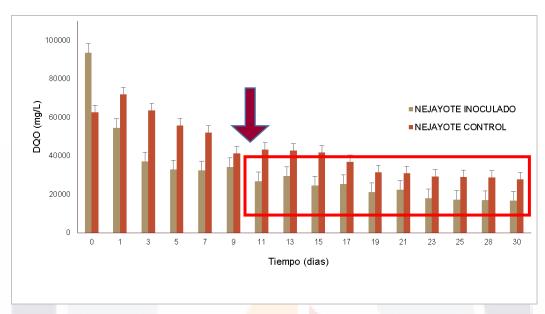


Figura 18. Remoción de la DQO en cultivo sumergido de nejayote completo no estéril con pH 4.5, Tratamiento con *Bjekandera adusta* 4312. Tratamiento por 30 días. Nejayote control (muestra de nejayote completo no estéril sin inocular) ($p \le 0.05$).

La concentración de azúcares reductores equivalentes a glucosa, durante el tratamiento siguió un comportamiento similar a la DQO. Al inicio del tratamiento se observó mayor concentración de azúcares en el nejayote debido a que en el sobrenadante del inóculo existen enzimas que permiten su liberación. En la Figura 19, se muestra que la concentración remanente de azúcares reductores en el nejayote inoculado ocurre desde el inicio del tratamiento. Por ello, no se observó algún cambio significativo en la concentración de azúcares a partir del día once, lo que explica que se vea limitado el crecimiento del hongo. Estos hallazgos ya habían sido explicados por Dávila y Vázquez-Duhalt (2006), señalando que, al disminuir la cantidad de azúcares en el medio, el hongo produce enzimas extracelulares como la celulasas, xilanasas, amilasas y MnP, LiP para degradar material ligninolítico y así obtener los nutrientes necesarios para su crecimiento.

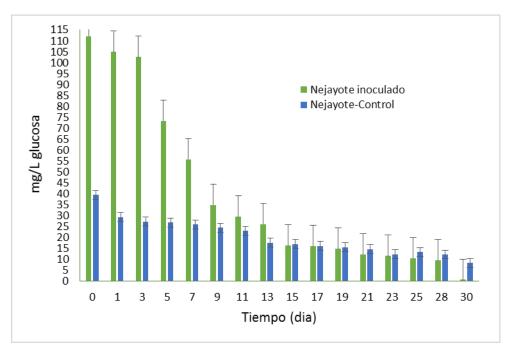


Figura 19. Remoción de la cantidad de azucares reductores en cultivo sumergido de nejayote completo no estéril con pH 4.5, Tratamiento con *Bjerkandera adusta* 4312. Tratamiento por 30 días. Nejayote control (muestra de nejayote completo no estéril sin inocular) ($p \le 0.05$).

Al degradar este material se liberan compuestos fenólicos como se muestra en la Figura 20. Se puede observar que la cantidad de fenoles durante el tratamiento varía en el tiempo, se presentaron picos en los días 5, 11 y 17, esto da evidencia de que hay actividad enzimática, como feruloilesterasas que liberan compuestos fenólicos unidos a la hemicelulosa, y éstos pueden ser oxidados o bien utilizados como mediadores por las enzimas ligninolíticas como la MnP y LiP. La parte última del tratamiento se observa que la presencia de fenoles se mantiene sin cambios.

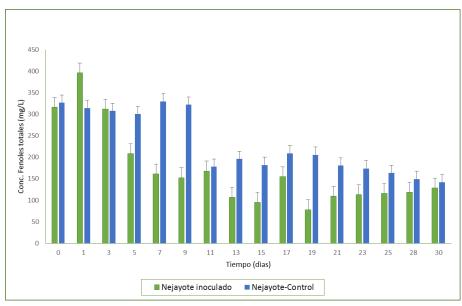


Figura 20. Cantidad de fenoles totales durante el tratamiento con el hongo *Bjerkandera adusta* 4312 en muestras de nejayote completo no estéril ($p \le 0.05$).

En la Figura 21 se muestra la cantidad de sólidos totales respecto al tiempo. De manera general la cantidad de sólidos disminuye conforme pasa el tiempo de tratamiento. Mientras que en el nejayote control no existe diferencia respecto al tiempo. La cantidad de sólidos totales en el nejayote control y en el nejayote tratado es diferente al inicio, debido a que la cantidad de éstos se ve modificada por la adición del hongo. Se puede observar que la cantidad de sólidos del nejayote inoculado presenta un pico alto al tercer día de tratamiento, y después va en declive. El aumento de sólidos en el tercer día evidencia el mayor crecimiento del hongo, el cual es posible debido al consumo de azucares producidos al inicio del tratamiento. Sin embargo, la cantidad de nutrientes en el medio fue una limitante, ya que no se volvió a presentar el aumento en la cantidad de sólidos durante el tratamiento. En este trabajo se observó que a pesar de que el nejayote presentara remoción de la DQO por acción de microorganismos propios del nejayote, el tratamiento con *Bjerkandera adusta* 4312 disminuye el tiempo de remoción de la DQO.

TESIS TESIS TESIS TESIS



Figura 21. Cantidad de sólidos totales remanente durante el tiempo de tratamiento con el hongo Bjerkandera adusta 4312 en muestras de nejayote completo no estéril. ($p \le 0.05$)

Por otro lado, se midió la dureza en el medio expresada como mg CaCO₃/L, se monitoreó para conocer su influencia en el aumento del pH. Las muestras de nejayote se mantuvieron a pH 4.5, para que el CO₂ liberado por el hongo se vaya a la atmósfera. En la Figura 22 se muestra la dureza en función del tiempo, se observa que los primeros 9 días, la dureza fue más alta en muestras de nejayote inoculado que en las muestras de nejayote control, esto puede explicarse por la acción metabólica del hongo, que al biodegradar el material del nejayote, libera CO₂ que a pesar de que está a pH de 4.5 es posible que una fracción de éste se combine con iones hidroxilo para formar bicarbonato que provocan el aumento del pH. Después del día 9 se mantuvo sin algún cambio significativo, al igual que el nejayote control. Esto explica que el máximo crecimiento del hongo se da en los primeros días, como se mencionó en la figura 14 a 18, por lo que la producción de CO₂ por el hongo es limitado a partir del día 11.

TESIS TESIS TESIS TESIS

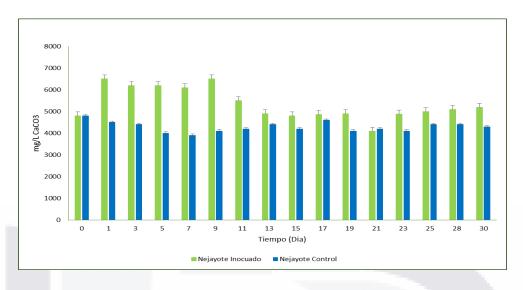


Figura 22. Variación de la dureza del nejayote con respecto al tiempo. Nejayote completo no estéril tratado con *Bjerkandera adusta* 4312 ($p \le 0.05$).

La cuantificación de proteína se realizó con el fin de relacionar la producción de enzimas extracelulares producidas por Bjerkandera adusta 4312 durante el tratamiento del nejayote. La Figura 23 muestra la concentración de proteína soluble, que disminuye en los primeros once días de tratamiento, luego muestra un poco de aumento en su concentración en los días 13 al 15. A partir del día 19 hasta el final del tratamiento aumenta nuevamente la concentración de proteína. Este comportamiento muestra la producción de enzimas extracelulares que responden a la necesidad del hongo para obtener los nutrientes necesarios para su desarrollo, la relación de la cantidad de proteína y la producción de enzimas extracelulares la obtuvieron Rincón-Reina et al. (2016) en una fermentación sólida en mesocarpo de coco para obtener enzimas hidrolíticas por Trametes polizona, observaron que la cantidad de proteína aumentó con el tiempo al igual que la actividad enzimática. Guerrero-Elías et al. (2015) hicieron estudios con el nejayote y una serie de hongos filamentosos de Aspergillus y Trichoderma para hidrolizar parcialmente arabinoxilanos presentes en los sólidos del nejayote y obtener compuestos de valor agregado, la actividad de enzimas que se midieron fueron de xilanasas, celulasas y feruloilesterasa, enzimas que permitieron obtener compuestos antioxidantes como ácido ferúlico y ácido cinámico. En este estudio, la cantidad de proteína en el nejayote control y el nejayote inoculado evidenció la producción de enzimas extracelulares producidas por organismos presentes en el nejayote (nejayote control) o por el hongo (nejayote inoculado). Comparando la cantidad de proteína con la concentración de fenoles y de los ESIS TESIS TESIS TESIS

sólidos totales, muestra que al inicio del tratamiento existen compuestos de fácil acceso para el hongo, por lo que no requiere de producir enzimas especializadas para liberar azúcares del material ligninolítico del nejayote, conforme pasa el tiempo, y al agotarse los nutrientes de fácil acceso, libera enzimas más especializadas para degradar compuestos más complejos (Dávila y Vázquez-Duhalt 2001; Gutiérrez y Martínez 1996). Por esta razón la cantidad de proteína aumenta en la segunda mitad del tratamiento.

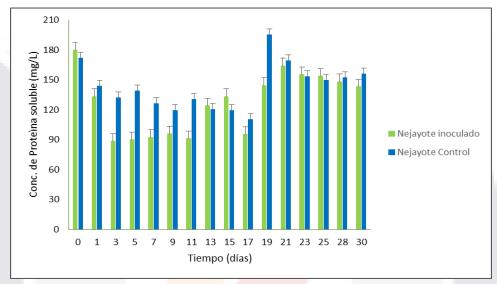


Figura 23. Concentración de proteína soluble durante el tratamiento con el hongo *Bjerkandera adusta* 4312 en muestras de nejayote completo no estéril (p ≤ 0.05).

Puede observarse también que el nejayote control tiene el mismo comportamiento que el nejayote inoculado, a diferencia de que el porcentaje de degradación es menor que con el hongo. Esto se debe muy probablemente a la acción de las bacterias propias del nejayote; Sánchez-González et al. (2011) identificaron la presencia de bacterias alcalófilas, Bacillus flexus NJY2, que tiene la capacidad de crecer en medio alcalino con pericarpio de maíz, lo que les da la facultad de producir un conjunto de enzimas que le permiten degradar sustancias complejas como la hemicelulosa. También se observó niveles altos de actividad feruloil esterasa, que hidroliza el enlace éter del ácido ferúlico que es común en el xilano, esto también les permitió encontrar xilanasas. La capacidad de estas enzimas pudiera explicar que el nejayote control tenga el mismo comportamiento que el nejayote inoculado, debido a que se sugiere la presencia de este tipo de organismos. Sin embargo, cabe la posibilidad de la presencia de organismos ajenos al tratamiento.

La actividad enzimática de LiP, MnP y lacasa no se logró medir debido a la presencia de agentes antioxidantes disueltos en el nejayote. Se hizo un ensayo para corroborar que dichos agentes antioxidantes impiden la medición de la actividad de estas enzimas. Para esto se evaluó la actividad de lacasa comercial al 2 % (p/v) y obtuvo una actividad de 51.01 ± 8.28 U/L, mientras que la actividad lacasa con nejayote y sustrato fue nula. Este ensayo demuestra que el nejayote contiene antioxidantes que impiden medir la actividad, es decir, la lacasa oxida al sustrato y los agentes antioxidantes lo reducen inmediatamente de forma tal, que no es posible medir su actividad enzimática.

6.4. Tratamiento biológico posterior al fisicoquímico.

Como parte final de este estudio, se aplicó una combinación de tratamiento biológico con el fisicoquímico a muestras de nejayote, siguiendo los procedimientos que resultaron con mejor rendimiento en los experimentos anteriores. Para controlar el efecto de orden del tratamiento, se probaron las siguientes combinaciones: a) tratamiento biológico seguido de tratamiento fisicoquímico (BIOL-FQ) y b) tratamiento fisicoquímico seguido de tratamiento biológico (FQ-BIOL). Las condiciones para el tratamiento biológico fueron: pH 4.5, en matraz Erlenmeyer de 2000 mL, agitación orbital (125 rpm), temperatura de 28 °C y 10 % (p/v) de inóculo de *B adusta* 4312. En el tratamiento fisicoquímico se siguió el procedimiento con el que se obtuvieron mejores resultados: tratamiento con alginato de sodio al 2 % (v/v), y de forma consecutiva se trató con 0.8 % p/v de quitosano soluble. Para cada combinación de hizo un control, es decir, se aplicó el tratamiento a nejayote sin inocular.

En la Tabla 9 puede observarse que con el tratamiento por separado con *Bjerkandera* adusta 4312 se logró una remoción del 54.13 % de la DQO y con el fisicoquímico se logró un 69.57 % de remoción de la DQO. En el nejayote control del tratamiento biológico se obtuvo una remoción del 26.9 ±0.82 %. Se pone énfasis en los resultados de la DQO ya que es un parámetro que muestra el nivel de contaminación de un efluente.

La combinación de los tratamientos elevó el porcentaje de remoción. En la secuencia del tratamiento BIOL-FQ, se logró remover el 79.45 % de la DQO, mientras que el nejayote control el 77.2 % de la DQO y en la secuencia FQ-BIOL se logró una remoción del 86.26 % de la DQO, siendo ésta última la de mayor eficiencia. Sin embargo, la mejora que aporta el tratamiento BIOL al FQ es del 16.69 % y el fisicoquímico aporta una mejora al

ESIS TESIS TESIS TESIS

tratamiento BIOL de 25.32 %. El nejayote control para esta última secuencia no se logró obtener resultados, ya que se contaminaron las muestras debido a que el tratamiento FQ no se hace en condiciones estériles.

Tabla 9. Porcentaje de remoción de contaminantes en tratamiento biológico, fisicoquímico secuencial y tratamiento combinado

Tratamiento	DQO (%)	Fenoles (%)	Azúcares (%)	ST (%)
BIOL	54.13 ±0.85	28.73 ±01.71	28.73 ±0.97	46.81 ±0.67
BIOL-FQ	79.45 ±0.72	78.34 ±2.35	87.28 ±1.06	59.88 ±0.33
FQ	69.57 ±0.45	71.80 ±1.45	70.61 ±0.65	46.90 ±0.43
FQ-BIOL	86.26 ±0.68	86.23 ±1.93	59.03 ±1.32	63.72 ±0.87

Biol. Tratamiento biológico con B. adusta 4312 por 15 días en matraz Erlenmeyer de 2000 mL.

Estos hallazgos superan a los reportados por otros autores quienes sólo aplicaron un tipo de tratamiento. Por ejemplo, con técnicas físicas como la ultrafiltración, se reportó una reducción de la materia orgánica medida en carbono orgánico total del 28.38% (Castro-Muñoz 2015). Otra técnica probada por García-Zamora et al. (2015) fue tratamiento con lacasa en presencia de quitosano y lograron remover solo el 78% de la DQO.

Por otro lado, se han propuesto diversos tratamientos biológicos como nejayote para la producción de metano mediante un sistema acoplado que implica un sistema de digestión anaerobia con un reactor anaerobio de columna empacada (APCR) y un reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB), este proceso implica el tratamiento de 19 días (España-Gamboa *et al.* 2018). Aunque representa buena eficiencia en la remoción de la DQO (96 %), este proceso resultó más eficiente en la disminución de este parámetro en muestras de nejayote con DQO de 22 gL-1 que con las de una DQO mayor (29 g/L-1). Otro método que se empleó fue la purificación del nejayote por medio de hidrólisis enzimática de los sólidos, y un tratamiento de micro, ultra y nanofiltración que removieron el 77.5% de la DQO que les permitió descargar sin ningún problema el nejayote tratado al alcantarillado municipal (Ramírez-Jiménez y Castro Muñoz 2020; Díaz-Montes *et al.* 2016). Es entonces evidente que el uso de hongos mejora la remoción de materia orgánica del nejayote; sin embargo, alarga el tiempo de tratamiento y el porcentaje de remoción adicional no es representativo (16.69% en este estudio).

FQ. Tratamiento fisicoquímico secuencial con Alginato de sodio al 0.33% y Quitosano soluble al 0.8 %

BIOL-FQ. Tratamiento Biol seguido de FQ FQ-BIOL. Tratamiento FQ seguido de Biol

La remoción de la concentración de azúcares reductores dada por el tratamiento secuencial FQ-BIOL resultó menos efectivo. Esto probablemente a que haya quedado fragmentos de los biopolímeros en el nejayote, además, la actividad enzimática del hongo en la remoción de los sólidos del nejayote libera azúcares que al ser hidrolizados por enzimas como la xilanasas, celulasas, liberan azúcares reductores (Martínez-Anaya et al. 2008; Pérez et al. 2001). Esto se relaciona con la cantidad de fenoles removidos del nejayote, como se observa en la tabla 12, este tratamiento (FQ-BIOL) removió el 86.3%, lo que permite pensar que hubo actividad enzimática sobre el material sólido del nejayote. La cantidad de sólidos totales también se removió con más eficiencia en este tratamiento, ya que por una parte el hongo degrada los sólidos del nejayote y a la hora de separar el hongo al término del tratamiento, los sólidos quedan atrapados por el hongo, lo que se ve reflejado en el porcentaje de remoción. Esto se ve reflejado en ambas combinaciones de tratamiento, en donde está involucrado el tratamiento BIOL, la remoción de los sólidos es más eficiente.

7. CONCLUSIONES

Con base a los hallazgos de este estudio, se considera que el mejor tratamiento para disminuir la carga orgánica del nejayote completo es el tratamiento fisicoquímico secuencial ALG-QUIT, con el cual se logró remover el 70% de la DQO.

El tratamiento fisicoquímico del nejayote completo con los biopolímeros ALG y QUIT por separado resultó efectivo para disminuir los niveles de contaminantes (DQO) en un 61.43 % y 59.74 % respectivamente. Los factores con los que se obtuvo este resultado fueron ALG con una concentración de 0.33 % (p/v) y pH 4, y con QUIT una solución al 0.8 % (v/v). Sin embargo, el tratamiento secuencial ALG-QUIT mejora hasta un 10 % la remoción de la carga orgánica. Por su parte la disminución de fenoles totales, azucares reductores y ST con el tratamiento secuencial fue de 55.34%, 60.78% y 10.47 % respectivamente.

El material suspendido y disuelto del nejayote al interaccionar con los biopolímeros, reducen de manera significativa la cantidad de los contaminantes (DQO, fenoles, azucares reductores y ST). Si solo se llevara a cabo una filtración, estos parámetros se reducirían en un 33.4 ± 0.41 % de DQO, 35.2 ± 0.2 % de fenoles, 34.73 ± 0.23 de azúcares y 13 % de ST.

Además de la eficiencia en la remoción de dichos parámetros, los biopolímeros facilitan el manejo de este tipo de aguas para la eliminación del material sólido del nejayote tratado. Lo anterior sugiere que dichos polímeros son una opción viable de aplicarse en el tratamiento de este residuo debido a que son polisacáridos biodegradables y los residuos sólidos provenientes del tratamiento del nejayote también pueden ser biodegradados de manera efectiva. Incluso es posible que este residuo pueda ser materia prima para el proceso de composteo, de producción de biogás e incluso como alimento para ganado.

Los biopolímeros utilizados tienen potencial para escalarse a nivel industrial, considerando su capacidad de remoción de contaminantes. Inclusive permite obtener un efluente apto para uso de riego agrícola o bien, descargarlo directamente al alcantarillado municipal o urbano. No se pierda de vista que el maíz es el alimento básico en México y América Latina, por lo que es más factible generar efluentes aptos que modificar la cultura de la alimentación.

El tratamiento biológico logró una remoción de DQO menor a la obtenida con el tratamiento fisicoquímico secuencial ALG-QUIT, alcanzando solo el 52 % y en un tiempo mayor de tratamiento. Por su parte el tratamiento combinado FQ-BIOL mostró una efectividad superior en un 16.6 % en la remoción de la DQO que el tratamiento fisicoquímico. No obstante, se requiere mayor número de operaciones unitarias lo que incrementa su costo-efectividad. Por lo tanto, se sugiere realizar otros ensayos en los que se logre eficientar ambos tratamientos.

TESIS TESIS TESIS

8. REFERENCIAS

- Alvarado-Granados A.R., Díaz-Cuenca E. y Guerrero-Peñuelas A. G. (2013). Diagnóstico para el saneamiento del agua en las cuencas de la laguna de San Miguel Almaya en el Valle de Toluca, México. Quivera, 15 (2013-2), 93-121.
- Mex-Álvarez R.M.J., Bolívar-Fernández N.J., Garma-Quen P.M., Tut-Heredia J.A., Romero-Guillén K.I. (2013). Actividad antioxidante de cinco variedades de maíz cultivadas en Campeche, México. Boletín Latinoamericano y de Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 12(6):558-571.
- APHA, AWWA, WEF. (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater (20th ed.). American Public Health Association/American Waste Works Association/Water Environmental Federation, Washington, D.C., USA, pp. 1207.
- Annanduray G. (2002). Adsorption of basic dye on strongly chelating polymer: Batch Kinetics Studies. Iran. Polym. J. 11:1026-1265.
- Argun M. S. (2017). Treatment and alternative usage possibilities of special wastewater:

 Nejayote. J. Food Process Eng. 41:12609-12616.

 https://doi.org/10.1111/jfpe.12609
- Ayala-Soto F. E., Serna-Saldívar S. O., García-Lara S., Pérez-Carrillo E. (2014). Hydroxycinnamic acids, sugar composition and antioxidant capacity of arabinoxilans extracted from different maize fiber sources. Food Hydrocolloid. 35:471-475. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.004
- Ávila-Zárraga J.G. (2009). Síntesis fotoquímica mediante luz solar. Educación química. UNAM. 426-432.
- Bartolo-Pérez P., Peña J.L., Cruz-Orea A. y Calderón A. (1999). Estudio de la composición química de pericarpio de maíz con las técnicas XPS y EDAX. Superficies y Vacío: 8:64-68.
- Battistuzzi G., Bellei M., Leonardi A., Pierattelli R., De Candia A., Vila A. J. y Sola M. (2005). Reduction thermodynamics of the T1 Cu site in plant and fungal laccases. J. Bio.I Inorg. Chem. 10:867–873. https://doi.org/10.1007/s00775-005-0035-z

- Bertrand B., Martínez-Morales F., Tinoco R., Rojas-Trejo S., Serrano-Carreón L., Trejo-Hernández M.R. (2014). Induction of laccases in *Trametes versicolor* by aqueous Wood extracts. World J. Microbiol Biotechnol. 30:135-142. https://doi.org/10.1007/s11274-013-1420-3
- Berlanga-Reyes C., Carvajal-Millan E., Niño-Medina G., Rascón-Chu A., Ramírez-Wong B., y Magaña-Barajas E. (2011). Low-value maize and wheat by-products as a source of ferulated arabinoxylans, En: Waste Water Treatment and Reutilization. (García-Einschlag, F.S. Ed.). Intech, Croacia, 341-353. http://doi.org/10.5772/15840
- Blackburn R. (2004). Natural polysaccharides and their interactions with dye molecules: Applications in Effluent Treatment. Environ Sci. Technol. 38:4905-4909. http://doi.org/10.1021/es049972n
- Bolto B. y Gregory J. (2007). Organic polyelectrolytes in water treatment. Rev. Water Research 41 (11):2301-2324. https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.03.012
- Bourbonnais R., Paice M. G. (1990). Oxidation of non-phenolic substrates: an expanded role for laccase in lignin biodegradation. FEBS Lett. 267:99-102. https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80298-W
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantization of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254. http://doi.org/10.1006/abio.1976.9999.
- Budnyak T., Terntykh V., Yanovska E. (2014). Chitosan immobilized on silica surface for wastewater treatment. Materials Science (Medziagotyra). 20 (2):177-182. http://dx.doi.org/10.5755/j01.ms.20.2.4975
- Bumpus J. y Aus D. (1987). Biodegradation of Environmental Pollutants by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: Involvement of the Lignin Degrading System. BioEssays. 6 (4):166-170. https://doi.org/10.1002/bies.950060405
- Cai D y Tien M. (1991). Lignin Peroxidase of *Phanerochaete* chrysosporium. Evidence for an acidic ionization controlling activity. J. Biol. Chem. 266:14464-14469.

Caldera Y., Gutiérrez E., Fuentes L., Mendoza I., Rodríguez Y. y Sánchez M. (2015).

Quitosano: un coagulante natural alternativo para el tratamiento de aguas con alta

turbidez. REDIELUZ. 5:184-188.

- Caldera Y., Rodríguez Y., Oñate H., Prato J. y Gutiérrez E. (2011). Eficiencia del quitosano como coagulante durante el tratamiento de aguas de baja turbidez asociadas a la producción de petróleo. Revista Tecnocientífica. 1:45-52. http://dx.doi.org/10.31910/rudca.v21.n2.2018.990.
- Cameron M. D., Timofeevski S. y Aust S. D. (2000). Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. Appl Microbiol Biotechnol. 54:751-758. https://doi.org/10.1007/s002530000459
- Campechano Carrera E.M., Figueroa Cárdenas J.D., Arámbula Villa G., Martínez Flores H.E., Jiménez Sandoval S.J. and Luna Bárcenas Gabriel. (2012). New ecological nixtamalization process for tortilla production and its impact on the chemical properties of whole corn flour and wastewater effluents. International Journal of Food Science and Technology. 47:564-571. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02878.x
- Campo-Vera Y., Delgado M. A., Roa Y., Mora G., Carreño-Ortiz J. (2018). Evaluación preliminar del efecto del quitosano y cáscara de naranja en la coagulación-floculación de aguas residuales. Rev. U.D.C.A Act. y Div. Cient. 21(1):565-572. http://doi.org/10.31910/rudca.v21.n2.2018.990
- Clemente A.R., Anazawa, T.A., and Durrant L. R. (2001). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon by soil fungi. Braz J Microbiol. 32:255-261. https://doi.org/10.1590/S1517-83822001000400001
- Castro-Muñoz R., Cerón-Montes G. I., Barragán-Huerta B. E. y Yañez-Fernández J. (2015). Recovery of carbohydrates from nixtamalization wastewaters (nejayote) by ultrafiltration. Rev. Mex. Ing. Quim. 14 (3): 735-744.
- Chávez G., Estrada N., Gómez J., Choque R., Crespo C., Álvarez M. T., (2013). Potencial de cepas fúngicas en el área de biotecnología fúngica. Revista Con-Ciencia. 1(1):85-92.

- Chan-Cupul W., Heredia-Abarca G. P. y Rodriguez-Vazquez R. (2016). Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática ligninolítica de macromicetos del estado de Veracruz, México. Rev. Int. Contam. Ambie. 32(3):339-351. https://doi.org/10.20937/RICA.2016.32.03.08
- Cheng W.P., Chi F.H., Yu R. F. y Lee Y.C. (2005). Using chitosan as a coagulant in recovery of organic matters from the mash and lauter wastewater of brewery. J. Polym. Environ. 13:383-388. https://doi.org/10.1007/s10924-005-5533-0
- Christian, V., Shrivastava, R., Shukla, D., Modi, H. A. y Vyas, B. R. (2005). Degradation of xenobiotic compounds by lignin-degrading white-rot fungi: enzymology and mechanisms involved. Indian J.Exp.Biol. 43:301-312. http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/23105
- Cruz L. (2007). Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii T*h003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Tesis de Grado en Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Jveriana. Bogotá-Colombia. http://www.javeriana.edu.co/bibllos/tesis/ciencias/tesis23.pdf.Acceso:Octubre 2020.
- Colina A., Ferrer A. y Urribarri L. (2009). Cellulase production by *Trichoderma reese* Rut C-30 from different cellulosic substrates. Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia, 32:152-159.
- Core R. T. R. (2013). A Language and environment for statistical computing. R, Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. https://cran.r-project.org/doc/manuals/fullrefman.pd
- Cuervo L., Folch J.L., Quiroz R.E. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de Etanol. BioTecnología. 13 (3):11-25.
- D'Annibale A., Ricci M., Leonardi V., Quarantino D., Mincione E. y Petruccioli M. (2005).

 Degradation of aromatic hydrocarbons by white rot fungi in a historically contaminated soil. Appl Environ Microbiol. 90:723-731.

 https://doi.org/10.1002/bit.20461
- Díaz de Apodaca E., Villarán Velasco M, Río Pérez F, Ramírez A, López C. y Lorenzo Ibarreta L. (2007). Utilización de adsorbentes basados en quitosano y alginato sódico para la eliminación de iones metálicos: Cu²+, Pb²+, Cr³+ y Co²+. Rev. Iberoamer. Polím. 8 (1):20-37.

ESIS TESIS TESIS TESIS

- Díaz-Montes, E., Castro-Muñoz, R. y Yáñez-Fernández J. (2016). An overview of nejayote, a nixtamalization by product. Ingeniería Agrícola y Biosistemas 8 (2):41-60. https://doi.org/10.5154/r.inagbi.2016.03.002
- Demir, G. (2004). Degradation of toluene and benzene by *Trametes versicolor*. J.Environ Biol. 25:19-25. https://doi.org/10.4489/MYCO.2010.38.4.238
- Domínguez- Espinosa R. y Pancho-Carrillo D. (2003). Efluentes de la industrialización del maíz: ¿contaminante o recurso valioso? Revista de la Universidad Autónoma de Yucatán. 227:54-63.
- Dominguez-Espinoza R., Wang R. y Pacho-Carrillo J.D. (2002). Residuos agroindustriales como materia prima para la producción de compuestos químicos finos. Tecnol.Ciencia. Ed. (IMQ) 17 (2):77-83.
- Donati I. y Paoletti S. (2009). Material Properties of Alginates En: B.H.A. Rehm (ed.), Alginates: biology and applications. Microbiology Monographs 13. Springer Verlag, Berlin, Germany. 13:1-53. https://doi.org/10.1007/978-3-540-92679-5_1
 - Donati I., Holtan, S., Morch A., Borgogna M., Dentini M. y Skjak-Braek G. (2005).
 New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium-alginate gels.
 Biomacromol. 6:1031-1040. https://doi.org/10.1021/bm049306e
- Draget K. I., Moe T. M, Skja°k-Bræk G. y Smidsrød O. E. (2006). Alginates En: Food polysaccharides and their applications (Alistar, M.S., Phillips, G. S., Willams, P. A. Ed. Taylor & Francis Group. Boca Ratón, FL. Cap. 9 pp. 289-334.
- Durán-de Bazúa, C., Sánchez-Tovar, S.A., Hernández-Morales, M.R. y Bernal-González, M. (2007). Use of anaerobic-aerobic treatment system for maize processing Installations: Applied Microbiology in Action. Formatex. Capitulo 1. pp. 3-12. https://doi.org/10.5772/16032
- Eichlerova I., Homolka I., Nerud F. (2007). Decolorization of high concentration of synthetic dye by the white rot fungus *Bjerkandera adusta* strain CCBAS 232. Dyes and Pigments. 75:38-44. https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2006.05.008

TESIS TESIS TESIS

- Escorcia D., Hernández M., D., Sanchez M. y Benavente M. (2009). Diseño y montaje de una planta piloto para la extracción de Quitina y proteínas. Nexo, Revista Científica. 22 (02):45-55. https://doi.org/10.5377/nexo.v22i2.42
- Espaa-Gamboa E., Domínguez-Maldonado J., Tapia-Tussell R., Chale-Canul J., Alzate-Gaviria L. (2018). Corn industrial wastewater (nejayote): a promising substrate in Mexico for methane production in a coupled system (APCR-UASB). Env. Science and Pollution Res. 25(1):712-721. https://doi.org/10.1007/s11356-017-0479-z
- Evans Ch. And Hedger J.N. (2001). Degradation of plant cell wall polymers. En: Fungi in Bioremediation. Edited by Gadd, G.M. Cambridge Univerity press. 1-25.
- FAO. (1993). El maíz en la nutrición humana. Colección FAO: Alimentación y nutrición, Nº25. Capítulo-2. pp. 31-63.
- Fernández J. A.; Henao L. M., Pedroza-Rodríguez A. M. y Quevedo-Hidalgo B. (2009). Inmovilizacion de hongos ligninolíticos para la remoción del colorante negro reactivo 5. Rev. Colomb. Biotecnol. 9 (1):59-72.
- Ferreira-Rolón A., Ramírez-Romero G. y Ramírez-Vives F. (2014). Aumento de la actividad metanogénica en lodos granulares precipitando calcio en el nejayote mediante el burbujeo de CO₂. Rev. Mex. Ing. Quim. 13 (2):517-525.
- Flores-Farías R., Martínez-Bustos F., Sal<mark>inas-Mo</mark>reno Y. y Ríos E. (2002). Caracterización de harinas comerciales de maíz nixtamalizado. Agrociencia. 36:557-567.
- Galhaup C., Goller S., Peterbauer C. K., Strauss J. y Haltrich D. (2002). Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. Microbiology. 148:2159-2169. https://doi.org/10.1099/00221287-148-7-2159.
- García-Zamora J. L., Sánchez-González M., Lozano, J.A., Jáuregui J., Zayas T., Santacruz V., Hernández F. y Torres E. (2015). Enzymatic treatment of wastewater from the corn tortilla industry using chitosan as an adsorbent reduces the chemical oxygen demand and ferulic acid content. Process Biochem. 50:125–133. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.10.012

- Ge Y., Cui X., Liao Ch. y Li Z. (2017). Facile fabrication of green geopolymer-alginate hybrid spheres for efficient removal of Cu (II) in water: Batch and column studies. Chem. En. J. 311:126–134. https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.11.079
- Glenn J. K. y Gol, M. H. (1985). Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys. 242:329-341. https://doi.org/10.1016/0003-9861(85)90217-6
- Gold M. H., Wariishi H., y Valli K. (1989). En: Biocatalysis in agricultural biotechnology (Whitaker, J. R., y Sonnet, P., Ed.) A CS Symposium Series. 389. pp. 127-140. https://doi.org/10.1021/bk-1989-0389.ch009
- Gómez-Dorado C, Martínez-Salgado M, Nieto- Mosquera D, Pedrosa-Rodríguez A., Rodríguez-Vázquez y Rosas-Acosta J. (2005). Estudio del efecto de dos inductores y un protector enzimático sobre la actividad de las enzimas Mnperoxidasa y lacasa producidas por *Trametes versicolor* y su efecto en la decoloración de efluentes de la industria papelera. Universitas Scientiarum. Revi. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 10 (2):37-45.
- González Alvarado, G., (2009). Estabilidad e Intercambio de iones calcio en geles de alginato. Reporte de residencia profesional. Instituto Tecnológico de Durango, Departamento de Ingenierías Química y Bioquímica. pp. 44.
- Guibal E., Van Vooren M., Dempsey B.A. y Roussy J. (2006). A Review of the use of chitosan for the removal of particulate and dissolved contaminants. Separ. Scie. Technol. 41:2487–2514. https://doi.org/10.1080/01496390600742807
- Guibal E. y Roussy J. (2007). Coagulation and flocculation of dye-containing solutions using a biopolymer (Chitosan). React. Funct. Polym. 67:33-42. https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2006.08.008
- Gillén-Navarro G. K., Márquez-Rocha F.J., Sánchez-Vázquez José E. (1998). Producción de Biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. Rev. Iveroam. Micol. 15:302-306.

- Guerrero E., Rodríguez-González J. A., Assaf-Torres J.A., Mateos-Díaz J.C., Camacho-Ruiz R. M. (2015). Búsqueda y selección de hongos filamentosos capaces de hidrolizar arabinoxilanos presenes en el nejayote. En: Memorias del XXXVI Encuentro Nacional de la AMIDIQ, del 5 al 8 de mayo de 2015, Cancún, Quintana Roo, México. 1120-1123.
- Gurdo N. (2016). Mejoramiento de la levadura Saccharomyces cerevisiae Y138 por ingeniería evolutiva para la producción de bioetanol de segunda generación. (Tesis de pregrado). Instituto de investigaciones Biotecnológicas. Argentina. https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4246.3602.
- Gutiérrez-Cortéz E., Rojas-Molina I., Rojas A., Arjona J.L., Cornejo-Villegas M.A., Zepeda-Benítez Y., Velázquez-Henández R., Ibarra-Albarado C. y Rodríguez-García M.E. (2010). Microstructural changes in the maize kernel pericarp during cooking stage in nixtamalization process. Journal of Cereal Science. 51:81-88. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2009.098
- Gutiérrez-Uribe J. A., Rojas-García C., García-Lara S. y Serna-Saldívar S. O. (2010). Phytochemical analysis of wastewater (nejayote) obtained after lime-cooking of different types of maize kernels processed into masa for tortillas. Journal of Cereal Science. 52:410-416. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2010.07.003
- Gyu-Park H y Yun-Chae M. (2004). Novel type of alginate gel-based adsorbents for heavy metal removal. J Chem. Technol Biotechnol. 79:1080-1083. https://doi.org/10.1002/jctb.1080
- Harvey P. and Thurston C. (2001). The biochemistry of lignolytic fungi. En: Fungi in Bioremediation. Edited by Gadd, G.M. Cambridge Univerity press. 27-51.
- Heinfling A., Ruiz-Dueñas F. J., Martínez M. J., Bergbauer M., Szewzyk y U., Martínez A. T. (1998). A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta*. FEBS Lett. 428:141-146. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00512-2
- Hernández-Cocoletzi, Águila-Almanza E., Flores-Agustín O., Viveros-Nava E.L y Ramos-Cassellis E. (2009). Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. Superficies y Vacío. 22 (3)57-60.

TESIS TESIS TESIS

- Higuchi, T. (1990). Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. Wood. Sci. Technol. 24:23-63.
- Holguín-Múnera J. F., Escobar-Oquendo A. E., Monroy-Rodríguez R. P., Muñoz-Marin G.
 M. (2017). Remoción de colorantes reactivos empleando el hongo *Bjerkandera adusta*. Informador Técnico (Colombia). 8 (2):142-150. http://doi.org/10.23850/22565035.877
- Hofrichter M. (2002). Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). Enzyme and Microbial Technology. 30:454–466. https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00528-2
- Sodeneath H., Jug-In L., Seaung-Ok Y., Hyekyeng J., Hee-Wook R. y Kyung-Suk Ch. (2017). Decolorizationof textile dyes in an air-lift bioreactor inoculated with *Bjerkandera adusta* OBR105. Jour. Envi. Science and Health. 52:1099-1111. https://doi.org/10.1080/10934529.2017.1340753
- INEGI. Instituto Nacional de Estadística, Geográfica e Informática. (2004). Industrias manufactureras, censo económico. México.
- Izarra M. L., Santayana M. L., Villena G. K., Gutiérrez-Correa M. (2010). Influencia de la concentración de inóculo en la producción de celulasa y xilanasa por *Aspergillus niger*. Rev. Colomb. Biotecnol. 7:139-150.
- Janve B., Yang W., Kozman A., Sims C., Teixeira A., Gunderson M. A. y Rababah T. M. (2013). Enhancement of Corn Nixtamalization by Power Ultrasound. Food Bioprocess Technol. 6:1269-1280. https://doi.org/10.1007/s11947-012-0816-7
- Jáuregui-Rincón J., Lozano-Álvarez J. A., Medina-Ramírez I. (2009). Zimm-Bragg Model Applied to Sorption of Dyes by Biopolýmers: Alginic Acid and Xanthan. In: Biotechnology of Biopolymers. 165-190.
- Jaszek M, Grzywnowicz E, Malarczyk E, Leonowicz A. (2006). Enhanced extracellular laccase activity as a part of the response system of white rot fungi: *Trametes versicolor* and *Abortiporus biennis* to paraquat-caused oxidative stress conditions. Pesticide Biochemistry and Physiology. 85:147-154. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.01.002

- Kahraman S. and Yesilada O. (2003). Decolorization and Bioremediation of Molasses Wastewater by White-Rot Fungi in a Semi-Solid-State Condition. Folia Microbiol. 48 (4):525-528. https://doi.org/10.1007/BF02931335
- Keharia H., Madamwar D. (2002). Transformation of textile dyes by white-rot fungus *Trametes versicolor*. Appl Biochem Biotechnol. 102 (103):99-108. https://doi.org/10.1385/ABAB:102-103:1-6:099
- Kirk T. K., Chang H. M. (1975). Decomposition of lignin by white-rot fungi. II. Characterization of heavily degraded lignins from decayed spruce. Holzforschung. 29:56-64.
- Lacayo M., Terrazas E. Bavel B. y Mattasson B. (2006). Degradación de toxafeno en medio líquido por *Bjerkandera sp* BOL13 utilizando diferentes sustratos. Encuentro, año XXXVIII. 75:46-57.
- Lárez-Velázquez C. (2003). Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. Rev. Iber. de Pol. 4 (2):91-109.
- Levin L., Papinutti L. y Forchiassin F. (2004). Evaluation of argentinean white rots fungi for their ability to produce lignin-modifyng enzymes and decolorize industrial dyes. Bioresour Technol. 2:169-176. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.12.002
- Leonowicz A., Matuszewska A., Luterek J., Ziegenhagen D., Wojtas-Wasilewska M., Cho, N.S., Hofrichter, M. (1999). Biodegradation of lignin by white-rot fungi. Fungal Genet Biol. 27:175-185. https://doi.org/10.1006/fgbi.1999.1150
- Levin L., Viale, A. y Forchiassin, A. (2003). Degradation of organic pollutants by the white rot basidiomycete *Trametes trogii*. International Biodet and Biodeg. 52:1-5. https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00091-4
- Li J., Song X., Pan J., Zhong L., Jiao S. y Ma Q. (2013). Adsorption and flocculation of bentonite by chitosan with varyingdegree of deacetylation and molecular weight. Int. J. Biol. Macromol. 62:4–12. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.08.009
- Lin N., Bruzzese C. y Dufresne A. (2012). Tempo-Oxidized Nanocellulose Participating as Crosslinking Aid for Alginate-Based Sponges. ACS Appl: Mater. Interfases. 4:4948-4959. https://doi.org/10.1021/am301325r

Lozano-Alvarez J. A., Marañón-Ruiz V.F., Jáuregui-Rincón J., Medina-Ramírez I., Frausto-Reyes C. y Salinas-Gutiérrez R. (2015) Removal of Direct Dyes with alginic acid. J.

Mex. Chem. Soc. 59:215-228.

- Lozano-Álvarez J.A., Jáuregui-Rincón J., Mendoza-Díaz G., Rodríguez-Vázquez R. y Frausto-Reyes C. (2009). Study of sorption equilibrium of biopolymers alginic acid and xanthan with C.I. Disperse Yellow 54. J. Mex. Chem. Soc. 53 (2):59-70.
- Maestro-Durán R. y Borja-Padilla R. (1993a). Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. Grasas y Aceites. 44 (2):101-106.
- Maestro-Durán R. y Borja-Padilla R. (1993b). Actividad antioxidante de compuestos naturaes nitrogenados. Grasas y Aceites. 44 (3):204-207
- Maheswari D., Gohade S. y Varma P. (1994). Paper mil sludge as a potential source for cellulase production by *Trichoderma reesei* QM9123 and *Aspergillus niger* using mixed cultivation. Carbohidr. Polymer. 23:161-3. http://doi.org/10.1016/0144-8617(94)90098-1
- Martínez A.T., Speranza M, Ruiz-Dueñas F. J., Ferreira P., Camarero S., Guillén F., Martínez M. J., Gutiérrez A. y Del Río J. C. (2005). Biodegradation of ligninocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. Int. Microbiol. 8 (3):195-204.
- Maurstad G., Danielsen S. y Stokke B.T. (2003). Analysis of compacted semiflexible polyanion visualized by atomic force microscopy: influence of chain stiffness on the morphologies of polyelectrolyte complexes. J. Phys. Chem. 107:8172-8180. https://doi.org/10.1021/jp0271965
- Mester T., Field J. A. (1998). Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese. J.Biol. Chem. 273:15412-15417. https://doi.org/10.1074/jbc.273.25.15412
- Mester T., M. Peña, J. A. Field (1996). Nutrient regulation of extracellular peroxidases in the white rot fungus, *Bjerkandera sp.* strain BOS55. Applied Microb. Biotechnol. 44:6:778–784. https://doi.org/10.1007/BF00178618

- Méndez-Albores A., Zamora-Rodríguez D., Arámbula-Villa G., Vázquez-Duran A. y Moreno-Martínez E. (2014). Impact of different alkaline-heating processes on technological and nutritional properties of maize tortillas. J. Food Nutr. Res. 53:60-70.
- Meng H., Zheng j., Wen X., Cai Z., Zhang J. y Chen T. (2015). pH-and sugar-induced shape memory hydrogel based on reversible phenylboronic acid-diol ester bonds.

 Macromol. Rapid Commun. 36:533-537. https://doi.org/10.1002/marc.201400648
- Medina-Morales M. A., Lara-Fernández L., Aguilar C. N. y Garza-Toledo H. (2011). Aprovechameiento de materiales ligninocelulósicos para la producción de etanol como carburante. Revista científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. 3:35-41.
- Miller G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.

 Anal. Chem. 31 (3):426-428. https://doi.org/10.1021/ac60147a030
- Moldes D., Rodríguez-Couto, S., Cameselle C. y Sanromán, M.A. (2003). Study of the degradation of dyes by MnP of *Phanerochaete chrysosporium* produced in a fixed-bed bioreactor. Chemosphere. 51:295-303. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00406-X
- Monroy Rivera, J. A. (2008). Microondas en maíz humididficado. En: Memorias de Congreso Internacional. Últimas Tendencias de la Nixtamalización "Del maíz a la tortilla". pp.131.
- Montoya-Barreto S. (2008). Actividad Enzimática, degradación de residuos sólidos orgánicos y generación de biomasa útil del macromiceto *Grifola frondosa*. Tesis de Maestria Ingeniería-ingeniería química. Universidad Nacional de Colombia sede Manizales.

 96
 p. file:///E:/Doctorado/Articulos%20Nejayote/articulos/sandramontoyabarreto.2008.pdf
- Morozova, O.V., Shumakovich, G.P. y Shleev, S.V. (2007). "Blue" Lacases. Biochem. (Mosc). 72 (10):136-150. https://doi.org/10.1134/S0003683807050055
- Orozco C., León R., Ramírez G., Ambríz JJ. y Hernández, Y. (2008). Neutralización del nejayote en molinos de nixtamal. En memorias de Congreso Internacional. Últimas Tendencias de la Nixtamalización "Del maíz a la tortilla". pp. 23.

- Pant D. y Adholeya A. (2007). Enhanced production of ligninolytic enzymes and decolorization of molasses distillery wastewater by fungi under solid state fermentation. Biodegradation. 18 (5):647-659. https://doi.org/10.1007/s10532-006-
- Perju M.M. y Dragan, E.S. (2010). Removal of azo dyes from aqueous solutions using chitosan based composite hydrogels. Ion Exchange Letters. 3:7-11. http://dx.doi.org/10.13005/ojc/300222

9097-z

- Paredes López O., Guevara Lara F. y Bello Pérez L. A. (2009). La nixtamalización y el valor nutritivo del maíz. Revista Cultural Científica. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de México. (92-93):60-68.
- Perju M.M. y Dragan, E.S. (2010). Removal of azo dyes from aqueous solutions using chitosan based composite hydrogels. Ion Exchange Letters. 3:7-11.
- Pinotti A., A. Bevilacqua A. y Zaritzky N. (1997). Optimization of the flocculation stage in a model system of a food emulsion waste using chitosan as polyelectrolyte. J. Food Eng. 32 (1):69-81. https://doi.org/10.1016/S0260-8774(97)00003-4
- Pointing, S. B. (2001). Feasibility of bioremediation by white rot fungi. Appl. Microbiol Biotechnol. 57 (1-2):20-33. https://doi.org/10.1007/s002530100755
- Poulos T. L., Edwards S.L., Wariishi H. y Gold M. H. (1993). Crystallographic refinement of lignin peroxidase at 2 A. Journal of Blol. Chem. 268 (6):4429-4440. doi: https://doi.org/10.2210/pdb1lga/pdb.
- Pulido R., Escárcega C. y Durán de Bazúa, C. (1987). Modelo cinético para reactores biológicos rotatorios usados en el tratamiento aerobio de efluentes líquidos de industria del maíz. Tecnol Ciencia Ed. (IMIQ). 2 (1):15-24.
- Quin Y., Cai L., Feng D., Shi B., Liu J., Zhang W. y Shen Y. (2007). Combined Use of Chitosan and Alginate in the Treatment of Wastewater. J. Appl. Polym. Sci. 104:3581-3587. https://doi.org/10.1002/app.26006
- Quintero Diaz, J.C. (2011). Degradación de plaguicidas mediante hongos de la pudrición blanca de la madera. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín. 64 (1):5867-5882. https://revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/26394

- Quiñones-Pérez, C. Z., Nevarez-Moorillón, V. G., Quintero-Ramos, A., Rascón-Polanco,
 G., Rascón Cruz, Q. (2008). Aprovechamiento de subproductos de la nixtamalización del maíz para la obtención de productos con aplicación industrial.
 En memorias de Congreso Internacional. Últimas Tendencias de la Nixtamalización "Del maíz a la tortilla". pp.73.
- Ramírez-Romero G., Ortega Flores, J.L., Cornejo-Villegas, M.A., Reyes-Regalado, J. y Ambriz-García, J. (2011). Eliminación de sólidos suspendidos en nejayote y manejo para su reutilización. En: Memorias del Simposium Internacional Sobre Tecnologías Convencionales y Alternativas en el Procesamiento del Maíz.Chihuahua, Chihuahua, México, agosto.
- Ramírez-Romero G., Reyes-Velázquez M. y Cruz-Guerrero A. (2013). Estudio del nejayote como medio de crecimiento de probióticos y producción de bacteriocinas. Rev. Mex. Ing. Quím. 12 (3):463-471.
- Ramírez G., Ambriz, J.J., Hernández Y. y Escamilla, L. (2007). El tratamiento del nejayote y la diversificación de la producción, como primer paso hacia la sustentabilidad de la producción de nixtamal en los molinos tradicionales. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. pp. 15.
- Reddy C.A. y Matew Z. (2001). Bioremediation potential of white rot fungi. En: Fungi in Bioremediation. Edited by Gadd, G.M. Cambridge University Press. 27-51.
- Renault F., Sancey B., Badot P. y Crini G. (2009). Chitosan for coagulation/flocculation processes An eco-friendly approach. Eur Polym J. 45:1337–1348. https://doi.org/10.1016/j.jece.2016.03.029
- Retes-Pruneda J. L., Dávila-Vázquez G., Medina-Ramírez I., Chávez-Vela N.A., Lozano-Alvarez, J. A., Alatriste-Mondragón, F. y Jáuregui-Rincón, J. (2014). High removal of chemical and biochemical oxygen demand from tequila vinasses by using physicochemical and biological methods. Environ. Technol. 35 (13-16):1-12. https://doi.org/10.1080/09593330.2014.882960
- Rees D.A. (1969). Structure, conformation and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. Advances Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, 24: 303-304. https://doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60352-2

- Rincón-Reyna J. F., Rincón-Reyna p. G., Mondragón-Rojas A. G., Torres-Maravilla E., Ortiz-Moreno A., Jiménez-García E., Sánchez-Pardo M. E. y Arana-Cuenca A. (2016). Producción de enzimas hidrolíticas por fermentación sólida en mesocarpo de coco con *Trametes polizona*. Inv. y des. en Ciencia y Tecnol. de Alimentos. 1
- Rodríguez E., Pickard M. A. y Vazquez-Duhalt R. (1999). Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. Curr Microbiol. 38:27-32. https://doi.org/10.1007/PL00006767

(2):176-181.

- Rodríguez S., Fernández Bermúdez R.C. y Morris H. (2003). Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus spp.* Rev. Iberoam. Micol. 20:164-168.
- Rodríguez V. L., Figueroa J.D.C., Vales M. J. J. y Gaitán M.M. (2008). Potencial de los maíces criollos del estado de Hidalgo para su destino a la industria de botanas nixtamalizadas. En memorias de Congreso Internacional. Últimas Tendencias de la Nixtamalización "Del maíz a la tortilla". pp.23.
- Rojas-García C., García-Lara S., Serna-Saldívar S. O. y Gutiérrez-Uribe J. A. (2012).

 Chemopreventive effects of free and bound phenolics associated to steep waters (nejayote) obteained after nixtamalization of different maize types. Plant Foods Hum

 Nutr.

 67:94-99.

 https://doi.org/10.1007/s11130-011-0272-y
- Román R., Torres-Duarte C., Ayala M. y Vázquez-Duhalt R. (2010). Producción a escala piloto de lacasa de *Coriolopsis gallica*. Rev. Mex.Mic. 32:19-27.
- Roussy R., Van Vooren M.V. y Guibal G. (2005). Treatment of ink-containing wastewater by coagulation/flocculation using biopolymers. Water SA. 31 (3):369-376. https://doi.org/10.4314/wsa.v31i3.5208
- Roussy J., Van Vooren M., Dempsey B.A. y Guibal E. (2005). Influence of chitosan characteristics on the coagulation and the flocculation of bentonite suspensions. Water Res. 39:3247–3258. https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.05.039
- Rojas-García C., García-Lara S., Serna-Saldívar S. O. y Gutiérrez-Uribe J. A. (2012). Chemopreventive effects of free and bound phenolics associated to steep waters (nejayote) obtained after nixtamalization of different maize types. Plant Foods Hum.

TESIS TESIS TESIS

Nutr. 67:94-99.

https://doi.org/10.1007/s11130-011-0272-y

- Ruiz-Dueñas. (1998). Caracterización molecular de un nuevo tipo de peroxidasa ligninolítica (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. Madrid.
- Ruiz-Gutiérrez M.G., Quintero-Ramos A., Meléndez-Pizarro C.O., Lardizábal-Gutiérrez, D., Bernard, J., Márquez-Meléndez, R. y Talamás-Abbud, R. (2010). Changes in mass transfer, termal and physicochemical properties during nixtamalization of corn with an without agitation at different temperatures. J.I of Food Eng. 98:76-83. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.12.010
- Sahu O. y Chaudhari P.K. (2013). Review on Chemical treatment of industrial wastewater.

 J. Appl. Sci. Environ. Manage. 17 (2):241-257.

 https://doi.org/10.4314/jasem.v17i2.8
- Salazar R., Arámbula-Villa G., Luna-Bárcenas G., Figueroa-Cárdenas J.D., Azuara E. y Vázquez-Landaverde P.A. (2014). Effect of added calcium hydroxide during corn nixtamalization on acrylamide content in tortilla chips. LWT Food Sci. Technol. 56:87-92. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.046
- Saleha A., Ibrahimb A., Abdelhaib F., Elsharmaa E., Metwallya E. y Siyam T. (2017).

 Preparation of poly (chitosan-acrylamide) flocculant using gamma radiation for adsorption of Cu(II) and Ni(II) ions. Radiation Physics and Chemistry. 134:33–39.

 https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2017.01.019
- Salmerón-Alcocer A., Rodríguez-Mendoza N., Pineda-Santiago S., Cristiani-Urbina E., Juárez-Ramírez C., Ruíz-Ordaz N. y Galíndez-Mayer J. (2003). Aerobic treatment of maize-processing wastewater (nejayote) in a single stream multistage reactor. J. Environ. Eng. Sci. 2:401-406. https://doi.org/10.1139/s03-046
- Sánchez-González M., Blanco-Gámez A., Escalante A., Valladares A. G., Olvera C y Parra R. (2011). Isolation and characterization of new facultative alkaliphilic Bacillus flexus strains from maize processing waste wáter (nejayote). The Society for Applied Microbiology. 52:413–419. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03021.x

- Scheel T., Hofer M., Ludwig S. y Holker, U. (2000). Differential expression of manganese peroxidase and laccase in white-rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds. Appl Microbiol Biotechnol. 54:686-691. https://doi.org/10.1007/s002530000427
- SCFI (2001). Norma Oficial Mexicana NMX-AA-028-SCFI-2001. Análisis de aguadeterminación de la demanda bioquímica de oxígeno en aguas naturales, residuales (DBO₅) y residuales tratadas método de prueba (cancela a la NMX-AA-028-1981). Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Diario Oficial de la Federación. 17 de abril de 2001.
- SCFI (2001a) Norma Oficial Mexicana NMX-AA-050-SCFI-2001. Análisis de agua determinación de fenoles totales en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas método de prueba (cancela a la NMX-AA-050-1981). Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1 de agosto de 2001.
- SCFI (2001b) Norma Oficial Mexicana NMX-AA-072-SCFI-2001. Análisis de agua determinación de dureza total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas método de prueba (cancela a la NMX-AA-072-1981). Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Diario Oficial de la Federación. 14 de agosto de 2001.
- SCFI (2012). Norma Oficial Mexicana NMX-AA-030/1-SCFI-2012. Análisis de agua medición de la demanda química de oxígeno en aguas naturales, residuales y residuales tratadas- método de prueba parte 1 método de reflujo abierto (cancela a la nmx-aa-030-scfi-2001). Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Diario Oficial de la Federación. 21 de mayo de 2013.
- SCFI (2013). Norma Oficial Mexicana NMX-AA-004-SCFI-2013. Análisis de agua determinación de sólidos sedimentables en aguas naturales, residuales y residuales tratadas método de prueba (cancela a la NMX-AA-004-2000). 13 de noviembre de 2013.
- SEMARNAT (1996) Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial. 6 de enero de 1997.

- SEMARNAT (1996) Norma Oficial Mexicana NOM-002-SEMARNAT-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial. 3 de junio de 1998.
- SEPAFIN (1978) Norma Oficial Mexicana NMX-F-090-S-1978. Determinación de fibra cruda en alimentos. Secretaría de Patrimonio y Fomento Industrial. Diario Oficial de la Federación. 27de marzo de 1979.
- Shah, V. y Nerud, F. (2002). Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. Can J. Microbiol. 48 (10):857-870. https://doi.org/10.1139/w02-090
- SIAP. 2007 "Maíz: Situación Actual y Perspectivas 1996-2010", elaborado por el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, Marzo.
- Skwarek E., Goncharuk O., Sternik D., Janusz W., Gdula K. y Gun'ko V. (2017).

 Synthesis, Structural, and Adsorption Properties and Thermal Stability of Nanohydroxyapatite/Polysaccharide Composites.

 Nanoscale Res. Lett. 155:2-12.

 https://doi.org/10.1186/s11671-017-1911-5
- Smith A.T. y Veitch N.C. (1998). Substrate binding and catalysis in heme peroxidases.

 Current opinion in chem. Biol. 2:269-278. https://doi.org/10.1016/S1367-5931(98)80069-0
- Sodhi GS. (2000). Fundamental concepts of environmental chemistry. Alfa Science. India. pp. 161.
- Suárez-Meraz K.A., Ponce-Vargas S.M., López-Maldonado J.T., Cornejo-Bravo J.M., Oropeza-Guzmán M.T. y López-Maldonado E.A. (2016). Eco-friendly innovation for nejayote coagulation-flocculation process using chitosan: Evaluation through zeta potential measurements. Chem. Eng. J. 284:536-542. https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.09.026
- Tao X., Li A. y Yang H. (2017). Immobilization of metals in contaminated soils using natural polymer-based stabilizers. Environ. Pollut. 222:348-355. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.12.028

- Tien M, Kirk K. (1988). Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. Methods Enzymol. 161:238-248. https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)61025-1
- Torres E., Bustos-Jaimes I., Le Borge S. (2003). Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutant. Applied catalysis B: Environmental. 46:1-15 https://doi.org/10.1016/S0926-3373(03)00228-5
- Tripathy T., Bhagat R.P. y Singh R.P. (2001). The flocculation performance of grafted sodium alginate and other polymeric flocculants in relation to iron ore slime suspension. European Polymer Journal. 37:125-130. https://doi.org/10.1016/S0014-3057(00)00089-6
- Valderrama-Bravo C., E. Gutiérrez-Cortéz E., Contreras-Padilla M., Rojas Molina, I., Mosquera J.C., Rojas-Molina, A., Beristain, F. y Rodríguez-García, M.E. (2012). Constant pressure filtration of lime water (nejayote) used to coock kernels in maize processing. Journal of food Engineering. 110:428-486. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.12.018
- Vite-Vallejoa L., Palomares E., Dantán-González H., Ayala-Castro G., Martínez-Anaya C., Valderram B. y Folch-Mallola A. (2009). The role of N-glycosylation on the enzymatic activity of a *Pycnoporus sanguineus* laccase. Enzyme and Microbial Technol. 45:233-239. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.05.007
- Wang Q.Z., Chen X.G., Liu N., Wang S.X., Liu C.S., Meng X.H. y Liu, C.G. (2006)
 Protonation constants of chitosan with different molecular weight and degree of deacetylation.

 Carbohydr.

 Polym. 65:194–201.

 https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.01.001
- Wesenberg D., Kyriakides I. and Agathos S. N. (2003). White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. Biotechnol Adv. 22:161-187. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2003.08.011
- Wetzel, R.G. (1995). Limnología. Ed. Omega, Barcelona. 696 p.
- Xiao Y. Z., Hong Y. Z., Li J. F. Hang J., Tong P.G., Fang W. y Zhou C. Z. (2006). Cloning of novel laccase isozyme genes from *Trametes sp* AH28-2 and analysis of their differential exression. Applied Microbiology and Biotechnology. 71:493-501. https://doi.org/10.1007/s00253-005-0188-2

- TESIS TESIS TESIS TESIS
 - Yan Y., An Q., Xiao Z., Zheng W. y Zhai S. (2017). Flexible core-shell/bead-like alginate@PEI with exceptional adsorption capacity, recycling performance toward batch and column sorption of Cr(VI). Chem. Eng. J. 313:475–486. https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.12.099
 - Yi-Ling L., Munusamy T. y Jiunn-Fwu L. (2010). Effective adsorption of heavy metal ions (Cu²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺) from aqueus solution by immobilization of adsorbents on Caalginate beads. Toxicol. & Environ. Chem. 92 (4):697-705. https://doi.org/10.1080/02772240903057382
 - Zheng Z., Obbard J. P. (2002). Removal of surfactant solubilized polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium* in a rotating biological contactor reactor. J Biotechnol. 96:241-249. https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00050-0
 - Zhuo N., Lan Y., Yang W., Yang Z., Li X., Zhou X., Liu Y., Shen J. y Zhang X. (2017).

 Adsorption of three selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) onto MIL-101(Cr)/natural polymer composite beads. Sep. and Purif. Technol. 177:272–280. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.12.041

FESIS TESIS TESIS TESIS

9. APÉNDICE

9.1. Artículo publicado en la revista internacional de contaminación ambiental

Vol. 36, Núm. 3 (2020)

DOI: http://dx.doi.org/10.20937/RICA.53185

Rev. Int. Contam. Ambie. 36 (3) 497-515, 2020 https://doi.org/10.20937/RICA.53185

REMOCIÓN DE CONTAMINANTES DEL NEJAYOTE CON ALGINATO Y QUITOSANO

Removal of nejayote contaminants with alginate and chitosan

Karina Jannet VACIO-MURO¹, Juan Antonio LOZANO-ÁLVAREZ¹, Mónica Noel SÁNCHEZ-GONZÁLEZ², Norma Angélica CHÁVEZ VELA¹, Eduardo TORRES-RAMÍREZ³ y Juan JÁUREGUI-RINCÓN¹*

¹ Departamento de Ingeniería Bioquímica, Universidad Autónoma de Aguascalientes. Av. Universidad 940 Cd. Universitaria, C.P. 20131 Aguascalientes, Aguascalientes México

² Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Periférico Norte, kilómetro 33.5 Tablaje Catastral 13615, Chuburná de Hidalgo Inn, C.P. 97203 Mérida, Yucatán

³ Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Edificio 103-E, Ciudad Universitaria, colonia San Manuel, C.P. 72570 Puebla, México

*Autor para correspondencia: jjaureg@correo.uaa.mx

(Recibido marzo 2018, aceptado noviembre 2019)

Palabras clave: nixtamalización, biopolímeros, tratamiento de aguas, materia orgánica

RESUMEN

El nejayote es el agua residual proveniente del proceso de nixtamalización que se caracteriza por poseer un pH alcalino (pH > 10) así como altas concentraciones de materia orgánica disuelta y suspendida (DQO > 10 200 mg/L), por lo que se considera uno de los efluentes más contaminantes vertidos a diferentes cuerpos de agua. Se probó la efectividad del alginato de sodio y el quitosano para disminuir los contaminantes del nejayote. La aplicación de alginato de sodio involucró la adsorción y gelificación con la que se atrapó material suspendido y disuelto, y el uso del quitosano implicó adsorción y precipitación. Se realizó la aplicación de estos polímeros de manera separada y secuencial. En el tratamiento independiente, el alginato resultó más eficiente que el quitosano, obteniéndose una remoción de DQO de 61.43 ± 0.24 % y de 59.74 ± 0.36 %, respectivamente. En el tratamiento secuencial, la eficiencia de remoción de la DQO con el tratamiento alginato-quitosano resultó ser mayor (70.19 \pm 0.85 %) que la del tratamiento quitosano-alginato (67.21 \pm 0.24 %). Por su parte, la cantidad de sólidos totales presentes después del procesamiento se encuentra dentro del límite máximo permisible establecido en las normas oficiales mexicanas NOM-002-SEMARNAT-1996 y NOM-001-SEMARNAT-1996, permitiendo su descarga al sistema de alcantarillado urbano o municipal e incluso puede ser utilizada en suelo para riego agrícola. El uso de estos polímeros biodegradables es una opción viable que tiene potencial para escalarse a nivel industrial, contribuyendo a la depuración de descargas de la industria de la nixtamalización y en beneficio del ambiente.

Key words: nixtamalization, biopolymers, water treatment, organic material

ABSTRACT

Nejayote is the residual water from the nixtamalization process characterized by an alkaline pH (pH > 10) as well as high concentrations of dissolved and suspended



ESIS TESIS TESIS TESIS

9.2. Medio GMY.

Disolver en un litro de agua destilada los siguientes reactivos:

SUSTANCIA	CANTIDAD
Glucosa	10 g/L
extracto de malta	3.5 g/L
extracto de levadura	2 g/L
fosfato diácido de potasio	2 g/L
sulfato de magnesio	0.5 g/L
peptona	0.1 g/L
solución de sales *	1 mL/L

* SOLUCIÓN DE SALES

Sustancia	Cantidad
Sulfato cúprico (CuSO4)	0.5 mg/L
Sulfato manganoso (MnSO4)	0.16 mg/L
Sulfato de zinc (ZnSO4)	0.14 mg/L
Cloruro de cobalto (CoCl2)	0.29 mg/L

Ajustar el medio a pH 4.5 y esterilizar a 121°C por 15 minutos. Conservarlo en refrigeración.

9.3. Determinación de variables de respuesta.

9.3.1. Determinación de DQO.

Para evaluar la demanda química de oxígeno se utilizó el método 800 de Hach, con viales de alto rango (20-1500 mg/L), el cual consistió en mezclar 2 mL de muestra diluida 1:100 en un vial con reactivo Hach y después de agitarlo vigorosamente. Se digirió a 150 °C por 120 min. Una vez que se enfrió, se determinó el valor de este parámetro en mg/L. Se midió en espectrofotómetro visible portátil DR 2700 Hach (con programa predeterminado).

El principio de este método es que, una gran cantidad de compuestos orgánicos e inorgánicos son oxidados con una mezcla de ácido crómico y sulfúrico a ebullición, al estar en contacto la muestra con el ácido fuerte con exceso de dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) éste se reduce, por lo que al término de la digestión (120 min), el dicromato de potasio no reducido se mide espectrofotométricamente para determinar la cantidad de dicromato consumido y calcular la materia oxidable en términos de oxígeno equivalente (NMX-AA-030-SCFI-2001).

9.3.2. Concentración de fenoles totales.

Para determinar la concentración de fenoles totales en la muestra, se aplicó la técnica espectrofotométrica (NMX-AA-050-SCFI-2001/9.3) (método de la aminoantipirina). Para la curva patrón se preparó solución de fenol a concentraciones de 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 60 y 100 µg/mL (muestras estándar), obtenida mediante lecturas de Absorbancia a una longitud de onda de 510 nm de cada muestra estándar de concentración de fenol conocida. Posteriormente, se midió Absorbancia a 510 nm de las muestras problema y se determinó la concentración de fenoles totales de acuerdo a la curva patrón.

Para el blanco y cada una de las muestras se realizó el siguiente procedimiento:

De cada una de las muestras centrifugadas a 16,000 rpm por 25 min, se diluyeron a una proporción de 1:100 y se colocaron 10 mL de cada muestra en un tubo de ensaye. Posteriormente, a la muestra se añadieron 250 µL de solución de amoniaco 0.5 N y 100 µL de 4-aminoantipirina al 2% p/v mezclando entre cada adición. Finalmente, se le agregó 100 µL de solución de ferricianuro de potasio al 8% p/v, se mezcló y se dejó reposar 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, cada una de las muestras se transfirió a la celda del espectrofotómetro y se leyó la absorbancia a 510 nm.

9.3.3. Concentración de proteína.

Para determinar la concentración de proteína, se realizó la técnica de Bradford, utilizando el kit de prueba Bio-Rad Protein Assay. Standard II.

Para obtener la curva patrón se preparó solución de albumina sérica bovina (standard II) a concentraciones de 0, 10, 20, 30, 40 µg/mL (muestras estándar), se obtuvo mediante lecturas de Absorbancia a una longitud de onda de 595 nm de cada muestra estándar de concentración de proteína conocida. Después se realizaron las lecturas de Absorbancia a las muestras problema.

Se realizó el siguiente procedimiento para el testigo y para cada una de las muestras de nejayote tratado:

Cada una de las muestras de nejayote tratado se centrifugó a 16,000 rpm por 25 min, para lograr separar todos los pellets fúngicos. Cabe mencionar que se hicieron varias pruebas a diferentes tiempos hasta lograr obtener muestras libres del hongo. Una vez

centrifugada la muestra, se midió la cantidad de proteína. Primeramente se hicieron diluciones a una proporción de 1:100; para analizarlas se colocaron en tubos eppendorf de 2 mL y se agregaron 200 µL de muestra, añadiendo 600 µL de agua destilada y 200 µL de reactivo Bradford. Posteriormente, se mezcló vigorosamente cada tubo y se dejó reposar 5 minutos en ausencia de luz. Se leyó la absorbancia a 595 nm. La concentración de proteína se calculó usando la ecuación de la recta obtenida con la curva patrón.

