



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DEL pH INICIAL Y EL AGREGADO DE UN AGENTE TENSOACTIVO
(TWEEN 80) EN LA PRODUCCIÓN DE LACASAS A PARTIR DE *Pleorotus ostreatus*

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología.

Profesor Guía

M.Sc. Ing. Diana Maricela Flores

Autor

Ricardo Mauricio Proaño Cárdenas

Año
2016

DECLARACIÓN DE PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante Ricardo Mauricio Proaño Cárdenas, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento con a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de titulación”

Diana Maricela Flores
Máster en Biotecnología Avanzada
C.C.1715334833

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”

Ricardo Mauricio Proaño Cárdenas
C.C. 1713462123

AGRADECIMIENTOS

Este logro en mi vida no hubiera sido posible de alcanzar sin el infinito amor de mis padres. Papi te agradezco por haberme dado un estilo de vida, me enseñaste el amor por el conocimiento, también por enseñarme las cosas que son verdaderamente importantes en la vida, no sabes cuándo te quiero y agradezco. Mami siempre estaré en deuda contigo por todo el amor y comprensión que me has brindado, por siempre haberme apoyado en los momentos difíciles y por haberme tenido tanta paciencia.

DEDICATORIA

“Un ruiseñor preso en la red de un cazador,
cantó con más fuerza que nunca, como si su fugaz melodía pudiera volar y apartar la red. Al amanecer el cazador cogió su presa, el ruiseñor jamás su libertad. Todas las aves y todos los hombres tienen que morir, que las canciones y los libros pueden vivir eternamente”.

Ken Follett

A mis padres, me siento orgulloso de los dos y me siento orgulloso de ser su hijo, sé que cuanto me quieren y eso me hace muy feliz, queridos padres ustedes son lo mejor que me ha pasado en la vida, siempre estaré agradecido con Dios por habernos dado la posibilidad de encontrarnos los tres en esta vida.

RESUMEN

En los últimos años las enzimas lacasas han tomado una relevante importancia debido a que son útiles en la remediación de efluentes contaminados con diferentes tipos de colorantes, por esta razón, en el siguiente trabajo de investigación se determinó la actividad enzimática de un extracto crudo que contiene enzimas lacasas, obtenido de una fermentación líquida utilizando el hongo *Pleurotus ostreatus*, analizando el efecto producido por las variables pH y presencia de un agente tensoactivo (Tween 80) durante su fermentación en un ambiente controlado y de esta manera encontrar las condiciones óptimas para alcanzar una máxima producción de este grupo de enzimas.

Para determinar las condiciones óptimas de producción se utilizó un modelo de superficie de respuesta de primer orden analizando dos variables (pH y la presencia de Tween 80) cuya respuesta era la actividad enzimática. La presencia de lacasas en el extracto crudo se identificó por medio del cambio de coloración del guayacol y la actividad enzimática del extracto fue cuantificada por espectrofotometría a 470nm, utilizando guayacol como sustrato.

La prueba de medición de actividad enzimática fue realizada durante 20 días determinando que en el día 17 se presentó el punto máximo de actividad enzimática. Con la utilización del modelo estadístico de superficie de respuesta de primer orden, se llegó a la conclusión que el hongo *Pleurotus ostreatus* presentó mayor actividad enzimática de lacasas cuando las condiciones de fermentación fueron a un pH 8.5 y Tween 80 de 7.6 mL/L.

Palabras clave: *Pleurotus ostreatus*, lacasas, Tween 80, pH.

ABSTRACT

In recent years laccases enzymes have taken a significant importance because they are useful for the remediation of dyes contaminated effluents. By this reason, in this research paper the enzymatic activity was determined of the crude extract that contains laccases enzymes obtained by liquid fermentation using the fungus *Pleurotus ostreatus*, analyzing the effect of two variables pH and presence of a surfactant agent (Tween 80) during fermentation in a controlled environment and in this way find the optimal conditions to achieve the maximum production of this enzymatic group.

To determine the optimal conditions for production a surface model of the first order response analyzing two variables (pH and the presence of Tween 80) was used whose response was enzyme activity. The presence of laccases in the crude extract was identified by the discoloration of guayacol and the enzymatic activity of the extract was quantified spectrophotometrically at 470nm, using guayacol as substrate.

The test for measuring enzyme activity was conducted for 20 days, determining that on day 17 the peak of enzyme activity was presented. By using the statistical model surface first-order response, *Pleurotus ostreatus* has greater enzymatic activity of laccases when the fermentation conditions were pH 8.5 and Tween 80 7.6 mL / L.

Keywords: *Pleurotus ostreatus*, laccases, Tween 80, pH.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 ANTECEDENTES.....	1
1.1.1 <i>Pleorotus ostreatus</i>	1
1.1.2 Lacasas	2
1.1.3 Ph	3
1.1.4 Tween 80	4
1.2 JUSTIFICACIÓN	4
1.3 OBJETIVOS.....	6
1.3.1 Objetivo general.....	6
1.3.2 Objetivos específicos	6
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1 ENZIMAS LACASAS	7
2.1.1 Mecanismo Catalítico y Estructura de las lacasas	8
2.1.2 Especificidad de sustrato de las lacasas	9
2.1.3 Aplicaciones biotecnológicas de las lacasas	11
2.2 <i>Pleorotus ostreatus</i>	13
2.3. Método estadístico de superficie de respuesta.....	16
3. METODOLOGÍA	17
3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	17
3.2.- TRATAMIENTOS.....	17
3.2.1 Datos Tratamientos.....	17
3.2.2 Detalle de tratamientos	18

3.3 REACTIVACIÓN DE LA CEPA DE <i>Pleorotus ostreatus</i> EN MEDIO AGAR PAPA DEXTROSA (PDA).	18
3.4 SIEMBRA DE <i>Pleorotus ostreatus</i> EN MEDIO LÍQUIDO INDUCTOR DE LACASAS.	19
3.5 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	20
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	20
3.7 COMPROBACIÓN DEL MODELO MATEMÁTICO.....	21
4. RESULTADOS.....	22
4.1 MEDIO INDUCTOR.	22
4.2 PRODUCCIÓN DE LACASAS	22
4.3.-pH	28
4.4 TWEEN 80	29
4.5 MODELO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA	29
4.5.1 Análisis de Varianza y estadística de regresión.....	30
4.6 COMPROBACIÓN DEL MODELO MATEMÁTICO	31
5. DISCUSIÓN	33
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	36
6.1.- CONCLUSIONES	36
6.2.- RECOMENDACIONES	37
REFERENCIAS	38

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES.

1.1.1 *Pleorotus ostreatus*.

Pleorotus ostreatus es un hongo de pudrición blanca perteneciente a la familia de los Basidiomycetes, este hongo ha sido estudiado ampliamente debido a que puede ser utilizado en aplicaciones medicinales, agroindustriales ambientales y biotecnológicas (Díaz, 2009, pp.23). En el campo médico las enzimas producidas por este hongo han sido utilizadas para la fabricación de analgésicos, en el ambiental este hongo ha sido ampliamente utilizado en la remediación de suelos y agua contaminados con hidrocarburos, en la agroindustria el cultivo de *Pleorotus ostreatus* se ha intensificado a nivel mundial, se estima que hoy en día es el tercer hongo más cultivado en el mundo con fines alimenticios (Mendoza, 2012, pp.5), pero cabe decir que la mayoría de investigaciones en *Pleorotus ostreatus* se concentran en las aplicaciones biotecnológicas que se pueden realizar con sus exoenzimas (Moya, 2011, pp.50).

Este hongo posee un sistema multienzimático extracelular compuesto de lacasas, manganeso peroxidasas y lignino peroxidasas, el cual le permite degradar una gran variedad y cantidad de compuestos aromáticos de distintas estructuras (Lettera, Del Vecchio, Piscitelli y Sannia, 2008). La versatilidad que tienen estas enzimas les permiten actuar sobre compuestos contaminantes como hidrocarburos, compuestos aromáticos, plaguicidas, dioxinas, etc (Sandoval, 2008, pp.25). Existen una gran variedad de organismos que poseen este complejo multienzimático, sin embargo, únicamente algunos tipos de hongos Basidiomycetes son capaces de degradar estos contaminantes, esta capacidad de degradación ha llamado la atención de este grupo de hongos especialmente los de la podredumbre blanca, los cuales han demostrado una gran eficacia en la remediación de efluentes industriales (Cabrera, 2011, pp.18).

Una de las ventajas que presentan los hongos de podredumbre blanca es que pueden crecer fácilmente en casi cualquier sustrato lignolítico sin necesidad de compost o una cubierta, en el caso de *Pleurotus ostreatus* no se necesita medios sofisticados se ha visto que crece eficientemente en sustratos como paja de trigo triturado y cañote de maíz (Mendoza, pp. 2012).

En condiciones controladas de cultivo se ha comprobado que las lacasas son las primeras enzimas lignolíticas producidas por este hongo, por lo que presenta una gran capacidad de degradar compuestos lignocelulósicos sin necesidad de someterlos a un tratamiento físico, químico o biológico (García, 2008, pp.29; Flores, Casasanero, Galindo, Serrano y Trejo 2011).

1.1.2 Lacasas

Las lacasas tienen una gran importancia biotecnológica debido a que varias investigaciones han demostrado que estas enzimas están íntimamente involucradas en la degradación y mineralización completa de compuestos contaminantes de naturaleza orgánica e inorgánica (Mendoza, 2012; Pérez, 2010). Muchas investigaciones han demostrado que las lacasas pueden ser utilizadas en una gran variedad de procesos como el blanqueamiento de la pulpa de madera en la industria del papel, modificación de las características organolépticas de algunos alimentos, elaboración de fármacos, degradación de residuos lignocelulósicos y en la biodegradación de colorantes de origen fenólico y no fenólico presentes en aguas residuales, que muchas veces son causa de problemas de contaminación ambiental y de salud pública (Manjarez *et al.*, 2008); (Hongman , Bin, Cuihong y Jiti, Jing , 2003).

La implementación de tratamientos biológicos utilizando enzimas lacasas, presenta una serie de ventajas debido a que es un proceso más económico y en la mayoría de las ocasiones se logra degradar completamente el contaminante (Macellaro, Pezzella, Cicatiello, Sannia y Piscitelli, 2014). Sin embargo, la producción de estas enzimas depende de una gran cantidad de

factores como: temperatura, pH, concentración de oxígeno, nitrógeno y la presencia de un agente tensoactivo (Dekker, Barbosa, Godoy, Covizzi y Giesse, 2007).

1.1.3 Ph

Actualmente no existe una gran número de publicaciones que hayan estudiado el efecto que tiene el pH sobre la producción de lacasas, pero se ha encontrado que se presenta actividad enzimática en valores de pH que oscilan entre 3 y 8 (Díaz, 2009, pp.42). Se ha encontrado que la producción de lacasas en valores de pH ácidos presenta una producción muy baja pero constante a lo largo de la fermentación y que cuando se utiliza valores de pH cercanos a 8 generalmente la producción aumenta con el transcurso de la fermentación hasta alcanzar su punto máximo y luego empieza a decaer la producción (Cabrera, 2011, pp.29). Se han realizado investigaciones en diferentes microorganismos, la Tabla 1 resume los trabajos más relevantes.

Tabla 1. Investigaciones relevantes sobre el efecto del pH en la producción de lacasas.

Microorganismos	Tipo de fermentación/sustrato	pH óptimo	Referencia
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	Sumergida/Glucosa	5 - 6,5	(Dekeer <i>et al.</i> , 2007)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Sólida/Glucosa	7	(Díaz, 2009)
<i>Pleorotus ostreatus</i>	Sumergida/Agave Tequilana Weber	4	(Cabrera, 2011)
<i>Streptomyces psammoticus</i>	Sumergida/Pulpa de café	5	(Niladevi <i>et al.</i> , 2006)

1.1.4 Tween 80

El Tween ha demostrado ser un reactivo o detergente que induce una mayor actividad enzimática, este detergente ayuda romper al membrana celular y facilita la secreción de diferentes tipos de enzimas al medio externo (Dekker *et al.*, 2007 Gayosso, 2008; Saparrat *et al.*, 2007, Ramos *et al*), se han realizado estudios en diferentes organismos, la Tabla 2 muestra algunas investigaciones relevantes.

Tabla 2. Investigaciones relevantes sobre el efecto del Tween en la producción de enzimas

Microorganismos	Tipo de fermentación/sustrato	Tween	Enzima	Referencia
<i>Pleorotus ostreatus</i>	Sólida /Dextrosa	13mL/L*	Lacasa	(Gayosso <i>et al.</i> , 2008)
<i>Minimidochium parvum</i>	Sumergida/Glucosa	1mL/L**	Lacasa	Saparrat <i>et al.</i> , 2007
<i>Botryosphaeria Rhodina</i>	Sumergida/Glucosa	1mL/L***	Lacasa	Dekker <i>et al.</i> , 2007
<i>Serratia marcescens</i>	Sólida/ Agar yema de huevo	5mL/L*	Lipasa	(Ramos <i>et al</i>)

Nota: *Tween 80, **Tween 20, ***Tween 60.

1.2 JUSTIFICACIÓN

Las enzimas son catalizadores biológicos, estas pueden acelerar una gran diversidad de reacciones químicas, en los últimos años el uso de enzimas ha aumentado a nivel mundial y su aplicación en diferentes sectores de la industria ha tomado una gran relevancia. Por esta razón, se han realizado varias investigaciones para desarrollar técnicas y procesos que permitan una producción más efectiva de diferentes tipos de enzimas (Calle Villegas, Álvarez, Gimenez y Terrazas, 2007). Las lacasas han tomado una gran

importancia en las últimas décadas ya que estas enzimas presentan una gran cantidad de aplicaciones, basta mencionar algunas de ellas: remociones de contaminantes orgánicos e inorgánicos de aguas residuales, deslignificación de materiales, detoxificación de suelos entre otras (Tinoco *et al.*, 2010). Las lacasas han sido ampliamente estudiadas en la remoción de contaminantes presentes en efluentes industriales y han demostrado ser una opción más eficaz y económica en contraste a muchos tratamientos tradicionales utilizados actualmente para la remoción de contaminantes en efluentes industriales como la floculación, ósmosis inversa, oxidación con ozono, etc (García, 2008). Se ha comprobado que las lacasas son capaces de remover una gran cantidad de colorantes presentes en las aguas residuales, estas pueden ser producidas por una gran cantidad de organismos, uno de ellos es el hongo *Pleurotus ostreatus* (Macerallo *et al.*, 2013).

Resulta importante investigar la optimización de las condiciones de cultivo para que la producción de lacasas aumente, analizando el efecto que tiene la combinación de variables como fuente de carbono, fuente de nitrógeno, temperatura, pH, inductores, entre otros (D Agostini *et al.*, 2010; Dekker *et al.*, 2009; Díaz, 2009, pp.42 Manikandan *et al.*, 2010).

Se ha visto que el pH tiene un efecto significativo en la producción de enzimas lacasas en algunos organismos, como los hongos filamentosos, los rangos de pH utilizados varían desde 3 a 8.5 (Dekker *et al.*, 2009; Cabrera, 2011; Díaz 2009). Por otro lado, investigaciones advierten que el agregado de un agente tensoactivo en la producción de lacasas en diferentes organismos aumenta la permeabilidad de la bicapa lipídica lo cual facilita la secreción de estas enzimas (Dekker *et al.*, 2009; Gayosso, 2008; Saparrat *et al.*, 2007). Por lo antes mencionado, se busca evaluar distintos valores de pH y agente tensoactivo para comprobar su efecto en la producción de lacasas por el hongo *Pleurotus ostreatus*.

Aunque no es objeto de estudio en este proyecto utilizar las lacasas producidas en el tratamiento biológico de aguas contaminadas con colorantes, varias

publicaciones y grupos de investigación han trabajado en este tipo de aplicación biotecnológica. Por lo tanto, se plantea como perspectiva a futuro el uso de lacasas producidas por el hongo *Pleurotus ostreatus* en el tratamiento biológico de aguas contaminadas con colorantes de naturaleza orgánica e inorgánica.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del pH inicial y del agregado de un agente tensoactivo Tween 80 en la producción de lacasas a partir *Pleurotus ostreatus*.

1.3.2 Objetivos específicos

- Analizar el efecto que provoca el aumento y la disminución del pH en la producción de lacasas a partir hongo *Pleurotus ostreatus*.
- Valorar si el agregado del agente tensoactivo Tween 80 aumenta la secreción de lacasas.
- Establecer si existe una diferencia en la producción de lacasas con los tratamientos utilizados.
- Determinar si existe una correlación entre el pH y el agregado del agente tensoactivo (Tween 80) en la producción de lacasas.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 ENZIMAS LACASAS

Los hongos de la podredumbre blanca han demostrado una gran utilidad en procesos de biorremediación, ya que poseen un complejo multienzimático capaz de degradar una gran diversidad de compuestos xenobióticos. El complejo enzimático de degradación lignolítico está compuesto por tres principales tipos de enzimas que son: enzimas Manganese Peroxidasa dependientes de Mn^{+2} (MnP), Ligninoperoxidasas (LiP) y lacasas (Lac) (Jing, 2010; Rodriguez Bermúdez, Serrat y Kourouma 2006). Estas enzimas presentan una gran peculiaridad, la cual es que son muy inespecíficas con el sustrato por lo que, pueden oxidar una gran gama de contaminantes presentes en efluentes industriales como colorantes, hidrocarburos aromáticos y restos orgánicos (Aguilar *et al.*, 2010; Moya, 2011, pp.15; Poornima, Sneha y Sridhar, 2014). El tipo de sustrato lignocelulósico y la composición del medio son los factores que determinan la proporción de las enzimas lacasas, peroxidasa y ligninoperoxidasas que producirá el hongo, de esta manera en condiciones controladas se puede producir una mayor cantidad de una enzimas requerida en particular (García, 2008).

Las lacasas son enzimas del tipo oxidasas multicobre las cuales, pueden oxidar anillos de lignina, derivados de ésta y además catalizan la oxidación de las posiciones *orto* y *para* de los difenoles y diferentes tipos de aminas aromáticas (Moya, 2011, pp.6), por medio de este mecanismo de reacción las lacasas pueden oxidar y mineralizar una gran cantidad de compuestos como aldehídos, compuesto fenólicos, no fenólicos, aminas aromáticas y varios tipos de radicales libre (García, 2008 ; Kalra, Chauhan, Shavez y Sachdeva, 2013).

El grupo de las oxidasas multicobre, participan en una gran cantidad de reacciones químicas como la fosforilación oxidativa, la fotosíntesis y una diversidad de reacciones del metabolismo celular, las enzimas oxidasas

multicobre son las únicas capaces de oxidar el oxígeno hasta su mineralización completa es decir lo oxidan hasta convertirlo en dos moléculas de agua (Moya, 2011, pp.6).

Por la importancia de estas enzimas se han realizado una gran cantidad de investigaciones en diferentes sectores industriales como el alimentario, cosmético, médico y ambiental en diferentes organismos, destacando entre estos los hongos de pudrición blanco por su gran capacidad de producir estas enzimas (Jing, 2008; Niladevi *et al.*, 2006; Salony *et al.*, 2005). Además, con la información genética obtenida en diferentes investigaciones se han realizado ensayos de sobreexpresión de estas enzimas en organismos genéticamente modificados, por ejemplo las lacasas fúngicas se han sobreexpresado en *Saccharomyces cerevisiae* y *Trichoderma reesei*; sin embargo todavía no se logra la producción esperada a nivel industrial, por lo cual se continúa realizando investigaciones para mejorar la especificidad de las enzimas por el sustrato y las condiciones de cultivo durante la fermentación (Madzak *et al.*, 2005).

2.1.1 Mecanismo Catalítico y Estructura de las lacasas

Las lacasas están compuestas por 4 átomos de cobre los cuales forman los centros T1, T2 y T3, los mismos que pueden ser identificados y clasificados midiendo sus características espectrofotométricas, se ha reportado que el centro T1 presenta su mayor absorción a 660nm, bajo esta misma absorción el centro T2 presenta una absorción muy baja, mientras que el centro T3 presenta su máxima absorción a 330nm (Rodríguez, 2006). Las lacasas en su gran mayoría poseen 3 dominios en su estructura del tipo cupredoxinal los cuales son la unidad básica fundamental de las enzimas oxidasa multicobre, los 3 dominios presentan un tamaño similar y tienen una estructura de barril (Figura 1) (Pezzella, Russo y Marzocchella, 2014).

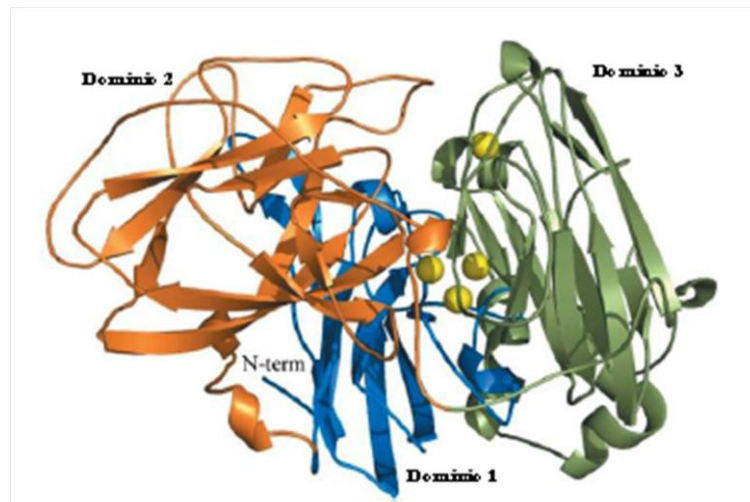


Figura 1 Estructura tridimensional de la lacasa de *Cerrena máxima*, en la que se pueden observar los tres dominios tipo cupredoxina y los centros del cobre. Tomado de (Moya, 2011)

Las lacasas son enzimas cobre dependientes y se ha visto que los sitios catalíticos y los aminoácidos que se encargan de coordinar las funciones de los iones de cobre en la molécula están conservados en la mayoría de los tipos de enzimas lacasas, la secuencia conservada es una estructura formada por 10 histidinas y una cisteína que se distribuyen de manera similar en los diferentes tipos de enzimas lacasas (Macerralo *et al.*, 2014; Moya, 2011)

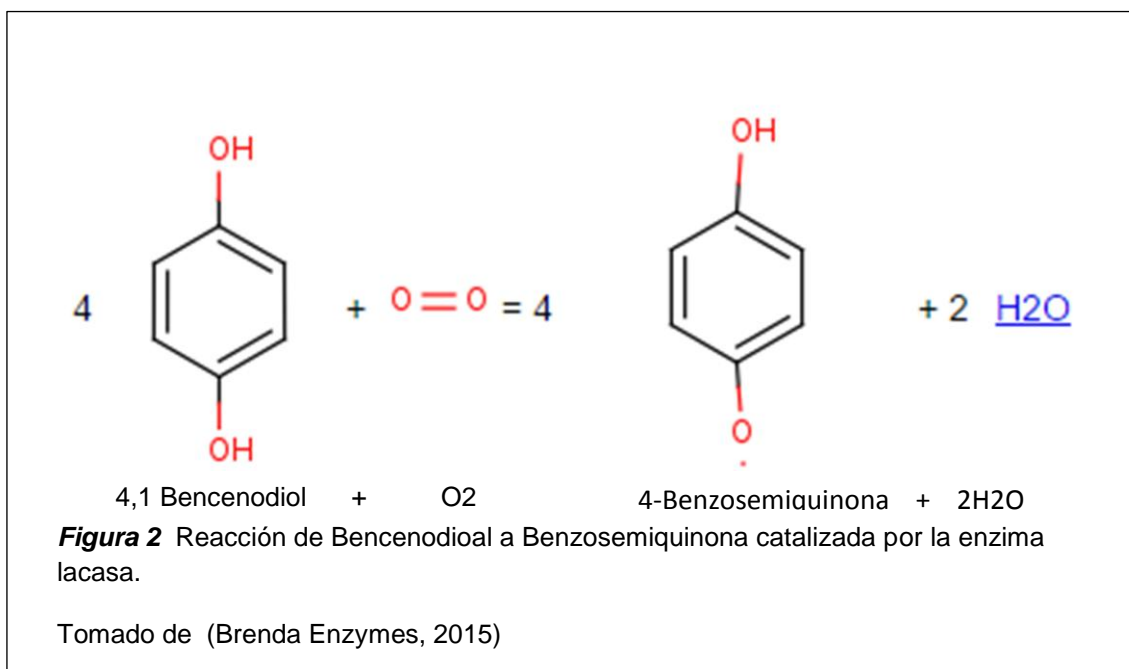
Para llevar al cabo su ciclo catalítico de despolimerización de la lignina completa las lacasas necesitan de peróxido de hidrógeno el cual oxida al ion cobre aumentando su estado de oxidación, cuando sucede esto las enzimas pueden actuar (García, 2008).

2.1.2 Especificidad de sustrato de las lacasas

Una característica muy importante de las lacasas es que presentan una especificidad muy baja sobre el sustrato, esto les permite oxidar una gran cantidad de compuestos de naturaleza fenólica debido a que poseen un bajo

potencial redox. Sin embargo, pese a que estas enzimas tienen un alto espectro de sustratos sólo se dispone de información de la cinética con muy pocos compuestos como el 2,2 azino-bis (3-etilbenzoatiazolin-6-sulfónico) (ABTS), siligandazina y guayacol de los cuales se conoce el coeficiente de extinción molar (Giardina *et al.*, 2010).

Las lacasas actúan sobre el sustrato reduciendo el oxígeno a dos moléculas de agua, el mecanismo se da por medio de la transferencia de 4 electrones y la oxidación del sustrato, además durante la reacción generalmente no se producen intermediarios tóxicos (Figura 2) (Moya, 2011, pp.8).



Todos los compuestos presentan una susceptibilidad para ser oxidados por la lacasas y esta susceptibilidad está dada por su estructura química y por su potencial redox, es importante mencionar que las lacasas tienen una gran cantidad de iones metálicos lo cual significa que pueden ser inhibidas por aniones como el floruro o el cianuro (Macellaro *et al.*, 2014).

2.1.3 Aplicaciones biotecnológicas de las lacasas

Existe muy poca cantidad de lacasas comerciales sin embargo, cada día aumenta el interés por la producción de estas enzimas ya que presentan una gran cantidad de aplicaciones en la industria.

2.1.3.1 Industria Textil

Con el paso de los años y con la revolución industrial, se vio un incremento en la producción textil en todo el mundo y con esto la industria se vio en la necesidad de crear nuevos colorantes sintéticos para satisfacer la demanda de productos. Los colorantes más utilizados son los colorantes tipo azo que se emplean para la coloración de celulosa. Se estima que aproximadamente un 10% de estos colorantes son descartados directamente a través de efluentes al medio ambiente sin ningún tratamiento previo (Cortazar-Martinez *et al.*, 2010). Actualmente existen más de 100.000 colorante sintéticos en todo el mundo y la gran mayoría de estos son perjudiciales para el ambiente, no sólo estéticamente si no que muchos de estos pueden causar alteraciones en los ecosistemas marinos afectando la solubilidad de los gases y pueden resultar mutagénicos para los seres vivos de estos ecosistemas (Díaz-Godinez, 2013; Moya, 2009, pp.26). Los colorantes sintéticos usados en la industria textil representan una gran amenaza para las flora y fauna de los ecosistemas marinos ya que más de un 90% de estos colorantes han demostrado ser mortales (Coronel *et al.*, 2013). Los tratamientos físicos y químicos utilizados como la floculación, filtración, flotación, ósmosis inversa y oxidación con ozono son muy costosos, además por la diversidad de estructuras que tienen estos colorantes su eficacia se ve disminuida (Aguilar *et al.*, 2010; García, 2008).

Las lacasas han demostrado una gran efectividad de remoción de colorantes, especialmente los tipo azo que son de naturaleza persistente, esto se debe a que son enzimas muy inespecíficas lo cual les permite oxidar una gran cantidad de sustratos, por lo cual el uso de enzimas lacasas es un tratamiento muy

prometedor ya que la materia prima utilizada para la producción de estas enzimas es muy económica (Moreno, 2008). Se han realizado investigaciones donde se ha simulado un efluente textil real y por medio de una lacasa comercial se obtuvo la decoloración del mismo (Aguilar *et al.*, 2008; Coronel *et al.*, 2013 Cortazar-Martinez *et al.*, 2008; Páez, 2012; Sandoval *et al.*, 2008).

2.1.3.2 Industria del papel

La lacasas son utilizadas para el blanqueo de la pasta de papel, por medio del complejo lacasa-mediador se puede disminuir la concentración de lignina presente en el papel (Moldes, Díaz, Tnazov y Vidal, 2011), con esto se puede tener un material rico en celulosa y con baja concentración de lignina y se elimina la posibilidad de que el papel presente un color pardo. Generalmente, en la industria papelera se utiliza cloro para eliminar el color pardo de la pasta de papel, pero esto conlleva otro problema debido a que el cloro es desechado por los efluentes industriales, el uso de lacasas ayuda a reducir la utilización de cloro y la contaminación del medio ambiente (Babot, 2012).

La mayoría de las lacasas utilizadas para este proceso son de origen fúngico pero también se ha visto que las lacasas de origen microbiano funcionan un rendimiento es menor. Actualmente, en el mercado, existe un producto comercial específico para el blanqueamiento de la pasta del papel denominado Lignozym (Call y Mucke 1998).

2.1.3.3 Degradación de hidrocarburos

Las características oxidativas de estas enzimas les permiten degradar algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) (Arana, Tellez y González, 2002). Se han realizado estudios donde se ha comprobado que las lacasas fúngicas pueden ayudar a mineralizar diferentes concentraciones de petróleo crudo presente en suelos contaminados (Adenipekun, 2008).

2.1.3.4 Industria alimentaria

Las lacasas pueden utilizar como sustrato grasas, carbohidratos y proteínas, por lo cual muchos alimentos pueden modificar sus propiedades gracias a la acción de estas enzimas, uno de los campos en los que más se las utiliza es en la modificación del color de algunas bebidas como cerveza y zumos de frutas (Román, Torres y Ayala, 2010). En el procesamiento del vino las lacasas pueden ayudar a eliminar los polifenoles y de esta manera mejorar las características organolépticas del producto (Manjarez *et al.*, 2008)

En la industria panadera las lacasas han demostrado que pueden mejorar la calidad de la masa debido a la formación de biopolímeros de ácido felúrico (Moya, 2011, pp.50).

2.1.3.5 Sector farmacéutico

Las lacasas han sido utilizadas para la producción de yodo que es un desinfectante, así como para la fabricación de antiinflamatorios y diversos analgésicos, pero el hallazgo más importante es que se encontró que las lacasas tienen la capacidad de inhibir la actividad transcriptasa inversa del virus HIV-1 (Moya, 2011, pp.50).

2.2 *Pleorotus ostreatus*

Pleorotus ostreatus es un hongo de podredumbre blanca perteneciente a la familia de los Basidiomycetos, el orden al cual pertenece es a los Agaricales y se encuentra dentro del género *Pleorotus*. La principal característica de estos hongos es la presencia de basidios en los cuales se producen basidiosporas (Ramírez *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2006) En el Tabla 3 se muestra la clasificación taxonómica del hongo *Pleorotus ostreatus*.

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *Pleorotus ostreatus* (Cabrera, 2011)

Reino	Fungi
Phylum	Basidiomycetes
Clase	Agaricomycete
Orden	Agaricales
Familia	Pleorotaceae
Género	<i>Pleorotus</i>
Especie	Spp

Su nombre se deriva de su particular forma parecida a una ostra. Este tipo de hongo puede crecer en casi cualquier tipo de sustrato lignocelulósico (Moreno y Ospina, 2008), además es un hongo saprófito y muchas veces actúa como parásito de diferentes tipos de árboles, poseen un gran número de hifas que le permite penetrar incluso en materiales muy complejos estructuralmente como la madera y las cutícula de insectos (Cabrera, 2011, pp.7). Este hongo es muy apreciado por sus características organolépticas para la industria alimentaria su composición puede variar pero en general está conformado por un 30% de proteínas, 56% de carbohidratos y 14% de grasas, adicionalmente se ha encontrado que presenta una gran cantidad de minerales en su estructura (Díaz, 2013).

En estudios realizados se ha visto que este hongo puede acoplarse a una gran diversidad de condiciones climáticas y de cultivo (Moya, 2011). El crecimiento microscópico de este hongo es micelar, algodonoso y aéreo, además en las diferentes etapas de su crecimiento forma anillos desde su centro hasta la periferia, mientras que en forma de cuerpo fructífero presenta la forma de una ostra (Figura 3)



Figura 3 Fotografías de cuerpo fructífero (a) y crecimiento micelar (b) de *Pleurotus ostreatus*.

Tomado de (Moya, 2011)

Este hongo ha despertado un gran interés del mundo científico de la biorremediación debido a que tiene un sistema multienzimático oxidativo muy poco específico, que puede mineralizar una gran cantidad de derivados de la celulosa, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y colorantes presente en los efluentes industriales (Rodríguez *et al.*, 2005; Tinoco *et al.*, 2001).

El complejo multienzimático del hongo *Pleurotus ostreatus* está compuesto por tres tipos de enzimas que son las lacasas (Lac), magnesio peroxidadasas (MnP) y lignino peroxidadasas (Lip), con las condiciones de cultivo se puede inducir a la producción de un tipo de estas enzimas en mayor o menor medida (Pezella, *et al.*, 2014).

Estas enzimas tiene funciones vitales sobre el hongo y al ser catalizadores naturales presentan una gran ventaja en comparación a los catalizadores químicos ya que su producción y uso es más económico, pueden llevar el sustrato hasta su mineralización completa y si no es así el residuo es biodegradado, además pueden operar en temperaturas moderadas (Cabrera, 2011; Macarallo *et al.*, 2010)

2.3. Método estadístico de superficie de respuesta

El modelo estadístico de superficie de respuesta es un método que se utiliza para determinar las condiciones óptimas para el desarrollo de un práctica o proceso, mediante las implementación de un número de tratamientos de acuerdo al modelo se pueden encontrar niveles óptimos de un factor sobre una variable de respuesta determinada como puede ser la actividad enzimática (Camara *et al.*, 2013). Este modelo permite al investigador obtener respuestas promedio de la acción de dos o más factores sobre una variable de respuesta, de esta manera se pueden evaluar el efecto de cada uno de estos factores (De zan, 2006).

El método de superficie de respuesta permite mejorar varios factores de un proceso como pueden ser: costos, tiempos, eficiencia y productividad en función de los valores óptimos obtenidos, al final de modelo es necesario realizar una optimización del proceso para evidenciar que el ensayo es reproducible (Camara *et al.*, 2013). Como cualquier otro modelo estadístico el modelo de superficie de respuesta contiene un término de error que es causado por diferentes variables en el manejo que no se pueden controlar (Camara, De zan y Goycochea, 2013).

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

Las diferentes fases de laboratorio fueron llevadas a cabo en el Laboratorio de Docencia de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Américas.

A continuación se describirá la metodología que se utilizó para alcanzar los objetivos planteados.

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un modelo de superficie de respuesta de primer orden 2^k para analizar el efecto combinado del pH y Tween 80 en la producción de enzimas lacasas. Se realizaron 9 tratamientos con diferentes valores de pH y Tween 80 y, todos los tratamientos se realizaron por triplicado (Tabla 4). Para la implantación de modelo se tomó como valores centrales: Tween 80 5mL/L y pH=6 (Tabla 4), basándose en datos obtenidos de diferentes investigaciones (Gayosso, 2008; Dekker, 2007; Saparrat, *et al* 2007).

3.2.- TRATAMIENTOS

3.2.1 Datos Tratamientos

Tabla 4. Unidades codificadas y descodificadas de los tratamientos a realizar bajo el modelo de superficie de respuesta de primer orden.

Unidades codificadas	Unidades descodificadas	
	Tween 80 (mL/L)	pH
-1,4	2,2	3,2
-1	3	4
0	5	6
1	7	8
1,4	7,8	8,8

3.2.2 Detalle de tratamientos

Tabla 5. Descripción de los 9 tratamientos utilizados

Tratamiento	Tipo de punto	Coordenadas		Valor asignado a coordenadas	
		Tween 80 (X1)	pH (X2)	X1 (mL/L)	X2
T1	Central	0	0	5	6
T2	Axial	0	-1,4	5	3,2
T3	Axial	0	1,4	5	8,8
T4	Factorial	1	1	7	8
T5	Factorial	1	-1	7	4
T6	Axial	-1	-1	3	4
T7	Axial	-1	1	3	8
T8	Factorial	1	0	7	6
T9	Factorial	-1	0	3	6

3.3 REACTIVACIÓN DE LA CEPA DE *Pleorotus ostreatus* EN MEDIO AGAR PAPA DEXTROSA (PDA).

La cepa de *Pleorotus ostreatus* utilizada fue obtenida de la colección microorganismos del Laboratorio de Docencia de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Américas. Dicha cepa fue reactivada tomando 5mm de micelio, el cual se inoculó en medio sólido PDA esterilizado. Las cajas Petri inoculadas se incubaron a 28°C durante 7 días.

3.4 SIEMBRA DE *Pleurotus ostreatus* EN MEDIO LÍQUIDO INDUCTOR DE LACASAS.

Para cada experimento propuesto según el diseño experimental (Tabla 5), se prepararon 100mL de medio de cultivo líquido que base compuesto por los reactivos detallados en la Tabla 6 y la respectiva cantidad de Tween 80 (Tabla 5). El pH de cada medio fue ajustado de acuerdo a lo planteado en la Tabla 5. A continuación, se colocaron a los 100 mL del medio y 2 g de esponja de poliuretano en los matraces de 250 mL y se autoclavó a 121 °C y 20 psi de presión durante 15 minutos. Una vez autoclavados los matraces con el medio de cultivo, a temperatura ambiente se procedió a colocar de forma aséptica un disco de aproximadamente 5mm de diámetro de la cepa reactivada en PDA en cada matraz y se incubó a 28 °C durante 20 días, se realizaron 3 réplicas de cada tratamiento.

Tabla 6. Composición de medio líquido inductor (Díaz, 2009; Cabrera, 2008)

Reactivo	g/L
Glucosa	13,15
Extracto de levadura	6,25
Fosfato de potasio	0,625
Sulfato de Magnesio	0,625
Fosfato de calcio	0,375
Cloruro de cobalto	1,5
Sulfato de Zinc	0,02
Sulfato de magnesio	0,025
Sulfato cúprico	0,25
Bacto pectona	0,5

3.5 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

Los niveles de enzimas lacasas son detectables claramente a partir del día 8 de la fermentación, por lo mismo a partir del día 8 se tomaron alícuotas diarias de 600 μL de medio líquido, las mismas que se centrifugaron a 13200 rpm por 15 minutos. Se cuantificó la actividad enzimática del extracto crudo mezclando 600 μL de dicho extracto con 400 μL de guayacol 100mM y 250 μL de buffer acetato pH 5. Se midió la absorbancia de la mezcla hecha previamente a 470nm durante 300 segundos con intervalos de 10 segundos. La actividad de lacasas se expresó en U/mL de extracto crudo, definiendo U como las μmoles de guayacol consumido por minuto.

La fórmula utilizada para la medición de la actividad fue (Saparrat *et al.*, 2007; Poornima, *et al* 2014; Viswanath, *et al* 2006; Karla, 2013):

$$U = \frac{(Abs\ Final - Abs\ inicial) * VT * fd}{\epsilon * VS * t} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Dónde:

Abs final = absorbancia medida a los 300 segundos de la reacción.

Abs inicial = absorbancia medida a 0 segundos de la reacción.

VT= Volumen total de la reacción.

fd = factor de dilución

ϵ = coeficiente de extinción molar de guayacol a 470 nm (6740/M/cm)

VS = volumen guayacol

t = tiempo de reacción

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

La información obtenida con las mediciones espectrofotométricas fue transformada a unidades de actividad enzimática. Posteriormente, se realizó en Excel una estadística de regresión y un análisis de varianza, obteniendo los

coeficientes que se utilizaron en la ecuación del modelo propuesto de superficie de respuesta de primer orden 2^k (Ecuación 2).

$$U = aX_1 + bX_2 + cX_1X_2^2 + dX_2X_1^2 + eX_1X_2 + f \text{ (Ecuación 2)}$$

Dónde:

y= Valor de variable de respuesta (Actividad enzimática)

a,b,c,d,e,f= coeficientes obtenidos del análisis estadístico de regresión de excel

X1=valor de Tween 80

X2=valor de pH

3.7 COMPROBACIÓN DEL MODELO MATEMÁTICO.

Una vez que se obtuvieron los valores óptimos según la metodología de superficie de respuesta, se procedió a realizar la verificación del modelo propuesto, para lo cual se realizó un ensayo con los valores óptimos de pH y Tween 80 obtenidos. Se realizaron tres réplicas de este ensayo.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

4.1 MEDIO INDUCTOR.

El medio inductor utilizado permitió el crecimiento del hongo, además propició la producción de enzimas lacasas, comprobando cualitativamente su presencia en el extracto crudo obtenido mediante la oxidación de guayacol (Figura 4)

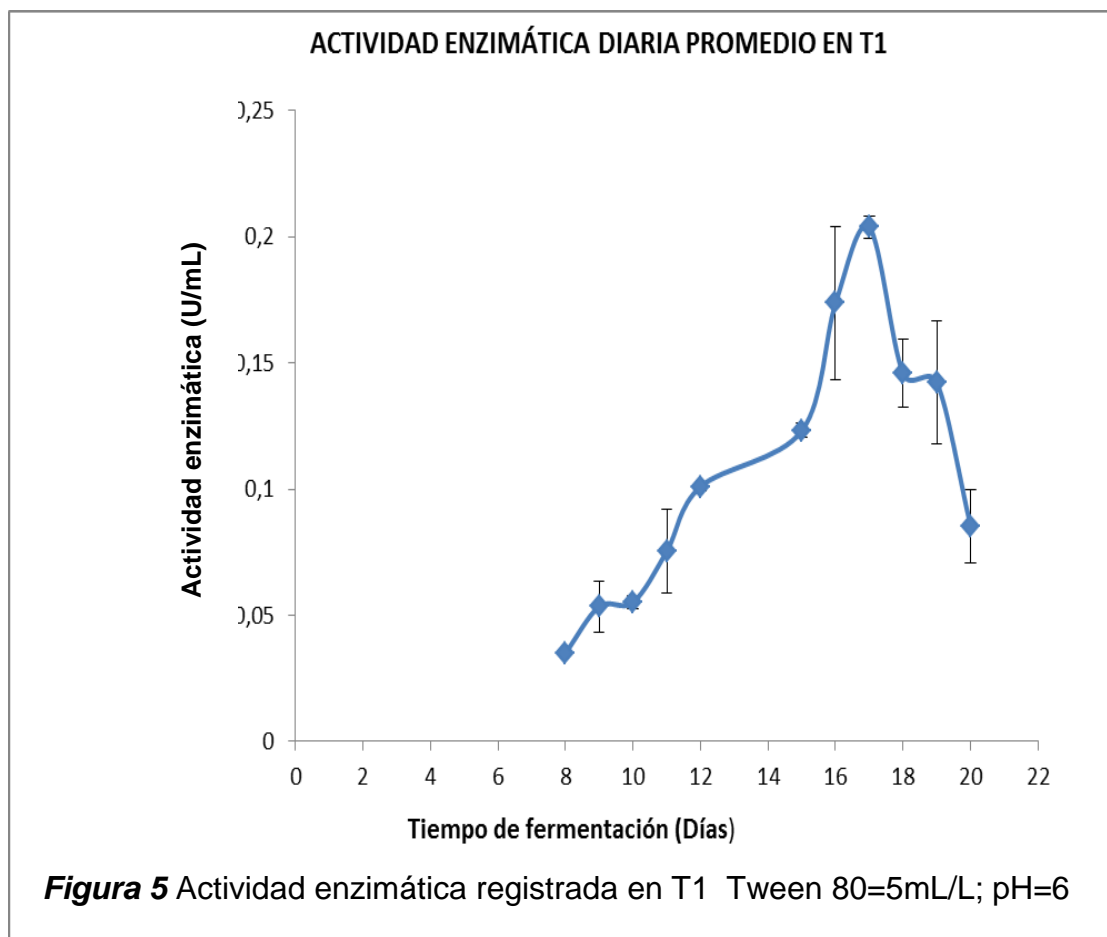


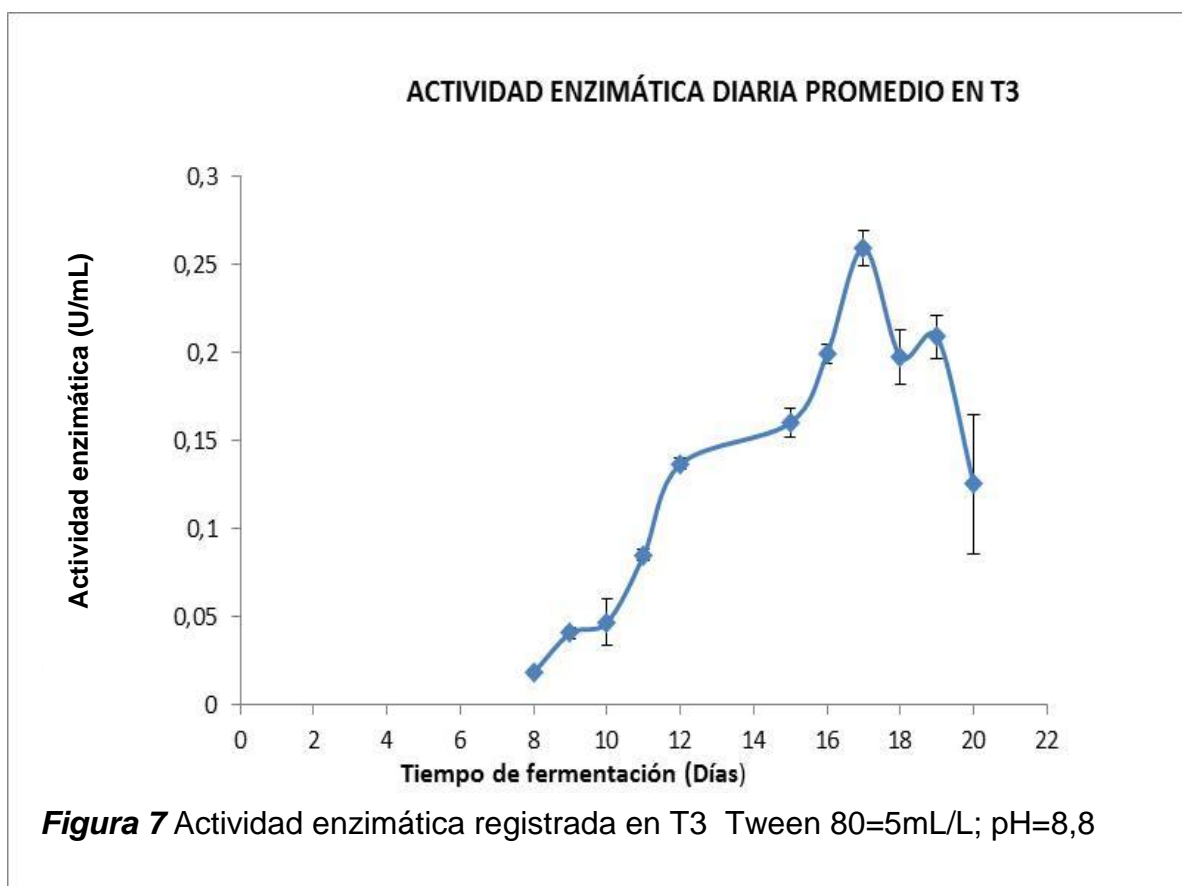
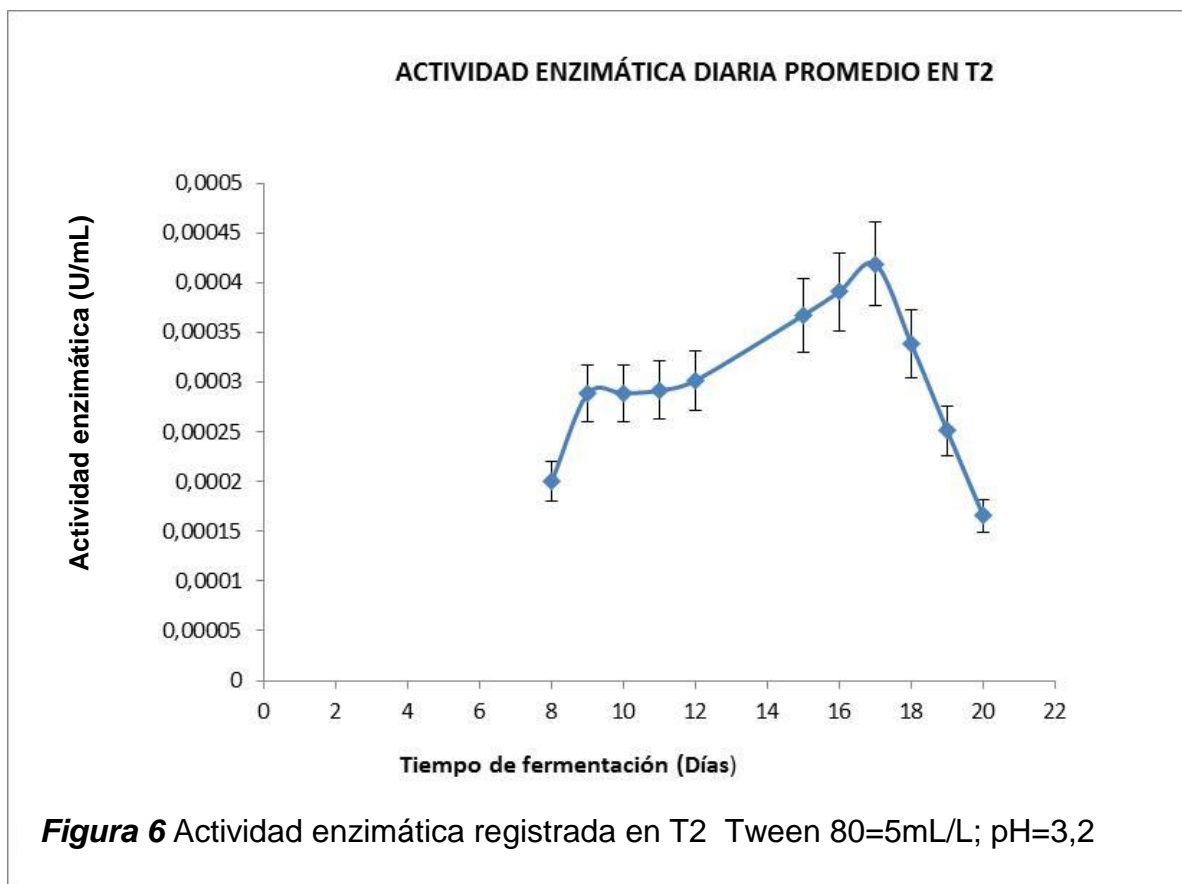
Figura 4 Cubetas donde se evidencia la oxidación de guayacol

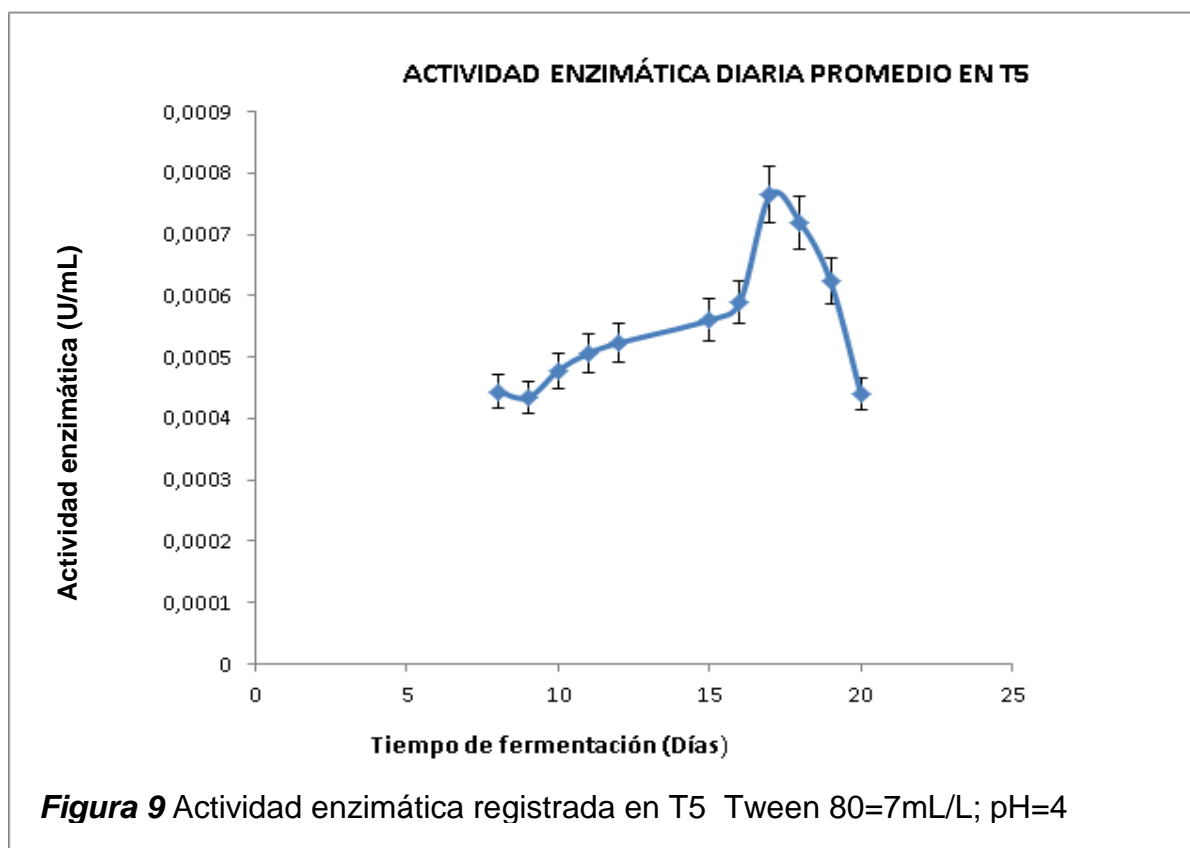
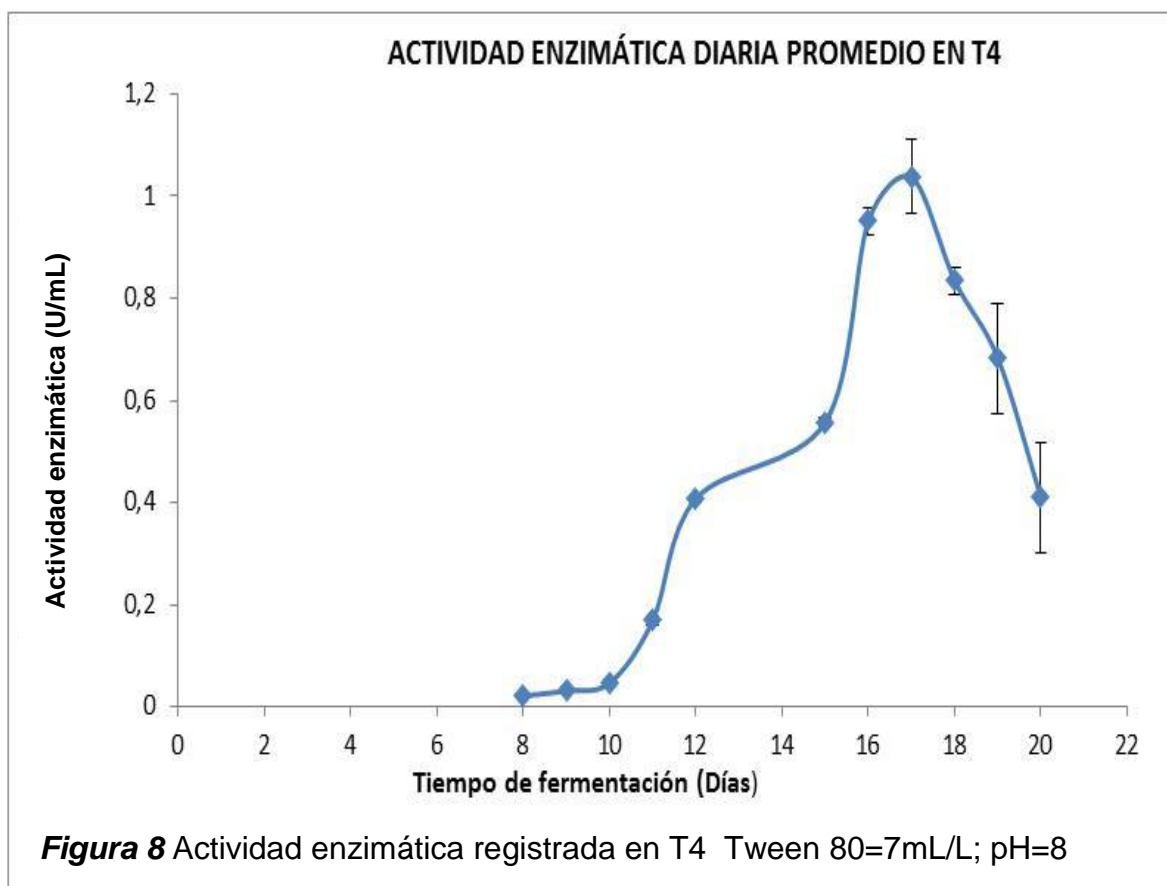
4.2 PRODUCCIÓN DE LACASAS

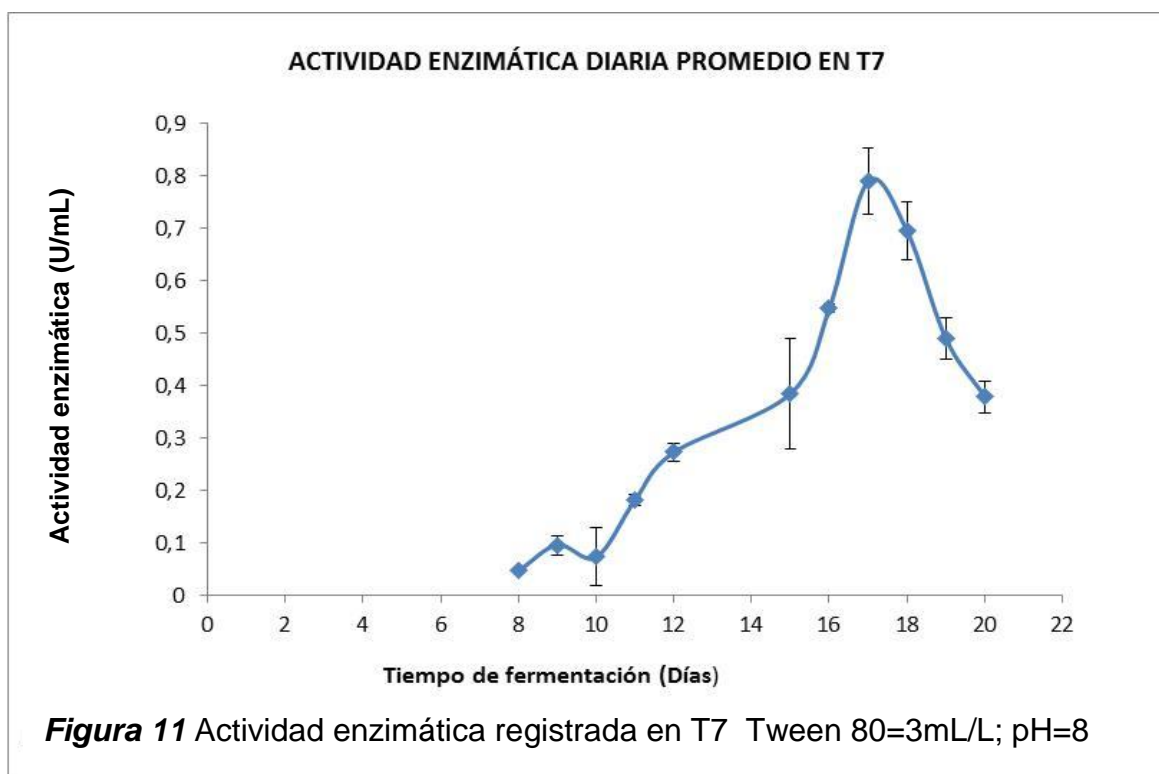
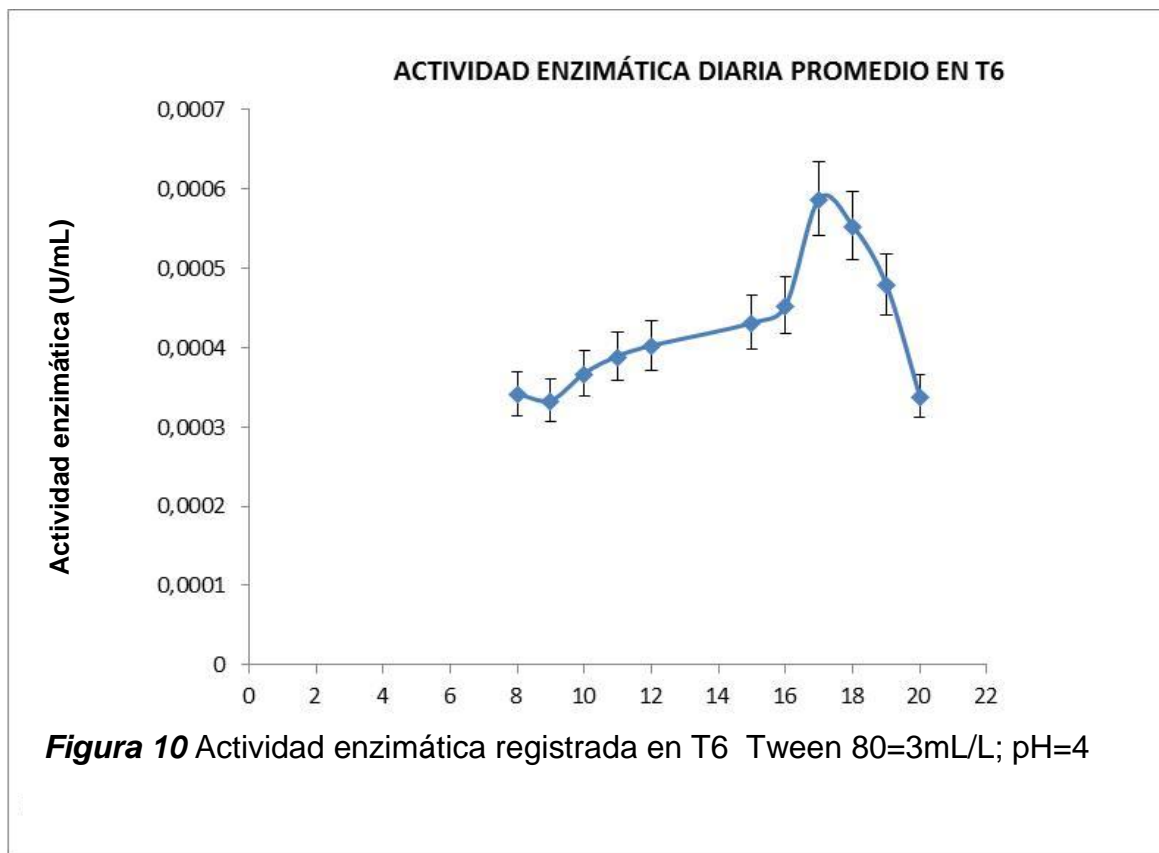
Se determinó de forma cuantitativa la actividad enzimática a través de la medición espectrofotométrica diaria de la reacción entre el sustrato (guayacol) y el extracto crudo que contenía las enzimas a 470nm durante 300 segundos y con intervalos de medición de 10 segundos para todos los tratamientos y todas sus repeticiones. La producción de lacasas fue aumentando con el pasar de los días hasta llegar a su punto máximo el día 17 de la fermentación en todos los tratamientos; esta aseveración se comprobó midiendo la actividad enzimática

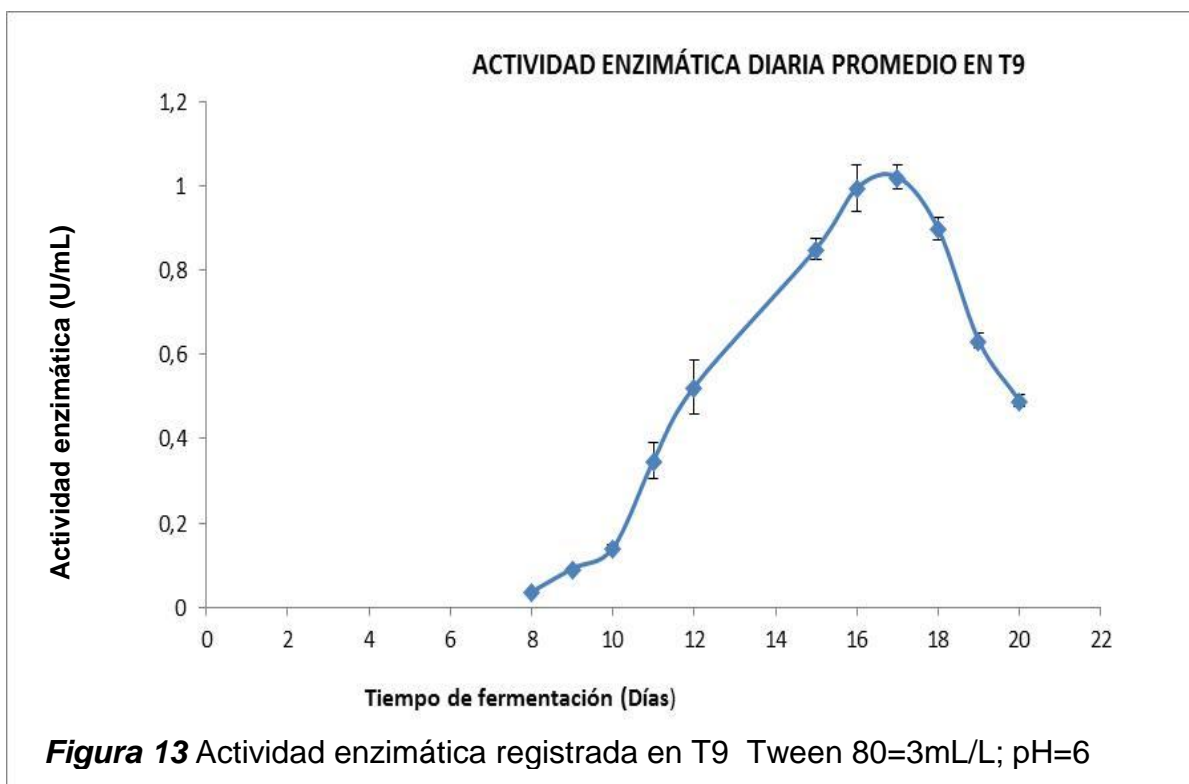
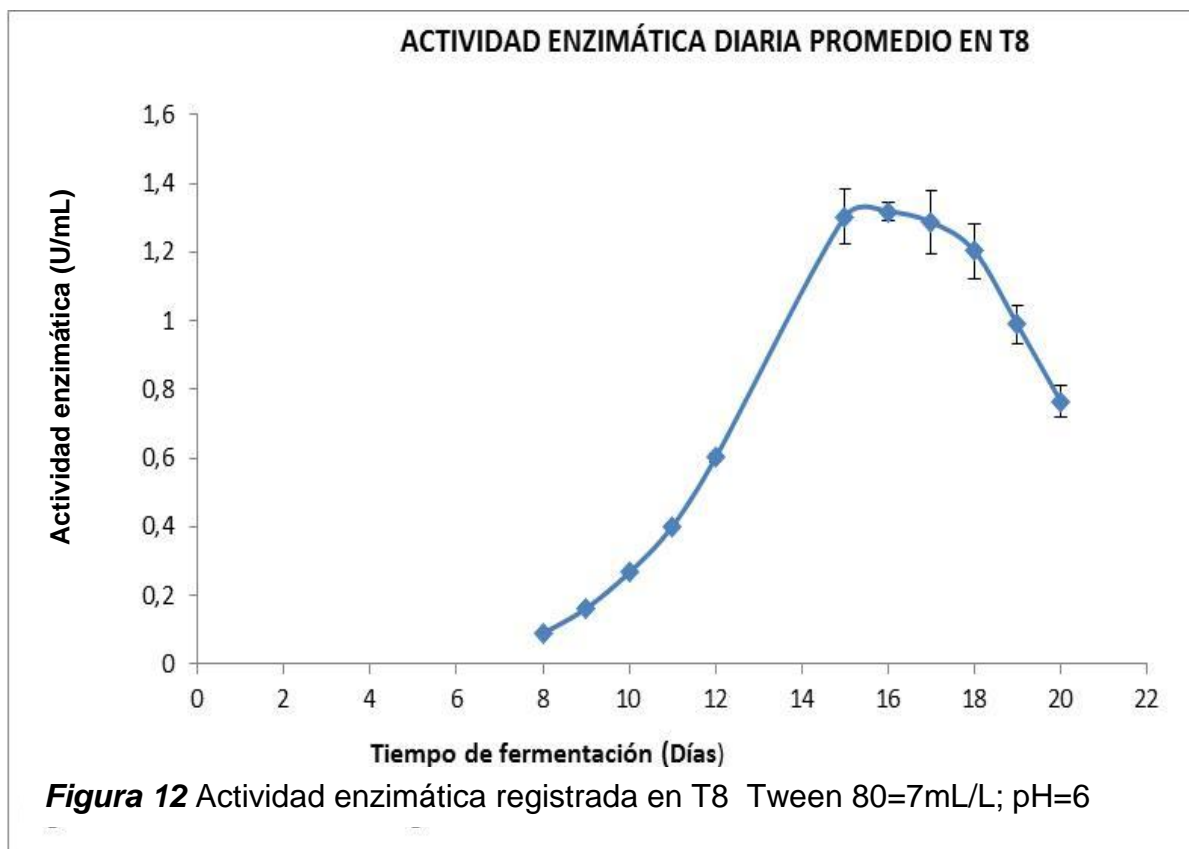
diaria. A partir del día que presentó máxima actividad, el valor de la misma fue decreciendo en todos los tratamientos de manera significativa (Figuras 5 a 13).











4.3.-pH

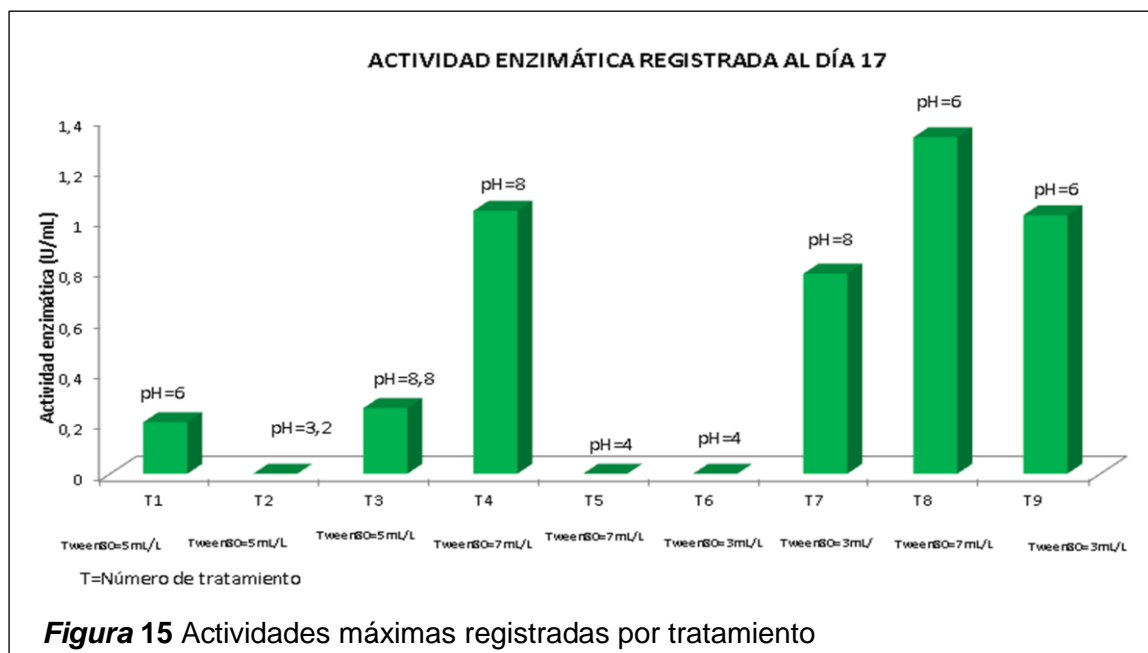
El efecto que tiene el pH en la producción de lacasas fue muy significativo, pues en los tratamientos donde la fermentación tenía valores de pH cercanos a 3 la actividad enzimática fue muy baja o casi nula, siendo estos tratamientos T2, T5 y T6, cuyos valores máximos de actividad fueron 0,000424 U/mL, 0,000716 U/mL y 0,0005896 U/mL respectivamente. Además, se pudo constatar que en los tratamientos T2, T5 y T6 donde se utilizaron pHs cercanos a 3 el micelio del hongo no crecía de la misma manera que en los tratamientos donde se utilizaban valores de pH cercanos a 7 o mayores a este (Figura 14).



En los tratamientos donde la fermentación tenía valores de pH cercanos o mayores a 7 la actividad enzimática aumentó considerablemente hasta el día 17 de la fermentación, siendo estos tratamientos T1, T3, T4, T7 y T8, cuyos valores máximos de actividad fueron 0,203 U/ml, 0,259 U/mL, 1,037 U/mL, 0,789 U/mL, 1,327 U/mL respectivamente (Figura 15).

4.4 TWEEN 80

La presencia de Tween 80 como agente surfactante aumentó la producción de enzimas lacasas. Los dos valores de actividad enzimática más altos 1,037 U/mL y 1,327 U/mL se registraron en los tratamientos T4 y T8 respectivamente (Figura 15).



4.5 MODELO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

Para la generación del modelo de superficie de respuesta se utilizaron los promedios de los valores de actividad medidos al día 17, con lo cual se realizó una estadística de regresión y análisis de varianza de los datos, obteniendo una ecuación (Ecuación 3) con la cual se generó el gráfico de superficie de respuesta (Figura 16). Como se observa en la Figura 15 los valores de actividad enzimática incrementan a pH superiores a 5 y Tween 80 superior o igual a 7 mL/L.

4.5.1 Análisis de Varianza y estadística de regresión

Resumen

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación múltiple	0,911592402
Coeficiente de determinación R ²	0,831000707
R ² ajustado	0,79076278
Error típico	0,256883029
Observaciones	27

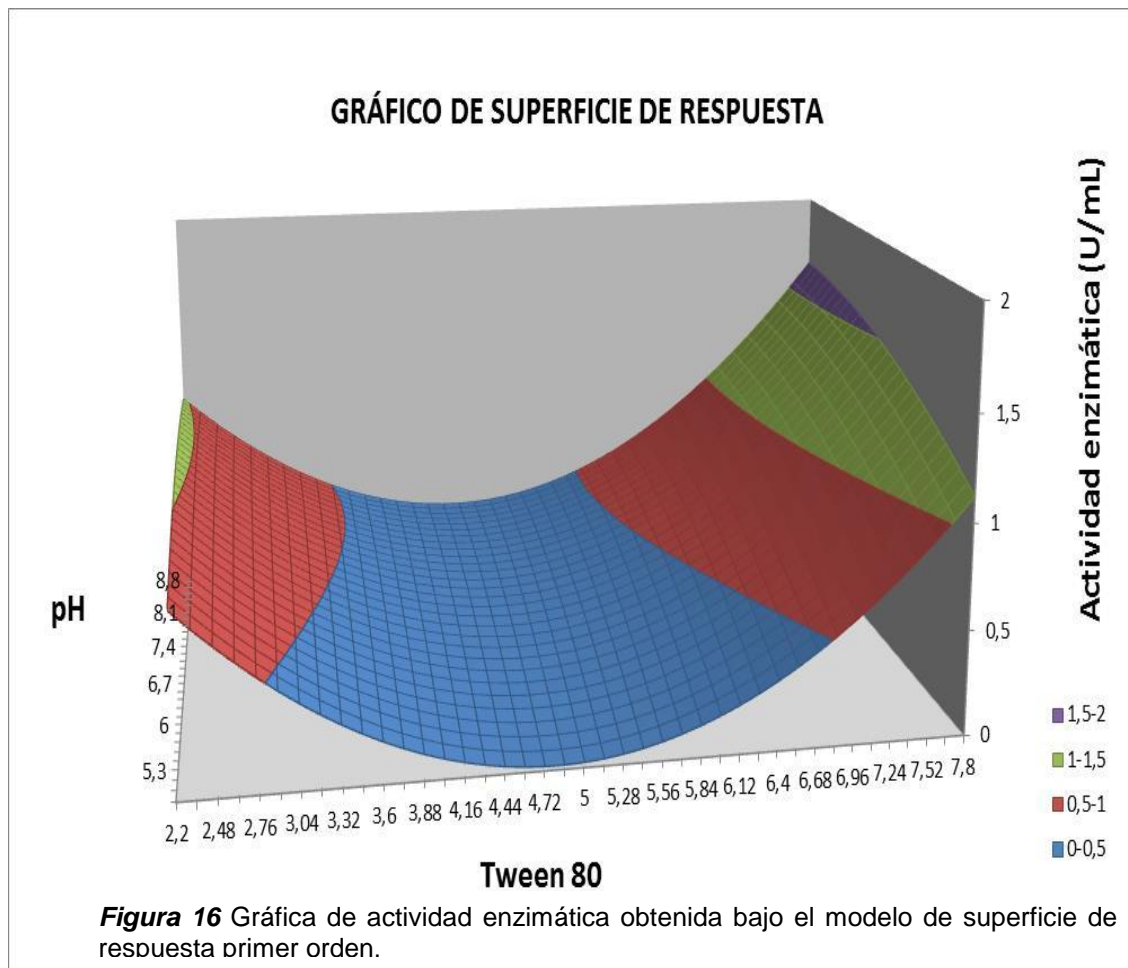
ANÁLISIS DE
ARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	5	6,814070534	1,362814107	20,6521749	1,84005E-07
Residuos	21	1,385766699	0,06598889		
Total	26	8,199837233			

	<i>Coefi</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico</i>		<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>
			<i>t</i>	<i>Prob</i>	<i>95%</i>	<i>95%</i>
f Intercep	0,214558	0,148251	1,44726167	0,16259	0,09374684	0,522862822
a Var X 1	0,132563	0,05270019	2,51542668	0,0201	0,02296742	0,242159516
b Var X 2	0,275268	0,05270019	5,22328194	3,5E-05	0,16567191	0,384864008
c Var X 3	0,488631	0,08796438	5,55487143	1,6E-05	0,30569887	0,671562752
d VarX 4	-0,11379	0,08796438	-1,2936194	0,20985	0,29672437	0,069139511
e Var X 5	0,061991	0,07415574	0,83595515	0,41259	0,09222443	0,216206185

$$U/mL = 0,132X_1 + 0,275X_2 + 0,488X_1X_2^2 - 0,113X_2X_1^2 + 0,061X_1X_2 + 0,214$$

(Ecuación 3)



4.6 COMPROBACIÓN DEL MODELO MATEMÁTICO

Para la comprobación del modelo matemático generado (Ecuación 3 y Figura 16) se realizó un ensayo biológico (Tabla 7) con tres réplicas a pH 8,5 y Tween 80 7,6 mL/L, obteniendo una actividad enzimática promedio de 1,43 U/mL con una desviación estándar de 0,035. El valor teórico del modelo propuesto (Ecuación 3) fue de 1,535 U/mL, el mismo que se comparó con el valor experimental obtenido (1,43 U/mL) generando un porcentaje de error entre ambas medidas de apenas el 6%.

Tabla 7. Actividad enzimática registra en ensayo de comprobación de modelo matemático

Tratamiento	Tween 80 (X1)	pH (X2)	X1 (mL/L)	X2	Actividad (U/mL)
1	Óptimo	Óptimo	7,8	8,5	1,439484
1	Óptimo	Óptimo	7,8	8,5	1,378716
1	Óptimo	Óptimo	7,8	8,5	1,448736
1	Óptimo	Óptimo	7,8	8,5	1,457163

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

Actualmente se desarrollan investigaciones con el fin de encontrar una estrategia efectiva para degradar compuestos contaminantes cuya disposición final y acumulación en el medio ambiente puede traer una gran cantidad de problemas ambientales y sanitarios (Páez, 2012). Una de las estrategias más prometedoras es el uso de enzimas lignolíticas como las lacasas, que son producidas por una gran cantidad de microorganismos; entre estos *Pleorotus ostreatus* que además es uno de los que más investigaciones concentra y con el cual se ha logrado producir enzimas lacasas en esta investigación. La producción de estas enzimas está sujeta a una gran cantidad de factores como: sustrato utilizado, cepa productora, condiciones de ambientales o de fermentación, formas de cultivo, entre otros (García, 2008).

Con el objeto de investigar el potencial de la cepa utilizada para la producción de lacasas bajo diferentes condiciones de cultivo se investigó el efecto combinado que tienen el pH inicial y el agregado de un agente tensoactivo (Tween 80), se utilizó un modelo de superficie de respuesta con el cual se plantearon 9 tratamientos utilizando como punto de partida los valores medios utilizados en otras investigaciones (pH 6 y Tween 5mL/L) (Díaz, 2013; Díaz-Godinez, 2012; Cabrera, 2011; Ramirez, *et al.*, 2003; Dekeer *et al.*, 2007). El tiempo en el cual se presentó la máxima actividad enzimática fue en el día 17 a diferencia de otros trabajos como el de Cabrera y su grupo de colaboradores donde se menciona que la producción máxima se da al día 18 (Cabrera, 2011). Esto probablemente se debe a que en esta investigación se utilizó *Agave Tequila Webber* como fuente de carbono para la fermentación y en este trabajo se utilizó dextrosa.

En estudios realizados se ha visto que el hongo *Pleorotus ostreatus* puede desarrollarse y producir lacasas en una gran diversidad de valores de pH que van desde 3 hasta 8, determinando que los valores óptimos de pH para la producción de lacasas oscilan entre 5,5 a 7,5 (Dekker *et al.*, 2009; Cabrera,

2011; Díaz 2009). De igual manera se han realizado trabajos donde se ha investigado el efecto que tiene en la producción de lacasas el agregado de un agente tensoactivo como Tween 20 y Tween 80 al medio líquido de cultivo, demostrando que este aumenta la secreción de enzimas lacasas al medio extracelular las cantidades utilizadas son en un amplio rango que va desde 1mL/L hasta 13mL/L, señalando en todos los casos que el Tween 80 aumenta la secreción de enzimas al medio extracelular (Gayosso *et al.*, 2008; Dekker *et al.*, 2009; Saparrat, *et al* 2007).

Otro factor a tomar en cuenta es el método de fermentación; en otros trabajos como en el trabajo de Sandoval y Ospina se utilizó un sistema de fermentación sumergida y la actividad máxima se registró al día seis y en esta investigación, que el método de fermentación fue semisólido, la actividad máxima se reportó al día 17 (Sandoval *et al.*, 2008).

Con relación al crecimiento del hongo, éste presentó una contextura algodonosa en todos los tratamientos. En los tratamientos alcalinos el micelio del hongo alcanzó un área mayor y en los tratamientos con pH ácido el crecimiento fue reducido. Esta puede ser una de las razones por la cual en los tratamientos a pH ácidos la producción de enzimas fue muy reducida y no aumentó con el tiempo.

Para la medición de la actividad enzimática se utilizó guayacol que es un sustrato que al ser oxidado por las enzimas lacasas produce un cambio de coloración de translúcido a café. El presente trabajo coincide con otros trabajos realizados con guayacol para determinar la presencia de enzimas lacasas (Saparrat *et al.*, 2007; Poornima *et al.*, 2014; Viswanath *et al.*, 2006; Karla *et al.*, 2013), donde se muestra actividad positiva de lacasas por la oxidación de guayacol.

Con los datos obtenidos en esta investigación se evidenció que el pH y el agregado Tween 80 tienen un efecto sobre la producción de lacasas con

Pleorotus ostreatus. La interacción de estos dos factores pueden aumentar o disminuir la actividad enzimática, y cabe mencionar que el pH fue un factor clave en la producción enzimática pues existieron diferencias en los tratamientos que se llevaron a cabo en valores de pH mayores a 5 respecto a los tratamientos con valores de pH menores a 5.

Con los valores máximo obtenidos del modelo se llevó a cabo un ensayo pH=8,5 y Tween 80 = 7,6mL/L, donde se obtuvieron resultados experimentales cercanos al valor teórico propuesto por el modelo, presentándose un porcentaje de error en la medición de 6%. Esto posiblemente puede deberse a errores de manipulación de equipos, soluciones preparadas y otros parámetros ambientales.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1.- CONCLUSIONES

- Se determinó que el pH inicial es un factor decisivo en la producción de lacasas, lo cual se vio reflejado en la actividad enzimática medida espectrofotométricamente ya que en todos los tratamientos con pH mayores a 5 se obtenían valores de actividad enzimática máxima entre 0,203 U/mL a 1,327 U/mL y para los tratamientos con pH menores a 5 se obtuvieron valores de actividad máxima entre 0,0004 U/mL a 0,0005 U/mL.
- Se observó que el pH inicial tiene un efecto en el crecimiento del hongo, pues solamente en los tratamientos donde se utilizó un pH mayor a 5 el hongo invadió la totalidad del soporte estructural (esponja de poliuretano).
- La adición del agente tensoactivo Tween 80 demostró aumentar la producción de enzimas lacasas, aunque la cantidad de Tween 80 utilizada durante la fermentación no demostró ser tan determinante como efecto marcado que tuvo el valor de pH inicial.
- La actividad enzimática máxima se presentó al día 17 de la fermentación.
- El tratamiento donde se presentó una mayor actividad enzimática fue el ensayo donde se utilizó un pH de 6 y una cantidad de Tween 80 de 7,8mL/L.
- El efecto combinado se determinó mediante un modelo de superficie de respuesta y se obtuvo que el valor óptimo de pH es 8,5 y el valor óptimo de Tween 80 es 7,6 mL/L.

- Se demostró que el modelo propuesto es reproducible pues el valor teórico de actividad con respecto al valor experimental obtenido difieren en un 6%.

6.2.- RECOMENDACIONES

- Se podría completar el estudio con la optimización de temperatura de crecimiento del hongo y sustratos utilizados en el medio de cultivo con el propósito de aumentar la producción de enzimas tipo lacasa.
- Al momento de coleccionar las alícuotas de caldo de cultivo con enzimas es necesario manejar normas de asepsia para evitar la contaminación de los tratamientos.
- Se recomienda que la toma de alícuotas para medir la actividad enzimática sea cada 24 horas exactas para obtener datos más precisos.
- La producción de lacasas podría ser llevada a cabo en un biorreactor escala laboratorio con las condiciones de fermentación óptimas encontradas.

REFERENCIAS

- Aguilar, O., Martínez C., Hernández C. (2010). Remoción de colorantes de efluentes de la industria textil. Puebla, México, recuperado de <http://148.206.53.84/tesiuami/UAMI15676.pdf>.
- Adenipekun, C. (2008). Bioremediation of engine-oil polluted soil by *Pleurotus tuber-regium* Singer, a Nigerian white-rot fungus. Ibadan, Nigeria, recuperado de <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/viewFile/58319/46669>.
- Arana, A., Tellez, A., González, T., González, A. (2002). Aspectos generales de la biodegradación de madera: Aplicaciones industriales de la lacasas. Madrid, España, recuperado de http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2002_3/aspectos_grls_biodegradacion.pdf.
- Babot, E. (2010). Utilización de enzimas en la industria de la pasta y papel. Sevilla, España, recuperado de <http://digital.csic.es/bitstream/10261/66303/1/Utilizaci%C3%B3n%20de%20enzimas%20en%20la%20industria%20de%20la%20pasta%20y%20papel.pdf>.
- Brenda enzymes. Recuperado de <http://www.brenda-enzymes.org>.
- Cabrera, M. (2011). Producción de lacasa de *Pleurotus ostreatus* utilizando los residuos de Agave tequilana Weber como sustrato. México, recuperado de <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/8856?show=full>.
- Call, H., Mucke, I. (1998). History, overview and applications of mediated Lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process). Baesweiler, Germany, recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165697016830>.
- Calle, J., Villegas, R., Álvarez, M., Gimenez, A., Terrazas, A. (2007). Optimización de las condiciones de cultivo para la producción de enzimas redox por *Aspergillus niger* QD y *Pestalotia* sp, recuperado de <http://www.ops.org.bo/textocompleto/rnbiofa20071504.pdf>

- Camara, M., De zan, M., Vera, L., Goychochea, H. (2013). Tópicos de quiometría, diseño experimental y optimización de sistemas con múltiple respuestas. Argentina, recuperado de <http://www.aaqa.org.ar/pdfs/cursos-2013-UNL.pdf>.
- Chávez, M., Domine, M. (2013). Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. Valencia, España, recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=323629266003>.
- Coronel, V., Tenesaca, M. (2013). Estudio de la factibilidad de un proceso de biorremediación de colorante índigo presente en las aguas residuales de la industria textil en la ciudad de Cuenca a través de hongos lignolíticos. Cuenca, Ecuador, recuperado de <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/6725/1/UPS-CT003412.pdf>.
- Cortázar, A., Coronel, C., Escalante A y González, C. (2010). Contaminación generada por colorantes de la industria textil. México, recuperado de <http://www.uaeh.edu.mx/scige/boletin/prepa4/n3/e1.html>.
- Cortázar, A., Coronel, C., Escalante, A., Gonzalez C, Castro J, Villagómez J (2012). Biotecnología aplicada a la degradación de colorantes de la industria textil. México, recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-29792012000200009.
- Cortazar-Martínez, C., González, C., Coronel, J., Escalante, J., Castro-Rosas, J., Villagómez (2010). Biotecnología aplicada a la degradación de colorantes de la industria textil. México, recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=15424357009>.
- D'Agostini, E., D'Agostini, R., Mantovani, J., Silveira, J., Paccola, D., Barros, N., Giani, A. (2009). Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. Umaurama, Brasil, recuperado de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162011000300004&lng=en&nrm=iso&tlng=en.

- Debing, J. (2010). Improving the simultaneous production of laccase and lignin peroxidase from *Streptomyces lavendulae* by medium optimization. *Bioresource Technology*, recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/44663380>.
- Dekker, R., Barbosa, A., Godoy, S., Covizzi, E., Giesse, H. Influence of nutrients on enhancing laccase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. (2007). Londrina, Brazil, recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18075999>.
- De zan, A. (2006). Principios de metodología de superficie de respuesta para modelos logísticos. Barcelona, España, recuperado de <http://upcommons.upc.edu/handle/10803/6518>.
- Díaz, R. (2009). Efecto del pH inicial de desarrollo de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida sobre su actividad de lacasas. Tlaxcala, México, recuperado de <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/6937>.
- Díaz-Godínez R, Bibbins-Martínez M, Rojas M, Sánchez C, Díaz G. (2013). Efecto del pH del medio de cultivo líquido sobre la producción de lacasas de *Pleurotus ostreatus*. México, recuperado de http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/acapulco09/TRABAJOS/AREA_I/CI-36.pdf.
- Dominic, W. (2010). Structure and Action Mechanism of Lignolytic Enzymes. *Appl Biochem Biotechnol*, recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18581264>.
- Flores, C., Casasanero, R., Trejo-Hernandez, M., Galindo, E., Serrano-Carreo, L. (2009). Production of laccases by *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation in co-culture with *Trichoderma viride*. Cuernavaca, México, recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19709340>.
- García, N. (2008). Producción de setas comestibles y enzimas lacasas por fermentación en estado sólido en pulpa de café con *Pleurotus spp.* Santiago de Cuba, Cuba, recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S2224-61852014000300005&script=sci_arttext.

- Garzón, C. (2009). Cinética de degradación de colorantes textiles de diferentes clases químicas por hongos y bacterias. Bogotá, recuperado de <http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis217.pdf>.
- Gayosso, M., Fernando, C., García, E., Ríos, E., Rodríguez, R. (2009). Evaluación de la actividad enzimática de *Pleurotus ostreatus* en presencia de bifenilos policlorados. Hidalgo, México, recuperado de http://www.uaeh.edu.mx/investigacion/icap/LI_BiotHongos/Martha_Gayo/6.pdf.
- Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S. y Sannia, G. (2010). Laccases: a never-ending story. Napoles, Italia, recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19844659>.
- Hongman, H., Jiti, Z., Jing, W., Cuihong, D., Bin, Y. (2003). Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. China, recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003295920300267X>.
- Jing, D. (2010). Improving the simultaneous production of laccase and lignin peroxidase from *Streptomyces lavendulae* by medium optimization. Beijing, China, recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20537891>.
- Kalra, K., Chauhan, R., Shavez, M., Sachdeva, S. (2013). Isolation of Laccase Producing *Trichoderma* Spp. And Effect Of pH and temperature on its activity. Haryana, India, recuperado de [http://sphinxesai.com/2013/JulySept13/chPDF/CT=24\(2229-2235\)JS13.pdf](http://sphinxesai.com/2013/JulySept13/chPDF/CT=24(2229-2235)JS13.pdf).
- Lettera, V., Del Vecchio, C., Piscitelli, A., Sannia G. (2008). Low impact strategies to improve ligninolytic enzyme production in filamentous fungi: The case of laccase in *Pleurotus ostreatus*. Italia, Napoli, recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22078734>.
- Niladevi, K., Rajeev, K., Sukumaran, N., Jacob, G., Anisha, P., Prema. Optimization of laccase production from a novel strain—*Streptomyces psammoticus* using response surface methodology. Micorbiological

- Research, recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17207981>.
- Macellaro, G., Pezzella, C., Cicatiello, P., Sannia, G., Piscitelli, A. (2014). Fungal Laccases Degradation of Endocrine Disrupting Compounds. Naples, Italia, recuperado de <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/614038/>.
- Madzak, C., Otterbein, L., Chamkha, M., Moukha, S., Asther, M., Gaillardin, C. Beckerich, J. (2005). Heterologous production of a laccase from the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus* in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. Marsella, Francia, recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15780663>.
- Manjarez, K., Castro, A., Rodriguez, E. (2008). Producción de lacasas utilizando *Pleurotus Ostreatus* sobre cascaras de plátano y bagazo de caña. Colombia, Bogotá, recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/rlsi/v7n2/v7n2a02>.
- Manikandan, K., Viruthagiri, T. (2010). Optimization of C/N ratio of the medium and Fermentation conditions of Ethanol Production from Tapioca Starch using Co – Culture of *Aspergillus niger* and *Sachormyces cerevisiae*. USA, recuperado de [http://sphinxsai.com/s_v2_n2/CT_V.2No.2/ChemTech_Vol_2No.2_pdf/CT=32%20\(947-955\).pdf](http://sphinxsai.com/s_v2_n2/CT_V.2No.2/ChemTech_Vol_2No.2_pdf/CT=32%20(947-955).pdf).
- Mendoce, M., Castro, A., Camarao, H. (2010). Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*, recuperado de <http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/630>.
- Mendoza, G. (2012). Estudio de enzimas ligninolíticas producidas por *Pleurotus ostreatus* y *lentini* usando diferentes inductores. Madrid, España, recuperado de <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/handle/28000/1029>.

- Moldes, D., Diaz, M., Tzanov, T., Vidal, T. (2008). Comparative study of the efficiency of synthetic and natural mediators in laccase-assisted bleaching of eucalyptus kraft pulp. California, USA, recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18499450>.
- Moreno, N., Ospina, X. (2008). Evaluación de inductores metélicos y co-sustratos para la remoción de negro reactivo 5 empleando *Pleurotus ostreatus* inmovilizado en fique. Bogotá, Colombia, recuperado de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis222.pdf>.
- Moya, R. (2011). Caracterización de la lacasa de *Streptomyces cyaneus* cect 3335 y aproximación al estudio de su potencial oxidativo y función biológica. Alcará, España, recuperado de <http://dspace.uah.es/dspace/handle/10017/16781>.
- Niladevi, K., Rajeev, K., Nicemol, G., Anisha, P. (2006). Optimization of laccase production from a novel strain—*Streptomyces psammoticus* using response surface methodology. India, recuperado de <http://dspace.uah.es/dspace/handle/10017/16781>.
- Páez, M. (2012). Determinación de la actividad enzimática de lacasas y lignino peroxidasas de hongos degradadores de colorantes seleccionados para el tratamiento de aguas residuales de la industria textil. Departamento de ciencias de la vida (ESPE), recuperado de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/5269/1/AC-BIO-ESPE-033267.pdf>.
- Pérez, R., Becerra R., Arce, A., Romero, R., Montalvo, C., Villegas, O., Alonso, A. (2009). Purificación de lacasas y su aplicación en la remoción de contaminantes en agua. Puebla, México, <http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/queretaro11/TRABAJOS/trabajos/IV/carteles/CIV-76.pdf>.
- Pezzella, C., Russo, M., Marzocchella, A. (2014). Immobilization of a *Pleurotus ostreatus* Laccase Mixture on Perlite and Its Application to Dye Decolourisation. Napoles, Italia, recuperado de <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/308613/>.

- Poornima, R., Sneha, U., Sridhar, S. (2014). Optimization of Enzymatic Decolourization of Amido black by Laccase from *Rigidoporus ulmarius* using Response Surface Methodology. Tamil Nadi, India, recuperado de <http://iosrjournals.org/iosr-jestft/papers/vol8-issue4/Version-2/J08426467.pdf>.
- Ramírez, N., Vargas, M., Ariza, J., Martínez, C. (2003). Caracterización de lacasa obtenida por dos métodos con *Pleurotus ostraetus*. Bucaramanga, Colombia, recuperado de <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/580/1096>.
- Ramos, M., Martínez, F., Guzmán, Refugio, M. "Incremento de la producción de lipasa de *serratia marcescens* sm3 por mutagénesis química". Cuernavaca, México, recuperado de <http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/queretaro11/TRABAJOS/trabajos/l/carteles/CI-66.pdf>.
- Rodríguez, S., Bermúdez, R., Serrat M., Kourouma, A. (2006). Selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* para la decoloración de efluentes industriales. Santiago de Cuba, Cuba, recuperado de <http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/queretaro11/TRABAJOS/trabajos/l/carteles/CI-66.pdf>.
- Rodriguez, E. (2006). Caracterización molecular de lacasas de *Pleurotus eryngii*: expresión heteróloga de estas enzimas y aplicaciones en la degradación de contaminantes aromáticos. Madrid, España, http://digital.csic.es/bitstream/10261/40187/1/TESIS_EnriqueRodriguezSanchez.pdf.
- Román, R., Torres-Duarte, C., Ayala, M., Vázquez, R. (2010). Producción a escala piloto de lacasa de *Coriolopsis gallica*. Cuernavaca, México, recuperado de <http://revistamexicanademicologia.org/wp-content/uploads/2010/08/3.-TR-214-VOL1.pdf>.
- Salony . S. Mishra . V. . Bisaria S. Production and characterization of laccase from *Cyathus bulleri*. and its use in decolourization of recalcitrant textile

dyes. India, recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16261367>.

Sandoval, N., Ospina, X. Evaluación de inductores metálicos y co-sustratos para la remoción de negro reactivo u utilizando *Pleurotus ostreatus* inmovilizado en fique. Bogotá, Colombia, recuperado de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis222.pdf>.

Saparrat, M., Arambarri, M., Balatti, P. (2007). Growth and extracellular laccase production in liquid cultures of *Minimidochium parvum* LPSC # 548 Strain. Argentina, recuperado de <https://doaj.org/article/f364f57ca44d4b6b9817e23091deff3c>.

Spezzia, T. (2012). Selección de cepas de hongos comestibles productoras de lacasas y su potencial aplicación a procesos de remediación en zonas contaminadas con hidrocarburos en México, Puebla, recuperado de http://www.lareferencia.info/vufind/Record/MX_c1b3d52ca98fa8fcc824e17d9311563f.

Tinoco, R., Pickard, M., Vazquez-Duhalt. (2001). Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. México-Canada, recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328500>.