



FACULTAD DE INGENIERÍAS Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE  
ENZIMAS OXIDORREDUCTASAS TIPO LACASAS DE *Pleurotus ostreatus*,  
PARA SU POSTERIOR INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA EN ALGINATO DE  
CALCIO

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

Profesora guía

M.Sc. María Alejandra Cruz Salazar

Autora

Adriana Estefanía Larrea Sarmiento

Año

2016

## **DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA**

"Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con la estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

María Alejandra Cruz Salazar  
Máster en Ingeniería de Bioprocesos y Biotecnología  
C.C.: 1719928572

## **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".

---

Adriana Estefanía Larrea Sarmiento  
C.C.: 1721761722

## **AGRADECIMIENTOS**

A Rommel Granja, María Alejandra Cruz y Diana Flores quienes supieron guiarme y confiar en mis conocimientos durante el desarrollo de este proceso.

A Alejandro Olmedo quien hizo posible la realización de este proyecto.

A Darío Arizala, un amigo especial en mi vida universitaria, quien supo brindarme su amistad sincera y fue parte esencial en este proyecto.

## **DEDICATORIA**

A los responsables de mi felicidad, culminación de metas y el amor a la vida y mi carrera, mis padres Ariosto y Emilia. Quienes son mi sonrisa y motivo de lucha diaria, enseñándome a disfrutar de los detalles de cada día.

A mis hermanos y compañeros de vida, Gabriela y Javier, con quienes he compartido momentos únicos e inolvidables.

A mi vieja Hectorina, motivo de perseverancia y amor eterno.

A Alejandro, un hombre maravilloso que me ha acompañado en cada momento, ganándose mi corazón y mi amor incondicional, creciendo juntos y realizando nuestros sueños.

## RESUMEN

Las lacasas son enzimas oxidasas multicobre, secretadas extracelularmente por varios organismos, incluyendo a *Pleurotus ostreatus*. Éstas han sido foco de estudios por su capacidad de oxidar una amplia variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos, por lo que su campo de aplicación es muy variado. El objetivo de este proyecto fue evaluar la producción de enzimas tipo lacasas, en función de la concentración del ion  $\text{Cu}^{2+}$  como un agente inductor y tres sustratos como fuente de carbono, para su posterior inmovilización en perlas de alginato de calcio al 2% y glutaraldehído al 0.5%. Los resultados obtenidos mostraron que la glucosa fue la mejor fuente de carbono comparada con la cascarilla de arroz y salvado de trigo, mientras que los análisis estadísticos indicaron que el T2 (0,2 g/L  $\text{Cu}^{2+}$ , 9.23 g/L de glucosa) presentó la mayor actividad enzimática al día 38, con un valor de 100.62 U/mL. La actividad enzimática del extracto crudo y enzima inmovilizada, con respecto a la temperatura y pH, presentó el mismo patrón: incrementó proporcionalmente hasta alcanzar un punto máximo y luego decreció. El pH y temperaturas óptimas fueron 6,05 y 30°C para el extracto crudo y, 5.5 y 40°C para la enzima inmovilizada, respectivamente. Por otra parte, los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  indicaron que la inmovilización produjo una disminución en la afinidad de la enzima lacasa hacia el sustrato guayacol comparada con el extracto crudo, pero la eficiencia catalítica fue mayor para la enzima inmovilizada. Por lo que se concluye que es posible optimizar la producción de la enzima lacasa y su inmovilización direccionaría aplicaciones futuras en la industria del Ecuador.

## ABSTRACT

The laccases are multicopper oxidase enzymes secreted extracellularly by several organisms, including *Pleurotus ostreatus*. These have been the focus of studies for their ability to oxidize a wide variety of organic and inorganic substrates, so its scope is varied. The aim of this project was to evaluate the production of laccase-type enzymes, depending on the concentration of  $\text{Cu}^{2+}$  ion as an inducing agent and three substrates as a carbon source, for further immobilization in 2% calcium alginate and 0.5% glutaraldehyde beads. The results showed that glucose was the best carbon source compared to rice husks and wheat bran, whereas statistical analyzes indicated that T2 (0.2 g/L  $\text{Cu}^{2+}$ , 9.23 g/L glucose) presented the largest enzyme activity at day 38 with a value of 100.62 U/mL. The enzymatic activity of crude extract and immobilized enzyme, with respect to temperature and pH, presented the same pattern: it proportionally increased reaching a maximum point and then decreased. The optimum pH and temperature were 6.05 and 30°C for crude extract and 5.5 and 40°C for immobilized enzyme, respectively. Furthermore, the kinetic parameters  $V_{\max}$  and  $K_m$  indicated that the immobilization produced a decrease in the affinity of the laccase toward guaiacol substrate compared with the crude extract, but the catalytic efficiency was higher for the immobilized enzyme. So it is concluded that it is possible to optimize the production of the laccase enzyme and its immobilization would address future applications in the industry of Ecuador.

## ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Formulación del problema .....	4
1.4 Objetivos.....	7
1.4.1 Objetivo General.....	7
1.4.2 Objetivos específicos .....	8
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO .....	9
2.1 Descripción de la especie <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	9
2.1.1 Morfología y cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i> . .....	9
2.1.2 Importancia del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	10
2.2 Lacasas .....	11
2.2.1 Generalidades de la enzima lacasa. ....	11
2.2.2 Estructura de las lacasas.....	12
2.2.3 Propiedades catalíticas de la enzima lacasa. ....	13
2.2.4 Aplicaciones Industriales de la enzima lacasa.....	16
2.3 Producción de la enzima lacasa en el reino fungi. ....	18
2.3.1 Características y propiedades del medio de cultivo. ....	18
2.3.2.1 Tipos de sustratos.....	18
2.3.2.2 Inductores e inhibidores enzimáticos .....	19
2.3.2 Generalidades de la fermentación de lacasas. ....	20
2.3.2.1 Fermentación en estado sólido.....	20
2.3.2.2 Fermentación sumergida .....	21
2.4 Inmovilización enzimática .....	21
2.5 Superficie de Respuesta.....	24
3. CAPÍTULO III. METODOLOGÍA.....	26
3.1 Obtención del microorganismo .....	26
3.2 Selección del sustrato y producción de enzima lacasa por fermentación en estado sólido (SSF) .....	27
3.3 Preparación del sustrato guayacol.....	27

3.4 Extracción de las enzimas y medición de la actividad enzimática .....	28
3.6 Superficie de respuesta (Diseño Central Compuesto) .....	29
3.7 Inmovilización enzimática de la enzima lacasa .....	30
3.8 Influencia del pH y temperatura en la estabilidad de la enzima lacasa.....	31
3.9 Determinación de los parámetros cinéticos.....	32
3.10 Análisis estadístico .....	32
<b>4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
4.1 Cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i> y elaboración de la curva de calibrado.....	33
4.2 Evaluación del mejor sustrato .....	34
4.3 Ensayo de superficie de respuesta (Diseño central compuesto).....	36
4.4 Inmovilización enzimática en alginato de calcio .....	40
4.5 Evaluación de la influencia y estabilidad de la enzima lacasa a diferentes pH .....	41
4.6 Evaluación de la influencia y estabilidad de la enzima lacasa a diferentes temperaturas .....	45
4.7 Determinación de los parámetros cinéticos de la enzima lacasa .....	47
<b>5. CAPÍTULO V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>50</b>
5.1 Evaluación del mejor sustrato como fuente de carbono.....	50
5.2 Optimización de la producción de enzima lacasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	53
5.3 Inmovilización enzimática en alginato de calcio .....	56
5.4 Evaluación de la influencia y estabilidad de la enzima lacasa a diferentes pH .....	58
5.5 Evaluación de la influencia y estabilidad de la enzima lacasa a diferentes temperaturas .....	61

5.6 Determinación de los parámetros cinéticos de la enzima lacasa .....	62
6. CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	65
6.1 Conclusiones .....	65
6.2 Recomendaciones .....	66
7. REFERENCIAS .....	67
8. ANEXOS .....	79

## **CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Antecedentes**

La enzimología constituye un importante campo de investigación dentro de la biotecnología. La producción de enzimas ha crecido de forma sustancial en los últimos años; consecuentemente, el empleo de enzimas en diferentes sectores de la industria ha permitido la optimización de procesos industriales, debido a que estos biocatalizadores presentan una alta especificidad, incrementan la velocidad de reacción y favorecen la disminución de compuestos químicos que contaminan el medio ambiente (Johannes, Woodyer y Zao, 2002, p. 86). Una de las enzimas más estudiadas por su multiplicidad de aplicaciones es la enzima lacasa, una glicoproteína generalmente extracelular, que pertenece a la familia de las polifenol oxidasas (Desai, Tennali, Channur, Anup, Deshpande y Azhar, 2011, pp. 543–549).

Las lacasas son secretadas por bacterias, plantas e insectos, destacándose las producidas por los hongos. En este punto, se ha reportado que las lacasas fúngicas son estables a pH ácido, en valores de 3.6 y 5.2; poseen un punto isoeléctrico que oscila entre 3 y 7; un rango de temperatura óptimo de 30 a 50°C, y un peso molecular entre 60 y 70 kDa (Ravindra, Pinnamaneni y Koon, 2012, pp. 1–13). Esta enzima, a diferencia de cualquier otra, presenta una baja especificidad por el sustrato, lo que hace posible la oxidación de un amplio rango de componentes fenólicos, aminas aromáticas, y compuestos no aromáticos (Pezzella, Lettera, Piscitelli, Giardina y Sannia, 2013, pp. 705–717; Desai et al., 2011, pp. 543–549).

La búsqueda y evaluación de nuevas fuentes de sustrato para una producción eficiente de enzima lacasa, ha venido constituyendo un método indispensable en la optimización de los componentes de un medio de cultivo. Con este propósito, distintos sustratos con alto contenido de celulosa, hemicelulosa, lignina, proteínas, lípidos y minerales han sido empleados como fuente de carbono, para estimular una mayor producción de enzimas ligninocelulíticas. Entre las distintas fuentes de sustratos utilizadas se reportan los siguientes residuos alimenticios: pulpa de café (Niladevi y Prema, 2008, pp. 4583–4589),

pulpa de manzana (Park, Yoon, Kim, Kwon, Yoo, Kong, Lee, 2014, pp. 193-197) y pulpa de tomate (Freixo, Karmali y Arteiro, 2012, pp. 245–254). También se documentan el uso de varios residuos agrícolas como sustratos para la producción de las lacasas: paja de trigo (Niladevi y Prema, 2008, pp. 4583–4589), cascarilla de arroz (Niladevi, Sukumaran y Prema, 2007, pp. 665–674), almidón de maíz y bagazo de caña (Karp, Faraco, Amore, Letti, Thomaz y Soccol, 2015, pp. 1-8)

El Ecuador, a pesar de ser un país megadiverso y por lo tanto poseedor del seta *Pleurotus ostreatus*, la producción e investigación relacionada a este microorganismo es limitada. Hasta la actualidad su producción y comercialización de este microorganismo se da netamente para el consumo humano, por lo que estudios empleando bagazo de caña, paja de trigo (Aguinaga, 2012), aserrín de eucalipto, tamo de cebada y cascarilla de arroz mezclado con afrecho de trigo (Jaramillo, 2013) como sustratos, han sido desarrollados para optimizar su producción en otros campos de aplicación. Existe un solo reporte aplicado a la biorremediación de suelos con metales pesados que fue realizado en la Escuela Politécnica del Litoral, mismo que concluyó que *P. ostreatus* remueve de forma eficiente Co y Cd, y en menor proporción Pb y Cu (Coello y Burgos, 2012).

Ensayos relacionados con la optimización en la producción de la enzima lacasa usando el hongo de pudrición blanca *Marasmius* sp. y residuos provenientes de la agricultura entre los cuales se incluyen el esqueleto de racimos de frutas, paja de arroz, tusa de maíz y cascarilla de arroz han sido realizados, obteniendo que el microorganismo *Marasmius* sp. metabolizó de una forma más eficiente el sustrato de paja de arroz y obteniendo una actividad correspondiente a 1116.11 U/L en un periodo de 10 días (Risdiando, Sofianti, Harjati y Setiadi, 2012, pp. 93–105).

Con la finalidad de facilitar la producción y extracción de la enzima lacasa, se han realizado ensayos basados en fermentación en estado sólido (SSF, por sus siglas en inglés), empleando diferentes compuestos biodegradables como sustratos: cáscaras de arroz, salvado de trigo y residuos alimenticios (Karp et

al., 2015, pp. 1-8). Adicionalmente, se han evaluado el uso de soportes sintéticos como son las esponjas de poliuretano (PUF) (Téllez, Fernández, Montiel, Sánchez y Díaz, 2008, pp. 675–679). De igual forma, se han evaluado parámetros que influyen en el proceso de secreción de la enzima lacasa. En el caso antes mencionado del hongo *Marasmius* sp., mediante una superficie de respuesta se evaluó pH, temperatura y extracto de levadura; llegando a optimizar dichos parámetros a 4.9, 31°C y 0.36 g/L, respectivamente (Risdianto et al., 2012, pp. 93–105).

Por otro lado, la secreción y síntesis lacasas se han visto influenciadas no solo por el medio de cultivo, sino también por el uso de diferentes inductores que se añaden al mismo. Por ejemplo, se ha evaluado la influencia de compuestos aromáticos como el alcohol veratrílico, 2,5-xilidina, compuestos xenobióticos, compuestos fenólicos, celobiosa, lignina y etanol; dichos inductores han mejorado la producción de las enzimas lacasas y han incrementado su potencial de biosíntesis (Shraddha, Shekher, Sehgal, Kamthania y Kumar, 2011, pp. 1-11; Tinoco, Acevedo, Galindo y Serrano-Calderón, 2011, pp. 531–540). Otros inductores que han sido evaluados con un efecto positivo sobre la síntesis de lacasas, son los iones metálicos: cadmio, plata, cobre y magnesio (Viswanath, Rajesh, Janardhan, Kumar, Narasimha, Viswanath, Narasimha, 2014, pp. 1-21).

En cuanto a ensayos de inmovilización enzimática de lacasa, se han evaluado métodos físicos y químicos de atrapamiento, encapsulación, absorción, unión covalente y la auto inmovilización con agentes de entrecruzamiento, en donde se han empleado diferentes microorganismos y soportes (Fernández, Sanromán y Moldes, 2013, pp. 1808–1825; Sheldon y Pelt, 2013, pp. 6223–6235). De igual forma, ensayos de inmovilización de enzimas lignocelulíticas, entre las cuales se incluyen las enzimas lacasas, en nanopartículas magnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , han permitido mantener o incrementar el valor de la actividad enzimática y su estabilidad, estas enzimas han sido empleadas para la producción de compuestos de alto valor como es el etanol (Sánchez, Martínez, Segura, Contreras, Medina, Aguilar e Iliná, 2014, pp. 504–512).

## 1.2 Formulación del problema

En hongos basidiomicetes, las lacasas son secretadas de forma constitutiva, es decir que no se requiere de una modificación de su genoma o medio de cultivo para estimular su síntesis o excreción, pero esta es realizada en pequeñas cantidades; esto representa un gran inconveniente para la aplicación industrial, en donde se requieren grandes cantidades de enzima y cuyo costo de producción no sea elevado (Niladevi, Sukumaran, Jacob, Anisha y Prema, 2009, pp. 105–113). El empleo de las enzimas oxido-reductasas se ha visto afectado por los altos costos en el proceso de producción y purificación, pérdida de la enzima soluble durante el proceso de reacción (Sheldon y Pelt, 2013, pp. 6223–6235), baja eficiencia de biocatálisis, baja productividad enzimática (Tinoco et al., 2011, pp. 531–540) y sensibilidad frente a cambios en las condiciones de operación de la reacción han impedido su reutilización.

Otro obstáculo eminente en el uso de lacasas a nivel industrial es que la enzima en forma soluble es muy susceptible a sales, solventes orgánicos, pH extremos, elevadas temperaturas y la presencia de otras enzimas proteolíticas. Estas condiciones generan daños conformacionales en la enzima que terminan afectando su estructura terciaria, con una consecuente pérdida de la actividad y baja eficiencia catalítica (Ba, Arsenault, Hassani, Jones y Cabana, 2013, pp. 404–418).

Desde el descubrimiento de la estructura del benceno en 1865, la producción de colorantes sintéticos y compuestos nocivos (recalcitrantes, hidrocarburos policíclicos aromáticos, plaguicidas clorados y organofosforados) se vio fuertemente estimulada; desde entonces más de 100000 colorantes han sido sintetizados en el mundo y la liberación de los efluentes generados en los sistemas acuáticos han resultado en impactos ambientales y para la salud humana. Según investigaciones más de un 90% de los 4000 colorantes investigados por la ETAD (Ecological and Toxicological Association of the Dyestuffs Manufacturing Industry) presentaron elevadas tasas de toxicidad (Robinson, McMullan, Marchant y Nigam, 2001, pp. 247–255).

En el caso de los hidrocarburos poliaromáticos (HPAs), la contaminación es dada por el uso excesivo de combustibles fósiles y su han concluido que la forma de remediar la contaminación por formación de aminas aromáticas es emplear un método físico-químico oxidativo, y un sistema mediado por la enzima lacasa ofrece una alternativa interesante, debido a su baja especificidad de sustrato que le permite actuar sobre colorantes de diversa estructura (Moya, 2011).

### 1.3 Justificación

La creciente demanda de la enzima lacasa, hace necesaria la búsqueda de un proceso de producción económico y eficiente. La evaluación de materias primas de bajo costo, así como el uso de inductores en el medio de cultivo, son una solución prometedora para obtener una enzima con buenas características cinéticas (Niladevi y Prema, 2008, pp. 4583–4589). La capacidad de las lacasas de oxidar sustratos fenólicos y no fenólicos, las hacen muy atractivos para aplicaciones industriales, lo cual ha llevado a las lacasas a posicionarse en un eje central de investigación dentro de la biotecnología industrial y ambiental, impulsando estudios dirigidos hacia el afinamiento de su producción, purificación y reutilización (Ravindra et al., 2012, pp. 1–13).

La producción de enzima lacasa se ha reportado en varias especies de hongos, destacándose los basidiomicetes de pudrición blanca tales como: *Agaricus bisporus*, *Coprinus cinereus*, *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Fomes fomentarius*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Coriolopsis gallica* (Ravindra et al., 2012, pp. 1–13), siendo el *Pleurotus ostreatus*, uno de los principales secretores de esta enzima (Desai et al., 2011, pp. 543–549). El cultivo de este hongo es rápido y sencillo, además que esta especie tiene importantes propiedades medicinales y nutricionales, y no presenta ningún riesgo para el ser humano, debido a que no es patogénico y es considerado como una fuente invaluable de oxidasas (Pezzella et al., 2013, pp. 705–717).

Entre los metales empleados como inductores para estimular la secreción de la enzima lacasa, se destaca el ion cobre, el cual se caracteriza por ser un fuerte

inductor en distintas especies fúngicas (Tinoco et al., 2011, pp. 531–540). Se ha demostrado que el ion cobre tiene un fuerte efecto modulador a nivel transcripcional y post transcripcional sobre los genes codificantes de las lacasas (Pezzella et al., 2013, pp. 705–717). Palmieri y colaboradores (2003) demostraron que concentraciones alrededor de 150  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre resultan en un aumento sustancial de la actividad lacasa; sin embargo, a mayores concentraciones, el cobre resulta tóxico para la célula del organismo, inhibiendo su crecimiento y afectando la secreción constitutiva de la enzima (Palmieri, Cennamo, Faraco, Amoresano, Sannia y Giardina, 2003, pp. 220–230; Viswanath et al., 2014, pp. 1–21). Esto hace necesario un estudio en el que se evalúe la concentración idónea del ion  $\text{Cu}^{+2}$  que permita estimular la secreción de la enzima lacasa, sin que se presente el efecto adverso (inhibición).

Otro factor importante para la producción de la enzima es el tipo de fermentación empleada. La fermentación en estado sólido (SSF), presenta ventajas frente a la fermentación en estado líquido (SmF), como: mayor producción enzimática, reducción en la generación de aguas residuales, uso de sustratos ligninocelulósicos (que pueden ser residuos agroindustriales) y el requerimiento de necesidades energéticas y equipos de laboratorio es menor, debido a que no se requiere de agitación (Niladevi y Prema, 2008, pp. 4583–4589; Niladevi et al., 2009, pp. 105–113). Adicionalmente, la SSF empleando esponjas de poliuretano (PUF) como matriz de soporte en la cual crece el *Pleurotus ostreatus*, facilita la recuperación del extracto enzimático, por lo que no es necesario un proceso de tamización.

Estudios anteriores han demostrado que un método eficiente en el mejoramiento del rendimiento de enzimas en ambientes no naturales es la inmovilización de las mismas. Así, la inmovilización enzimática garantiza la resistencia a la desnaturalización por disolventes orgánicos, altas temperaturas y proteólisis durante el empleo de la enzima y su almacenamiento. Así mismo, posibilita una sencilla separación del biocatalizador del producto, permitiendo la fácil recuperación o retención de la enzima. Esto implica la rentabilidad del

proceso, puesto que el proceso se vuelve continuo y se abaratan costos (Sheldon y Pelt, 2013, pp. 6223–6235).

Por otra parte, la enzima en forma soluble es susceptible a condiciones ambientales que limitan su función catalítica. La inmovilización física por medio de la encapsulación de la enzima en geles de alginato es una herramienta adecuada para resolver este inconveniente (Lu, Zhao y Wang, 2007, pp. 159–166). Este tipo de inmovilización incrementa la estabilidad enzimática a distintos rangos de pH y temperatura, además brinda protección a la enzima frente a factores ambientales como: solventes orgánicos, oxígeno, proteasas, agentes quelantes e inhibidores; sin mencionar que el alginato no es tóxico, resulta económico y es una matriz muy utilizada en protocolos de inmovilización gracias a su versatilidad. Además, con esta metodología se garantiza la capacidad de recuperación y reutilización del extracto proteico inmovilizado en los distintos procesos ya sea aplicados en el área industrial o de biorremediación (Ba et al., 2013, pp. 404–418).

Es por esto que el presente proyecto tiene como objetivo incrementar la producción de enzimas oxidorreductasas tipo lacasa que se presenta en forma constitutiva en el microorganismo *Pleurotus ostreatus* para su posterior inmovilización enzimática con alginato de calcio. Esto con la visión de que la enzima lacasa inmovilizada sea aplicada en futuro en procesos industriales o de biorremediación en el Ecuador, con una posible sustitución de procesos químicos de biorremediación, por procesos naturales (principio básico de la biotecnología).

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo General**

Optimizar un medio de cultivo que promueva la producción de enzimas oxidorreductasas de tipo lacasa de *Pleurotus ostreatus* para su posterior inmovilización física con alginato de calcio.

### 1.4.2 Objetivos específicos

- Evaluar tres sustratos como fuente de carbono, para la producción de la enzima lacasa, empleando como variable de respuesta la actividad enzimática.
- Evaluar la concentración de cobre y del sustrato para la producción de la enzima lacasa en fermentación en estado sólido, empleando ensayos de superficie de respuesta de la actividad enzimática.
- Implementar un proceso de inmovilización mediante el uso de esferas de alginato de calcio.
- Comparar los parámetros cinéticos, así como la dependencia al pH y temperatura del extracto proteico soluble e inmovilizado.

## CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Descripción de la especie *Pleurotus ostreatus*.

*Pleurotus ostreatus*, hongo comestible basidiomiceto, es el segundo mayor cultivado alrededor del mundo por sus propiedades nutricionales (Guadarrama, Valencia del Toro, Ramírez, Robles, Yáñez, Garín y Bravo, 2014, pp. 861–872). Los hongos comestibles de pudrición blanca, como el *P. ostreatus*, deben su nombre a la capacidad de degradar lignina y dejar la celulosa de color blanco; Además, son empleados en el área ambiental por su capacidad de degradar compuestos contaminantes, como son los hidrocarburos policíclicos aromáticos (Rhodes, 2014, pp. 196–198). Se los encuentra distribuidos alrededor del mundo, recubriendo superficies de árboles muertos y vivos, en especial de maderas duras como el pino (Sánchez, 2009, pp. 185–194).

#### 2.1.1 Morfología y cultivo de *Pleurotus ostreatus*.

El hongo *P. ostreatus*, conocido además como hongo ostra o Gírgola, presenta características morfológicas cambiantes con el paso de un cuerpo fructífero joven a uno adulto. Se lo reconoce morfológicamente en su estadio joven por su sombrero en forma de abanico convexo, el mismo que va aplanándose con el paso del tiempo (Morales, 2008). Su diámetro oscila entre los 5 y 15 cm, presentando un color variable en una gama que va desde gris claro hasta pardo, tomando colores amarillentos cuando el cuerpo fructífero culmina su desarrollo (Deepalakshmi y Mirunalini, 2014, pp. 718–726)

En la parte interior del sombrero se aprecia laminillas de color crema, dispuestas radialmente que se extienden desde el tallo hasta el borde del mismo, y reciben el nombre de hifas; entre ellas se producen las esporas que determinarán la reproducción de la especie. El pie por lo general es corto, oblicuo, duro y de color blanco. Se lo distingue por su olor característico a anís, debido a la presencia de benzaldehído (Morales, 2008; Deepalakshmi y Mirunalini, 2014, pp. 718–726).

El microorganismo *P.ostreatus* puede ser cultivado para propósitos de consumo o para la investigación. Para el consumo, el hongo es cultivado en un sustrato leñoso-celulósico húmedo y pasteurizado, que posteriormente es incubado de 25°C a 30°C durante un periodo aproximado de 15 días, para finalmente ser colocado a 15°C, temperatura a la cual el cuerpo fructífero se desarrollará y cosechará a las 3 semanas (figura 1-a) (Sánchez, 2009, pp. 185–194). Para investigación el hongo se inocula en medio agar papa dextrosa (PDA) a 30°C, donde iniciara su crecimiento radial (figura 1-b); la manipulación en laboratorio es realizada bajo condiciones de esterilidad, con la finalidad de garantizar su pureza (Vamanu, 2012, pp. 1-8).



### 2.1.2 Importancia del hongo *Pleurotus ostreatus*.

Debido a la gran producción de desechos lignocelulósicos a base de celulosa, hemicelulosa y lignina (20.3 x 10<sup>3</sup> kg de lignina/año), el reciclaje que realizan los hongos de pudrición blanca juega un papel fundamental en el ciclo del carbono (Rhodes, 2014, pp. 196–198). Por otra parte *P. ostreatus* exige un bajo control ambiental y su cuerpo fructífero no es atacado constantemente por enfermedades o plagas (Sánchez, 2009, pp. 185–194).

A más de su uso para propósitos de consumo, gracias a su sencillo, basto y económico proceso de producción, el hongo *P. ostreatus* puede ser aplicado en el tratamiento de áreas contaminadas con moléculas similares a la lignina,

compuestos orgánicos halogenados e hidrocarburos aromáticos policíclicos, esto gracias a las enzimas extracelulares que posee: lacasa, lignino peroxidasa y peroxidasa dependiente del manganeso; haciendo de este hongo, un organismo que no requiere de un sustrato específico (Adenipekun y Lawal, 2012, pp. 62–68).

Además, *P. ostreatus* puede acumular metales pesados en su pared celular, gracias a la capacidad adsorbente de los polisacáridos que la conforman (Morales, 2008). El *P. ostreatus* ha sido empleado en el área ambiental en: degradación de lindano, un insecticida sintético organoclorado que actualmente su uso se encuentra restringido debido a su toxicidad y persistencia en el medio ambiente; biorremediación de suelos contaminados con DDT (dicloro difenil tricloroetano), un compuesto orgánico clorado usado como insecticida que afecta a animales que encabezan la cadena alimenticia (Purnomo, Mori, Putra, y Kondo, 2013, pp. 40–44); decoloración de colorantes y tintes químicos (Rodríguez y Toca, 2006, pp. 500–513); entre otros.

## **2.2 Lacasas**

### **2.2.1 Generalidades de la enzima lacasa.**

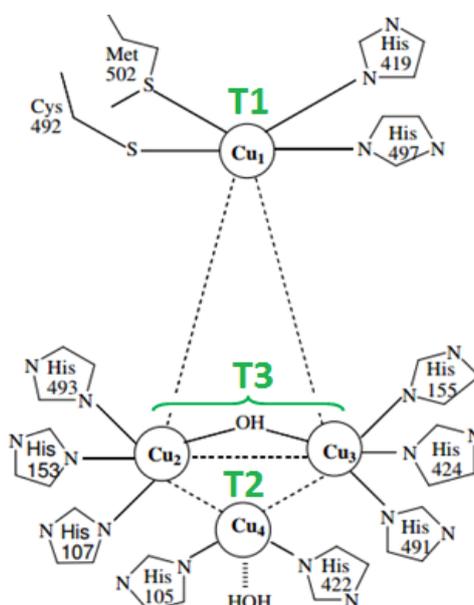
Las enzimas lacasas pertenecen al grupo de las oxidasas multicobre (EC 1.10.3.2), glicoproteínas generalmente extracelulares que pueden estar unidas a hidratos de carbono como la manosa, fucosa, hexoamina, galactosa, glucosa (Ravindra et al., 2012, pp. 1–13). Se caracterizan por poseer una baja especificidad de sustrato, lo que hace posible la oxidación de polifenoles, fenoles, diaminas aromáticas, entre otros compuestos aromáticos y estructuras no fenólicas; razón por la cual se aplican a varias áreas, especialmente en el área ambiental para la degradación de ambientes contaminados con estos compuestos (Desai et al., 2011, pp. 543–549).

Las enzimas lacasas se las encuentran generalmente en hongos, plantas e insectos; en el primer caso se ha reportado la presencia de lacasas en diferentes especies de Ascomicetes, Deuteromicetes o Basidiomicetes, donde intervienen en la modificación de la lignina, interacción hongo/hospedero,

mecanismos de estrés y morfogénesis (Ramesh y Ajay, 2007, p. 79); en el segundo caso las lacasas están involucradas en procesos de síntesis tales como la formación de la lignina y en el tercer caso se ha visto que las lacasas están implicadas en la esclerotización de la cutícula, proceso que consiste en el endurecimiento de la pared del cuerpo de los insectos que conforman el exoesqueleto (Ravindra et al., 2012, pp. 1–13).

### 2.2.2 Estructura de las lacasas.

Ensayos previos de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico SDS-PAGE han reflejado que la enzima lacasa tiene un peso molecular entre 50 a 100 KDa, de los cuales del 10 al 50% pueden ser atribuidos a la glicosilación, misma que es responsable de la retención de cobre, secreción, susceptibilidad proteolítica y estabilidad termal; estas a su vez dan paso diferentes reacciones celulares, como son la inmunidad, morfogénesis de los organismos y patogenicidad. La retención de cobre es importante para llevar a cabo reacciones de transferencia de electrones, esto debido a que los átomos de cobre son capaces de cambiar sus estados de oxidación entre  $\text{Cu}^{1+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  (Ravindra et al., 2012, pp. 1–13).



*Figura 2.* Sitios de cobre de la lacasa

Adaptado de Claus, 2004, pp. 93–96.

La lacasa contiene cuatro átomos de cobre distribuidos en tres sitios redox: tipo 1 o T1, tipo 2 o T2 y tipo 3 o T3 (figura 2), los cuales pueden ser distinguidos usando radiación UV visible o resonancia paramagnética electrónica (EPR). El sitio T1, que debe su color azul a la interacción covalente cobre-cisteína, es detectable a una absorbancia aproximada de 610 nm y además es detectable por EPR; debido a su alto potencial redox, este es el lugar en donde se efectúa la oxidación del sustrato, el ligando axial es metionina en bacterias y leucina o fenilalanina en lacasas fúngicas. El cobre tipo 2 no muestra detección en un espectro visible pero es detectable por EPR (Claus, 2004, pp. 93–96).

El sitio T3 se conforma de una pareja de iones cobre conectados por un puente hidróxido, este sitio es detectable a una absorbancia aproximada de 330 nm, pero no es detectable por EPR. Adicionalmente, los sitios de cobre T2 y T3 forman un centro trinuclear, que está involucrado en el mecanismo de catálisis de la enzima. A más de los tres sitios de cobre, la enzima lacasa se conforma de diez histidinas y una cisteína (Garzillo, Colao, Buonocore, Oliva, Falcigno, Saviano y Sannia, 2001, pp. 191–201).

### **2.2.3 Propiedades catalíticas de la enzima lacasa.**

La actividad catalítica de la lacasa hace referencia a la reducción de un sustrato, que generalmente es un compuesto aromático, acompañada de la reducción de oxígeno molecular a agua. El oxígeno molecular cumple el rol de aceptor final de electrones y este es reducido a dos moléculas de agua (ecuación 1). Por otra parte, la oxidación de grupos hidroxilo a radicales fenoxi está determinada por una reacción mediada por la enzima lacasa, donde el oxígeno remueve protones de grupos hidroxilo presentes en compuestos fenólicos dando origen usualmente a radicales libres (ecuación 2) (Ravindra et al, 2012, pp. 1–13).





Asp206 es conservada en una gran cantidad de lacasas fúngicas de hongos Basidiomicetes. Igualmente, se sabe que independiente de la actividad de la lacasa, Asp206 cumple un papel importante en la determinación de pH durante la oxidación del sustrato. Por ejemplo, si el pH incrementa de 3 a 5, los valores de Km para sustratos de origen fenólico decrecen, esto podría ser debido a la desprotonación de la cadena lateral del Asp206 (Bertrand et al, 2002, pp. 7325–7333).

En cuanto a los parámetros funcionales de la enzima lacasa, en la tabla 1 se resumen los principales ensayos realizados, el microorganismo y sustrato correspondiente:

Tabla 1. Propiedades bioquímicas y físicas de la enzima lacasa

Especie	Sustrato	Peso (kDa)	(pI)	Km ( $\mu$ m)	pH	Temp (°C)
<i>Coprinus cinereus</i>	ABTS	58	4,0	26	4	60-70
<i>Lentinula edodes Lcc1</i>	ABTS	72	3,0	108	4	40
<i>Marasmius quercophilus</i>	ABTS	65		8	2,6	80
<i>Melanocarpus albomyces</i>	ABTS	80	4		3,5	65
<i>Pleurotus ostreatus POXA 3b</i>	ABTS	83-85	4,3	74	3,6	35
<i>Trametes gallica Lac 1</i>	ABTS	60	3,1	12	2,2	70
<i>Volvariella volvacea</i>	ABTS	58	3,7	30	3	45
<i>Bortrytis cinerea</i>	DMP	74	4	100	3,5	57
<i>Coniothyrium minitans</i>	DMP	74	4	100	3,5	60
<i>Trametes gallica Lac II</i>	DMP	60	3	410	3	70
<i>Pleurotus ostreatus POXA 3<sup>a</sup></i>	DMP	83-85	4,1	14000	5,5	35
<i>Pleurotus ostreatus POXA2</i>	DMP	67	4	740	6,5	25-35
<i>Cerrena máxima</i>	Guayacol	57-67	3,5	160-300		50
<i>Pleurotus ostreatus POXC</i>	Guayacol	59	2,9	1200	6	50-60
<i>Thelephora terrestris</i>	Guayacol	66		121	4,8	45
<i>Daedalea quercina</i>	Siringaldazina	69	3	131	7	55
<i>Magnaporthe grisea</i>	Siringaldazina	70		118	6	30
<i>Marasmius quercophilus</i>	Siringaldazina	60		4,2	4,4	80
<i>Pleurotus ostreatus POXA1w</i>	Siringaldazina	61	6,7	130	6	15-65

Adaptado de Ravindra et al, 2012, p. 8.

Nota: ABTS (ácido 2.2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), DMP (2,6-dimetiloxifenol), Km constante de Michaelis-Mentend, guayacol y siringaldazina, compuestos de origen fenólico usados como sustrato de enzimas peroxidadas y oxidasas multicobre.

#### 2.2.4 Aplicaciones Industriales de la enzima lacasa.

Recientes estudios sobre microorganismos ligninocelulíticos y las enzimas que producen han demostrado tener un potencial en alimentación animal, biorremediación, biotransformación, estabilización de comida o bebidas, manufactura de papel, producción de químicos, entre otras (Moya, 2011). Debido a la alta capacidad de oxidación no específica, las lacasas son biocatalizadores útiles en diversas aplicaciones biotecnológicas, como:

**Industria textil:** los colorantes textiles tipo azo, mismos que tiñen las telas de rojo, amarillo y naranja, son empleados en grandes cantidades para lograr que las telas alcancen el color deseado. Un sistema oxidativo mediado por enzimas lacasas puede ser usado, con la finalidad de obtener, degradar y disminuir las concentraciones de colorantes que son desechados en aguas residuales anualmente (Moya, 2011). Estudios realizados con enzimas oxido reductivas provenientes del hongo *P. ostreatus* demostraron poseer la capacidad de degradar los colorantes azo hasta un 50% en un plazo de 5 días (Zhao y Hardin, 2007, pp. 322–325).

**Biorremediación:** debido a su baja especificidad de sustrato, las enzimas lacasas pueden ser empleadas para tratar efluentes en ecosistemas acuáticos y terrestres provenientes de la industria textil, papelera y alimentaria (Adenipekun y Lawal, 2012, pp. 62–68). Por otro lado, las enzimas lacasas pueden degradar compuestos xenobióticos como: hidrocarburos aromáticos policíclicos, clorofenoles, residuos plásticos, medicamentos como el naproxeno, entre otros (Urrea, Pérez, Cruz, Caminal y Vicent, 2010, pp. 474–481).

**Industria papelera:** el objetivo en el proceso de fabricación de papel es la separación de las fibras de celulosa del resto de la matriz ligninocelulósica, este proceso es conocido como pasteo. Posteriormente a este proceso, se requiere de un blanqueamiento del papel para lo cual se ha empleado hipoclorito o cloro elemental, dando formación a cloroligninas (compuesto altamente tóxico). Una alternativa ambiental para sustituir este proceso es el bioblanqueo, en el cual se emplea la lacasa a través de un sistema enzima-

mediador, con la finalidad de reducir el número kappa (indicativo de la cantidad de lignina) (Madhavi y Lee, 2009, pp. 1694–1717; Moya, 2011). Adicionalmente, las enzimas lacasas son usadas en la industria papelera para la desintoxicación de efluentes (Rodríguez y Toca, 2006, pp. 500–513).

**Industria alimentaria:** en muchos de los alimentos que consumimos a diario se encuentran compuestos como carbohidratos, ácidos grasos insaturados, polifenoles y proteínas con grupos tioles; la modificación (color) de estos por enzimas lacasas como aditivos, permiten que dichos alimentos mejoren en calidad y por lo tanto incrementen su costo (Madhavi y Lele, 2009, pp. 1694–1717). Por otra parte, se ha reportado la posibilidad del uso de lacasas para la formación de geles a partir de pectinas, pudiendo así sustituir a las peroxidases debido a que en muchos países existen normas alimentarias en las que se prohíbe su uso en alimentos (Rodríguez y Toca, 2006, pp. 500–513).

Dentro del sector de bebidas la lacasa es empleada para la estabilización de vinos o cerveza, así también para mejorar las propiedades organolépticas, evitar la turbidez, eliminación del oxígeno residual al final del proceso de producción e intensificación de aroma y sabor. En la industria del pan, la lacasa es empleada para mejorar las propiedades de la masa y del producto horneado, mediante la formación de biopolímeros de ácido ferúlico y arabinosilano (Madhavi y Lele, 2009, pp. 1694–1717).

**Varios:** en cuanto a la nanotecnología las lacasas están siendo utilizadas en el desarrollo de biosensores, las cuales constan de sondas que contienen un compuesto biológico que por medio de un transductor electrónico es capaz de convertir una señal bioquímica en una respuesta eléctrica cuantificable. Los biosensores basados en lacasa detectan compuestos fenólicos, xenobióticos (herbicidas), morfina, flavonoides o catecolaminas (Kunamneni, Plou, Ballesteros y Alcalde, 2008, pp. 10–24). Por otra parte, el uso de células de biocombustible (lacasas inmovilizadas que proporcionan energía a sistemas de transmisión pequeños) es conocido por producir energía limpia (Moya, 2001). En la industria de cosméticos, las lacasas son usadas para la fabricación de tintes de cabello, gracias a su capacidad de oxidar fenoles y anilinas, y para la

fabricación de cremas aclaradoras de piel (Rodríguez y Toca, 2006, pp. 500–513; Madhavi y Lele, 2009, pp. 1694–1717).

### **2.3 Producción de la enzima lacasa en el reino fungi.**

El reino fungi produce un amplio número de enzimas que pueden ser diferenciadas por sus propiedades catalíticas, mecanismos de regulación y localización tanto del lugar de síntesis así como de secreción (Ravindra et al, 2012, pp. 1–13). La síntesis y secreción de enzimas a su vez se ven influenciadas por la concentración de nutrientes, fase de crecimiento y la adición de inductores al medio de cultivo; adicionalmente, estos factores están relacionados con la expresión de proteínas a nivel transcripcional (Piscitelli, Giardina, Lettera, Pezzella, Sannia y Faraco, 2011, pp. 104–112).

#### **2.3.1 Características y propiedades del medio de cultivo.**

El empleo de diferentes fuentes de sustratos de origen orgánico, al igual que el uso de diferentes inductores metálicos, han sido ampliamente estudiados en la producción y optimización de la enzima lacasa (Ravindra et al., 2012, pp. 1–13; Rhodes, 2014, pp. 196–198).

##### **2.3.2.1 Tipos de sustratos.**

Residuos orgánicos o materia orgánica sin procesar pueden ser empleados como sustratos para hongos descomponedores de pudrición blanca, debido a que poseen enzimas lignocelulíticas (Poppe, 2014, pp. 75-85). Celulosa, hemicelulosa y lignina son las principales fuentes de carbono empleadas en el cultivo de hongos lignocelulíticos. El sustrato empleado dependerá del tipo de hongo que se vaya a cultivar, así como de las demandas nutricionales del mismo. Por ejemplo: el hongo botón o *Agaricus bisporus* requiere de concentraciones elevadas de nitrógeno, mientras que el hongo ostra o *Pleurotus ostreatus* requiere concentraciones bajas de nitrógeno, pero altas de carbono (Poppe, 2014, pp.75-85; Rhodes, 2014, pp. 196–198).

Los hongos producen enzimas extracelulares e intracelulares en presencia de un determinado sustrato para facilitar la asimilación de nutrientes. Para el cultivo de *P. ostreatus* se han reportado aproximadamente 90 tipos de sustratos empleados como fuente de carbono entre los más destacados se encuentran: residuos de caña, cascarilla de arroz, cáscara de trigo, algodón, residuos de maíz, cáscara de plátano, entre otras (Barshteyn y Krupodorova, 2016, pp. 563–577). La concentración de material ligninocelulítico en el medio de cultivo puede ir en rangos entre 1 a 200 g/L, dependiendo de la cepa de hongo empleada, condiciones de cultivo y la escala de producción seleccionada (Kües y Rühl, 2011, pp. 72–94).

### **2.3.2.2 Inductores e inhibidores enzimáticos**

La producción de las enzimas no solo se ve influenciada por el tipo de medio de cultivo, en ella también participan diferentes compuestos que según estudios se ha comprobado que inducen la producción de enzimas específicas, degradando un determinado sustrato. Los inductores empleados en medios de cultivo de hongos por lo general suelen ser sales inorgánicas no solubles, pero también existen compuestos solubles (Kües y Rühl, 2011, pp. 72–94).

Existe un número amplio de micronutrientes que pueden ser añadidas al medio de cultivo, por ejemplo: potasio, magnesio, fosfatos, sulfatos e incluso clorhidratos; que pueden ir en rangos entre 0.05 y 1 g/L (Ravindra et al, 2012, pp. 1–13). Entre los inductores de la enzima lacasa se encuentra principalmente el cobre y compuestos aromáticos como el 2,4,6-trinitrotolueno, 2,6-dimetilfenol, ácido feruláico, hidroquinona, canelina, ácido vinílico and xiloidina (Kües y Rühl, 2011, pp. 72–94). En el caso del cobre, al ser un modulador transcripcional y post-transcripcional de los genes involucrados en la síntesis y secreción de la enzima lacasa, considerando que a concentraciones mayores a los 150  $\mu\text{M}$ , puede llevar a una inhibición de la secreción, dada por la toxicidad del mismo que causa al microorganismo secretor (Pezzella et al., 2013, pp. 705–717; Viswanath et al., 2014, pp. 1-21).

Así como existen sustancias que inducen la producción de enzimas, existen otras que cumplen la función contraria y son conocidas como inhibidoras. En el caso de la enzima lacasa se emplea inhibidores metálicos o compuestos orgánicos de origen sulfúrico (Ravindra et al, 2012, pp. 1–13).

### **2.3.2 Generalidades de la fermentación de lacasas.**

En el área industrial existen dos tipos de fermentaciones, la que se producen en presencia de aire (oxígeno) recibe el nombre de fermentación aerobia y la que ocurre en ausencia de oxígeno recibe el nombre de fermentación anaerobia. De igual forma, existen dos tipos de fermentación aerobia: en medio sólido recibe el nombre de fermentación en estado sólido (SSM); en medio líquido, ya sea que el oxígeno se encuentre disuelto en el medio o suministrado a través de aireación, recibe el nombre de fermentación en estado líquido o sumergida (SmF) (Rao, 2010, p. 103).

#### **2.3.2.1 Fermentación en estado sólido.**

La fermentación en estado sólido o también conocida como SSF por sus siglas en inglés, se caracteriza por ser un método en el cual los microorganismos crecen en condiciones limitadas de humedad y tienen acceso a oxígeno gracias al proceso de difusión que se realiza con la atmósfera. En este tipo de fermentación se pretende simular las condiciones naturales en las que un microorganismo se desarrolla y produce metabolitos (Rao, 2010, p. 104).

Bacterias, hongos y levaduras pueden crecer en sustratos sólidos. Sin embargo, los hongos filamentosos se caracterizan por adaptarse de forma más eficiente a las demandas de la SSF debido a su fisiología, maquinaria enzimática, propiedades bioquímicas, tipo de hifa característica en hongos filamentosos, alta tolerancia ante valores de presión osmótica elevadas y baja presencia de agua; haciendo de los hongos filamentosos, microorganismos eficientes y competitivos comparados con microorganismos unicelulares (Mienda, Idi y Umar, 2011, pp. 21–26).

En la SSF, la superficie sólida se encuentra en contacto directo con el aire, razón por la cual el costo de producción de metabolitos o materia viva es bajo. Entre las principales ventajas de este tipo de fermentación se destacan las siguientes (Rao, 2010, p. 103):

- Bajo requerimiento de energía y costo a nivel industrial, debido a que no se emplea agitación mecánica ni aireación en la mayoría de casos.
- Bajos requerimientos de humedad, lo que posibilita la producción de compuestos que no podrían ser producidos mediante fermentación en estado líquido (Mienda et al., 2011, pp. 21–26)
- No existe la formación de espuma.

### **2.3.2.2 Fermentación sumergida**

La fermentación sumergida o conocida como SmF debido a sus siglas en inglés, se caracteriza por que tanto el microorganismo como el sustrato se encuentran sumergidos en un medio líquido, donde existe la presencia de grandes cantidades del solvente (agua). Una mayor eficiencia en la transferencia de masa y calor es la característica principal que diferencia la SmF de la SSF (Rao, 2010, p. 104). Por otra parte, en la SmF los microorganismos y el sustrato son sometidos a una agitación constante, en donde el oxígeno es suministrado mediante un sistema de burbujas (Mienda et al., 2011, pp. 21–26).

### **2.4 Inmovilización enzimática**

La terminología de "inmovilización enzimática" hace referencia a enzimas físicamente localizadas en un espacio que retiene las propiedades catalíticas de las mismas, permite el flujo de sustratos y productos y le proporciona una eficacia funcional a la enzima, las cuales pueden ser usadas más de una vez y en procesos continuos (Sánchez et al, 2014, pp. 504–512). La inmovilización enzimática y sus aplicaciones han progresado desde 1815, fecha en la que se realizaron los primeros ensayos empíricos en procesos como el tratamiento de aguas residuales (Brena y Batista, 2006, pp. 18-19).

La inmovilización enzimática tiene como objetivo potenciar el uso de enzimas que presentan una maquinaria versátil mediante su re-uso de la misma. Considerando que las enzimas presentan características como: baja estabilidad, baja actividad e inhibición por altas concentraciones de sustrato, producto o compuestos presentes en el medio de reacción, la inmovilización enzimática ha cumplido un papel importante en la potenciación del uso de enzimas en las diferentes áreas (Guisan, 2006, pp. 1-2).

Las consideraciones que intervienen en el proceso de inmovilización son: enzima, matriz o soporte y el tipo de unión a la matriz. El tipo de soporte determina el rendimiento de sistema enzimático inmovilizado. Entre las características de los soportes ideales se encuentra la resistencia física a la compresión, hidrofobicidad, biocompatibilidad, resistencia al ataque microbiano y los bajos costos (Sánchez et al, 2014, pp. 504–512). Considerando la composición química, los soportes pueden ser divididos en inorgánicos y orgánicos; a su vez, los soportes orgánicos están subdivididos en polímeros naturales y sintéticos (tabla 2) (Brena y Batista, 2006, pp. 18-19).

Tabla 2. Clasificación de los soportes usados para inmovilización de acuerdo a su composición química

<b>Clasificación de soportes</b>	
<b>Orgánicos</b>	
<b>Polímeros de origen natural</b>	
Polisacáridos	alginato, almidón, celulosa, dextranos, agar, agarosa, quitina, chitosan, etc.
Proteínas	colágeno, albúmina, queratina, etc.
Carbón	
<b>Polímeros de origen sintético</b>	
Poliestireno	
Otros polímeros	poliacrilamida, polimetacrilato de poliacrilato, poliamidas, vinil y alil-polímeros, etc.
<b>Inorgánicos</b>	
Minerales naturales	Bentonita, sílice, arcilla, piedra pómez, etc.
Materiales procesados	Alúmina, cerámica, vidrio de tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, metales, óxidos de metales, etc.

Adaptado de Guisan, 2006, pp. 1-2.

A pesar de las ventajas que proporciona la inmovilización, algunos inconvenientes pueden presentarse durante y al final del proceso, como: alteración de la conformación de la enzima, pérdida de la actividad enzimática y variabilidad en el número de proteínas unidas al soporte (Sánchez et al, 2014, pp. 504–512). El estudio, uso y aplicación de la inmovilización enzimática ha ido aumentando con el paso de los años, con la finalidad de obtener catalizadores metabólicos eficientes, rápidos, de bajo coste y en especial amigables con el medio ambiente. Considerando el tipo de unión entre la enzima y el soporte la inmovilización puede ser física ó química (tabla 3, gráfico explicativo anexo 1).

Tabla 3. Inmovilización enzimática según el tipo de unión entre enzima-soporte

Método	Fundamento	Reversible/ Irreversible	Ventaja	Desventaja
<b>Inmovilización física</b>				
<b>Atrapamiento</b>	Retención en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa.	Irreversible	La enzima no sufre alteraciones químicas. Proporciona mayor estabilidad	La enzima puede desprenderse del soporte.
<b>Encapsulación</b>	Cubierta de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no de enzima.	Irreversible	Se puede encapsular simultáneamente una gran variedad de enzimas.	Rotura de las cápsulas.
<b>Inmovilización química</b>				
<b>Unión covalente</b>	Activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las enzimas.	Irreversible	La unión enzima-soporte es muy fuerte. Proporciona mayor estabilidad.	Pérdida de la actividad enzimática. Requiere la protección del centro activo de la enzima para evitar su alteración.
<b>Adsorción iónica</b>	Unión mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y por puentes de hidrógeno.	Reversible	Retención de actividad enzimática. Preparación sencilla.	La unión enzima-soporte es muy débil, se forman derivados poco estables.
<b>Reticulado o entrecruzamiento</b>	Reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de enzima.	Irreversible	Gran estabilidad de la enzima debido a la rigidez de la estructura.	Pérdida de la actividad enzimática.

Adaptado de Sánchez et al, 2014, p. 508.

## 2.5 Superficie de Respuesta

La metodología de superficie de respuesta o conocida también como RSM por sus siglas en inglés (response surface methodology), combina técnicas estadísticas y matemáticas con el objetivo de optimizar la respuesta esperada (variable dependiente), mediante el modelamiento y análisis de la influencia de las variables independientes (ecuación 3). La RSM puede subdividirse en dos: si la respuesta puede ser expresada por una función lineal de las variables independientes, la función corresponderá a un modelo de primer orden (ecuación 4); si la superficie de respuesta presenta una curvatura, un polinomio de tercer grado deberá ser empleado, y la función corresponderá a un modelo de segundo orden (ecuación 5) (Bradley, 2007).

$$y = f(x_1, x_2) + \varepsilon \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \varepsilon \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \varepsilon \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde:

$y$ : Valor promedio de la variable de respuesta (dependiente).

$x_1$  y  $x_2$ : Variables independientes

$\beta_0$ : Valor promedio de la respuesta, en ausencia del efecto de factores  $x_1$  y  $x_2$ .

$\beta_1$ : Razón de cambio (efecto lineal) del factor 1 sobre la respuesta promedio.

$\beta_2$ : Razón de cambio (efecto lineal) del factor 2 sobre la respuesta promedio.

$\beta_{11}$ : Razón de cambio (efecto cuadrático) del factor 1 sobre la respuesta promedio.

$\beta_{22}$ : Razón de cambio (efecto lineal) del factor 2 sobre la respuesta promedio.

$\beta_{12}$ : Razón de cambio del efecto de interacción entre  $x_1$  y  $x_2$  sobre la respuesta promedio.

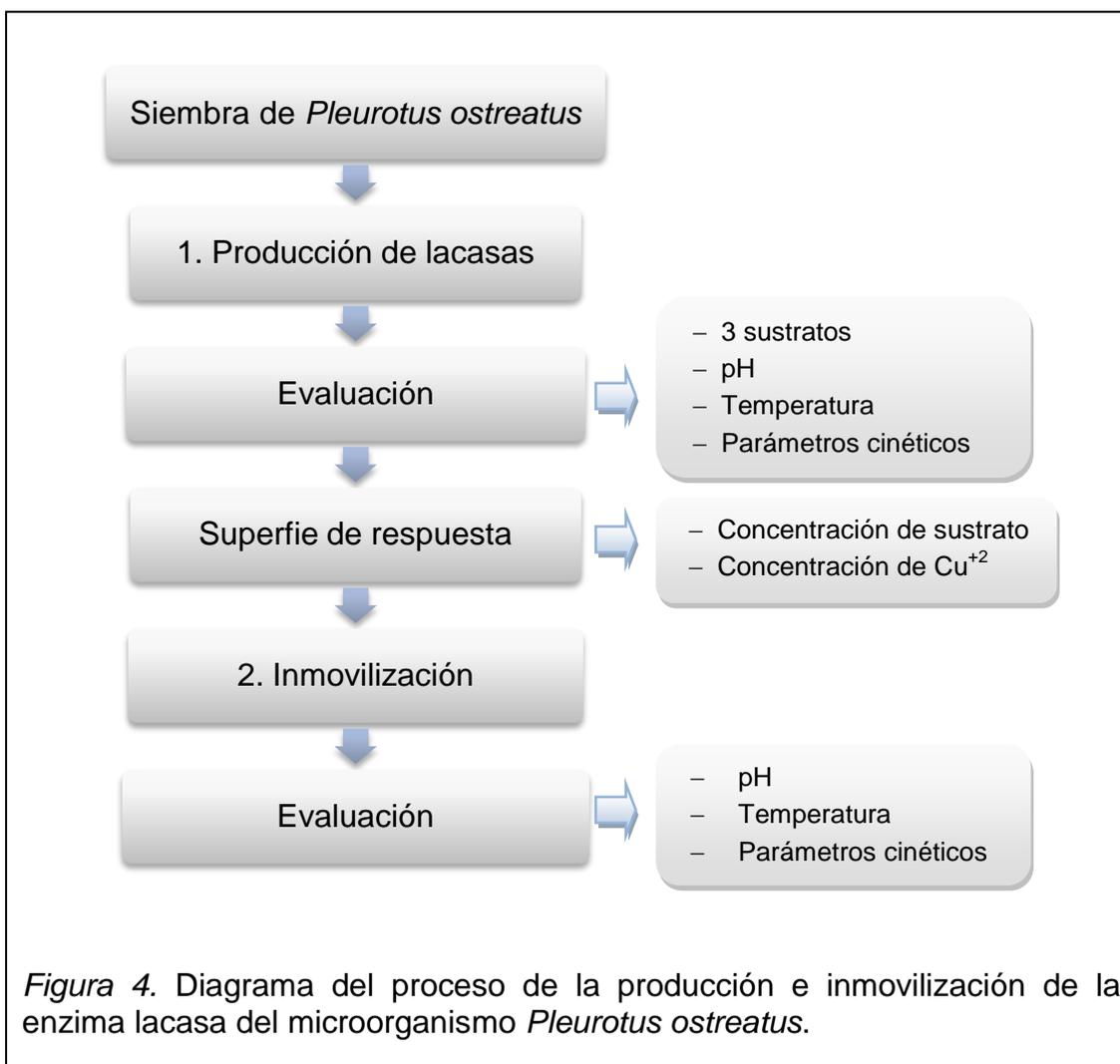
$\varepsilon$ : Término de error (efectos no explicados por el modelo)

El diseño estadístico empleado es relevante al momento de modelar y explorar la superficie de respuesta, por lo que se debe considerar que el modelo

abarque toda la región de interés (puntos mínimos y máximos de los factores), pero que simultáneamente presente el menor número de ensayos experimentales. Los diseños mayormente empleados son el diseño ortogonal y el diseño invariante por rotación. En el primer caso, la varianza en cualquier punto de la región puede ser expresada como la suma de las varianzas correspondientes a los parámetros del modelo; en el segundo caso, la varianza de un punto de la región de estudio corresponde a la distancia del punto al centro del diseño, por lo tanto, los puntos que equidisten del centro con la misma distancia, presentaran la misma variabilidad (Bradley, 2007).

## CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

En la figura 4 se describe el diagrama del proceso para el cumplimiento y ejecución del presente proyecto. Mismo que fue ejecutado en el laboratorio LQ3, correspondiente a las áreas de bioprocesos e ingeniería de los microorganismos, en la Universidad de las Américas (UDLA) en Quito.



### 3.1 Obtención del microorganismo

El hongo de pudrición blanca *P.ostreatus* fue obtenido en semilla por medio de la empresa The Fungus Garden, dedicada a la producción de hongos comestibles y medicinales en Quito. El microorganismo fue cultivado en medio de agar papa dextrosa (PDA) a 28°C durante un periodo de 7 a 14 días y

posteriormente fue conservado a 4°C. Se realizaron subcultivos cada 15 días para mantener la viabilidad del microorganismo.

### **3.2 Selección del sustrato y producción de enzima lacasa por fermentación en estado sólido (SSF)**

Tres diferentes sustratos (cascarilla de arroz, glucosa y germen de trigo) fueron seleccionados en base a su contenido de lignina para identificar su potencial de producción de enzima lacasa usando *Pleurotus ostreatus*. Los ensayos fueron realizados por triplicado en matraces de 250 mL, y fueron suplementados con 100 mL del medio de cultivo líquido modificado de Karp et al, 2015, pp. 1-8: MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3 g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.005 g/L, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.00156 g/L, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.0014 g/L, CaCl<sub>2</sub> 0.3 g/L, CoCl<sub>2</sub> 0.002 g/L, CuSO<sub>4</sub> 0.2 g/L y extracto de levadura 1.8 g/L. Adicionalmente, los matraces fueron suplementados con 1 gramo de esponjas de poliuretano (PUF) de 1 x 1 x 1 cm, 5 gramos de material ligninocelulósico correspondiente (cascarilla de arroz ó salvado de trigo), ó 0.2 g/L para la glucosa. El pH de cada ensayo fue regulado a 7 con ácido HCl 1 M ó NaOH 1 M. Los matraces fueron autoclavados a 121°C y 1 atm de presión.

Para la inoculación de *P. ostreatus*, se dejó enfriar los medios de cultivo hasta que alcancen la temperatura ambiente 18 a 20°C, posteriormente en la cabina de flujo laminar se procedió a inocular cada matraz con tres cuadrados de 1.5 x 1.5 cm de *Pleurotus ostreatus* en medio PDA.

### **3.3 Preparación del sustrato guayacol**

El sustrato guayacol fue preparado a una concentración de 200 mM, el mismo que fue resuspendido en buffer 0.1 M, pH 6. Este sustrato fue empleado para las mediciones tanto del extracto enzimático crudo como para la enzima inmovilizada.

Para los ensayos de estabilidad del pH, para lo cual se empleó diferentes soluciones buffers, el guayacol fue preparado a una concentración de 200 mM y resuspendido en el buffer de pH correspondiente (tabla 5).

### 3.4 Extracción de las enzimas y medición de la actividad enzimática

1000  $\mu\text{L}$  del extracto crudo de las enzimas lacasas producidas por fermentación en estado sólido fueron extraídas a diario en una cabina de flujo laminar. El extracto crudo fue centrifugado durante 5 minutos a 6708 g (gravedades) para descartar la presencia de cualquier material sólido. La actividad de la enzima lacasa fue medida mediante la oxidación del compuesto aromático guayacol (2-metoxifenol) (ver anexo 2). Cada ensayo fue medido en celdas para espectrofotometría, que contenía 200 mM de guayacol, 600  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato 0.1 M, pH 6 y 200  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático, dando un total 1000  $\mu\text{L}$ . La oxidación del guayacol fue medida a 470 nm de absorbancia (Findlay y Dillard, 2007, pp. E260–E267).

Los resultados de la actividad enzimática de la lacasa fueron expresados en unidades internacionales, representada por la letra U y que es definida como la cantidad de enzima que oxida 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato en un minuto), empleando la ecuación de la curva de calibración (ecuación 6) (Bisswanger, 2011, p. 14).

### 3.5 Curva de calibrado

Para realizar la curva de calibrado se consideró la ley de Beer, donde la concentración de un compuesto y su absorbancia son directamente proporcionales. En este caso se midió la absorbancia del producto formado como resultado de la oxidación del guayacol por la enzima lacasa. Partiendo de una concentración conocida del guayacol (200 mM), se procedió a preparar la siguiente reacción: 750  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato pH 6 (0.1 M), 1200  $\mu\text{L}$  de guayacol y 1800  $\mu\text{L}$  del extracto enzimático; se dejó reaccionar la mezcla durante 48 horas a temperatura ambiente, para asegurar que todo el sustrato sea consumido y convertido en producto.

Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas desde  $10^{-1}$  hasta llegar a la dilución de  $10^{-5}$ ; la absorbancia de cada dilución fue medida a 470 nm partiendo de un blanco hasta llegar a la solución menos diluida. El control negativo o blanco fue preparado con todos los reactivos que intervienen en la reacción, en la que el sustrato fue reemplazado por buffer fosfato. Se empleó el

método de mínimos cuadrados para conocer el valor de la pendiente de la ecuación 6.

$$y = m [x] - b \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde  $y$  corresponde a la absorbancia; y  $x$  la actividad enzimática en U/mL.

### 3.6 Superficie de respuesta (Diseño Central Compuesto)

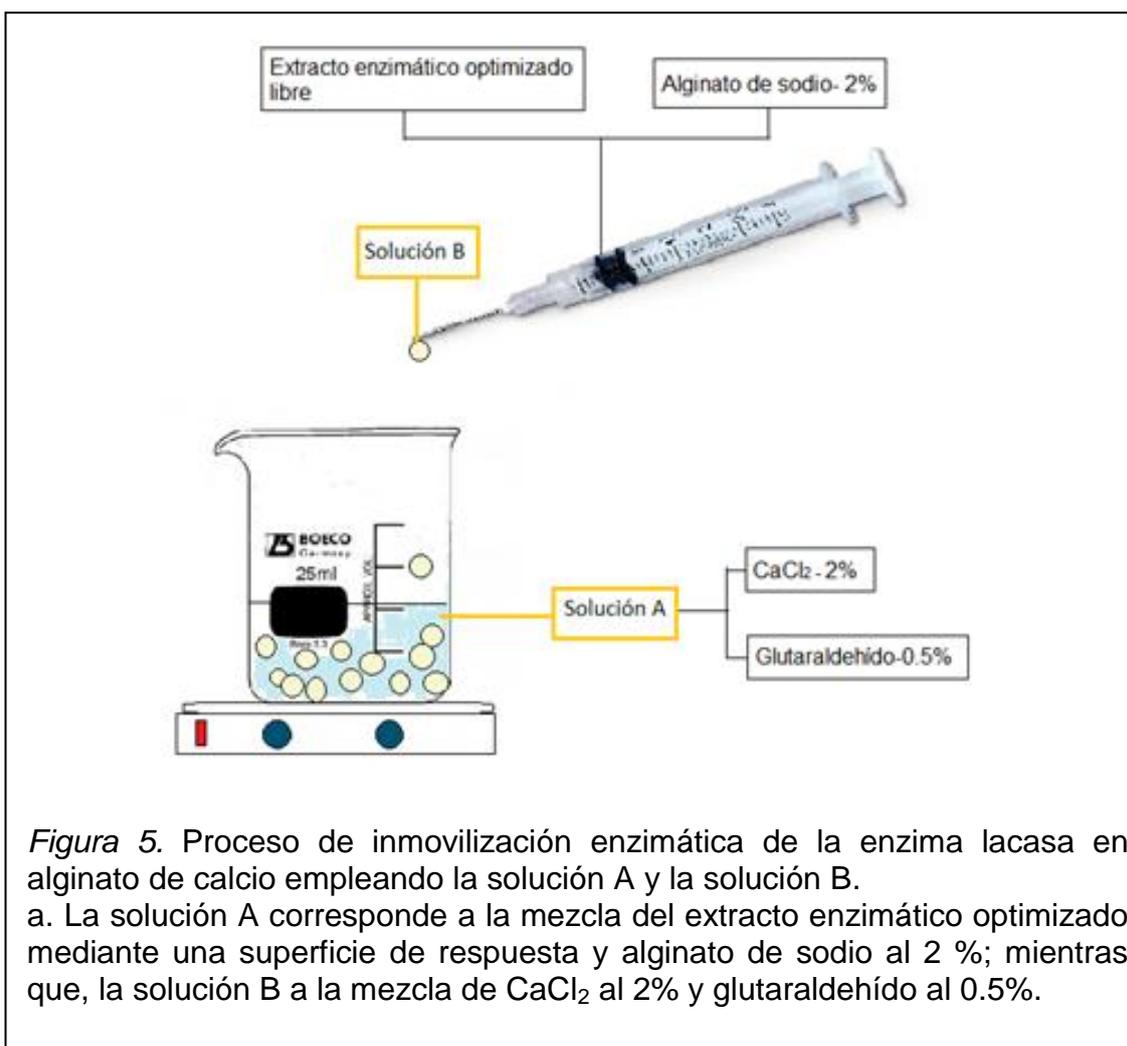
Los ensayos de superficie de respuesta fueron realizados considerando los factores concentración del ión  $\text{Cu}^{+2}$  (según bibliografía, Karp et al, 2015, pp. 1-8) y concentración de sustrato (de acuerdo al proceso del literal 3.2), como variables más influyentes en el proceso de secreción de la enzima lacasa por el hongo *P. ostreatus*. El diseño del modelo central compuesto para la producción de la enzima lacasa en fermentación en estado sólido fue construido a partir de un diseño  $2^k$ , agregándole dos puntos axiales, -1, +1 y un punto central 0, de los cuales se obtuvieron 5 niveles por cada variable de estudio y un total de 9 tratamientos (tabla 4).

Tabla 4. Diseño central compuesto para el modelamiento de la producción de la enzima lacasa en estado sólido ( $\alpha=1.414$ )

Tratamiento	Niveles codificados		Concentración (g/L)	
	Sulfato de cobre	Sustrato	Sulfato de cobre	Sustrato
T1	0	0	0,2	5
T2	0	$\alpha$	0,2	9,23
T3	1	1	0,3	8
T4	1	-1	0,3	2
T5	$\alpha$	0	0,34	5
T6	0	$-\alpha$	0,2	0,77
T7	-1	1	0,1	8
T8	$-\alpha$	0	0,05	5
T9	-1	-1	0,1	2

### 3.7 Inmovilización enzimática de la enzima lacasa

Para la inmovilización de la enzima lacasa, se utilizó alginato de sodio al 3%,  $\text{CaCl}_2$  al 2% y glutaraldehído al 0.5% como agentes inmovilizantes. Por otra parte, se empleó el extracto enzimático del ensayo que presentó mayor actividad en el ítem 3.5. Adicionalmente, se procedió a realizar dos soluciones A y B. La solución A fue preparada en un volumen de 20 mL, la misma que contenía  $\text{CaCl}_2$  al 2% (0.11 g) y glutaraldehído en una concentración de 0.5% (400  $\mu\text{L}$ ) y se dejó en agitación para facilitar su homogenización. Así mismo, la solución B fue preparada en un volumen de 6 mL, con una mezcla de 3 mL del alginato de sodio al 3% y 3 mL del extracto enzimático crudo; que luego se procedió a mezclar con ayuda de una espátula estéril hasta alcanzar su homogenización.



*Figura 5.* Proceso de inmovilización enzimática de la enzima lacasa en alginato de calcio empleando la solución A y la solución B.  
 a. La solución A corresponde a la mezcla del extracto enzimático optimizado mediante una superficie de respuesta y alginato de sodio al 2 %; mientras que, la solución B a la mezcla de  $\text{CaCl}_2$  al 2% y glutaraldehído al 0.5%.

Posteriormente y con ayuda de una jeringa de 0.3 mm con su respectiva aguja, se dejó caer lentamente gota a gota la solución B en la solución A (figura 5). Finalmente, la mezcla fue agitada a 200 rpm a temperatura ambiente, durante 3 horas (Modificado de Zhou, Li y Li, 2010, pp. 21–26). Una vez finalizado el proceso de inmovilización, se procedió a realizar tres lavados con agua destilada, para eliminar posibles residuos. Los ensayos de medición de la actividad enzimática de la lacasa se realizaron en celdas de cuarzo de 3 mL a 470 nm por un lapso de 5 minutos; cada celda contenía 40 perlas de enzima inmovilizada, 1500  $\mu$ L de buffer fosfato pH 6 (0.1 M) y 1000  $\mu$ L de guayacol.

La eficiencia del proceso de inmovilización fue calculada mediante la ecuación 7. Donde  $Y_E$ , representa la biocatálisis o rendimiento de la inmovilización,  $E_I$  enzima inmovilizada,  $E_T$  enzima total,  $E_R$  porcentaje de enzima no unida y  $E_L$  enzima no contenida en la biocatálisis, ni en la inmovilización o el sobrenadante. Todos los valores trabajados en unidades de actividad enzimática (U/mL) (Illinares et al, 2008, p. 168).

$$Y_E = \frac{E_I}{E_T + E_R + E_L} \quad (\text{Ecuación 7})$$

### 3.8 Influencia del pH y temperatura en la estabilidad de la enzima lacasa

Para determinar la influencia del pH y temperatura tanto de la enzima lacasa libre, como de la enzima inmovilizada del microorganismo *Pleurotus ostreatus*, se realizaron dos ensayos, en los cuales el extracto crudo fue precipitado con sulfato de amonio al 60%. En el primer ensayo se midió la actividad a 18°C (temperatura ambiente) y el pH fue evaluado de 2 hasta 10, con intervalos de 0.5, para lo cual se preparó soluciones buffer a diferente pH, el pH de cada buffer fue ajustado a 6 con HCl ó NaOH 1M (tabla 5); igualmente, se preparó el sustrato guayacol con cada solución buffer a una concentración de 200 mM.

En el segundo ensayo, donde se midió la estabilidad térmica de la enzima lacasa, se procedió a emplear el pH con el que se obtuvo un mayor valor en la actividad enzimática en el ensayo anterior.

Tabla 5. Soluciones buffers empleadas para ensayos de pH de la enzima oxidorreductasa tipo lacasa de *P. ostreatus*.

Rango de pH	Solución	Buffer
2,0 3,0	solución HCl 0,2 M/ KCl 0,2	Solución HCl/ KCl
3,5 5,5	solución CH <sub>3</sub> COOH 0,2 M/ C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> 0,2 M	Buffer acetato
6,0 7,5	solución NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,2m / Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O 0,2 M	Buffer fosfato
8,0 9,0	solución Tris 0,2 M7 HCl 1 M	Buffer Tris
9,5 10,0	solución NaHCO <sub>3</sub> 0,1 M/ NaCO <sub>3</sub> 0,1 M	Buffer Borato

Posteriormente, se incubó por separado el extracto purificado enzimático/enzima inmovilizada, la solución buffer y el guayacol a diferentes temperaturas por 30 minutos. La temperatura del extracto crudo y enzima inmovilizada fue evaluada de 5°C a 55°C. La actividad enzimática de la lacasa fue determina como se describe en ítems anteriores considerando las condiciones tanto para la enzima libre como para la enzima inmovilizada.

### 3.9 Determinación de los parámetros cinéticos

Para la evaluación de los parámetros cinéticos se procedió a medir la actividad de la enzima lacasa en buffer fosfato (pH 6 y 0.1 M) a temperatura ambiente (18°C). El sustrato guayacol fue evaluado en concentraciones desde 50 mM hasta 1500 mM. Los parámetros cinéticos de tasa de velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) y la constante de Michaelis-Mentend ( $K_m$ ) de los ensayos fue determinada por medio de la linealización de Lineweaver-Burk, y el valor final de la actividad enzimática fue expresada en U/mL (Zhou et al, 2010, pp. 21–26).

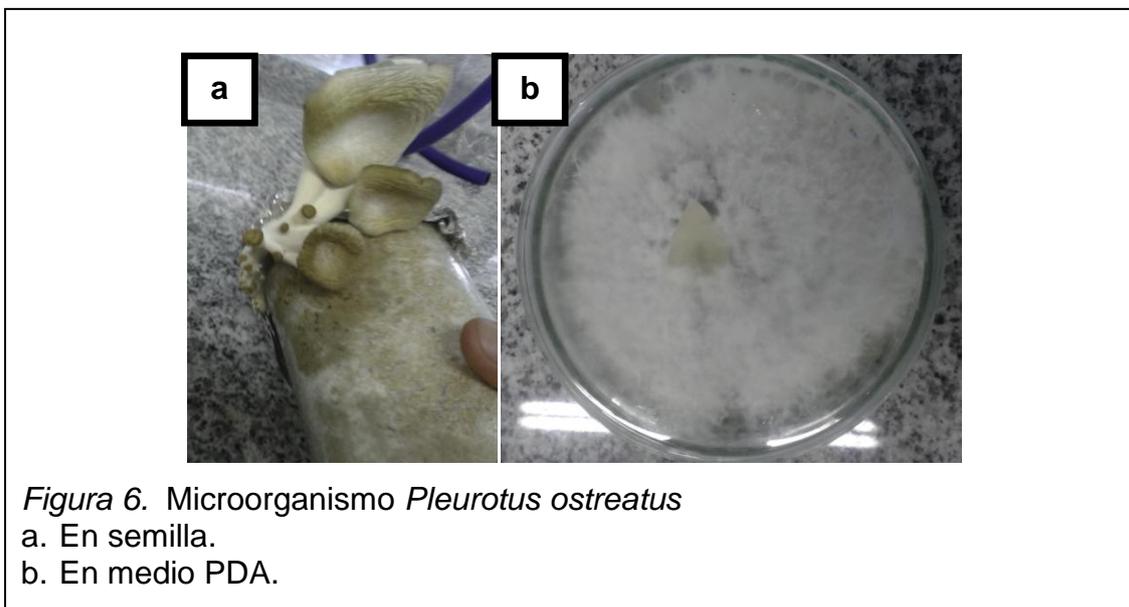
### 3.10 Análisis estadístico

El software estadístico Infostat versión estudiantil fue usado para el análisis de datos y representación gráfica de todos los ensayos excepto para el diseño y modelamiento de la superficie de respuesta (RSM), para el cual se usó el programa Statistica versión 9.0.

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS

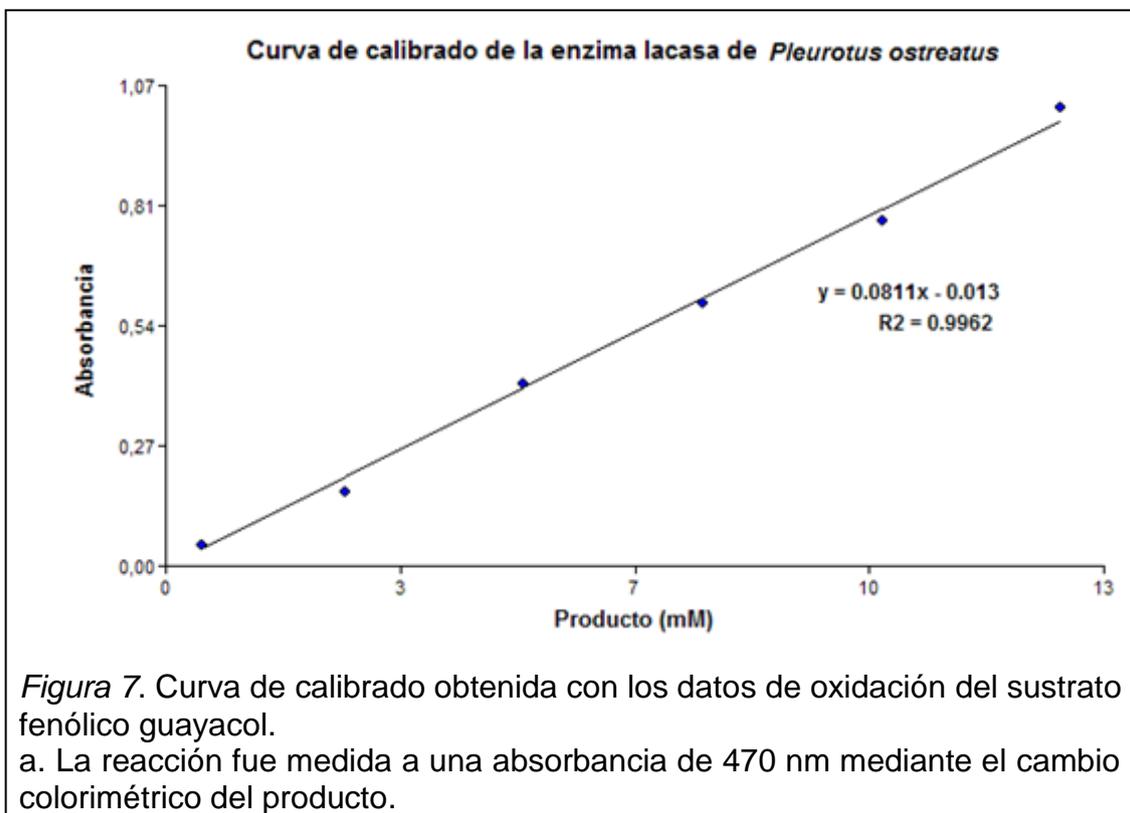
### 4.1 Cultivo de *Pleurotus ostreatus* y elaboración de la curva de calibrado

El hongo fue sembrado, conservado a 4°C y reactivado en PDA, sin la presencia de contaminación cruzada o inhibición en el crecimiento (figura 6). Para expresar los resultados obtenidos en espectrofotometría mediante la formación del producto entre el guayacol y la enzima oxidorreductasa se obtuvo la curva de calibrado con un  $R^2$  cercano a 1, cuyo valor fue de 0.9962, indicando que el 99% de los datos se ajustaron al modelo teórico (Bisswanger, 2014, pp. 41–55). Posteriormente, mediante regresión lineal se llegó a determinar la ecuación de la curva de calibrado (figura 7, ecuación 8), cumpliendo con el diseño óptimo para la calibración, en el que debe existir como mínimo de 6 y no más de 8 concentraciones de calibración (Findlay y Dillard, 2007, pp. E260–E267).



Para expresar la actividad de la enzima se empleó la ecuación 8 la cual se despejó el valor de  $x$  en términos de  $y$  (absorbancia).

$$Abs = 0.0811 [x] - 0.013 \quad (\text{Ecuación 8})$$



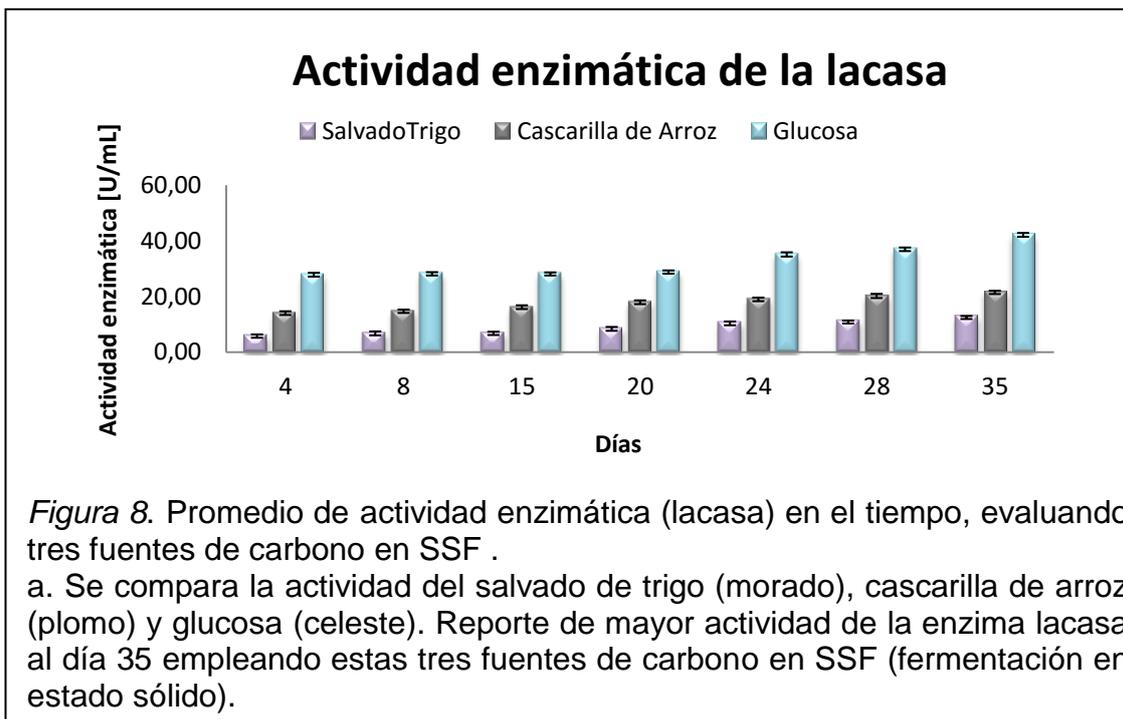
#### 4.2 Evaluación del mejor sustrato

La influencia de las tres fuentes de carbono cascarilla de arroz, salvado de trigo y glucosa en la producción de la enzima oxidoreductasa tipo lacasa de *Pleurotus ostreatus* fue evaluada a los 4, 8, 15, 20, 24, 28 y 35 días, donde se midió la actividad enzimática, misma que incrementó progresivamente en el tiempo en los tres casos. Sin embargo, el caso de la glucosa mostró una mayor actividad enzimática, con un incremento de 29.19 U/mL a 35.79 U/mL en un periodo de 4 días (día 20 y día 24, respectivamente). Adicionalmente, la actividad media al día 35 para el salvado de trigo, cascarilla de arroz y glucosa fue de 12.9 U/mL, 21.87 U/mL y 42,45 U/mL, respectivamente para cada fuente de carbono (figura 8 y tabla 6), por lo que la glucosa fue considerada como la fuente de carbono más adecuada para la obtención de enzimas.

En el anexo 3, se puede apreciar el crecimiento del microorganismo *P. ostreatus* en fermentación sólida sumergida con cubos de PUF y los tres sustratos evaluados como fuente de carbono.

Tabla 6. Actividad de la enzima lacasa de *Pleurotus ostreatus* empleando tres sustratos como fuente de carbono: salvado de trigo, cascarilla de arroz y glucosa.

Tiempo [días]	Actividad enzimática [U/mL]														
	Salvado de trigo						Cascarilla de arroz						Glucosa		
	Actividad enzimática [U/mL]			DESVEST	Actividad enzimática [U/mL]			DESVES T	Actividad enzimática [U/mL]			DESVEST			
	R1	R2	R3		PROMEDIO	R1	R2		R3	PROMEDIO	R1		R2	R3	PROMEDIO
4	5,9	6,3	6,25	6,15	0,18	14,62	14,45	13,95	14,34	0,28	28,45	27,69	28,28	28,14	0,33
8	6,53	7,18	7,34	7,02	0,35	14,87	15,33	14,99	15,06	0,19	28,73	28,58	28,31	28,54	0,17
15	7,31	6,91	7,19	7,14	0,17	16,78	16,08	16,56	16,47	0,29	28,64	28,43	28,56	28,54	0,09
20	8,18	8,81	8,94	8,64	0,33	18,46	18,44	17,81	18,24	0,30	29,06	29,39	29,15	29,20	0,14
24	10,23	10,76	10,95	10,65	0,30	19,35	19,57	18,96	19,29	0,25	34,79	35,85	35,41	35,35	0,43
28	11,26	11,34	11,29	11,30	0,03	21,03	20,09	20,16	20,43	0,43	36,98	37,5	37,48	37,32	0,24
35	12,81	12,99	12,89	12,90	0,07	22,09	21,73	21,79	21,87	0,16	42,71	41,98	42,67	42,45	0,34



Adicionalmente, en la figura 8 y tabla 6 se puede apreciar una variación no significativa entre las repeticiones para cada fuente de carbono por cada tiempo de evaluación, de lo cual se puede inferir que la influencia del operador al momento de realizar los ensayos fue mínima. También, se puede observar que la actividad enzimática para cada sustrato se mantiene casi constante hasta el día 15, a partir del cual la actividad incrementa considerablemente hasta el día 35.

#### 4.3 Ensayo de superficie de respuesta (Diseño central compuesto)

De acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo anterior, se logró determinar que la glucosa fue la mejor fuente de carbono para la producción de enzimas oxidoreductasas tipo lacasa.

## Cinética enzimática de la enzima lacasa - superficie de respuesta

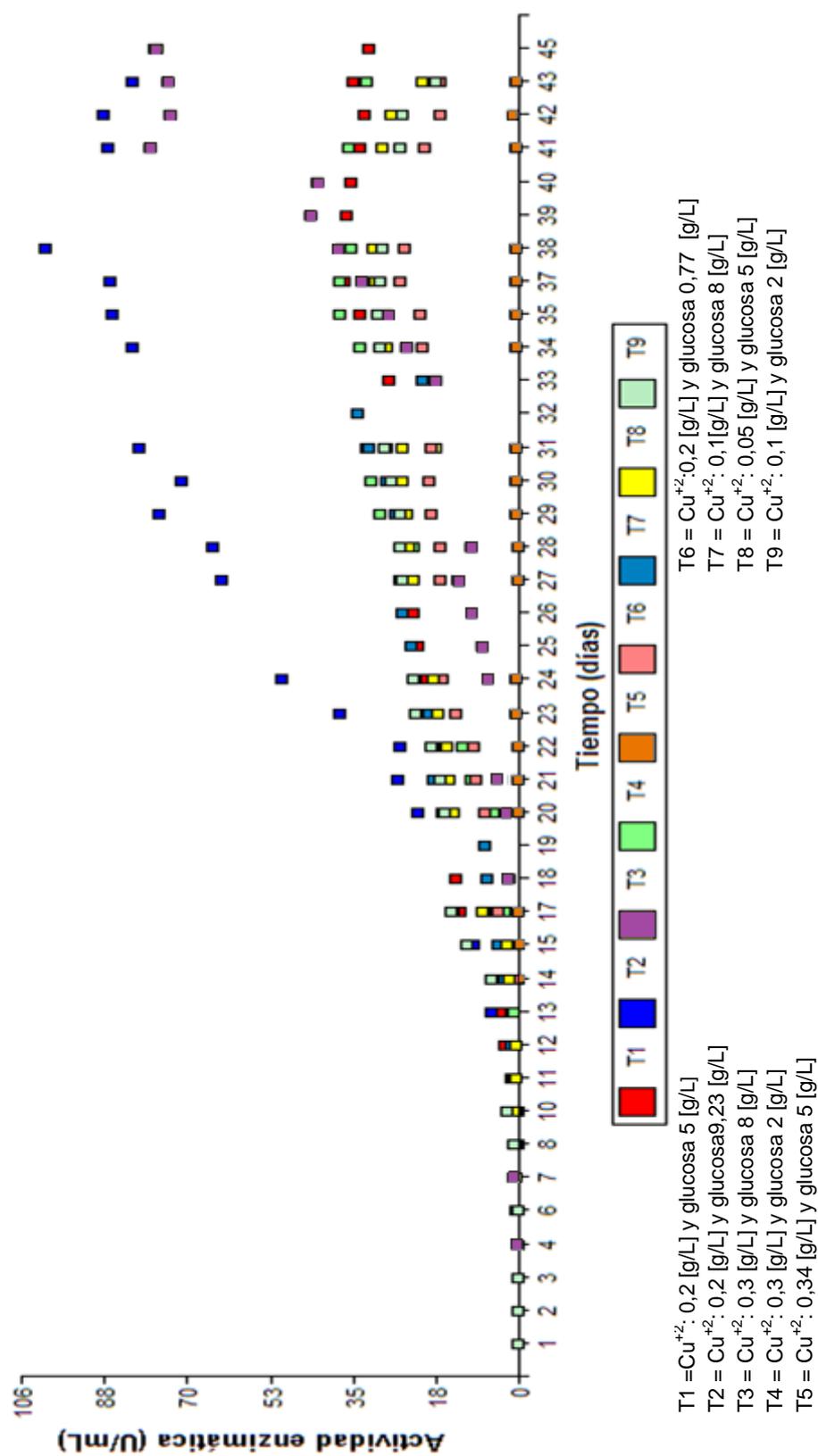


Figura 9. Cinética enzimática de los nueve tratamientos empleados para la optimización de la producción de enzimas oxidoreductasas tipo lacasa.  
 a. Se evalúa las variables concentración de glucosa como fuente de carbono y concentración del ión Cu<sup>2+</sup>.

En la figura 9 se puede apreciar la cinética enzimática en el tiempo (43 días) del diseño central compuesto, correspondiente a la evacuación de las concentraciones de la glucosa y el ion cobre  $\text{Cu}^{2+}$  (suplementado como  $\text{CuSO}_4$ ), de lo que obtuvo que al día 38 el T2 (0,2 g/L de  $\text{CuSO}_4$  y 9,23 g/L de glucosa), presentó una mayor actividad enzimática, seguida del tratamiento tres T3 (0,3 g/L de  $\text{CuSO}_4$  y 8 g/L de glucosa).

Tabla 7. Media aritmética de la cinética enzimática de la enzima oxidorreductasa tipo lacasa, para cada tratamiento en el día que presentó mayor actividad

Tratamiento	Día de mayor actividad	Actividad enzimática [U/mL]	$R^2$
T1	38	37,62	0,99
T2	38	100,62	1
T3	41	78,39	1
T4	35	37,73	0,99
T5	42	1,1	0,85
T6	37	25,34	0,94
T7	32	34,05	0,98
T8	38	30,9	1
T9	35	29,88	1

Una vez que se obtuvo la cinética enzimática de los nueve tratamientos se procedió a aplicar la media aritmética a cada tratamiento (tabla 7), de lo cual se llegó a determinar que al día 38 se obtuvo la mayor actividad enzimática para tres de los nueve ensayos, donde se incluye el T2 (tratamiento que presentó la mayor actividad enzimática). Además, T2 y T8 presentaron un  $R^2$  de 1, mientras que T1 presentó un  $R^2$  de 0.99, indicando que los valores obtenidos se ajustan a los valores esperados o teóricos.

Tabla 8. Ensayo de superficie de respuesta al día 38

Tratamiento	CuSO <sub>4</sub>		Glucosa		Actividad Lacasas U/mL
	Codificado	g/L	Codificado	g/L	
T1	0	0,2	0	5	<b>37.62</b>
T2	0	0,2	1,41	9,23	<b>100.62</b>
T3	1	0,3	1	8	<b>41.55</b>
T4	1	0,3	-1	2	<b>35.31</b>
T5	1,41	0,34	0	5	<b>0.42</b>
T6	0	0,2	-1,41	0,77	<b>24.24</b>
T7	-1	0,1	1	8	<b>24.54</b>
T8	-1,41	0,05	0	5	<b>30.9</b>
T9	-1	0,1	-1	2	<b>29.12</b>
T10	0	0,2	0	5	<b>35.49</b>

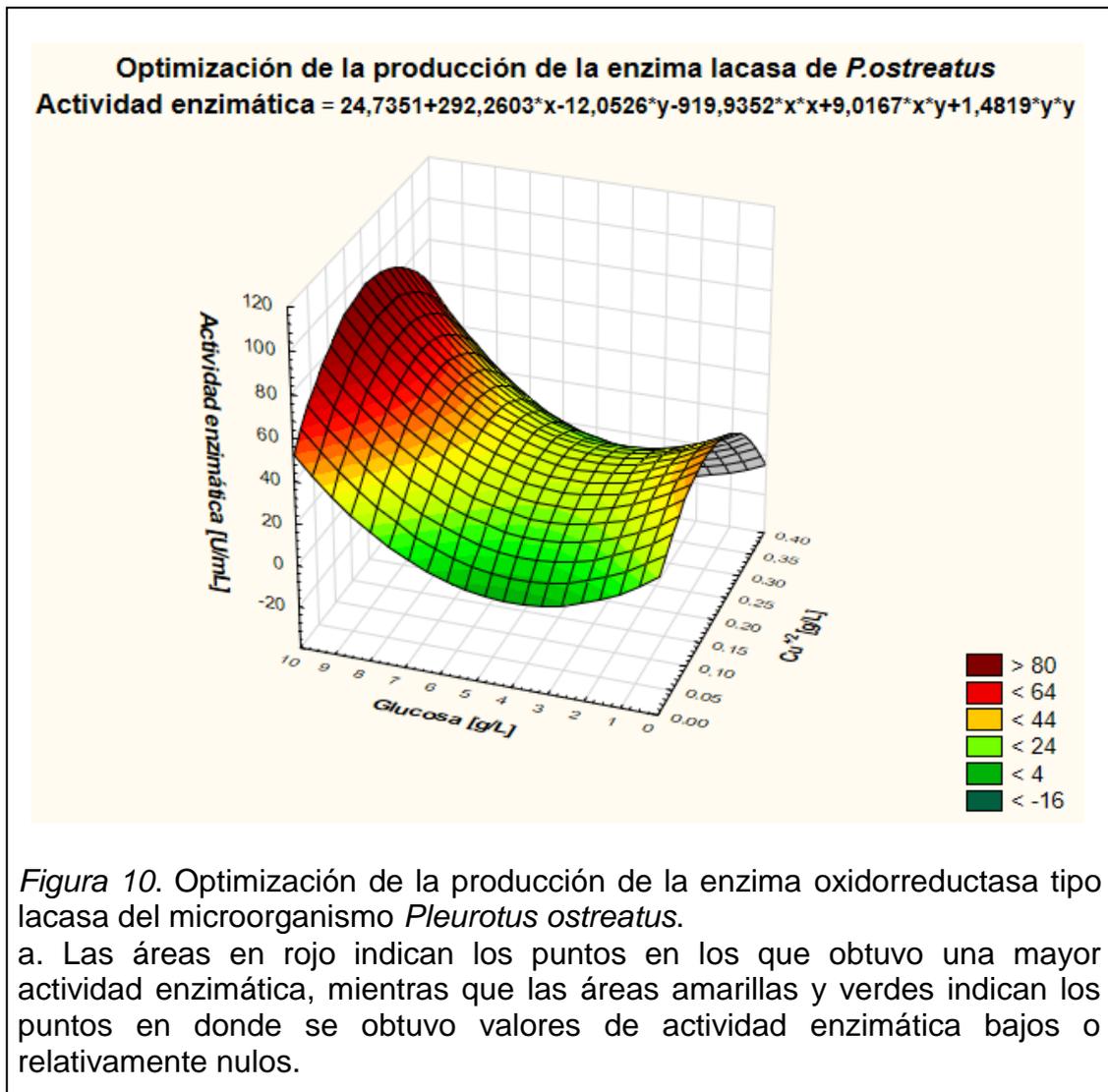
En la tabla 8 se puede observar la actividad enzimática al día 38 de los nueve tratamientos en los que se incluye el tratamiento 10 como una réplica del punto central. Por otro lado, las relación e influencia de las variables independientes concentración de glucosa y concentración del ion  $\text{Cu}^{2+}$  sobre la variable dependiente (actividad enzimática), fue representada en una gráfica en 3D de la superficie de respuesta (figura 10).

Adicionalmente, la figura 10 en conjunto con los resultados obtenidos en la cinética enzimática al día 38 (tabla 8), revelan que las concentraciones el ion  $\text{Cu}^{+2}$  y la glucosa, son factores significativos para la producción y secreción de la enzima lacasa por *P. ostreatus*. Sin embargo, debido a la conformación de la superficie del modelo en 3D se pudo observar que los valores de los factores para el punto central, no corresponden al mismo. Por lo que, según un análisis realizado en el programa Statistica versión 9.0 presentado en el anexo 7, los puntos del punto central para un futuro estudio serian 0.195 g/L para el ion  $\text{Cu}^{+2}$  y 9.23 g/L para la glucosa; valores cercanos a los de T2, tratamiento que presentó la mejor actividad enzimática.

La producción de la enzima oxidoreductasa tipo lacasa fue constada por medio de la actividad enzimática (variable dependiente), a la cual se le aplicó una regresión de análisis múltiple y se obtuvo la ecuación 9 (ecuación de

segundo orden). Mismo que describe el modelo matemático del proceso, donde "x" corresponde a la glucosa y "y" corresponde a la concentración del ion  $\text{Cu}^{+2}$ .

$$y = 24,735 + 292,260x - 12,526y - 919,935x^2 - 9,016xy + 1.481y^2 \quad (\text{Ecuación 9})$$



#### 4.4 Inmovilización enzimática en alginato de calcio

De los ensayos realizados mediante la inmovilización empleando alginato de calcio al 2% y glutaraldehído al 0.5%, se obtuvo un valor de actividad enzimática de 12.96 U/mL, para lo cual se empleó el extracto crudo procedente del T2 (tratamiento con mayor actividad enzimática obtenido mediante la

optimización por superficie de respuesta). Además, considerando la ecuación 7 (metodología), se llegó a determinar que el rendimiento por cada 40 perlas de enzima inmovilizada fue de 16.1%, considerado que la actividad enzimática del extracto crudo fue de 80.64 U/mL al día 31 ( $E_T$ ); mientras que la actividad de la enzima inmovilizada ( $E_I$ ) fue de 12.99 U/mL; y, finalmente el sobrenadante ( $E_R$ ) en el cual se encontraba la enzima no inmovilizada presentó una actividad de 3.48 U/mL, como se aprecia en la tabla 9.

Tabla 9. Rendimiento de inmovilización enzimática con glutaraldehído al 0.5% y alginato de calcio al 2%.

Inmovilización enzimática					
Réplica	Actividad enzimática [U/mL]				%
	Extracto crudo ( $E_P$ )	Alginato de calcio [2 %] y glutaraldehído [0,5 %]			
		Enzima inmovilizada ( $E_I$ )	Enzima no inmovilizada ( $E_R$ )	Enzima inactiva ( $E_L$ )	Rendimiento de la inmovilización enzimática ( $Y_E$ )
1	80,41	12,84	3,5	64,07	0,159682
2	81,01	12,48	3,43	65,10	0,154055
3	80,51	13,65	3,51	63,35	0,169544
<b>Promedio</b>	<b>80,64</b>	<b>12,99</b>	<b>3,48</b>	<b>64,17</b>	<b>0,161080</b>
<b>Desvest</b>	<b>0,2625</b>	<b>0,4893</b>	<b>0,0356</b>	<b>0,7182</b>	<b>0,0064</b>

Además, en el anexo 4, se puede apreciar el cambio colorimétrico en el tiempo de las perlas de alginato de calcio en las que se inmovilizó la enzima oxidorreductasa tipo lacasa, al reaccionar con el sustrato guayacol.

#### 4.5 Evaluación de la influencia y estabilidad de la enzima lacasa a diferentes pH

En el caso del extracto crudo, la enzima libre presentó una actividad en un rango de pH amplio, desde 2.5 a 9.5; de igual forma, la enzima inmovilizada presentó actividad enzimática en un rango de pH amplio que va desde 4 a 10 (tabla 10 y figura 11 literales a y b). Los resultados obtenidos fueron separados en tres grupos tanto para el extracto crudo como para la enzima inmovilizada,

considerando los parámetros para el proceso de linealización (determinación del pH óptimo).

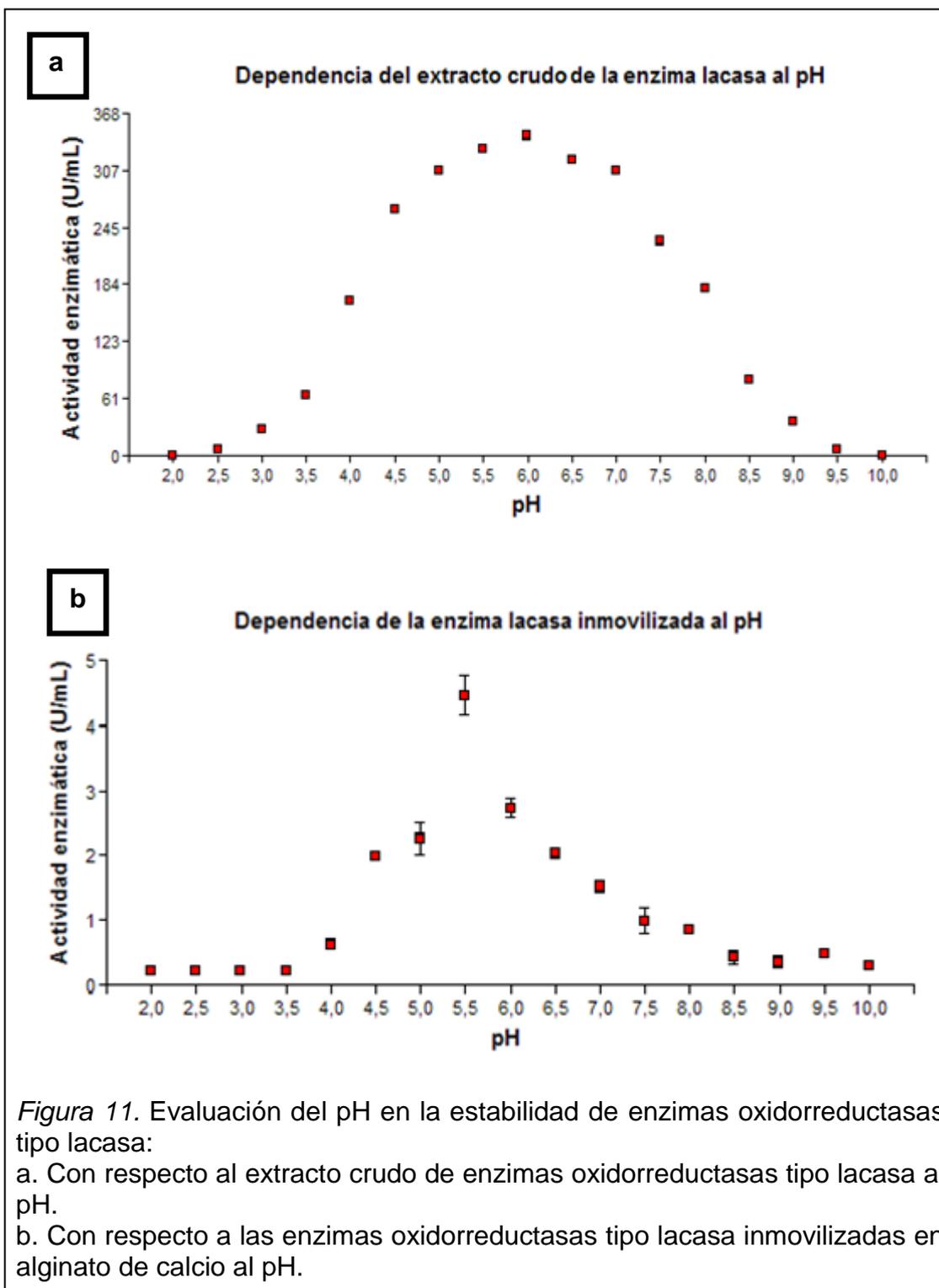
En el caso del extracto crudo de la enzima oxidoreductasa tipo lacasa, la actividad enzimática fue estable en rangos de pH entre 4.5 y 7.5, con valores de actividad enzimática entre los 265.1 U/mL y 231.8 U/mL, respectivamente. Mientras que, en valores de pH entre 3 y 4 se pudo observar un incremento de la actividad enzimática en el tiempo de 27.85 U/mL a 167.2 U/mL. Para valores de pH entre los 8 a 9 existió un decrecimiento de la actividad enzimática en el tiempo con valores de 180.5 U/mL a 36.6 U/mL, respectivamente. Finalmente, para los valores de pH de 2.5 y 9.5 la actividad enzimática fue baja, reportando valores de 7 U/mL (tabla 10).

En el caso de la enzima lacasa inmovilizada en alginato de calcio, no se pudo observar una actividad enzimática en el primer y tercer grupo, sin embargo en el segundo grupo se pudo observar que la actividad enzimática no varió significativamente, tomando valores entre 2.01 U/mL y 2.85 U/mL. El valor de pH donde se pudo apreciar una mayor actividad enzimática fue 5.5; valor que ingresa dentro del rango de estabilidad del extracto crudo (4.5 y 7).

Tabla 10. Ensayos de actividad enzimática del extracto crudo e inmovilizado de la enzima oxidorreductasa tipo lacasa en un rango de pH entre 2 y 10

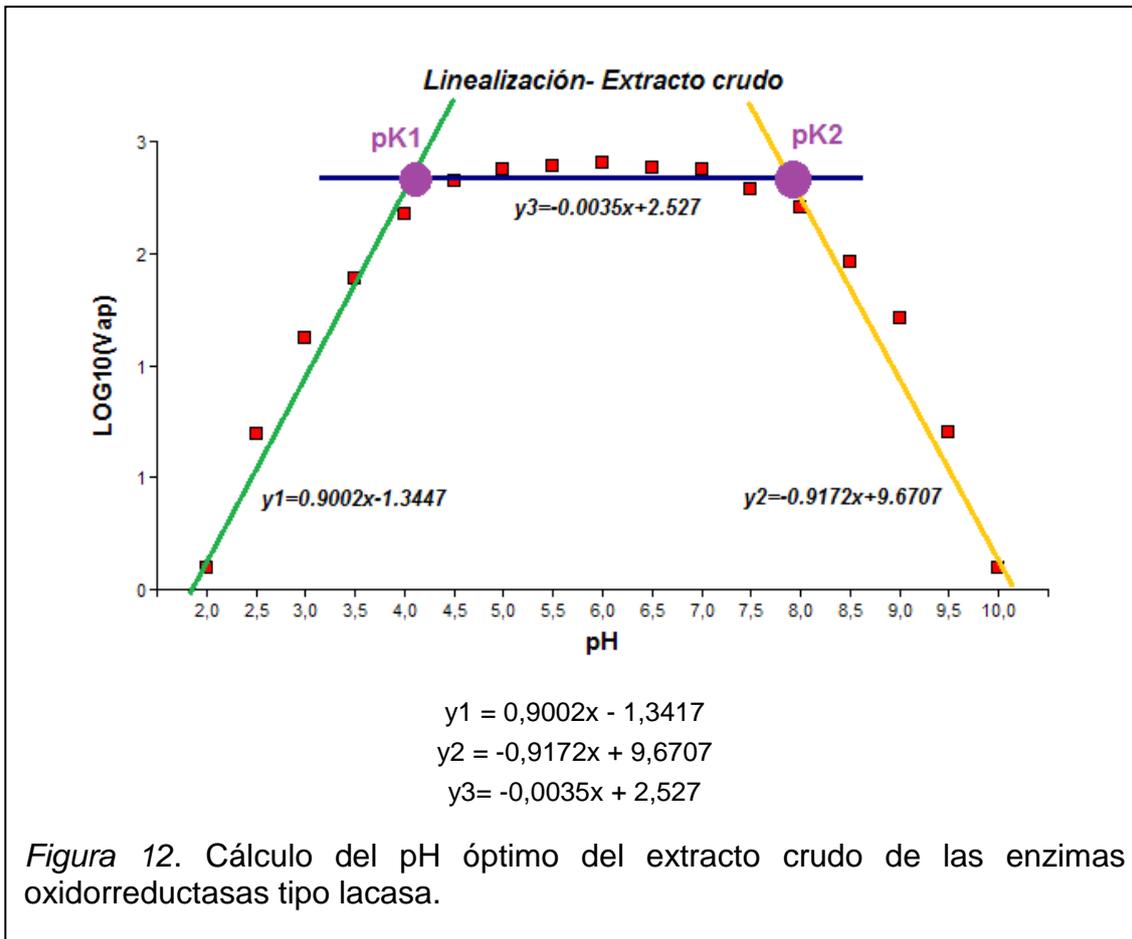
pH	Extracto crudo de la enzima lacasa – pH						Enzima lacasa inmovilizada - pH					
	Actividad enzimática [U/mL]						Actividad enzimática [U/mL]					
	R1	R2	R2	R promedio	Desvest	LN	R1	R2	R2	R promedio	Desvest	LN
2	-0,20	-0,12	-0,30	<b>-0,21</b>	0,07	<b>0,00</b>	-0,08	-0,05	0,04	<b>-0,06</b>	0,02	<b>0,00</b>
2,5	7,00	6,99	7,00	<b>7,00</b>	0,01	<b>0,84</b>	-0,03	-0,05	0,02	<b>-0,03</b>	0,01	<b>0,00</b>
3	27,80	27,90	27,9	<b>27,85</b>	0,07	<b>1,44</b>	-0,05	-0,02	0,04	<b>-0,03</b>	0,01	<b>0,00</b>
3,5	64,50	64,80	64,70	<b>64,67</b>	0,15	<b>1,81</b>	-0,02	-0,08	0,01	<b>-0,03</b>	0,04	<b>0,00</b>
4	168,00	168,00	165,60	<b>167,20</b>	1,39	<b>2,22</b>	0,53	0,46	0,39	<b>0,46</b>	0,06	<b>0,00</b>
4,5	265,50	265,50	264,30	<b>265,10</b>	0,69	<b>2,42</b>	2,07	1,89	2,07	<b>2,01</b>	0,08	<b>0,30</b>
5	306,30	305,90	306,70	<b>306,30</b>	0,40	<b>2,49</b>	2,79	1,80	2,34	<b>2,31</b>	0,40	<b>0,36</b>
5,5	330,00	330,30	329,70	<b>330,00</b>	0,30	<b>2,52</b>	4,32	5,49	4,69	<b>3,50</b>	0,75	<b>0,48</b>
6	348,40	348,30	339,30	<b>345,33</b>	5,23	<b>2,54</b>	3,06	2,52	2,97	<b>2,85</b>	0,24	<b>0,45</b>
6,5	317,20	317,70	318,12	<b>317,67</b>	0,46	<b>2,50</b>	2,16	1,89	2,16	<b>2,07</b>	0,13	<b>0,32</b>
7	306,00	306,10	305,90	<b>306,00</b>	0,10	<b>2,49</b>	1,62	1,35	1,44	<b>1,47</b>	0,11	<b>0,17</b>
7,5	225,90	234,90	234,60	<b>231,80</b>	5,11	<b>2,37</b>	0,63	1,35	0,63	<b>0,87</b>	0,34	<b>0,00</b>
8	182,40	180,60	178,50	<b>180,50</b>	1,95	<b>2,26</b>	0,62	0,73	0,72	<b>0,69</b>	0,05	<b>0,00</b>
8,5	78,00	85,80	83,10	<b>82,30</b>	3,96	<b>1,92</b>	0,01	0,45	0,27	<b>0,24</b>	0,18	<b>0,00</b>
9	36,30	36,60	36,90	<b>36,60</b>	0,30	<b>1,56</b>	0,05	0,36	0,04	<b>0,15</b>	0,15	<b>0,00</b>
9,5	7,00	6,99	7,01	<b>7,00</b>	0,01	<b>0,85</b>	0,27	0,31	0,27	<b>0,28</b>	0,02	<b>0,00</b>
10	-3,60	-0,27	-0,09	<b>-1,32</b>	1,98	<b>0,00</b>	0,05	0,09	0,09	<b>0,08</b>	0,02	<b>0,00</b>

Nota: LN: linealización



En la figura 12 se representa el proceso de determinación del pH óptimo, análisis que solo fue realizado para el extracto crudo de las enzimas oxidoreductasas tipo lacasa, puesto que la enzima inmovilizada no presento un rango de pH estable (figura 11 literal b). Los valores de pK1 y pK2

obtenidos mediante los puntos de inflexión de las tres rectas o ecuaciones fueron 4.28 y 7.81, dando como resultado final que el punto de pH óptimo fue 6.05.



#### 4.6 Evaluación de la influencia y estabilidad de la enzima lacasa a diferentes temperaturas

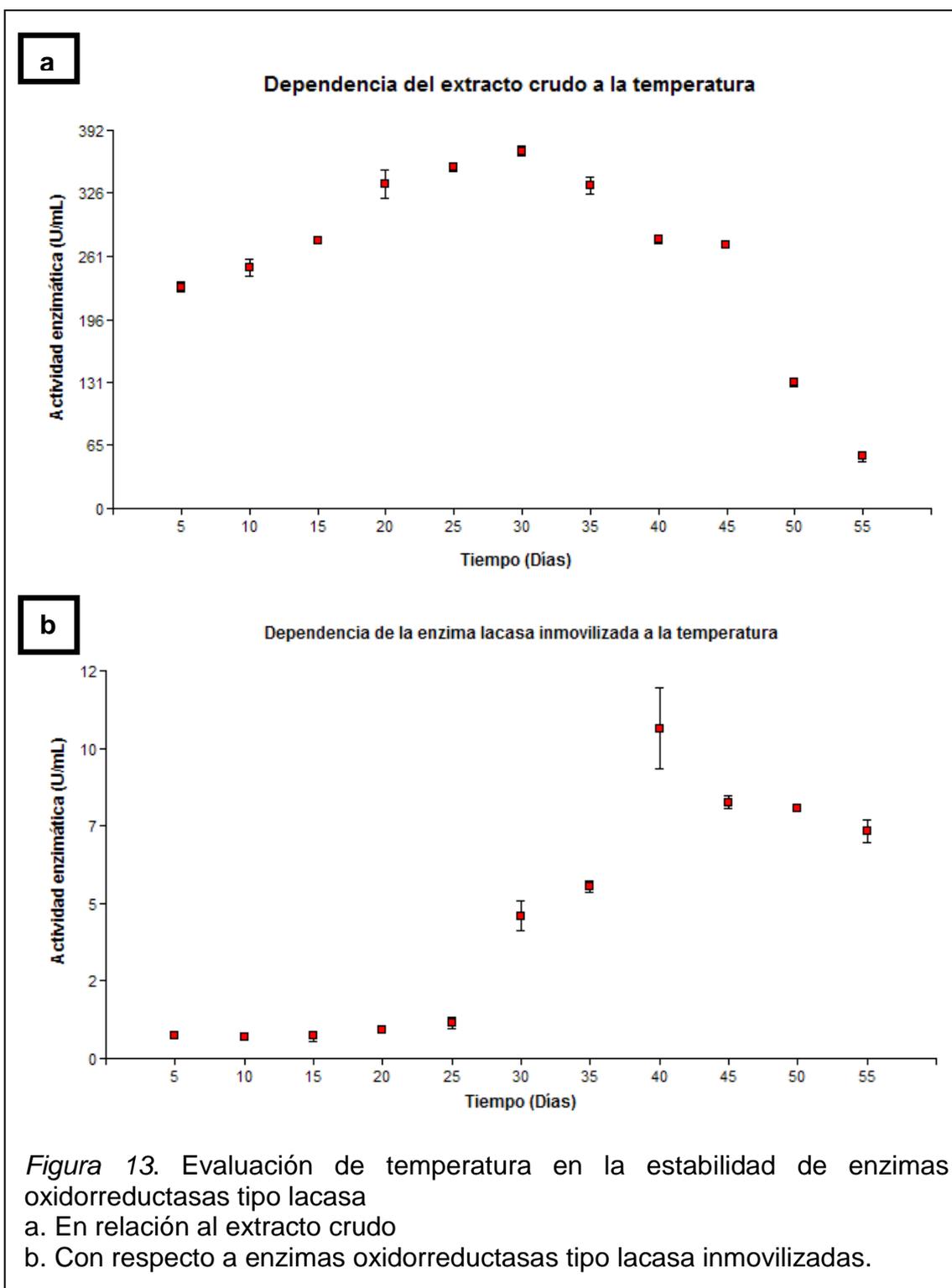
La dependencia a la temperatura fue evaluada tanto para el extracto enzimático purificado de la enzima lacasa como para la enzima lacasa inmovilizada en alginato de calcio. En el caso del extracto crudo, se pudo observar que entre los 20°C y 35°C la actividad enzimática tomó valores entre los 334.5 [U/mL] y 370.4 [U/mL]; mientras que a temperaturas superiores a 45°C la actividad enzimática decrece drásticamente de 272.73 [U/mL] a 130 [U/mL], y al alcanzar los 55°C la actividad enzimática fue de 53.55 [U/mL] (tabla 11). Por otro lado, se pudo observar que el extracto enzimático que

contenía a las enzimas oxidorreductasas tipo lacasa presentó actividad enzimática desde los 5°C, con un valor inicial de 229.2 [U/mL] y se mantuvo activa hasta los 55°C, punto en el que se reportó una actividad de 53.55 [U/mL], como se aprecia en la figura 13 literal a.

Tabla 11. Ensayos de actividad enzimática del extracto crudo e inmovilizado de la enzima oxidorreductasa tipo lacasa en un rango de temperatura entre 5°C y 55°C

Temperatura [°C]	Extracto crudo					Enzima lacasa inmovilizada				
	Actividad enzimática [U/mL]				Desvest	Actividad enzimática [U/mL]				Desvest
	R 1	R 2	R 3	Promedio		R1	R2	R3	Promedio	
5	226,5	226,2	234,9	229,20	4,03	0,71	0,64	0,79	0,713	0,061
10	242,8	259,8	246,3	249,63	7,33	0,68	0,75	0,65	0,693	0,042
15	277,2	277,8	276,9	277,30	0,37	0,63	0,63	0,9	0,720	0,127
20	328,1	326,4	352,2	335,57	11,78	0,85	0,97	0,83	0,883	0,062
25	359,2	351,6	350,8	353,87	3,79	1,08	0,99	1,35	1,140	0,153
30	365,7	369,9	375,6	370,40	4,06	4,03	4,65	4,95	4,543	0,383
35	331,2	344,7	327,6	334,50	7,36	5,67	5,4	5,31	5,460	0,153
40	274,9	281,7	278,1	278,23	2,78	9,63	11,98	9,89	10,500	1,052
45	273,4	269,4	275,4	272,73	2,49	8,1	8,01	8,37	8,160	0,153
50	132,9	125,4	131,7	130,00	3,29	7,89	8,01	7,96	7,953	0,049
55	58,2	48,9	53,7	53,55	4,65	6,93	7,65	7,11	7,230	0,306

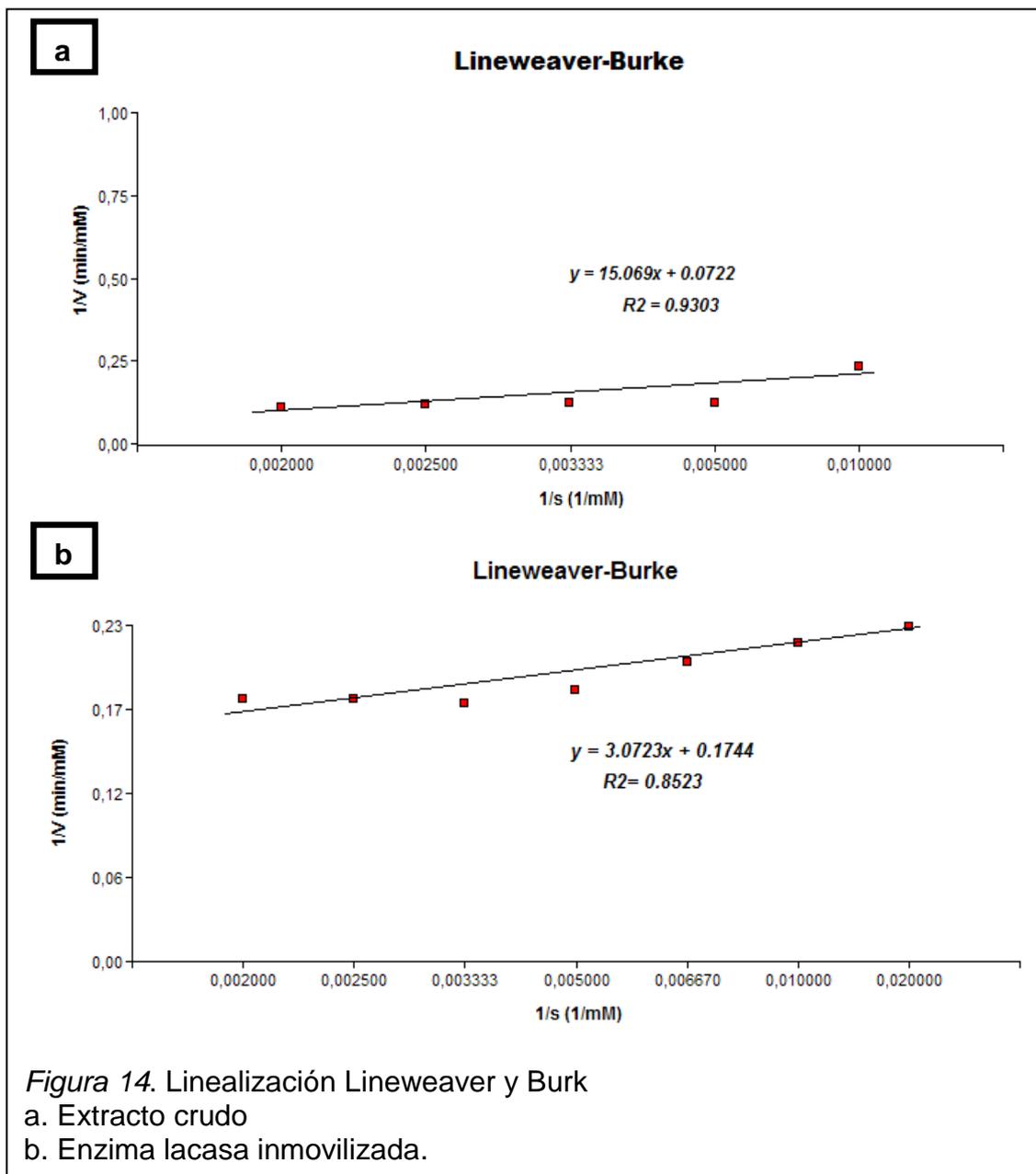
En el caso de la enzima lacasa inmovilizada, la dependencia a la temperatura fue representada gráficamente en la figura 13 literal b, donde se pudo observar que la actividad enzimática inicia un proceso de incremento al alcanzar los 30°C; mientras que, en el rango de temperatura de 5°C a 25°C la actividad enzimática se mantuvo constante tomando valores entre 0.713 U/mL y 1.14 U/mL, respectivamente. Por otra parte, a diferencia del extracto crudo que presentó una mayor actividad a los 30°C con un valor de 370.4 U/mL, la enzima inmovilizada presentó una variación de 10°C, es decir que la mayor actividad enzimática fue observada a los 40°C con un valor de 10.5 U/mL, como se observa en la tabla 11.



#### 4.7 Determinación de los parámetros cinéticos de la enzima lacasa

Para determinar los dos parámetros cinéticos, constante de disociación ( $K_m$ ) y la velocidad máxima de reacción ( $V_{m\acute{a}x}$ ), se empleó la propuesta por Hans

Lineweaver y Dean Burk. En la figura 14 se puede observar que al obtener la inversa de la velocidad ( $V$ ) y del sustrato ( $S$ ) la ecuación de la hipérbola de Michaelis y Menten se transformó en una línea recta, indicando que para el extracto crudo el 93% de los datos se ajustaron a la ecuación de la recta; mientras que, en el caso de la enzima inmovilizada solo el 85% de los datos se ajustaron al valor teórico o esperado.



En la tabla 12 se puede apreciar que el valor de la velocidad máxima para el extracto crudo (13.85 mM/min) fue mayor que la obtenida al inmovilizar la enzima lacasa en alginato de calcio (5.73 mM/min). De igual forma, los valores de  $K_m$  del extracto crudo libre fueron mayores que los valores de  $K_m$  obtenidos con la enzima lacasa inmovilizada.

Tabla 12. Cálculo de los parámetros cinéticos para la enzima lacasa (linealización Lineweaver - Burke)

<b>Enzima lacasa</b>	<b>m [min]</b>	<b>b [min/mM]</b>	<b><math>V_{m\acute{a}x}</math> [mM/min]</b>	<b><math>K_m</math> [mM]</b>	<b>Actividad enzimática [U/ml]</b>
<b>Extracto crudo</b>	15.069	0.0722	13.85	208.71	692.52
<b>Enzima inmovilizada</b>	3.0723	0.1744	5.73	17.68	259.7

## CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

### 5.1 Evaluación del mejor sustrato como fuente de carbono

A pesar de que los hongos basidiomicetes, como *Pleurotus ostreatus*, secretan la enzima lacasa de forma constitutiva, la secreción es llevada a cabo en cantidades mínimas, inconveniente que el sector industrial ha debido resolver mediante la evaluación de sustratos como fuentes de carbono, con alto contenido de celulosa, lignina, proteínas y minerales (Niladevi et al, 2007, pp. 665–674; Tišma, Žnidaršič, Vasić, y Zelić, 2012, pp. 36–46). En el caso de la secreción de la enzima lacasa por el microorganismo *P. ostreatus* se ha reportado adición de pulpa de tomate, bagazo de caña y pulpa de manzana reportando actividades de 147 U/mL, 11.6 U/mL y 114.64 U/mL, respectivamente en periodos de 4 a 9 días (Freixo et al, 2012, pp. 245–254; Park et al., 2014, pp. 193-197; Karp et al., 2015, pp. 1-8).

El estudio que se evaluó la adición de pulpa de manzana en un 2.5% (%v/v) como fuente de sustrato, se realizó en fermentación en estado sólido (SSF), en el cual se agregó glucosa en una cantidad de 20 g/L como segunda fuente de carbono obteniendo una actividad enzimática de 114.64 U/mL al noveno día (Park et al., 2014, pp. 193-197); valor que supera a los obtenidos en el presente proyecto, en el cual se pudo observar una actividad de 42,45 U/mL al día 35 con la adición de glucosa como fuente de carbono. Sin embargo, a pesar de que en el estudio comparativo se obtuvo un valor de actividad enzimática alto en un periodo de tiempo corto, no se logró disminuir los costos de producción debido al empleo de dos fuentes de carbono, de las cuales la manzana es de origen orgánico y de consumo mundial. Según la WAPA, en el 2013, la manzana abarcó el 12% del total de frutas consumidas alrededor del mundo, situándose en el segundo lugar después de los bananos (The World Apple and Pear Association [WAPA], 2016).

En otro estudio, la adición de la pulpa de tomate como fuente de sustrato, se obtuvo una mayor actividad enzimática al cuarto día con un valor de 147 U/mL mediante la adición de 20 g/L del sustrato; mientras que, al quinto día la

actividad decrece considerablemente a 20 U/mL (Freixo et al, 2012, pp. 245–254). Al contrastar con los resultados del presente trabajo, donde la actividad fue incrementando y se mantuvo constante en el tiempo, este fenómeno puede ser debido a que en nuestro caso se utilizó solo 5 g/L de cada sustrato ligninocelulósico de estudio, mientras que Freixo y otros (2012) empleó 20 g/L de pulpa de tomate como fuente de carbono.

Adicionalmente, el tipo de fermentación pudo haber influenciado en el proceso de secreción de la enzima lacasa, ya que en el presente estudio los ensayos fueron realizados SSF, y en el estudio de Freixo y otros (2012) fue en fermentación líquida (SmF); lo cual se explica por el mayor acceso al oxígeno como una de las ventajas que presenta la SmF frente a la SSF, debido a la agitación; por lo tanto, si incrementa el contenido de oxígeno la tasa de biodegradación de la lignina se incrementa (Sánchez, 2009, pp. 185–194).

Por otra parte, un estudio que empleó 20 g/L de bagazo de caña como fuente de carbono en SSF, reportó una actividad de 11.6 U/mL al décimo día (Karp, Faraco, Amore, Birolo, Giangrande, Thomaz, Pandey y Soccol, 2012, pp. 735–739), valor que solo supera la actividad reportada por el salvado de trigo en el presente ensayo, misma que presentó un valor de 7.14 U/mL al día 15; mientras que, en el caso de la cascarilla de arroz y glucosa los valores de la actividad enzimática superan al valor obtenido en el estudio que empleó bagazo de caña.

De igual modo, ensayos de obtención de la enzima lacasa con microorganismos diferentes a *Pleurotus ostreatus* han sido realizados, empleando las mismas fuentes de carbono que el presente ensayo. Por ejemplo, un estudio realizado con el microorganismo *Streptomyces psammoticus*, en el cual se empleó 10 g/L de salvado de trigo, cascarilla de arroz y pulpa de café por separado como fuentes de carbono, reportó actividades de 2.5 U/mL, 2.8 U/mL y 3 U/mL, respectivamente al cuarto día (Niladevi y Prema, 2008, pp. 4583–4589). Mientras que, en otro ensayo realizado con el microorganismo *Pleurotus sajor-caju*, en el cual se agregó 5 g/L de los inductores fructosa, glucosa, lactosa y sucrosa en SSF, se reportó

actividades de la enzima lacasa al noveno día de 37 U/mL, 36 U/mL, 3 U/mL y 26 U/mL, respectivamente (Bettin, Montanari, Calloni, Gaio, Silveira y Dillon, 2009, pp. 1-9). Los valores de actividad enzimática obtenidos en los ensayos comparativos son mayores a los valores obtenidos en el presente proyecto, lo cual puede fundamentarse en la diferencia del microorganismo empleado para cada ensayo o el sustrato empleado para la generación de la actividad enzimática (Freixo et al, 2012, pp. 245–254).

Los resultados obtenidos, en los cuales la glucosa fue considerada como la mejor fuente de carbono en relación a la cascarilla de arroz y salvado de trigo, puede deberse a la diferencia de absorción entre un compuesto y otro. Por ejemplo, la glucosa es un monosacárido que su absorción es directa y simple (Sánchez, 2009, pp. 185–194), a diferencia de la cascarilla de arroz y el salvado de trigo, sustratos compuestos de moléculas complejas que presentan valores de 14.5% y 6.8% de lignina, respectivamente (Niladevi et al., 2009, pp. 105–113). La lignina es un heteropolímero insoluble en agua y amorfo, presenta un elevado peso molecular y está formado por unidades de fenilpropano unidos por enlaces de carbono (Sánchez, 2009, pp. 185–194), lo cual dificulta la degradación en cadenas más simples que permitan la absorción y aprovechamiento de nutrientes. También, se debe considerar que el tipo de sustrato empleado para medición de la actividad enzimática de la lacasa influye en el valor final de la actividad enzimática. (Freixo et al, 2012, pp. 245–254).

De igual forma los resultados obtenidos de una actividad enzimática constante hasta el día 15, pueden deberse al estadio de fructificación del microorganismo *Pleurotus ostreatus*. Un ensayo empleando residuos sólidos producto de fermentación anaerobia se realizó para evaluar la relación entre la fructificación del *Pleurotus ostreatus* y la secreción de cuatro enzimas ligninocelulíticas: lacasas, celulasas, peroxidasa y xinalasas. En los resultados se obtuvo que para las tres primeras enzimas, la actividad enzimática incrementa en el tiempo hasta el periodo de la fructificación del hongo *P. ostreatus* (aproximadamente al día 58), posteriormente la actividad decrece. En el caso de las enzimas xinalasas la actividad no se ve afectada por la fructificación del

hongo, por tanto, se concluye que existe una relación entre la formación del cuerpo fructífero del microorganismo y la producción de enzimas ligninocelulíticas, como la lacasa (Isikhuemhen y Mikiashvilli, 2009, pp. 1353–1362).

En el estudio realizado por Isikhuemhen y Mikiashvilli (2009) la presencia de mezcla de residuos aportaron grasa, carbohidratos, lignina, celulosa y hemicelulosa, nutrientes que pudieron haber estimulado la secreción de la enzima. Adicionalmente, estos compuestos fueron añadidos diariamente, por lo que corresponde a un proceso de alimentación continua. Mientras que en el presente estudio se empleó micronutrientes, sales y las tres fuentes de carbono por separado, y los compuestos fueron añadidos en el inicio del proceso fermentativo, por lo que el proceso fue realizado en lote (batch).

Finalmente, comparando los valores obtenidos en el presente ensayo con estudios anteriormente realizados, se puede confirmar que el microorganismo *P. ostreatus* es uno de los principales secretores de enzimas oxidorreductasas tipo lacasa (Desai et al., 2011, pp. 543–549; Mendoza, 2012). Además, los resultados obtenidos en el presente estudio se ajustan a los resultados obtenidos por Periasamy y Palvannan (2010), en el cual se comprobó que la glucosa es la mejor fuente de carbono para incrementar la producción de enzima lacasa empleando *P. ostreatus* y no se requiere de la adición de inductores fenólicos o aromáticos, lignina o derivados de la lignina (Periasamy y Palvannan, 2010, pp. 548–556).

## **5.2 Optimización de la producción de enzima lacasa de *Pleurotus ostreatus***

De acuerdo a los resultados del presente estudio se obtiene que al día 38 se produjo la mayor actividad enzimática en el T2. Además, la producción de enzimas oxidorreductasas tipo lacasa con el microorganismo *P. ostreatus* presentó una actividad enzimática inferior a las 35 U/mL; comparada con el ensayo de Periasamy y Palvannan (2010), en el cual se obtuvo valores de actividad enzimática mayores. Estos resultados fueron obtenidos a pesar de

que en los dos estudios se ajustó el pH a 6 y la temperatura a 30°C. La diferencia de actividad enzimática entre los dos estudios pudo deberse a que en el ensayo de Periasamy y Palvannan el inductor  $\text{Cu}^{2+}$  fue añadido después de las 240 horas de incubación de los tratamientos y no desde un inicio del proceso fermentativo, como en el presente estudio (Periasamy y Palvannan, 2010, pp. 548–556; Palvannan, y Sathishkumar, 2010, pp. 325–335).

De igual forma, otra de las posibles causas por las que no se obtuvo valores de actividad mayores, como en el estudio realizado por Karp y otros (2015) en el cual se optimizó la producción de la enzima lacasa y se obtuvo un valor de 40 U/g, con ayuda del ión  $\text{Cu}^{2+}$  en una concentración de 150 mM como inductor, pudo ser el estado de purificación de la enzima lacasa, puesto que las impurezas (en las que se también se incluyen a la enzima peroxidasa) pueden intervenir con los sustratos al momento de la medición de la actividad enzimática de la enzima lacasa (Adenipekun y Lawal, 2012, pp. 62–68; Bisswanger, 2014, pp. 41–55).

Por ejemplo, en un estudios relacionados con la purificación de la enzima lacasa repostados en la literatura, una vez obtenido el extracto crudo de la enzima lacasa, se realizaron diferentes tratamientos, como: centrifugación a 10.000 g durante 20 minutos a 4°C (Niladevi et al, 2009, pp. 105–113), resuspensión en buffer fosfato 50 mM que adicionalmente contenía 1 mM de inhibidor de proteasas (Karp et al, 2012, pp. 735-739) o la precipitación con sulfato de amonio al 80%, seguida de la purificación mediante SDS-PAGE al 10 % (%v/v) y filtración por cromatografía (Freixo et al, 2012, pp. 245–254).

Los resultados obtenidos mediante la superficie de respuesta, representada en la figura 10 en 3D, indicaron que la glucosa y el ion  $\text{Cu}^{2+}$  son variables influyentes en el proceso de producción de la enzima lacasa. Debido a que los puntos centrales seleccionados no arrojaron los resultados esperados (representación en forma cónica, con un punto central), las concentraciones óptimas de glucosa y del ion  $\text{Cu}^{2+}$ , como puntos centrales estarían ubicadas entre el T2 y el T3. Resultado que puede ser respaldado por estudios encontrados en la literatura en los cuales se confirmó que el ion  $\text{Cu}^{2+}$  es un

inductor durante la producción de enzima lacasa (Nivadeli, 2007; Nivadeli et al, 2009; Periasamy y Palvannan, 2010, pp. 548–556; Palvannan y Sathishkumar, 2010, pp. 325–335; Karp et al, 2012, pp. 735-739).

De igual forma, y como ya se pudo observar en el presente estudio, se ha demostrado que concentraciones mayores a 0.34 g/L del ion  $\text{Cu}^{2+}$  pueden inhibir la secreción de la enzima; pero este fenómeno depende también de factores como la fuente de nitrógeno y su concentración. Por ejemplo, en el estudio realizado por Karp y otros (2015), se empleó 0.024 g/L de sulfato de cobre (dosis menor a la que se empleó en el presente estudio) y se evaluó dos fuentes de nitrógeno a la misma concentración (sulfato de amonio 2.5 g/L y extracto de levadura 2.5 g/L), revelando que con el extracto de levadura se obtiene 5 veces la actividad obtenida con sulfato de amonio (Karp et al, 2015, pp. 1-8).

Por otra parte, en un estudio que empleó simultáneamente sulfato de cobre como inductor con cascarilla de arroz y glucosa (5 g/L) como fuentes de carbono en la producción de la enzima lacasa de *Streptomyces psammoticus* realizada en SSF, a los 48 días se obtuvo la mayor actividad enzimática (55 U/g), comparada con el ensayo de control (17.3 U/g) (Niladevi et al, 2007, pp. 665–674), incrementando la actividad en un 318%. Mientras que en el presente estudio, en el que se empleó *P. ostreatus* y como ya se mencionó anteriormente al día 38, T2 alcanzó una actividad enzimática de 100.62 U/mL; este valor, comparado con el ensayo de control o punto central que presentó una actividad enzimática de 32.19 U/mL, incrementó en un 313%. Estos resultados obtenidos, en conjunto con otros estudios, indican que el ion  $\text{Cu}^{2+}$  es acertadamente un inductor en la secreción de la enzima lacasa, cuando se lo adiciona en la fase adecuada de crecimiento del hongo.

Finalmente, se determinó que el punto central para un ensayo futuro sería 9,23 g/L de glucosa y 0,195 g/L del ion  $\text{Cu}^{+2}$  (anexo 7); valores que se asemejan a los del T2, en el que se añadió 9,3 g/L de glucosa y 0,2 g/L de  $\text{CuSO}_4$  y que fue el mejor tratamiento.

### 5.3 Inmovilización enzimática en alginato de calcio

La ingeniería enzimática en conjunto con la biotecnología han establecido a la inmovilización enzimática como una de las cuatro técnicas que permiten potenciar el uso de las enzimas en la industria considerando sus excelentes propiedades funcionales (actividad, selectividad y especificidad) (Illinares et al, 2008, pp. 155,166). Estudios realizados en los cuales se ha inmovilizado enzimas lacasas ya han sido realizados, sin embargo en dichos estudios no se han empleado alginato de calcio y glutaraldehído simultáneamente como agentes inmovilizantes.

Los resultados obtenidos revelaron que a pesar de que la actividad enzimática del extracto crudo de T2 fue alta (80.64 U/mL al día 35), después de la inmovilización con perlas de alginato, se logró recuperar tan solo aproximadamente la sexta parte de la actividad. Para ello, se debe considerar que durante el proceso de inmovilización solo un porcentaje del extracto proteico es inmovilizado, mientras que la fracción restante se mezcla con la solución de inmovilización y debido a los efectos de inactivación, transferencia de masa o impedimentos estéricos propios de la inmovilización no puede ser inmovilizado completamente; por lo tanto, la enzima inmovilizada final solo expresa una fracción de la actividad esperada (Illinares et al, 2008, pp.167-168). Es por ello que en la ecuación del rendimiento se consideró el valor de  $E_L$  (valor que expresa la cantidad de enzima no contenida en ninguna de las etapas de la inmovilización) o conocido también como la fracción de enzima perdida.

Adicionalmente, un estudio realizado en el 2007 por Lu y otros, en el cual se inmovilizó enzima lacasa en micro-cápsulas de alginato y quitosano, se obtuvo un rendimiento de inmovilización del 46.93% a diferencia del presente ensayo en el cual se obtuvo la tercera parte del rendimiento. Esto pudo deberse a que en esta investigación se empleó alginato de sodio al 3% y no al 2%, además de glutaraldehído al 0.5% en lugar de quitosano al 0.3%. Por último, en el presente estudio se empleó el extracto crudo cuyo proceso de producción fue optimizado mediante una superficie de respuesta, en lugar de una enzima

comercial que se caracteriza por su grado de pureza (Novaenzima-enzima purificada / liofilizada) (Lu et al, 2007, pp. 159–166).

Según Poonkuzhali y Palvannan (2013), en el proceso de purificación e inmovilización enzimática de la lacasa existe una pérdida de la actividad enzimática, en comparación con la del extracto crudo que presenta una actividad del 100%. Adicionalmente, en el mismo estudio se logró concluir que existen diferentes matrices de alginato que pueden ser empleadas para inmovilizar enzimas lacasas, de lo cual se obtuvo que la enzima inmovilizada en alginato de bario presentó una mayor actividad con el 50%, seguido del alginato de calcio con el 45%, alginato de cobalto con un valor del 42% y alginato de cobre con un valor del 39%, las cuales fueron comparadas con la actividad del extracto crudo (100%) (Poonkuzhali y Palvannan, 2013, pp. 395-401). Los valores citados difieren de los resultados obtenidos en el presente estudio en el cual se recuperó aproximadamente el 15% de la actividad después del proceso de inmovilización empleando alginato de calcio. Este fenómeno, pudo deberse al microorganismo secretor, al sustrato empleado para las mediciones de la actividad y el porcentaje de pureza de la enzima (Bisswanger, 2014, pp. 41–55).

Además, otro factor a considerar durante el proceso de inmovilización, es la rigidez de las esferas de alginato, la cual se incrementa con la afinidad iónica por los elementos Mn>Co>Zn>Cd>Ni>Cu>Pb>Ca>Sr>Ba. Sin embargo, el ión  $\text{Ca}^{+2}$  es generalmente usado para ensayos de inmovilización debido a su baja toxicidad (Acarregui, Murua, Pedraz, Orive y Hernández, 2012, pp. 283–301).

En el presente estudio al emplear alginato de calcio, la enzima inmovilizada presentó una eficiencia del 16,1% en comparación con el extracto crudo. Este resultado a más de verse influenciado por el tipo de alginato o su concentración, pudo verse afectado por otros factores como la concentración de glutaraldehído ó tiempo de inmovilización (Zhou et al, 2010, pp. 21–26).

Cabe mencionar que en otro estudio donde se inmovilizó la enzima lacasa del microorganismo *Trametes versicolor*, en el cual se consideró los parámetros antes mencionados, se llegó a determinar que el mayor porcentaje de enzima

inmovilizada (78.7%) fue obtenido al usar glutaraldehído 3% (%v/v), durante 12 horas de agitación a temperatura ambiente y un pH de 4.5 (Spinelli, Fatarella, Di-Michele y Pogni, 2013, pp. 218–223). Los resultados citados difieren con el presente proyecto en el cual se empleó glutaraldehído al 0,5% en un pH de 6, pudiendo ser uno de los motivos por el cual no se pudo recuperar un alto porcentaje de la actividad enzimática. Sin embargo, se debe considerar que porcentajes altos de glutaraldehído pueden provocar la formación de agregados enzimáticos, precipitación, pérdida de la actividad y un cambio conformacional en la estructura de la enzima (Spinelli et al, 2013, pp. 218–223).

Otro factor influyente en la actividad de la enzima lacasa inmovilizada puede ser el almacenamiento posterior a la extracción del extracto crudo del T2 al día 38. A pesar de que el extracto crudo fue colocado a 4°C y en la solución buffer del mismo pH (buffer fosfato pH 5.6, 0.1 M) tras la recuperación de la enzima para su posterior almacenamiento, pudo haber pérdida de la actividad. Ciertas citas bibliográficas señalan que incluso bajo estas condiciones la enzima puede no estar estable y su actividad puede decrecer en el tiempo. Adicionalmente, otros factores como el proceso oxidativo, presencia de proteasas, iones metálicos, presencia de grupos tioles, entre otros también pudieron haber llevado a la pérdida de la actividad enzimática (Spinelli et al, 2013, pp. 218–223; Bisswanger, 2014, pp. 41–55).

#### **5.4 Evaluación de la influencia y estabilidad de la enzima lacasa a diferentes pH**

Ensayos realizados con enzimas lacasas han logrado establecer que el pH en el cual actúan es amplio, debido principalmente al microorganismo y el tipo de sustrato empleados (Bisswanger, 2011, p. 123). En el presente estudio, el rango de acción a diferentes pH tanto para el extracto crudo como para la enzima inmovilizada fue amplio. Según Madhavi y Lee (2009), en una revisión sobre propiedades y usos de lacasa empleando sustratos fenólicos, el pH de acción de la enzima puede ir en rangos entre 3 y 7 para lacasas provenientes de organismos fúngicos. Dicha afirmación fue confirmada en el año 1997 por

Palmieri y en la actualidad por medio del presente estudio, en los cuales tanto el extracto crudo como la enzima lacasa inmovilizada en alginato de calcio presentaron actividad en este rango de pH preestablecido (Palmieri, Giardina, Bianco, Scaloni, Capasso y Sannia, 1997, pp. 31301–31307; Periasamy y Palvannan, 2010, pp. 548–556).

En la figura 12 se puede observar que el pH óptimo para el extracto crudo que contiene a la enzima oxidoreductasa tipo lacasa es 6. Esta afirmación se realizó considerando la bibliografía, en la que se asevera que al valor de pH en el cual se obtenga un mayor valor de actividad enzimática se lo llama valor de pH óptimo, y es comúnmente usado como estándar para los ensayos de dicha enzima (anexo 5). Adicionalmente, en este punto la enzima exhibe su mayor actividad y es conocido como  $V_{max}$  (Bisswanger, 2014, pp. 41–55). Este resultado obtenido fue corroborado con un estudio realizado en la India en el cual se obtuvo que el extracto crudo de la enzima lacasa, presentó estabilidad en un rango de pH comprendido entre 4 a 6; sin embargo, empleando guayacol como sustrato se obtuvo que el pH óptimo del extracto crudo fue 4.5. La diferencia de los valores de pH ideales puede deberse a que en el presente ensayo el microorganismo empleado fue *Pleurotus ostreatus* y en el ensayo comparativo se empleó el basidiomiceta *Phanerochaete chrysosporium* (Prabu, Udayasoorian y Balasubramanian, 2006, pp. 522–529). Además, se ha visto que en el caso de la enzima lacasa proveniente de *P. ostreatus*, la diferencia del potencial redox entre un sustrato fenólico (guayacol) y el centro de cobre T1 puede incrementar los valores de pH en los que actúa la enzima lacasa (Madhavi y Lele, 2009, pp. 1694–1717).

La diferencia entre el rango de acción del extracto crudo y la enzima inmovilizada en alginato de calcio, puede justificarse con el reporte bibliográfico en el que se afirma que el estado de protonación del grupo funcional de aminoácidos y cofactores se ve involucrado en la reacción de catálisis enzimática; considerando que la protonación es un proceso reversible (Illinares, 2008, p. 134; Bisswanger, 2014, pp. 41–55). De esta forma, los valores de  $pK_1=4.28$  y  $pK_2=7.81$  obtenidos en este estudio sirvieron para

identificar al ácido glutámico ( $pK=4.32$ ) y cisteína ( $pK=8.3$ ) como los posibles aminoácidos que intervinieron en el mecanismo de catálisis de la enzima lacasa. Sin embargo, se debe considerar que los valores de  $pK$  de los aminoácidos puede variar por  $\pm 1-2$  unidades de  $pH$  cuando se integran en la estructura tridimensional de la enzima lacasa (Bisswanger, 2011, p. 43).

Adicionalmente, se pudo observar que el  $pH$  óptimo de acción para la enzima inmovilizada es ligeramente más ácido que el  $pH$  ideal calculado para el extracto crudo. Este fenómeno ha sido observado anteriormente con la enzima alcohol deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* y la enzima lacasa de *Trametes versicolor* (Periasamy y Palvannan, 2010, pp. 548–556; Spinelli et al, 2013, pp. 218–223). En el primer caso, la inmovilización se realizó con perlas de alginato y quitosano y en el segundo caso para la encapsulación se empleó glutaraldehído, fenómeno que se fundamenta en la teoría del potencial electrostático ejercido por el alginato de calcio, debido a que la matriz se encuentra cargada positivamente, por lo que el potencial electrostático dentro de la matriz es mayor que el del medio de reacción, mientras que la concentración de iones de hidrógeno es menor dentro de la matriz que en el medio de reacción, lo que provoca una variación del  $pH$  óptimo del extracto crudo, hacia un  $pH$  más ácido para la enzima inmovilizada (Periasamy y Palvannan, 2010, pp. 548–556; Spinelli et al, 2013, pp. 218–223).

Por otra parte, estudios reportan que las soluciones buffers ayudan a ajustar y mantener el valor del  $pH$  durante los ensayos enzimáticos (Bisswanger, 2011, p. 44). De este modo, mientras mayor sea la concentración de la solución buffer empleada para medir la actividad enzimática (extracto crudo y enzima inmovilizada) o para re-suspender el extracto crudo para su posterior almacenamiento y utilización, mayor será su capacidad de estabilizar el  $pH$ . Sin embargo, se debe tener en cuenta que la mayoría de enzimas, como en el caso de la enzima lacasa, solo aceptan fuerzas iónicas moderadas, es decir concentraciones entre 0.05 y 0.2 M; solamente, enzimas termófilas y halófilas prefieren altas concentraciones iguales o mayores a 1 M. Por otro lado, fuerzas iónicas bajo 0.05 M pueden desestabilizar la estructura de la proteína (Rainey y Oren, 2006, pp. 1–25; Bisswanger 2011, pp. 44-48). Por esta razón, se

puede afirmar que las concentraciones de las soluciones buffer empleadas en los ensayos de estabilidad frente al pH fueron las adecuadas y no influyeron negativamente al momento de la medición de la actividad enzimática (Ver tabla 5).

### **5.5 Evaluación de la influencia y estabilidad de la enzima lacasa a diferentes temperaturas**

La diferencia de 10° C de temperatura en la cual se pudo observar el mayor valor de actividad tanto para el extracto enzimático crudo como para la enzima lacasa inmovilizada, es un fenómeno que fue observado anteriormente en ensayos de inmovilización no solo con enzima lacasa, sino con la enzima alcohol deshidrogenasa proveniente del microorganismo *Saccharomyces cerevisiae* y con enzimas lipasas (Lu et al, 2007, pp. 159–166; Zhou et al, 2010, pp. 21–26; Miletić, Nastasović y Loos, 2012, pp. 126–135). Por ejemplo, en el estudio realizado por Lu y otros (2007), en el cual se inmovilizó enzimas lacasas con alginato de calcio al 2% y quitosano al 0.3% durante un tiempo de agitación de 30 minutos, el extracto enzimático crudo tuvo una actividad máxima a los 60°C, mientras que la enzima inmovilizada mostró su máxima actividad a los 65-70°C. Además, se observó que en los dos casos la actividad enzimática decrece cuando alcanza su máxima actividad, fenómeno que de igual forma fue observado en el presente ensayo.

En el caso de la enzima alcohol deshidrogenasa, la inmovilización fue optimizada trabajando con alginato de sodio al 3%, quitosano al 0.5%, CaCl<sub>2</sub> al 2%, glutaraldehído al 0.5% y 6 horas de agitación, observando que el proceso de inmovilización cambió la temperatura óptima obtenida del extracto crudo de la enzima lacasa de 30°C a 40°C, después de la inmovilización (Zhou et al, 2010, pp. 21–26). Finalmente, a pesar de que en los estudios comparativos se estudiaron diferentes variables en el proceso de inmovilización, la diferencia de temperatura entre el extracto crudo y la enzima inmovilizada difirió en un rango entre 5° y 10 °C, presentando el mismo patrón que en el presente ensayo.

De igual forma el fenómeno de estabilidad que presentó la enzima lacasa inmovilizada en el rango de temperatura entre los 5°C y 25°C (ver figura 13 literal b) y su baja actividad enzimática en relación a los valores obtenidos a partir de los 30 °C, se encuentran descritos por Illinares (2008), el cual hace referencia a que la estabilidad se encuentra relacionada contrariamente con la actividad, es decir cuando existe un incremento de la actividad enzimática la estabilidad disminuye y viceversa (anexo 6) (Illinares, 2008, p. 8).

Por otra parte, la dependencia del extracto crudo así como de la enzima lacasa inmovilizada a la temperatura, puede estar relacionada con la disociación del buffer fosfato empleado para la medición de la actividad enzimática y almacenamiento del extracto crudo teniendo en cuenta que compuestos como los buffers, también se encuentran en dependencia de la temperatura. De esta forma, estudios han llegado a determinar que 20°C es la temperatura estándar para los buffers y los valores de  $pK_a$  son calculados para esta temperatura (Bisswanger, 2014, pp. 41–55).

Además, otra de las posibles causas por las cuales no se recuperó el 100% de la actividad de la enzima lacasa inmovilizada, pudo haberse debido a la desnaturación por la influencia de factores ambientales durante el proceso de inmovilización. A pesar de que la mayoría de ensayos enzimáticos se realizan a condiciones ambientales, se debe tener en consideración que la temperatura ambiente no es una variable constante, ya que la misma depende del laboratorio, del tipo e intensidad de luz, del número de ventanas o puertas abiertas y del aire acondicionado (Bisswanger, 2014, pp. 41–55). Mientras que en un ensayo realizado en el año 2000, logró incrementar el valor de la actividad en la enzima lacasa pre-incubando la misma a temperaturas entre los 40°C y 50°C (Madhavi y Lele, 2009, pp. 1694–1717).

## **5.6 Determinación de los parámetros cinéticos de la enzima lacasa**

La diferencia entre los valores de  $V_{m\acute{a}x}$  del extracto crudo de enzima libre y de la enzima inmovilizada, pudo deberse a las limitaciones de difusión del sustrato y producto, desde y hacia el centro activo de la enzima; es decir, que el

guayacol no pudo saturar el centro activo para que esta trabaje tan rápido como sea posible (Bisswanger, 2011, p. 48; Bisswanger, 2014, pp. 41–55). Sin embargo, la cinética enzimática del presente estudio revela que las variables de la inmovilización seleccionadas pueden servir como un modelo de estudio para futura experimentación con inmovilizaciones de la enzima lacasa.

Por ejemplo, en un estudio realizado anteriormente se obtuvo un  $K_m$  de 0,027 mM y una  $V_{m\acute{a}x}$  de 0,02 mM/hora para la enzima lacasa inmovilizada, valores que resultan ser inferiores a los obtenidos en esta investigación, indicando que existió una mayor velocidad de reacción. Además, en el estudio comparativo se evaluó los sustratos siringaldazina y guayacol, obteniendo que este último es el mejor sustrato para la medición de la actividad de la enzima lacasa debido a la presencia de grupos metoxi en su estructura, incrementado la unión enzima-sustrato y por lo tanto su  $V_{m\acute{a}x}$  (Poonkuzhali y Palvannan, 2013, pp. 395-401).

Los parámetros cinéticos que se obtuvieron para la enzima libre (extracto crudo) fueron una  $K_m$  de 208.71 mM y una  $V_{m\acute{a}x}$  de 13.85 mM/min y para la enzima inmovilizada una  $K_m$  de 17.68 mM y una  $V_{m\acute{a}x}$  de 5.73 mM/min, lo que demostró que la  $K_m$  de la enzima inmovilizada decreció 12 veces con respecto a  $K_m$  del extracto crudo. Ya que el valor de  $K_m$  representa la afinidad de la enzima por el sustrato y valores bajos del mismo indican mayor afinidad, se puede decir que la enzima libre presenta menor afinidad hacia el guayacol comparada con la afinidad de la enzima inmovilizada (Spinelli et al, 2013, pp. 218–223). Sin embargo, el valor de  $V_{m\acute{a}x}$  de la enzima inmovilizada solo decrece 2.4 veces en relación con la  $V_{m\acute{a}x}$  del extracto crudo; fenómeno que ha sido observado en ensayos anteriores (Bayramoglu, Yilmaz y Arica, 2010, pp. 439–448; Nicolucci, Rossi, Menale, Godjevargova, Ivanov, Bianco y Diano, 2011, pp. 673–683). Finalmente se puede mencionar que la inmovilización afecta significativamente solo al parámetro cinético  $K_m$ .

Adicionalmente, la eficiencia catalítica, misma que está en relación de  $V_{m\acute{a}x}/K_m$ , para el extracto crudo fue de  $6.6 \times 10^{-2} s^{-1}$ , mientras que la eficiencia catalítica para la enzima inmovilizada fue de  $0,32 s^{-1}$  (Spinelli et al, 2013, pp.

218–223). Por lo que concluye que la eficiencia catalítica de la enzima inmovilizada incrementó 4.85 veces con respecto al extracto crudo. Por otro lado, el valor mayor de la constante de disociación de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) del extracto crudo con respecto a la enzima lacasa inmovilizada, indica que la reacción inversa se ve favorecida; por lo tanto, el complejo enzima-sustrato tenderá a disociarse en enzima lacasa y sustrato guayacol; mientras que en el caso de la enzima inmovilizada, debido a que se obtuvo un valor de  $K_m$  menor (17.68 mM), se puede afirmar que la formación del complejo enzima lacasa-guayacol se verá favorecida (Bisswanger, 2014, pp. 41–55).

Por último, debido a que el valor de  $K_m$  del extracto crudo inmovilizado se acerca al valor de la concentración media del sustrato, se puede afirmar de que se trata de una reacción de orden mixto. Mientras que, debido a que el valor de  $K_m$  es inferior a la concentración de sustrato, se concluye que  $V$  y  $V_{m\acute{a}x}$  son constantes y por tanto la reacción es de segundo orden (Illinares, 2008, p. 131; Bisswanger, 2011, p. 15; Bisswanger, 2014, pp. 41–55).

## CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1 Conclusiones

La glucosa, al ser un monosacárido de fácil absorción, fue la mejor fuente de carbono para la secreción de la enzima lacasa proveniente del microorganismo *P. ostreatus*; obteniendo valores de actividad mayores en relación a sustratos de origen ligninocelulósicos, mismos que al presentar una estructura compleja y ser insolubles en agua dificultan su degradación en cadenas simples y su absorción.

El modelo de superficie de respuesta presentado en 3D correspondió a una ecuación de segundo orden, llegando a determinar que los factores concentración de cobre y glucosa, fueron significativos en el proceso de optimización de la secreción de la enzima lacasa; obteniendo que el T2, con 0.2 g/L] de  $\text{Cu}^{+2}$  y 9.23 [g/L] de glucosa, presentó mayor actividad enzimática al día 38 con un valor de 100.62 [U/mL].

La inmovilización de la enzima lacasa con alginato de calcio como soporte, se caracterizó por ser un método sencillo. Adicionalmente, la inmovilización no es un factor influyente en la estabilización de la enzima lacasa, debido a que las condiciones de pH y temperatura en las cuales actúa la enzima lacasa inmovilizada no variaron significativamente con respecto a las del extracto enzimático libre.

La estabilidad de la enzima lacasa en diferentes pH y temperaturas, presentó el mismo patrón. Mientras incrementó el valor del factor de estudio, la respuesta o valor de la actividad enzimática lo hizo proporcionalmente, hasta llegar a un punto máximo en el cual se desestabilizó la estructura tridimensional de la enzima y decreció su actividad. Obteniendo que la temperatura y pH óptimos de acción para el extracto crudo de la enzima lacasa fueron 30°C y 6.05, respectivamente; y de 40°C y 5, respectivamente para la enzima inmovilizada.

El método de inmovilización enzimática afectó la cinética enzimática de la enzima lacasa. Tanto  $V_{\text{máx}}$  como  $K_m$  de la enzima inmovilizada decrecieron con

respecto a los parámetros del extracto crudo. Sin embargo, el parámetro más afectado fue la  $K_m$ , indicando que la afinidad de la enzima lacasa por el sustrato guayacol disminuyó después de la inmovilización. Además, el proceso de reacción inversa se vio favorecido y la reacción correspondió a un modelo de segundo orden mixto.

## 6.2 Recomendaciones

Se recomienda realizar un estudio posterior al presente en el cual el punto central sea 9,23 g/L de glucosa y 0,195 g/L de  $\text{Cu}^{2+}$ , con la finalidad de obtener un modelo matemático robusto.

Debido a la disminución de un 15% de la actividad enzimática de la enzima inmovilizada respecto al extracto crudo, se recomienda un estudio futuro en el cual se evalúen las concentraciones de los factores que intervienen en el proceso de inmovilización.

Para el uso de los cubos de PUF se recomienda lavar con agua deslizada durante 20 minutos a 80°C. Posteriormente, dejar los cubos en metanol toda la noche y lavarlos dos veces con agua destilada. Finalmente, secarlos a 50°C y colocarlos en el medio de fermentación. Esto evitará la presencia de residuos sólidos durante el proceso fermentativo.

La adición del ion  $\text{Cu}^{2+}$ , administrado en forma de sulfato de cobre no debe realizarse al inicio del proceso fermentativo, ya que esto puede provocar la inhibición del crecimiento y por lo tanto la secreción de la enzima lacasa. Se recomienda la adición a las 72 horas posterior a la incubación de los matraces con el microorganismo.

La precipitación con sulfato de amonio al 80% es recomendada para la recuperación y concentración de proteínas, lo que permitirá incrementar el valor de la actividad por volumen añadido. Además, la adición de un inhibidor de proteasas como el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (1mM) posterior a la extracción del extracto crudo de la enzima lacasa, evitaría la pérdida de actividad enzimática de la enzima lacasa.

## REFERENCIAS

- Acarregui, A., Murua, A., Pedraz, J., Orive, G., y Hernández, R. (2012). A perspective on bioactive cell microencapsulation. *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy*, 26(5), 283–301. Recuperado el 13 de enero del 2016 de <http://doi.org/10.2165/11632640-000000000-00000>
- Adenipekun, C., y Lawal, R. (2012). Uses of mushrooms in bioremediation: A review. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 7(3), 62–68. Recuperado el 01 de octubre del 2015 de <http://doi.org/10.5897/BMBR12.006>
- Aguinaga, P. (2012). *EVALUACIÓN DE CUATRO SUSTRATOS PARA LA PRODUCCIÓN DEL HONGO OSTRA (Pleurotus ostreatus) EN TRES CICLOS DE PRODUCCIÓN EN LA ZONA DE TAMBILLO, PROVINCIA DE PICHINCHA*. (Tesis de tercer grado, Escuela Politécnica Nacional). Recuperado el 16 de mayo del 2016 de <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/4663>
- Alemu, F. (2014). Cultivation of *Pleurotus ostreatus* on *Grevillea robusta* leaves at Dilla University, Ethiopia. *Journal of Yeast and Fungal Research*, 5(6), 74-83. doi: 10.5897/jyfr2014.0139
- Ba, S., Arsenault, A., Hassani, T., Jones, J., y Cabana, H. (2013). Laccase immobilization and insolubilization: from fundamentals to applications for the elimination of emerging contaminants in wastewater treatment. *Critical Reviews in Biotechnology*, 33(4), 404–418. Recuperado el 11 de noviembre del 2015 de <http://doi.org/10.3109/07388551.2012.725390>
- Barshteyn, V., y Krupodorova, T. (2016). Utilization of agro-industrial waste by higher mushrooms: Modern view and trends. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 5(6), 563–577. Recuperado el 08 de junio del 2016 de <http://doi.org/10.15414/jmbfs.2016.5.6.563-577>

- Bayramoglu, G., Yilmaz, M., y Arica, M. (2010). Preparation and characterization of epoxy-functionalized magnetic chitosan beads: Laccase immobilized for degradation of reactive dyes. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33(4), 439–448. Recuperado el 03 de marzo del 2015 de <http://doi.org/10.1007/s00449-009-0345-6>
- Bertrand, T., Jolival, C., Briozzo, P., Caminade, E., Joly, N., Madzak, C., y Mougín, C. (2002). Crystal Structure of a Four-Copper Laccase Complexed with an Arylamine: Insights into Substrate Recognition and Correlation with Kinetics. *Biochemistry*, 41(23), 7325–7333. Recuperado el 18 de mayo del 2016 de <http://doi.org/10.1021/bi0201318>
- Bettin, F., Montanari, Q., Calloni, R., Gaio, T., Silveira, M., y Dillon, A. (2009). Production of laccases in submerged process by *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 in relation to carbon and organic nitrogen sources, antifoams and Tween 80. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(1), 1–9. Recuperado el 16 de mayo del 2016 de <http://doi.org/10.1007/s10295-008-0463-1>
- Bisswanger, H. (2011). *Practical Enzymology* (2da ed.). Weinheim, Alemania: Wiley-VCH Verlag y Co. KGaA.
- Bisswanger, H. (2014). Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 1(1-6), 41–55. Recuperado el 13 de noviembre del 2015 de <http://doi.org/10.1016/j.pisc.2014.02.005>
- Bradley, N. (2007). The response surface methodology. (Tesis de maestría, Indiana University of South Bend). Recuperado el 03 de enero del 2016 de [https://www.iusb.edu/math-compsci/\\_prior-thesis/NBradley\\_thesis.pdf](https://www.iusb.edu/math-compsci/_prior-thesis/NBradley_thesis.pdf)
- Brena, B. y Batista, F. (2006). *Immobilization of Enzymes: A literature Survey*. En Guisan, J. Immobilization on Enzymes and Cells. (2da ed.). Madrid, España: Humana Press Inc.

- Claus, H. (2004). Laccases: Structure, reactions, distribution. In *Micron*, 35(1), 93–96. Recuperado el 16 de abril del 2015 de <http://doi.org/10.1016/j.micron.2003.10.029>
- Coello, J. y Burgos, F. (2012). *Aplicación del hongo Pleurotus ostreatus como alternativa para la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados*. (Tesis de tercer nivel, Escuela Superior Politécnica del Litoral). Recuperado el 15 de enero del 2016 de <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/21020>
- Deepalakshmi, K., y Mirunalini, S. (2014). *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. *J Biochem Tech*, 5(2), 718–726. Recuperado el 06 de febrero del 2016 de [http://www.jbiochemtech.com/index.php/jbt/article/view/JBT529/pdf\\_190](http://www.jbiochemtech.com/index.php/jbt/article/view/JBT529/pdf_190)
- Desai, S., Tennali, G., Channur, N., Anup, A., Deshpande, G., y Azhar, B. (2011). Isolation of laccase producing fungi and partial characterization of laccase. *Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering*, 1(4), 543–549. Recuperado el 15 de junio del 2015 de <http://bioscipub.com/journals/bbb/pdf/543-549.pdf>
- Fernández, M., Sanromán, M., y Moldes, D. (2013). Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1808–1825. Recuperado el 03 de febrero del 2016 de <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.02.013>
- Findlay, J., y Dillard, R. (2007). Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays. *The AAPS Journal*, 9(2), E260–E267. Recuperado el 12 de mayo del 2015 de <http://doi.org/10.1208/aapsj0902029>
- Freixo, M., Karmali, A. y Arteiro, J. (2012). Production, purification and characterization of laccase from *Pleurotus ostreatus* grown on tomato pomace, 28(1), 245–254. Recuperado el 05 de junio del 2016 de <http://doi.org/10.1007/s11274-011-0813-4>

- Garzillo, A., Colao, M., Buonocore, V., Oliva, R., Falcigno, L., Saviano, M., y Sannia, G. (2001). Structural and kinetic characterization of native laccases from *Pleurotus ostreatus*, *Rigidoporus lignosus*, and *Trametes trogii*. *Journal of Protein Chemistry*, 20(3), 191–201. Recuperado el 16 de mayo del 2015 de <http://doi.org/10.1023/A:1010954812955>
- Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., y Sannia, G. (2010). Laccases: A never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(3), 369–385. Recuperado el 05 de junio del 2015 de <http://doi.org/10.1007/s00018-009-0169-1>
- Guadarrama, P., Valencia del Toro, G., Ramírez, R., Robles, F., Yáñez, J., Garín, M., y Bravo, G. (2014). Morphology and mycelial growth rate of *Pleurotus spp.* strains from the Mexican mixtec region. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(3), 861–872. Recuperado el 02 de abril del 2016 de <http://doi.org/10.1590/S1517-83822014000300016>
- Guisan, J. (2006). *Immobilization of Enzymes and Cells-Volume. (2da ed.)*. Madrid, España: Humana Press Inc.
- Illanes, A. (2008). *Enzyme biocatalysis: Principles and applications*. (A. Illinares, Ed.), *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. Valparaíso - Chile: Springer. Recuperado el 28 de julio del 2015 de <http://doi.org/10.1007/978-1-4020-8361-7>
- Isikhuemhen, O., y Mikiashvilli, N. (2009). Lignocellulolytic enzyme activity, substrate utilization, and mushroom yield by *Pleurotus ostreatus* cultivated on substrate containing anaerobic digester solids. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(11), 1353–1362. Recuperado el 21 de mayo del 2015 de <http://doi.org/10.1007/s10295-009-0620-1>
- Jaramillo, I. (2013). EVALUACION DE TRES RESIDUOS AGROINDUSTRIALES LIGNOCELULOSICOS PROVENIENTES DE CEBADA (*Hordeum vulgare* L.), ARROZ (*Oriza sativa*) Y EUCALIPTO (*Eucalyptus globulus* L.) PARA EL CULTIVO DE DOS CEPAS DE HONGO

OSTRA (*Pleurotus ostreatus* J.) BAJO INVERNADERO. (Tesis de tercer nivel, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo) Recuperado el 12 de noviembre del 2015 de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/2872#sthash.SMzZIIKM.dpuf>

Johannes, T., Woodyer, R., y Zhao, H. (2002). Regeneration of cofactors for Enzyme Biocatalysis. En Pandey, A. (2006). *Enzyme Technology*. (1<sup>ra</sup> ed.) New Delhi: Springer Science y Business Media.

Karp, S., Faraco, V., Amore, A., Birolò, L., Giangrande, C., Thomaz, V., Pandey, A., y Soccol, C. (2012). Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse. *Bioresourse Technology*, 114, 735-739. Recuperado el 19 de abril del 2016 de <http://doi:10.1016/j.biortech.2012.03.058>

Karp, S., Faraco, V., Amore, A., Letti, L., Thomaz, V., y Soccol, C. (2015). Statistical optimization of laccase production and delignification of sugarcane bagasse by *Pleurotus ostreatus* in solid-state fermentation. *BioMed Research International*, 2015(2015), 1-8 . Recuperado el 19 de abril del 2016 de <http://doi.org/10.1155/2015/181204>

Kunamneni, A., Plou, F., Ballesteros, A., y Alcalde, M. (2008). Laccases and Their Applications: A Patent Review. *Recent Patents on Biotechnology*, 2(1), 10–24. Recuperado el 23 de mayo del 2016 de <http://doi.org/10.2174/187220808783330965>

Kües, U., y Rühl, M. (2011). Multiple Multi-Copper Oxidase Gene Families in Basidiomycetes - What for?. *Current Genomics*, 12(2), 72–94. Recuperado el 05 de abril del 2016 de <http://doi.org/10.2174/138920211795564377>

Lu, L., Zhao, M., y Wang, Y. (2007). Immobilization of laccase by alginate-chitosan microcapsules and its use in dye decolorization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(2), 159–166. Recuperado el 12 de noviembre del 2015 de <http://doi.org/10.1007/s11274-006-9205-6>

- Madhavi, V., y Lele, S. (2009). Laccase: Properties and applications. *BioResources*, 4(4), 1694–1717. Recuperado el 24 de noviembre del 2015 de <http://doi.org/10.15376/biores.4.4.1694-1717>
- Mendoza, G. (2012). *ESTUDIO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS PRODUCIDAS POR Pleurotus ostreatus y Lentinula edodes USANDO DIFERENTES INDUCTORES*. (Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Madrid). Recuperado el 12 de febrero del 2016 de <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/handle/28000/1029>
- Mienda, B., Idi, A., y Umar, A. (2011). Microbiological Features of Solid State Fermentation and its Applications -An overview. *Research in Biotechnology*, 2(6), 21–26. Recuperado el 08 de junio del 2015 de <http://doi.org/ISSN:2229-791X>
- Miletić, N., Nastasović, A., y Loos, K. (2012). Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. *Bioresource Technology*, 115, 126–135. Recuperado el 08 de junio del 2015 de <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.054>
- Morales, L. (2008). Biorremediación de suelos contaminados con el aceite usado de automóvil con el hongo de pudrición blanca *Pleurotus ostreatus* (setas) en Durango. (Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional. Victoria de Durango-México). Recuperado el 8 de diciembre del 2016 de <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/12726>
- Moya, R. (2011). *CARACTERIZACIÓN DE LA LACASA DE Streptomyces cyaneus CECT 3335 Y APROXIMACIÓN AL ESTUDIO DE SU POTENCIAL OXIDATIVO Y FUNCIÓN BIOLÓGICA*. (Tesis de doctorado, Universidad de Alcalá). Recuperado el 18 de marzo del 2016 de <http://hdl.handle.net/10017/16781>
- Nicolucci, C., Rossi, S., Menale, C., Godjevargova, T., Ivanov, Y., Bianco, M., y Diano, N. (2011). Biodegradation of bisphenols with immobilized laccase or tyrosinase on polyacrylonitrile beads. *Biodegradation*, 22(3), 673–683.

Recuperado el 03 de febrero del 2016 de <http://doi.org/10.1007/s10532-010-9440-2>

Niladevi, K. N., y Prema, P. (2008). Effect of inducers and process parameters on laccase production by *Streptomyces psammoticus* and its application in dye decolourization. *Bioresource Technology*, 99(11), 4583–4589. Recuperado el 16 de abril del 2015 de <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.056>

Niladevi, K., Sukumaran, R., y Prema, P. (2007). Utilization of rice straw for laccase production by *Streptomyces psammoticus* in solid-state fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(10), 665–674. Recuperado el 02 de febrero del 2015 de <http://doi.org/10.1007/s10295-007-0239-z>

Niladevi, K., Sukumaran, R., Jacob, N., Anisha, G., y Prema, P. (2009). Optimization of laccase production from a novel strain *Streptomyces psammoticus* using response surface methodology. *Microbiological Research*, 164(1), 105–113. Recuperado el 25 de junio del 2016 de <http://doi.org/10.1016/j.micres.2006.10.006>

Palmieri, G., Cennamo, G., Faraco, V., Amoresano, A., Sannia, G. y Giardina, P. (2003). Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(1-2), 220-230. Recuperado el 11 de marzo del 2015 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022903001170>

Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Scaloni, A., Capasso, A., & Sannia, G. (1997). A Novel White Laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(50), 31301–31307. Recuperado el 16 de agosto del 2015 de <http://doi.org/10.1074/jbc.272.50.31301>

Palvannan, T., y Sathishkumar, P. (2010). Production of laccase from *Pleurotus florida* NCIM 1243 using Plackett-Burman design and response surface

- methodology. *Journal of Basic Microbiology*, 50(4), 325–335. Recuperado el 11 de julio del 2015 de <http://doi.org/10.1002/jobm.200900333>
- Pandey, A., Weeb, C., Soccol, C., y Larroche, C. (2006). *Enzyme Technology*. (illustrate). New Delhi: Springer Science y Business Media.
- Park, Y., Yoon, D., Kim, H., Kwon, O., Yoo, Y., Kong, W., y Lee, C. (2014). Overproduction of Laccase by the White-Rot Fungus *Pleurotus ostreatus* Using Apple Pomace as Inducer. *Mycobiology*, 42(2), 193-197. Recuperado el 11 de julio del 2015 de <http://doi.org/10.5941/MYCO.2014.42.2.193>
- Periasamy, R., y Palvannan, T. (2010). Optimization of laccase production by *Pleurotus ostreatus* IMI 395545 using the Taguchi DOE methodology. *Journal of Basic Microbiology*, 50(6), 548–556. Recuperado el 30 de junio del 2015 de <http://doi.org/10.1002/jobm.201000095>
- Pezzella, C., Lettera, V., Piscitelli, A., Giardina, P., y Sannia, G. (2013). Transcriptional analysis of *Pleurotus ostreatus* laccase genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(2), 705–717. Recuperado el 03 de mayo del 2016 de <http://doi.org/10.1007/s00253-012-3980-9>
- Piscitelli, A., Giardina, P., Lettera, V., Pezzella, C., Sannia, G., y Faraco, V. (2011). Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. *Current Genomics*, 12(2), 104–112. doi:10.2174/138920211795564331
- Poonkuzhali, K., y Palvannan, T. (2013). Comparison of biopolymers for immobilization of laccase: Ecotoxicity assessment of azo dye. *Indian Journal of Biotechnology*, 12(3), 395-401. ISSN: 0975-096
- Poppe, J. (2014). *Agricultural wastes as substrates for oyster mushroom. Oyster Mushroom Cultivation* (1a ed). Belgium: Zero Emissions Research and Initiatives.

- Prabu, P., Udayasoorian, C., y Balasubramanian, G. (2006). Isolation, molecular characterization and reactivity with 2,6 dichlorophenol of a laccase and isolation of laccase gene specific sequences from lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* (TL 1). *Biotechnology*, 5(4), 522–529. Recuperado el 25 de mayo del 2016 de <http://doi.org/10.3923/biotech.2006.522.529>
- Purnomo, A., Mori, T., Putra, S., y Kondo, R. (2013). Biotransformation of heptachlor and heptachlor epoxide by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 82(August), 40–44. Recuperado el 03 de abril del 2016 de <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.02.013>
- Rainey, F., y Oren, A. (2006). Extremophile Microorganisms and the Methods to Handle Them. *Methods in Microbiology*, 35(05), 1–25. Recuperado el 22 de mayo del 2016 de [http://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70004-7](http://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70004-7)
- Ramesh, C. y Ajay, S. (2007). *Lignocellulose Biotechnology: Future prospects* (1a ed.). New Delhi-India: I.K. International Publishing House Pvt. Ltd.
- Rao, D. (2010). *Introduction to Biochemical Engineering*. (2da. Ed.) New Delhi: Tata McGraw Hill Education Private Limited.
- Ravindra, P., Pinnamaneni, R., y Koonna, S. (2012). Occurrences, Physical and Biochemical Properties of Laccase. *Universal Journal of Environmental Research*, 2(1), 1–13. ISSN 2249 0256
- Rhodes, C. (2014). Mycoremediation (bioremediation with fungi) - growing mushrooms to clean the earth. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 26(3), 196–198. Recuperado el 14 de junio del 2015 de <http://doi.org/10.3184/095422914X14047407349335>
- Risdianto, H., Sofianti, E., Suhardi, S. H., y Setiadi, T. (2012). Optimisation of Laccase Production using White Rot Fungi and Agriculture Wastes in Solid State Fermentation. *ITB Journal of Engineering Science*, 44(2), 93–105.

Recuperado el 13 febrero del 2015 de <http://doi.org/10.5614/itbj.eng.sci.2012.44.2.1>

Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., y Nigam, P. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*, 77(3), 247–255. Recuperado el 21 de octubre del 2014 de [http://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00080-8](http://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00080-8)

Rodríguez, S., y Toca, J. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances*, 24(5), 500–513. doi:10.1016/j.biotechadv.2006.04.003

Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27(2), 185–194. Recuperado el 25 de mayo del 2016 de <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>

Sánchez, J., Martínez, J., Segura, E., Contreras, J., Medina, M., Aguilar, C., y Iliná, A. (2014). Inmovilización de enzimas lignocelulolíticas en nanopartículas magnéticas. *Química Nova*, 37(3), 504–512. Recuperado el 29 de mayo del 2016 de <http://doi.org/10.5935/0100-4042.20140085>

Sheldon, R, y Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem. Soc. Rev.*, 42(15), 6223–6235. doi:10.1039/C3CS60075K

Shraddha, Shekher, R., Sehgal, S., Kamthania, M., y Kumar, A. (2011). Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme Research*, 2011(2011), 1-11. Recuperado el 12 de 01 de febrero del 2015 de <http://doi.org/10.4061/2011/217861>

Spinelli, D., Fatarella, E., Di Michele, A., y Pogni, R. (2013). Immobilization of fungal (*Trametes versicolor*) laccase onto Amberlite IR-120 H beads: Optimization and characterization. *Process Biochemistry*, 48(2), 218–223.

Recuperado el 03 de marzo del 2016 de <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.12.005>

- Téllez, M., Fernández, F., Montiel, A., Sánchez, C., y Díaz, G. (2008). Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(4), 675–679. Recuperado el 28 de abril del 2016 de <http://doi.org/10.1007/s00253-008-1628-6>
- Tinoco, R., Acevedo, A., Galindo, E., y Serrano-Carreón, L. (2011). Increasing *Pleurotus ostreatus* laccase production by culture medium optimization and copper/lignin synergistic induction. *Journal of Industrial Microbiology y Biotechnology*, 38(4), 531–540. Recuperado el 01 de mayo del 2015 de <http://doi.org/10.1007/s10295-010-0797-3>
- Tišma, M., Žnidaršič, P., Vasić, Đ., y Zelić, B. (2012). Optimization of Laccase production by *Trametes versicolor* cultivated on industrial waste. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(1), 36–46. Recuperado el 19 de junio del 215 de <http://doi.org/10.1007/s12010-011-9401-1>
- Urrea, E., Pérez, M., Cruz, C., Caminal, G., y Vicent, T. (2010). White-rot fungus-mediated degradation of the analgesic ketoprofen and identification of intermediates by HPLC-DAD-MS and NMR. *Chemosphere*, 78(4), 474–481. Recuperado el 22 de mayo del 2016 de <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.009>
- Vamanu, E. (2012). Biological activities of the polysaccharides produced in submerged culture of two edible *Pleurotus ostreatus* mushrooms. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012(2012), 1-8. Recuperado el 12 de octubre del 2015 de <http://doi.org/10.1155/2012/565974>
- Viswanath, B., Rajesh, B., Janardhan, A., Kumar, A., Narasimha, G., Viswanath, B., Narasimha, G. (2014). Fungal laccases and their

applications in bioremediation. *Enzyme Research*, 2014(2014), 1-21.  
doi:10.1155/2014/163242

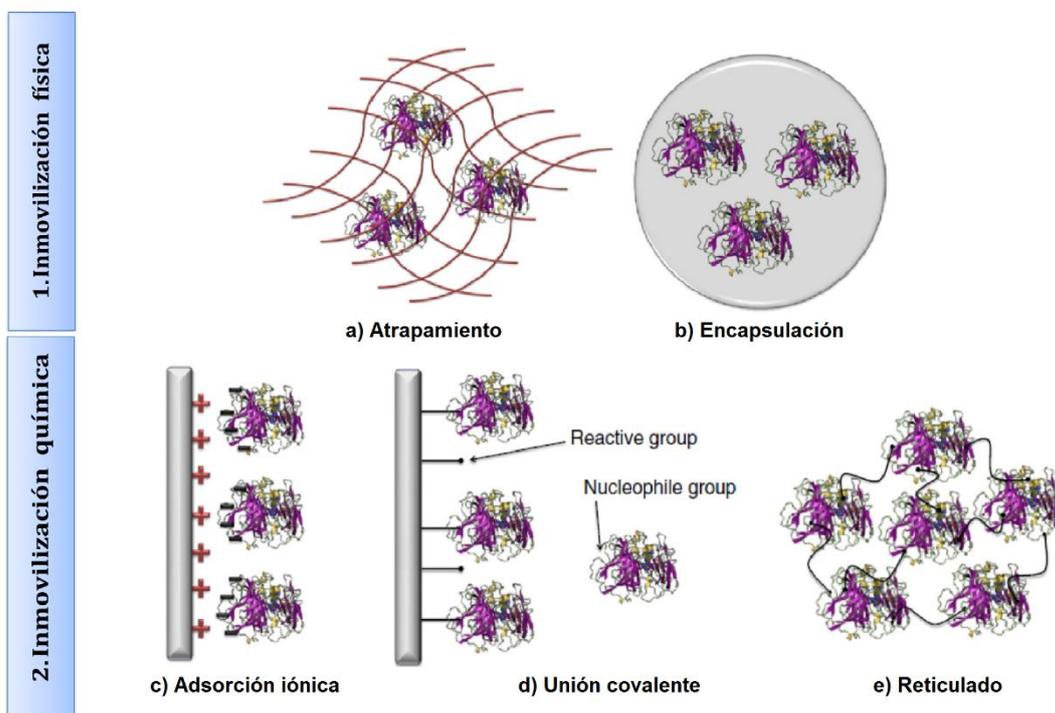
The world apple and pear association. (2016). Consumption of various forms of apples is associated with a better nutrient intake and improved nutrient adequacy in diets of children. Recuperado el 28 de junio del 2016 de [http://www.wapa-association.org/asp/research\\_studies.asp?num=0&cat\\_id=](http://www.wapa-association.org/asp/research_studies.asp?num=0&cat_id=)

Zhao, X., y Hardin, I. (2007). HPLC and spectrophotometric analysis of biodegradation of azo dyes by *Pleurotus ostreatus*. *Dyes and Pigments*, 73(3), 322–325. Recuperado el 11 de marzo del 2015 de <http://doi.org/10.1016/j.dyepig.2005.11.014>

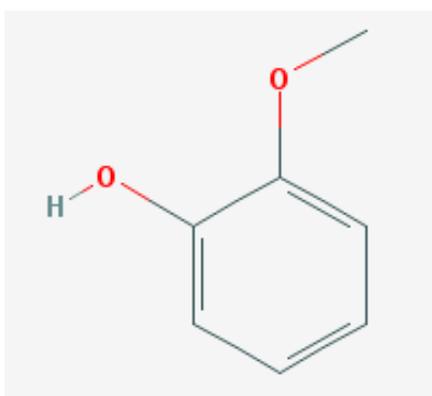
Zhou, Z., Li, G., y Li, Y. (2010). Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase on hybrid alginate-chitosan beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47(1), 21–26. Recuperado el 18 de junio del 2015 de <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.04.001>

**ANEXOS**

**Anexo 1. Métodos de inmovilización:** 1. Métodos de inmovilización física: a. atrapamiento b. encapsulación; 2. Métodos de inmovilización química: c. Adsorción iónica d. unión covalente e. encapsulación, modelo de agregados CLEAs. Tomado de Fernández, Sanromán y Moldes, 2013, pp. 1808–1825.



**Anexo 2. Estructura química del guayacol o 2-metoxifenol:** Se oxida en presencia de luz o aire, adquiriendo un tono café oscuro. Su estructura química presenta un hidrógeno donador de electrones y 2 oxígenos aceptores de electrones. Recuperado de la base de datos Pupchem compound número de CID: 460

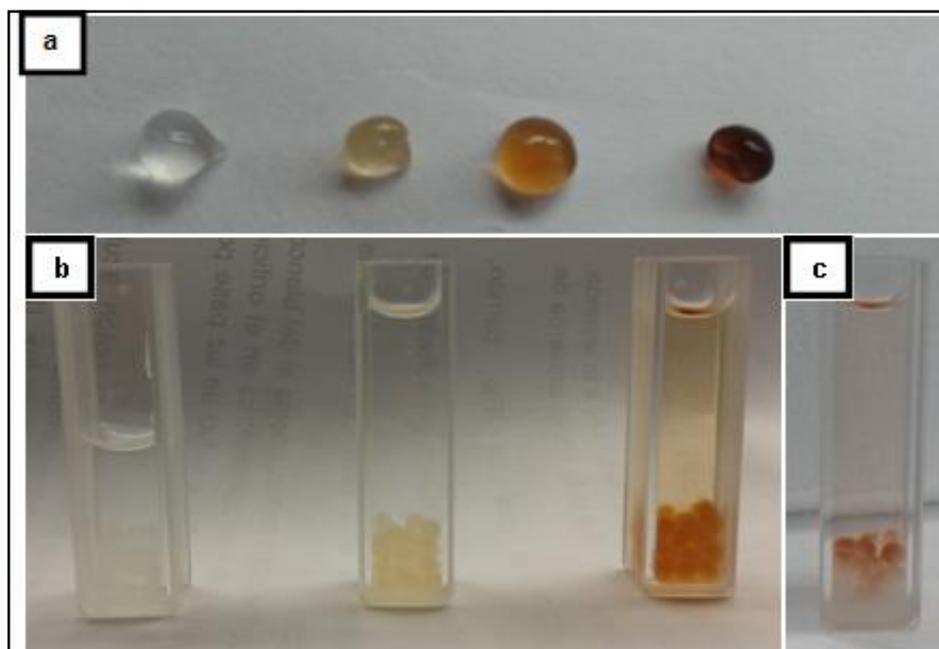


Características físico-químicas	
Formula química	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>
Peso molecular	121,14 g/mol
Densidad (sólido)	1,129 g/cm <sup>3</sup>
Punto de ebullición	205 °C
Solubilidad	1 g por 60-70 ml de H <sub>2</sub> O

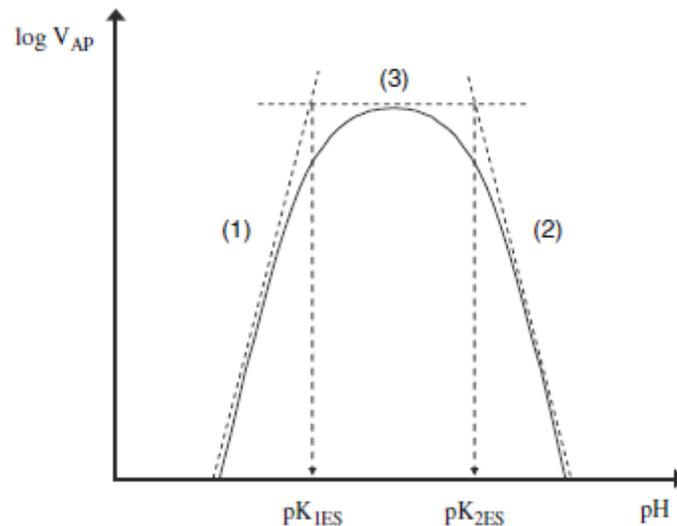
**Anexo 3.** Ensayos de evaluación del mejor sustrato como fuente de carbono para la producción y secreción de la enzima oxidoreductasa tipo lacasa a. glucosa; b. salvado de trigo; c. cascarilla de arroz.



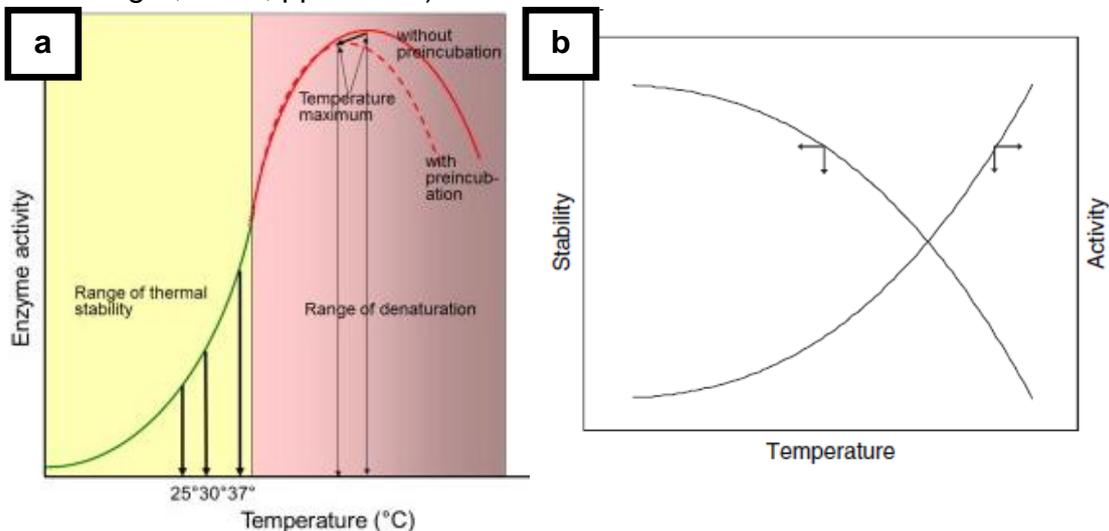
**Anexo 4. Inmovilización de la enzima lacasa:** a y b. Cambio colorimétrico de las perlas de alginato de calcio que contienen la enzima inmovilizada, al reaccionar con el sustrato guayacol; c. Recuperación del color de la perla de alginato de calcio después de 30 minutos de reacción.



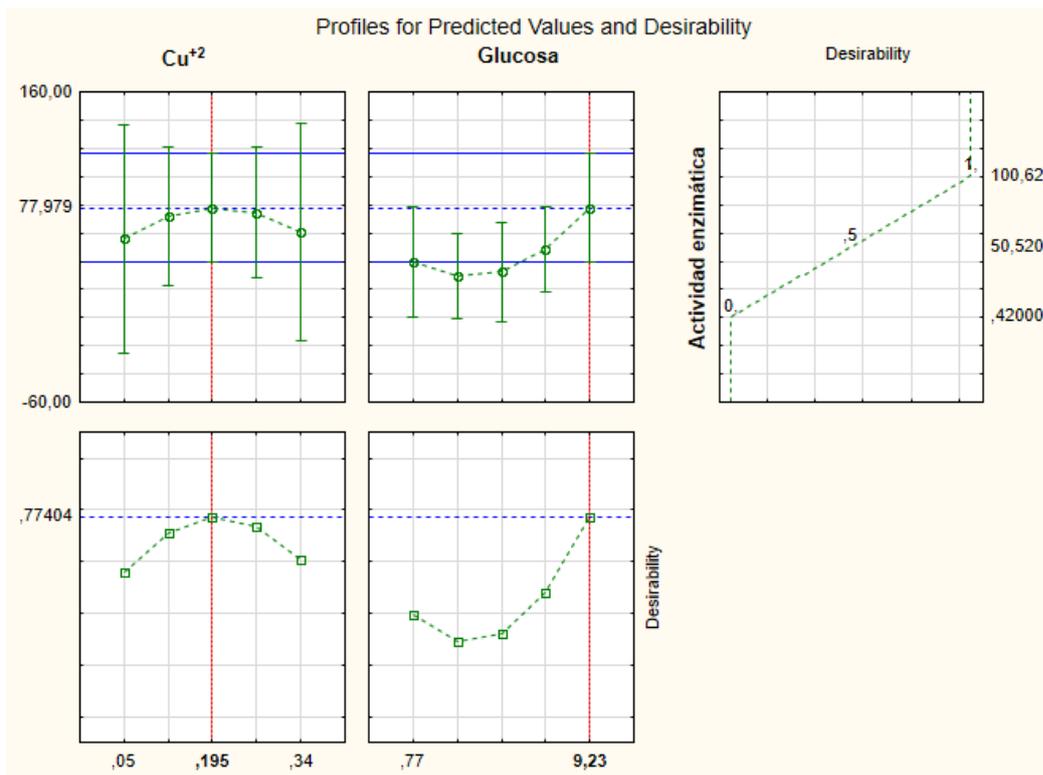
**Anexo 5. Curva del pH óptimo para la actividad de una enzima:** El pH al cual existe la mayor actividad enzimática, es considerado el pH óptimo. La inflexión de los puntos indican los respectivos valores de pK1 y pK2. El área comprendida entre los valores de pK1 y pK2 muestran el rango de estabilidad fisiológica (Illinares, 2008, pg. 139)



**Anexo 6. Curva de temperatura para la actividad de una enzima:** a. actividad enzimática es estable en rangos entre los 25°C-37°C, la temperatura y la actividad incrementan proporcionalme hasta alcanzar una temperatura máxima, punto en el cual la enzima se desnatura y pierde actividad; b. comportamiento de la estabilidad térmica de una enzima, mientras mayor sea el valor de la temperatura, su estabilidad decrecerá (Illinares, 2008, p. 140; Bisswanger, 2014, pp. 41–55).



**Anexo 7. Predicción del punto central para el ensayo de superficie de respuesta:** posterior al ensayo de superficie de respuesta en el cual se obtuvo con el T2 una actividad máxima de 100.62 U/mL y mediante el programa Statistica versión 9, se logró determinar que el punto central para un ensayo posterior sería 0.195 g/L para el ion  $\text{Cu}^{2+}$  y 9.23 g/L para la glucosa.



## Anexo 8. Siglas citadas durante el estudio

Siglas	Significado
ABTS	ácido 2.2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
DDT	Dicloro difenil tricloroetano
Desvest	Desviación estándar
DMP	2,6-dimetiloxifenol
EPR	resonancia paramagnética electrónica
ETAD	Ecological and Toxicological Association of the Dyestuffs Manufacturing Industry
LN	Linealización
PDA	Agar papa dextrosa
PUF	Esponjas de poliuretano
RSM	Metodología de superficie de respuesta
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SmF	Fermentación sumergida o líquida
SSF	Fermentación en estado sólido
WAPA	The world apple and pear association