

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
Centro de Estudios de Biotecnología Industrial



*“Obtención de lacasas de *Pleurotus* sp. en
residuales del café”*



**TESIS PRESENTADA EN OPCIÓN AL TÍTULO ACADÉMICO
DE MASTER EN BIOTECNOLOGÍA
MENCIÓN AMBIENTAL**

Autor: Lic .Ansoumane Kourouma

Tutoras: Dra.C. Suyén Rodríguez Pérez.

Dra. C.Rosa Catalina Bermúdez Savón.

Santiago de Cuba, 2007

Resumen

En el presente trabajo se valora el crecimiento, la excreción y obtención de la enzima lacasa en pulpa de café y el ELP, residual del cultivo de setas comestibles con la cepa CCEBI 3024. En el estudio se evidenció la producción de enzima lacasa (8.53 U/mL); (1.5 U/mL) y de la biomasa (1,9.1g/L) (5 g/L) en el ELP los cuales fueron mayores que en el sintético respectivamente.

En la FES se realizó la producción y la purificación de los crudos enzimáticos obtenidos a partir de dos tiempos de fermentación en los cuales hay mayor excreción de la enzima lacasa con el hongo *Pleurotus sp.* Se realizó además el estudio de la caracterización cinética de las isoenzimas obtenidas de cada proceso fermentativo. Se observan máximos de actividad enzimática con producción de proteínas extracelular, usando el ABTS y guayacol como sustratos. Donde los mayores valores de actividad enzimática se reportan para el guayacol 8.84 U/mL , 19.29 U/mL del crudo a los 10 días y a los 14 días de fermentación respectivamente. Se determinaron los parámetros cinéticos referidos a la caracterización de la isoenzima C, con una K_M aparente de $1,59 \cdot 10^{-3}$ mol/L y $5,12 \cdot 10^{-3}$ mol/L para el guayacol y el ABTS respectivamente. El estudio realizado contribuye al conocimiento teórico y la aplicación práctica de los hongos pudrición blanca, en la biodegradación de residuos agroindustriales y en la producción de enzima.

Leyenda.

AAO: Aril alcohol oxidasa

ABTS: ((2,2-azino-bis (3etilbenzotiazolina-6-sulfonato))

A.E: Actividad enzimática.

AEM: Agar Extracto de Malta.

APD: Agar Papa Dextrosa

CEBI: Centro de Estudios de Biotecnología Industria.

ϵ : Coeficiente de Extinción

DQO: Demanda química de oxígeno.

ELP: Extracto líquido de pulpa de café.

FES: Fermentación en estado sólido.

FS: Fermentación sumergida.

kDa: kiloDalton.

K_M : Constante de Michaelis.

LiP: Lignina Peroxidasa.

MnP: Manganese Peroxidasa.

PB: Pudrición blanca.

TA : Ácido tánico.

V_{max} : Velocidad máxima.

Índice

	Pág
I. -Introducción.	1
II. -Revisión bibliográfica.	4
II.1. - Empleo de los residuales del café para el cultivo de <i>Pleurotus sp.</i>	4
II.1.1. - Pulpa de café: poder contaminante y alternativas de tratamiento.	4
II.2. - Comparación entre la FES y la FS para la producción de metabolitos.	5
II.3. - Sistema ligninolítico de los hongos de pudrición blanca.	7
II.4. - <i>Pleurotus sp.</i>	9
II.5. - Características generales y aplicaciones de la lacasa.	10
II.5.1. - Características físico-químicas.	10
II.5.2. - Características estructurales y sitios de unión al cobre.	10
II.5.3. - Mecanismo catalítico de la lacasa.	11
II.5.4. - Sustratos de la lacasa e inhibidores.	12
II.6. - Aplicaciones.	13
III. -Materiales y Métodos.	15
III.1. - Materiales.	15
III.1.1. - Reactivos	15
III.2. - Equipos	16
III.3. - Organismo	17
III.4. - Medio de cultivo empleado	17
III.5. - Soluciones empleadas	17
III.6. - Residuales empleados	18
III.7. - Métodos.	19
III.7.1. - Metodología experimental.	19
III.7.2. - Cultivo de <i>Pleurotus sp.</i> en ELP:	19
III.7.3. - Cultivo de <i>Pleurotus sp.</i> en Pulpa de café.	19
III.7.4. - Extracción de la actividad enzimática del cultivo sólido.	22

III.8.	-Métodos analíticos empleados.	22
III.8.1.	-Análisis del contenido de azúcares reductores por DNS.	22
III.8.2.	-Determinación de Biomasa.	
III.8.3.	-Fraccionamiento cromatográfico del extracto enzimático extracelular.	23 23
III.8.4.	- Determinación de la actividad lacasa.	
III.8.5.	- Determinación de proteínas.	24
III.8.6	- Caracterización cinética	25
III.8.7	-Caracterización espectroscópica	25
III.9.	- Análisis estadísticos de los resultados.	26
IV.	-Resultados y Discusión.	26
IV.1.	- Excreción de la lacasa de <i>Pleurotus sp.</i> en FS..	27
IV.2.	- Excreción de la lacasa de <i>Pleurotus sp.</i> en FES.	27
IV.3.	- Purificación de la enzima por Cromatografía de intercambio iónico.	29
IV.3.1.	-Elución de las isoenzimas.	32
IV.4.	- Caracterización cinética de la enzima.	34
V.	-Conclusiones	34
VI.	-Recomendaciones	35
VII.	- Bibliografía.	36
	-Anexos	37

I.- Introducción

Uno de los grandes retos de la humanidad en este inicio del siglo XXI es convertir los procesos productivos en procesos limpios y eficientes energéticamente. Por otro lado, se requiere tener la capacidad tecnológica para restaurar los sitios del medio ambiente que han sido dañados. La biotecnología desempeña un papel importante en esta transformación tecnológica y dirige sus investigaciones en este campo, hacia la utilización de nuevas herramientas que prevengan, controlen y remedien la contaminación ambiental. Uno de los microorganismos responsables del reciclaje del carbono proveniente de la lignina, o degradadores de lignina, son los hongos de pudrición blanca que presentan un sistema enzimático poco específico con un uso potencial en la transformación de compuestos contaminantes y xenobióticos (Herrera y col., 1997).

El Centro de Estudios de Biotecnología Industrial de la Universidad de Oriente lleva a cabo investigaciones en la biodegradación de subproductos agroindustriales, que por su cantidad y difícil manejo causan contaminación del suelo y del agua. Una de las líneas de investigación más importantes del centro es la utilización de estos hongos en el tratamiento de efluentes coloreados y residuos sólidos para la producción de setas comestibles. Con estos fines se ha trabajado con el hongo *Pleurotus sp.*, el cual es uno de los hongos de pudrición blanca más estudiado y se cultiva como seta comestible, a nivel mundial está entre los cuatro más expandidos; por sus facilidades para crecer sobre una gran diversidad de residuos agroindustriales, por lo simple de su tecnología de cultivo y por la calidad nutritiva y organoléptica de su cuerpo fructífero (Sánchez y Royse , 2002). Ha sido usado además como fuente para la obtención de enzimas en diferentes sustratos (Mata, G. y col 2004).

Las enzimas están entre los productos más importantes obtenidos para satisfacer las necesidades humanas a través de las fuentes microbianas. Un amplio número de procesos industriales en las áreas de la industria alimentaria, medioambientales y la biotecnología utiliza las enzimas en sus procesos (Aehle, 2004; Rodríguez, 2005). El desarrollo actual en la biotecnología está rindiendo nuevas aplicaciones para las enzimas. Por lo que se requiere la búsqueda de medios que resulten apropiados y baratos para la obtención de las mismas, con el fin de abaratar los procesos y proceder a su implementación de forma viable (Arora. D ,2000).

Dentro de las enzimas constituyentes del complejo multienzimático ligninolítico de *Pleurotus sp.* se encuentra la lacasa (p-difenol: dioxígeno: oxido-reductasa, EC 1.10.3.2), la cual participa en la degradación de la lignina y compuestos similares en ausencia de lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa . Esta enzima ha sido empleada de forma inmovilizada para remover compuestos xenobióticos de residuales acuosos (Crecchio y col., 1995, Shüitzendüel y col., 1999), la detoxificación de compuestos fenólicos en vinos (Kersten y col., 1990), en la obtención de hidrolizados de ligninocelulosa antes de ser usados para la fermentación alcohólica por *S. cerevisiae* (Jönsson y col., 1998). Lacasas de otras fuentes como algunas plantas han sido usadas como biosensores para medir oxígeno en fase gaseosa.

En el caso de los residuales del café es incompleta la información que se tiene acerca de la obtención de las enzimas tanto por fermentación sumergida (FS), como por fermentación sólida (FES), por lo tanto la utilización de estos hongos pudiera ser una alternativa para disminuir el efecto contaminante de los residuales generados por la planta de setas comestibles del CEBI, y el aprovechamiento de los mismos para generar productos de alto valor agregado para el hombre como los alimentos, vitaminas, enzimas, bioabonos, etc...; de

esta manera hacer la tecnología limpia y ecológicamente viable. Por lo anterior se planteó la siguiente hipótesis

❖ Hipótesis

Es posible cultivar el *Pleurotus sp* sobre los residuales del café para la obtención de enzimas lacasas.

Objetivo General

Estudiar la producción de enzimas durante el cultivo de *Pleurotus sp.* por FS y FES sobre residuales del café.

Objetivos específicos

- 📌 Evaluar la actividad enzimática de las lacasas de la cepa CCEBI 3024 de *Pleurotus sp.* en el residual extracto líquido de pulpa (ELP).
- 📌 Evaluar la actividad enzimática de las lacasas de una cepa CCEBI 3024 de *Pleurotus sp* por FES sobre pulpa de café.
- 📌 Purificar las lacasas del crudo enzimático obtenido por FES.
- 📌 Determinar los parámetros cinéticos que caracterizan la actividad del crudo enzimático obtenido.

II. Revisión Bibliográfica

II.1. Empleo de los residuales del café para el cultivo de *Pleurotus sp.*

Desde el punto de vista económico, el café ha sido por muchos años, uno de los cultivos más rentables, tanto en América Latina, como en otras áreas del mundo. Como toda gran industria, la cafetalera genera subproductos sólidos y líquidos, caracterizados por su repercusión ambiental negativa.

Entre los desechos de café más importantes se encuentran la pulpa, el agua de despulpe y el agua de lavado de los granos fermentados, de ellas se plantea que la mitad de la contaminación corresponde al agua de percolado de la pulpa y la otra mitad al agua de fermentación del mucílago (Bressani, 1987; Morales, 1989). En un balance de materia realizado por Bressani y col. (1989) y expresadas en base seca, muestran que la pulpa constituye el 28,7 % de la materia seca de la cereza, el mucílago el 4,9 %, la cascarilla o pergamino el 11,9 % y el grano el 55,4%.

II.1.1. Pulpa de café: poder contaminante y alternativas de tratamiento.

La pulpa de café, tiene un alto contenido de lignina, potasio, cafeína, taninos y fenoles. En América Latina se considera el principal contaminante de los ríos y lagos cercanos a las zonas cafetaleras. Es por tanto necesario buscar nuevas alternativas para una racional transformación de la pulpa en beneficio de los cafetaleros y del medio ambiente.

Por su composición química (Braham y Bressani, 1978) la pulpa presenta potencialidades que son atractivas para ser empleadas como materia prima en diferentes tecnologías como son: producción de bioabono, producción de biogás, alimento animal y producción de setas comestibles (Lozano, 1991; Martínez-Carrera, 1989; Bermúdez, 2001). Estas tecnologías permiten utilizar

este subproducto, y a su vez generar beneficios en el orden económico, social y ambiental.

En el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), de la Universidad de Oriente, en Santiago de Cuba, se ha estudiado la tecnología de producción de setas comestibles del género *Pleurotus sp* empleando la pulpa de café como sustrato, en este proceso la pulpa se somete a un tratamiento de pasteurización antes de ser inoculada con el micelio del hongo. Durante este tratamiento se genera un residuo líquido de color negro muy intenso denominado Extracto Líquido de Pulpa (ELP) el cual contiene los elementos de la fracción soluble de la pulpa de café tales como el ácido clorogénico y el caféico. Este efluente es vertido al medio, convirtiéndose en un factor contaminante del proceso, por lo que la utilización de cepas de este género en el tratamiento de efluentes coloreados pudiera ser una alternativa para disminuir el efecto contaminante de este residual líquido y de esta manera hacer esta tecnología limpia y ecológicamente viable.

➤ Extracto líquido de Pulpa de Café

El color presente en el residual extracto líquido de pulpa de café (ELP); tiene su origen en compuestos de diferentes naturaleza, pero de forma general el color es debido a la presencia de compuestos orgánicos de alto peso molecular con estructuras complejas, presencia de compuestos fenólicos y otros, mostrado por la caracterización de este residual (Rodríguez, 2006)

II.2. Comparación entre la Fermentación en estado sólido (FES) y la Fermentación sumergida (FS) para producción de metabolitos.

La FES ha sido descrita por tener una alta potencialidad para la producción de enzimas (Pandey, 1991). Además este tipo de fermentación es apropiado

cuando se tiene un interés especial en los procesos donde los productos del crudo fermentado, pueden ser usados directamente como fuente de enzima.

La utilización de los residuos en FES y su adición y aplicaciones convencionales en alimentación y producción de enzimas microbianas han tenido un papel significativo en la biotransformación incluyendo solventes orgánicos, principalmente por componentes bioactivos (Rodríguez, 2005; Pérez, 2003).

Los residuos agroindustriales son generalmente considerados como los mejores sustratos para los procesos del FES y el uso de FES para la producción de enzimas no tiene excepción en esto. Diferentes sustratos han sido empleados para el cultivo de diversas enzimas. (Sánchez y Royse, 2002; Pérez, 2003)

Este sistema ofrece numerosas ventajas sobre el sistema de fermentación sumergida incluyendo altura, volúmenes, productividad relativamente alta de concentración de productos, una menor generación de efluentes.

Las principales ventajas de la fermentación sólida con respecto a la fermentación sumergida. (Pérez, 2003)

1. Estudios comparativos entre la FES y la FS, muestran que la primera es mas limpia y con mayores rendimientos.
2. La baja cantidad de agua reduce las posibilidades de contaminación por bacterias y levaduras. Esto en algunos casos permite trabajar en condiciones no estériles.
3. Se puede trabajar en condiciones ambientales similares a las de las condiciones de hábitat naturales cuando se emplean hongos, los cuales constituyen el principal grupo de microorganismos usados en FES.
4. Hay mayores niveles de aireación, especialmente en aquellos procesos que demandan un metabolismo oxidativo intenso.

5. La inoculación con esporas (en aquellos procesos que involucran hongos) facilita su dispersión uniforme a través del medio.
6. Los medios de cultivo son, a menudo muy simples. El sustrato usualmente provee los nutrientes necesarios para el crecimiento.
7. Se emplean diseños de reactores sencillos, con pocos requerimientos espaciales, debido a la naturaleza concentrada de los sustratos.
8. Son necesarios bajos requerimientos energéticos (en algunos casos el autoclavado, el tratamiento con vapor, la agitación mecánica y la aireación no son necesarios).
9. Emite pequeños volúmenes de efluentes contaminantes. Son necesarios más bajos requerimientos de disolventes para la extracción del producto por su alta concentración.
10. La baja humedad puede favorecer la producción de compuestos específicos que no pueden ser o pobremente producidos en FS.
11. Debido a la naturaleza concentrada del sustrato, pueden ser usados reactores más pequeños en FES, que en FS, con la misma cantidad de sustrato.

Todas estas ventajas son importantes y deben tenerse en cuenta no sólo por el aspecto económico, sino también por el aspecto ambiental, ya que la fermentación en medio sólido de modo general, tiene menor impacto sobre el medio ambiente.

II.3. Sistema ligninolítico de los hongos de pudrición blanca.

Los hongos de pudrición blanca son basidiomicetos, comunes en bosques de pino y encino, la nominación de estos hongos, deriva de su capacidad de mineralización de la lignina y sus derivados que le da a la madera un aspecto blanquecino (Pointing, 2001), estos hongos realizan una función natural

esencial en la degradación de la lignina, que es un polímero polifenólico heterogéneo que se degrada por oxidación y cuya producción es de 20.3×10^{12} kg/año. El reciclaje de la lignina por estos hongos, es un factor fundamental del ciclo del carbono en los bosques ya que constituye una de las mayores reservas de carbono orgánico del suelo.

Los hongos de pudrición blanca secretan varias enzimas extracelulares oxidativas esenciales en la mineralización de lignina. El patrón de actividad de estas enzimas es específico del género y especie de hongo de PB involucrado, por lo que se pueden clasificar en tres grandes grupos según la producción de enzimas extacelulares de su sistema ligninolítico (Kerem y Hadar, 1998):

- ❖ Grupo Lignina Peroxidasa (LiP) - Manganese Peroxidasa (MnP): En este grupo se encuentra el hongo de pudrición blanca más estudiado *Phanerochaete chrysosporium* que es una eficiente degradador de lignina y que posee ciertas propiedades industriales aprovechables selectiva en el biopulpeo. Existen otros hongos en este grupo como son *Trametes versicolor*, *Phlebia rabiata* y *Bjerkandera adusta* entre otros.
- ❖ Grupo LiP - Lacasa: Sólo dos hongos han sido encontrado en este grupo, los cuales degradan pobremente la lignina a CO_2 por la ausencia de la enzima MnP, aún a altas concentraciones de Mn^{2+} .
- ❖ Grupo Lacasa - MnP: Muchos de los hongos de pudrición blanca no producen aparentemente LiP, siendo esta la combinación enzimática más encontrada usualmente. Como ejemplo de este grupo tenemos el *Panus tigrinus*, *Lentinus tigrinus* y *Rigidosporus lignosus* entre otros. Dentro de ellos se encuentran hongos comestibles como *Pleurotus Ostreatus* que poseen además otro sistema enzimático que involucra a las enzimas Lacasa y Aril alcohol oxidasa (AAO).

El sistema enzimático ligninolítico presente en los hongos de pudrición blanca es muy complejo e implica diferentes actividades, algunas básicas y otras complementarias, todas necesarias para completar el proceso.

II.4. Pleurotus sp.

Pleurotus sp. es un hongo comestible del género de los basidiomicetos, que se caracteriza por crecer sobre una gran diversidad de sustratos, lo cual lo convierte en un candidato ideal para el aprovechamiento de desechos agropecuarios tales como cañeros, cafetaleros, paja de arroz etc (Fan y col, 2003). Este hongo posee además una alta calidad nutritiva y organoléptica de su cuerpo fructífero (García, 1999), debido a la presencia de proteínas que contienen todos los amino ácidos esenciales, con una calidad muy cercana a la proteína animal (Lelley, 1987), también contiene carbohidratos poliméricos tales como el glucógeno y la quitina, y otros compuestos carbonados de bajo peso molecular.

El hongo *Pleurotus sp.* Posee una maquinaria enzimática muy compleja que le permite degradar los grandes polímeros (lignina y celulosa) que componen la madera. Entre las enzimas más ampliamente estudiadas se encuentra la lacasa y se ha evolucionado para adaptarse a diferentes condiciones ambientales (Rodríguez, 2005). En tales condiciones cuando las lacasas son secretadas, funcionan de manera inusual. Esta habilidad adaptativa es importante en términos de aplicaciones industriales, como por ejemplo, en blanqueo de textiles, de pulpa de papel, en biorremediación y en síntesis orgánica.

II.5. Características generales de las lacasas

II.5.1. Características físico-químicas

El rango de pH de mayor actividad de esta enzima es de 4.0 a 7.0 con un pH óptimo de 6.0 y una pérdida significativa de la actividad a pH 7.5. El intervalo de temperatura de trabajo es de 24° C a 60° C con una temperatura óptima de 50°C y una rápida pérdida de la actividad a temperaturas mayores de 60°C, probablemente por la desnaturalización de la enzima (Yaropolov y col., 1994). El potencial redox es de 0.8-1V. La producción de esta enzima puede ser fuertemente inducida por la adición de CuSO₄ provocando un incremento de la actividad total y la producción de una nueva isoenzima (Palmieri y col. 1997). La enzima Lacasa es producida en múltiples isoformas en dependencia de la especie de hongo y las condiciones del medio de cultivo.

II.5.2. Características estructurales y sitios de unión al cobre.

Las lacasas son glucoproteínas con 4 átomos de cobre y de peso molecular variable (D'Souza et al., 1996). Los átomos de cobre están clasificados en tres tipos (1, 2 y 3) con diferentes propiedades (Shin et al., 1996; Yaropolov et al., 1994):

Cobre tipo I (T1): es responsable del color azul de la proteína. Tiene una alta absorbancia en la región del visible (605 nm) provocada por la unión covalente cobre-cisteína. Debido al alto potencial redox de este cobre es el sitio donde ocurre la oxidación del sustrato.

Cobre tipo 2 (T2): se caracteriza por no presentar absorbancia detectable en la región del visible y por tener una alta afinidad por aniones (F⁻, CN⁻...) que actúan como inhibidores de la actividad del enzima.

Cobre tipo 3 (T3): es un complejo binario formado por un par de iones Cu^{2+} - Cu^{2+} unidos por puente hidroxilo con un máximo de absorbancia a 330 nm y un espectro de fluorescencia característico.

Los cobre **T2** y **T3** forman un cluster trinuclear que es el lugar donde se reduce el oxígeno (Thurston, 1994). El cobre del centro T1 es el primer aceptor de electrones del sustrato. Después los electrones se transfieren secuencialmente al centro **T2-T3** que tras recibir cuatro electrones reducen una molécula de oxígeno a agua. Así la oxidación monoelectrónica del sustrato va acoplada a la reducción por cuatro electrones del oxígeno molecular.

II.5.3. Mecanismo catalítico de la lacasa

La lacasa es producida por casi todos los basidiomicetos transformadores de madera, como parte del sistema enzimático ligninolítico. La lacasa (*p*-difenol: dioxígeno: oxido-reductasa, EC 1.10.3.2) es una multicobre azul oxidasa que cataliza la oxidación unielectrónica de orto y para difenoles, aminas aromáticas, por remoción de un electrón y un protón de un grupo hidroxilo para formar un radical libre (Bezalel y col, 1996). Esta puede además catalizar la ruptura alquil-fenil y C -C de dímeros fenólicos de la lignina y la demetoxilación de muchos compuestos modelos de la lignina (Keren y Hadar, 1998). Su actividad de oxidación es acompañada por la reducción del oxígeno molecular a agua, lo cual la diferencia de las peroxidasa, al no necesitar al H_2O_2 en su acción oxidativa.

Este grupo de oxidasas azules extracelular N-glicosilada puede presentar un tamaño de 60-390 kDa.

La reacción que cataliza la lacasa se puede representar de la siguiente forma:



II.5.4. Sustratos de la lacasa e inhibidores.

Varios sustratos han sido usados para la determinación de esta enzima tales como el ABTS ((2,2-azino-bis (3etilbenzotiazolina-6-sulfonato)), el guayacol (orto-metoxifenol), dimetoxifenol y la syringaldazina. El sustrato artificial de la lacasa ABTS es el más comúnmente empleado para la determinación de la actividad debido a su alta afinidad, pero requiere de un pH ácido (pH=3) para su uso, siendo estable para un rango estrecho del mismo (Palmieri y col., 1997). Este puede actuar como mediador, permitiendo la oxidación de compuestos modelos de la lignina no fenólicos que por su estructura no son sustratos en particular de la lacasa.

Esta enzima presenta una inhibición total a concentraciones de 0.05 mmol/L de ácido tioglicólico, y 0.02 mmol/L de ácido sódico mientras que para el EDTA empieza a observarse inhibición a concentraciones mayores de 50 mmol/L según datos reportados por Palmieri y col. (1997).

La oxidación puede estar controlada por las diferencias en potencial redox entre los sustratos reductores y el cobre tipo 1 de la lacasa (Thurston, 1994). Generalmente las lacasas tienen baja especificidad por estos sustratos en relación al oxígeno. La oxidación monoelectrónica por la lacasa implica la formación de un radical libre. Estos radicales posteriormente pueden ser oxidados a quinonas por la enzima o bien sufrir reacciones enzimáticas variadas.

La oxidación de fenoles frecuentemente produce reacciones de acoplamiento carbono-carbono y carbono- oxígeno entre los radicales lo que origina productos de mayor peso molecular que los sustratos, es decir reacciones de polimerización.

II.6. Aplicaciones de la lacasa.

Las principales aplicaciones de las lacasas se encuentran en la industria del papel, Principalmente en el blanqueo biológico y en la detoxificación de efluentes. Existen trabajos sobre inmovilización de las lacasas solas o con mediadores como Pulp-Zyme, Novo-Nordisk (que utiliza la lacasa- ABTS) (Addleman y Archibald 1993; Reid y Paice, 1994).

Esta enzima inmovilizada ha sido empleada para la detoxificación de compuestos fenólicos en vinos (Kersten y col, 1990) y para mejorar la producción de etanol de materia prima renovable.

También un nuevo método enzimático basado en la lacasa se ha desarrollado para la diferenciación de morfina de la codeína simultáneamente en muestra de droga, inyectado en un sistema de detección de flujo (Oldair y col; 2003).

Un biosensor de pasta de carbono con un extracto bruto enzimático modificado del *Pleurotus ostreatus* como fuente de lacasa esta propuesta para la determinación de catecolamina en formulaciones farmacéuticas. Esta enzima cataliza la oxidación de Adrenalina o Dopamina en sus correspondientes quinonas y el corriente obtenido en la reducción electroquímica de cada producto esta relacionada con la concentración de estas catecolamina en las soluciones de la muestra.

Esta enzima se ha empleado como un sustituyente de la peroxidasa de rábano (Kersten y col., 1990) en los inmunoensayos enzimático por ser más sensible y simple su uso como marcador, ya que la peroxidasa de rábano exhibe un amplio espectro de tinción y forma ocasionalmente complejos no productivos con el H_2O_2 .

Existen actualmente numerosas aplicaciones de la lacasa como biosensores, teniendo como ejemplo los electrodos con enzimas inmovilizadas para medir el contenido de fenoles de muestras acuosas. (Zouari y col., 1994) y de forma más específica, para la determinación en jugos de frutas, té, y otros brebajes (Cliffe y col., 1994; Yaropolov y col., 1994). Lacasas de otras fuentes como algunas plantas han sido usadas como biosensores para medir oxígeno en fase gaseosa.

La tendencia de la lacasa de provocar reacciones de polimerización no es una desventaja en biorremediación puesto que la polimerización oxidativa de los contaminantes puede ser un método efectivo para su eliminación.

Sin embargo otros autores plantean que las lacasas naturales no siempre son adaptables para aplicaciones industriales (Mayer y Stamples, 2002).

III. Materiales y Métodos

Esta investigación se realizó en los laboratorios del Centro de Estudio de Biotecnología Industrial (CEBI) de la Universidad de Oriente.

III.1. Reactivos

ABTS	SIGMA
Ácido acético	IMEFA
Acetato de sodio	IMEFA
Ácido Cafeico	SIGMA
Ácido 3,5-dinitrosalicílico	PANCREAC
Albúmina de suero bovino	SIGMA
Carbonato de sodio	REACHIM
Citrato de sodio	ANALAR
Cloruro de manganeso (II) tetrahidratado	MERCK
Cloruro de sodio	PANCREAC
Dihidrógenofosfato de potasio	REACHIM
Dihidrógenofosfato de sodio	REACHIM
Extracto de levadura	OXOID
Etanol	COMERCIAL
Fenol	FLUKA
Glucosa	REACHIM
Glucosa anhidra	PANCREAC
Guayacol	SIGMA
Hidrógenofosfato de potasio	REACHIM
Hidrógenofosfato de sodio	BDH

Hidróxido de sodio	MERCK
Peptona	PANREAC
Peroxido de hidrogeno al 30%	IMEFA
Siringaldazina	SIGMA
Sulfato de cobre pentahidratado	REACHIM
Sulfato de magnesio heptahidratado	FLUKA
Sulfito de sodio	REACHIM
Tartrato de sodio y potasio	REACHIM

III.2. Equipos

- 1) Autoclave vertical (BK-25)
- 2) Zaranda (MIZARD.2001)
- 3) Espectrofotómetro UV/VIS (GENESYS. 10)
- 4) Espectrofotómetro UV/VIS (Shangai Optical Instrument Factory 53WBI)
- 5) Estufa (FRANK SKORCZEMKI KG)
- 6) Horno (VEBE Bebau)
- 7) Balanza analítica (SARTORIO)
- 8) Balanza técnica (NAGEMA)
- 9) Plancha eléctrica (MLW LP300)
- 10) pH-metro (MESSGERAT, MV88)
- 11) Centrifuga clínica (Clay Adams)
- 12) Incubadora (MYTRON)
- 13) Filtro Millipore TYPE GS 0.22 μm
- 14) Agitador magnético (MLW) RDA Modelo UR-2
- 15) Columna cromatográfica (21,4 x 5 cm)
- 16) Membrana de diálisis (Amicon PM-10)

III.3. Organismo

Se trabajó con la cepa CCEBI 3024 del género *Pleurotus sp.*, perteneciente a la Colección de Cultivo del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial de la Universidad de Oriente, conservadas en Agar Extracto de Malta a 4 °C.

III.4. Medio de cultivo empleado

Para el cultivo en medio líquido de este hongo ligninolítico se empleó el medio reportado por Martínez (1997) constituido por: 2 % de glucosa, 0.5 % de peptona, 0.2 % de extracto de levadura, 0.2 % de KH_2PO_4 , 0.05 % de MgSO_4 y 150 $\mu\text{mol/L}$ de CuSO_4 . Además se utilizaron otros medios de cultivo comerciales de gran calidad para el cultivo, Agar Papa Dextrosa APD (para el crecimiento de *Pleurotus* en placa)

Se ajustó el pH a 6 y se autoclavó a 120 °C y 1 atmósfera.

III.5. Soluciones empleadas

- **Reactivo DNS:** Pesar 10.6 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico y 19.8 g NaOH, disolver en 150 mL de agua destilada caliente a 80 °C. Pesar 306 g de tartrato de sodio y potasio, 16 g de fenol y 8.3 g de sulfito de sodio, disolver en 600 mL de agua destilada. Unir ambas soluciones y llevar a 1 L con agua destilada. Guardar en frasco ámbar en un lugar fresco (estable por un mes).
- **Solución de guayacol al 20 mmol/L (orto-metoxifenol):** disolver 210 μL de guayacol en agua y enrasar en un volumétrico de 100 mL.
- **Solución tampón acetato de sodio 20mmol/L ó 20 mM:** 0,82 g de NaCH_3COO en 100 mL de agua destilada y ajustar a pH 4,5 con una solución preparada de ácido acético.

- **Solución tampón fosfato 50 mmol/L:** 0.6 g de NaH_2PO_4 en 100 mL de agua destilada y ajustar a pH 6 con una solución preparada con 0.71 g de NaHPO_4 disueltos en 100 mL de agua destilada.
- **Reactivo de Benedict:** Disolver en agua destilada caliente 173 mL de citrato de sodio y 100 g de Na_2CO_3 . Disolver aparte 17,3 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de agua destilada. Mezclar ambas soluciones y enrasar a 1 L con agua destilada.
- **Solución de patrón de seroalbúmina bovina:** Se prepara una solución de concentración final 1g/L a partir del reactivo.
- **Solución ABTS 20mmol/L** (Ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)): disolver 1,097g de ABTS en 100 mL de agua destilada y guardar en un frasco ámbar.
- **Solución de siringaldazina** (4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde azine) (1mM): disolver 0.0360 g de siringaldazina en 100 mL de agua destilada.

III.6. Residuales empleados

- **Pulpa de café,** la pulpa de café utilizada procede de la finca “La Mandarina”, Cruce de los Baños, Santiago de Cuba.
- **Extracto líquido de pulpa de café (ELP).** residual de la pasteurización de la pulpa, que proviene de la planta de setas comestibles del CEBI. Para este trabajo se utilizó el residual al 100 %, y suplementado con los componentes del medio descrito en III.4.

III.7 - Métodos.

III.7.1. Metodología experimental

Para el estudio de la producción de lacasa durante el cultivo de *Pleurotus sp.* sobre pulpa de café, se realizó un estudio cinético que abarcó la etapa de colonización (crecimiento del micelio) y otros dos en la etapa de fructificación (35 y 60 días). Para ello se prepararon bolsas de 250 g de pulpa de café húmeda (75 % de humedad) y se inocularon como posteriormente se describe. La actividad lacasa fue monitoreada, utilizando dos sustratos, guayacol y ABTS, como se refiere en el acápite III. 8.4

III.7. 2. Cultivo de *Pleurotus sp.* en ELP:

En este experimento se utilizó como inóculo el micelio crecido en una placa de 9 cm de diámetro en Agar Papa Dextrosa (APD) de la cepa CCEBI 3024 , el cual fue raspado con una espátula estéril y adicionado en un erlenmeyer que contiene 50 mL de NaCl al 1% y agitado vigorosamente. Luego se tomaron 5 mL de esta mezcla y se inocularon en balones de 50 mL de medio sintético o residual ELP. Este fue el procedimiento empleado para la inoculación del organismo, en todos los casos.

Todos los cultivos de micelio fueron sumergidos con agitación en zaranda en la oscuridad y con temperatura de 27-30 °C. El tiempo de fermentación fue de 15 días a menos que se especifique.

III.7.3. Cultivo de *Pleurotus sp.* en Pulpa de café.(García, 1999)

1. Preparación del inóculo.

Para iniciar la producción del inóculo se siembra la cepa en placas Petri con Agar Malta, colocando una pequeña porción en el centro de la placa con el asa de siembra, para lograr una colonia gigante. Se incuba a 28 °C durante dos o tres semanas, hasta que el micelio cubra toda la placa.

Como inóculo primario antes de la siembra en Pulpa de café se utilizó el trigo. Con las semillas de trigo se procede a su limpieza, remojo en agua durante 24 horas, desinfección con Benomyl y esterilización en autoclave a 121 °C durante una hora.

Generalmente para la esterilización se emplean frascos de vidrio de boca ancha (Omnia) de 750 - 1 000 mL aunque también es factible el uso de bolsas plásticas de polipropileno resistentes al calor.

Cuando el soporte está completamente estéril y enfriado se procede a su inoculación en el propio envase, posteriormente se mantiene en reposo a una temperatura de 28 – 30 °C, en penumbras hasta lograr la total propagación del micelio.

Los frascos inoculados directamente de la placa Petri se llaman inóculos primarios, los cuales se emplean para inocular en otros frascos; llamados inóculos secundarios. Para grandes producciones es necesario propagar el micelio en un número significativo de frascos, lo cual se logra de inóculos secundarios a terciarios.

El inóculo producido de esta forma debe ser almacenado en frío (4-6 °C) hasta su utilización.

2. Preparación del sustrato.

El procedimiento que se utilizó es el siguiente:

- Moler el residual hasta obtener un tamaño de partícula entre 1 y 3 cm.
- Limpiar el residual y eliminar los cuerpos extraños.
- Remojar en agua por 24 horas.
- Escurrir.
- Pasteurizar por una hora a 90 °C.
- Escurrir y remojar en solución fúngica al 0.02 % por espacio de 5-10 minutos.

- Drenar hasta alcanzar un 75 % de humedad.

3. Inoculación y montaje.

Se realiza mezclando el inóculo con el sustrato; a una razón del 10 % de inóculo con relación al peso de sustrato húmedo; homogeneizando de forma tal que todo el inóculo se distribuya en el volumen de sustrato. Se empaca en bolsas de PVC transparentes, cuidando no dejar espacios libres, se sellan y se eliminan las puntas para favorecer el intercambio con el medio. Se colocan en los estantes ubicados en el cuarto de colonización.

4. Colonización.

Se realiza en un local con penumbra a una temperatura entre 26 y 28 °C y humedad de un 70-80 %. En esta etapa el micelio de *Pleurotus sp.* se desarrolla de forma vegetativa sobre toda la masa del sustrato. Al tercer día de colocadas las bolsas se realizan perforaciones de 1 cm. de diámetro separadas por 8 cm cada una.

5. Fructificación

Una vez colonizado el sustrato, el hongo cambia de su fase de crecimiento vegetativa al desarrollo de los cuerpos fructíferos, por lo que se realizan cambios en las condiciones establecidas para la estimulación y desarrollo de los mismos.

-Humedad: Entre 90 – 95 %; se logra mediante el rociado de 3 a 5 veces en el día.

-Temperatura: Entre 24 – 26 °C

-Iluminación: Se requiere de más de 400 lux, en foto períodos de 12 h/días; se logra con lámparas fluorescentes en el techo y paredes.

-Ventilación: Es decisivo eliminar el CO₂ producido durante la respiración del hongo, se logra mediante extractor de aire, removiendo el aire 2 ó 3 veces por hora.

Cuando aparecen los brotes o primordios se comienza a inducir con iluminación, una vez desarrollado el cuerpo fructífero o setas, lo cual se indica cuando la oreja del hongo se encuentra en forma plana, la cosecha se hace cortando el estípite con un cuchillo, justo a la base del tallo en la unión con el sustrato, aunque pueden tomarse delicadamente los hongos con las manos, sin dañarlos y sin producir hoyos en el sustrato.

III.7.4. Extracción de la actividad enzimática del cultivo sólido.

Se realizó la extracción de la actividad enzimática extracelular producida durante la fermentación sólida de *Pleurotus sp.* sobre pulpa de café como sustrato. Para ello se tomaron las bolsas de nylon transparente de 30 x 15 cm, con un contenido de 250 g de pulpa café al 75 % de humedad, sobre las cuales el hongo creció. Durante la fermentación se siguió la cinética de excreción de la enzima lacasa en dicho medio cada 7 días.

Se suspendió el contenido de la bolsa en 200 mL de agua destilada, se puso a zarandear suavemente durante 1 hora, después se filtró con un medio filtrante (una gasa o papel de filtro) y el sobrenadante se centrifugó durante 10 minutos a 5 000 rpm.

III.8 -Métodos analíticos empleados

III.8.1. Análisis del contenido de azúcares reductores por DNS (Miller, 1959)

Fundamento: Este método se basa en determinación colorimétrica de los azúcares reductores por la formación de un compuesto coloreado, producto de la reducción del ácido 3.5-Dinitrosalicílico a 3-nitro-5-aminosalicílico. El

contenido de azúcares reductores es determinado por Interpolación en la curva de calibración.

Procedimiento

- 1 Curva de calibración: De la solución preparada de 1g/L de glucosa tomar 4, 5 , 6.5, 7.5, 8.5, 10 mL y enrasar en volumétricos de 10 mL.
- 2 En un tubo de ensayo añadir 0.5 mL de muestra y 1 mL de reactivos DNS.
- 3 Calentar en baños de agua hirviendo 10 minutos.
- 4 Enfriar y añadir agua destilada hasta completar 5mL.
- 5 Leer contra blanco de reactivo a 530nm.

Cálculos

$$\text{Glucosa (g/L)} = X * \text{FD.} \quad (2)$$

Donde X es el valor obtenido por interpolación en curva de calibración y FD es el factor de dilución.

III.8.2. Determinación de Biomasa (APHA; 1998).

La biomasa crecida del hongo fue secada en estufa a 103-105⁰C hasta peso constante.

III.8.3. Fraccionamiento cromatográfico del extracto enzimático extracelular.

Una vez conocidos los tiempos de mayor actividad para la lacasa, se volvieron a montar bolsas cultivadas con este hongo y se dejó crecer para éste tiempo. Se procedió a la extracción, como se describió y luego a la semipurificación para la actividad enzimática de interés (la lacasa).

Para ello se procedió a la extracción de los caldos a los 10 días y luego a los 14 días del cultivo de *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 en pulpa de café. Para la obtención del caldo se procedió a resuspender el contenido de las bolsas plásticas previamente colonizado en buffer fosfato a pH 6,5 y en agua destilada para 10 días y 14 días de fermentación respectivamente, puesto que las determinaciones se hacen en fase acuosa. Luego se puso en agitación durante una hora, después se filtró con una gasa y papel de filtro. Las proteínas extracelulares fueron separadas del medio mediante precipitación del medio filtrado, empleando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta el 80% de saturación y posterior centrifugación a 5.000 rpm por 30 minutos. El precipitado fue resuspendido en tampón fosfato de sodio 50 mmol/L a pH 6,5 y dializado contra el mismo buffer al menos tres veces por un espacio de 24 horas. La muestra fue nuevamente centrifugada y el sobrenadante cargado a una columna cromatográfica (21,4 x 5 cm) de Q- Sepharose Fast Flow previamente equilibrado con el mismo buffer. La columna se lavó a un flujo de 0.5 mL/min con 200 mL del fosfato y la proteína retenida en la matriz, se eluyó con la aplicación de un gradiente discontinuo de NaCl de 0.1, 0.3 y 0.5 mol/L (100 mL). El eluato se colectó en fracciones de 4 mililitro y las fracciones activas fueron identificadas por valores de actividad lacasa, usando ABTS y guayacol como sustratos. Finalmente se agruparon las fracciones que contienen mayor actividad lacasa y se determinaron la concentración de proteínas por Microbiuret.

III.8.4. -Determinación de la actividad lacasa

- La actividad lacasa se determinó mediante la oxidación de del sustrato guayacol a 470 nm (Palmieri y col., 1997), ($\epsilon=6740 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) en una mezcla de reacción a 30° C, que contiene 10 mmol/L de guayacol y 50 mmol /L de tampón fosfato a pH 6 y una alícuota de 200 μL de la muestra, para un volumen final del ensayo de 2mL.

- El ensayo de la actividad lacasa con ABTS se realizó según modificación realizada por Palmieri y col. (1997) al método descrito por Wolfenden Wilson (1982). La mezcla de la reacción contiene 20 mmol/L de ABTS en 0,1 mol/L de tampón citrato de sodio, pH 3,0. La oxidación del sustrato ABTS se siguió a través del incremento de la absorbancia a 420 nm ($\epsilon=36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

III.8.5 - Determinación de proteínas

La concentración de proteínas de los sobrenadantes de los cultivos se midió por el método de Microbiuret utilizando el reactivo de Benedict y una solución alcalina de NaOH al 3% en un espectrofotómetro UV/VIS Genesys 10 (USA) a 330 nm, utilizando la extrapolación en una ecuación de regresión lineal estandarizada con albúmina de suero bovina: $Y = (1,4321X - 0,0026)$ $R^2 = 0,9997$. (Fig.11)

III.8.6 -Caracterización cinética

Para la caracterización cinética se emplearon tres sustratos: ABTS, guayacol y la siringaldazina. Se determinó la actividad enzimática usando estos sustratos con los siguientes ensayos:

- ❖ ABTS: La mezcla de la reacción contiene 20 mmol/L de ABTS en 0,1 mol/L a diferentes concentraciones (20 μL , 50 μL , 100 μL , 150 μL y 200 μL) de tampón citrato de sodio, pH 3,0 (1600 μL) y una alícuota de 200 μL de la muestra, para un volumen final del ensayo de 2mL.
- ❖ Guayacol: La mezcla de la reacción contiene 10 mmol/L de guayacol a diferentes concentraciones (250 μL , 500 μL , 750 μL y 1000 μL) y 50 mmol/L de tampón fosfato a pH 6 (800 μL) y una alícuota de 200 μL de la muestra, para un volumen final del ensayo de 2mL.

- ❖ Siringaldazina: La mezcla de la reacción contiene 1 mmol /L de siringaldazina a diferentes concentraciones (250 µL, 500 µL, 750 µL y 1000 µL) y 50 mmol/L de tampón fosfato a pH 6 (800 µL) y una alícuota de 200 µL de la muestra, para un volumen final del ensayo de 2mL.

Para todos los casos, la muestra es cada fracción (Pool): I, II, III y U (unido) los que fueron preparados para una dilución de 1/10 en volumétrico de 10 mL se hizo el ensayo para diferentes concentraciones de sustrato para fracción y se calculó gráficamente el inverso de la actividad enzimática y de la concentración de sustrato, para valorar el cumplimiento del gráfico de *Lineweaver Burk* para la determinación de los parámetros cinéticos de las enzimas (Aehle,2004) .

II.8.7 - Caracterización espectroscópica

Se hizo la caracterización espectroscópica de cada fracción en el rango de longitud de onda desde 200 nm hasta 700 nm (UV-VIS).

III.9. Análisis estadísticos de los resultados.

En cada estudio se realizó experimentos tipos, en los cuales se procesó de 3 a 5 réplicas para cada tratamiento. Para el tratamiento estadístico de los resultados se utilizó el software STATGRAPHICS *Plus™ 5.1 (versión Abril 2002)*. Se utilizó las herramientas de Análisis de Regresión y Comparación de Rectas de Regresión, ANOVAS de Clasificación simple; y se aplicaron diseños completamente aleatorizados (DCA) y estudios cinéticos. En el caso de diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos experimentales, las medias fueron comparadas *dos a dos* mediante la prueba T de Student. En todos los casos se utilizó un nivel de significación del 0.05 %.

IV. Resultados y discusión.

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó la cepa CCEBI 3024 por ser la más empleada y estudiada en el CEBI, además de su facilidad para crecer a temperatura ambiente y sobre diversos sustratos.

IV.1. Excreción de la lacasa de *Pleurotus sp.* en FS.

Para el conocimiento del crecimiento en medio líquido de este hongo se procedió a monitorear su desarrollo en medio sintético sumergido y en el medio residual ELP (100 %) fuertemente coloreado. El ELP se uso al 100%, pues si se diluye el residual para tratarlo, se generan mayores volúmenes a tratar y además se conoce de trabajos anteriores que existe tolerancia a este residual al 100% (Álvarez, 2004).

Se siguió a su vez la excreción de lacasa en estos medios, por el interés que existe en esta enzima, pues se ha probado su participación en la decoloración de aguas residuales conteniendo colorantes (Rodríguez, y col 2003); además de las ventajas del empleo de esta forma inmovilizada en procesos industriales de tratamiento, pues no requeriría la adición de peróxido de hidrógeno como es el caso de otras enzimas ligninolíticas.

Durante el crecimiento del hongo en medio sintético (Fig. 1) se muestra el consumo de la fuente de carbono utilizada (glucosa) pues se conoce en otros trabajos, que esta es requerida en concentraciones superiores a 5 g/L para mostrar su actividad de decoloración. Se evidencia la producción de lacasa durante todo el crecimiento de *Pleurotus*, por lo que a diferencia de otros hongos, la aparición de esta enzima no está asociada al agotamiento de los nutrientes y por tanto, no debe considerarse un metabolito secundario. De

ahí que el establecimiento de condiciones apropiadas para el crecimiento del hongo beneficiaría la excreción de enzimas.

Se aprecia un crecimiento apropiado del hongo en el residual ELP (19.1 g/L promedio) para 10 días de cultivo, obteniéndose valores de biomasa superiores, a los obtenidos en medio sintético (5 g/L) o en otros trabajos con 16 días de fermentación (8,6 g/L) (Guillén y col., 1998). Se obtuvo mayor crecimiento micelial en este, que los obtenidos en otros trabajos donde es crecido el hongo en residuales similar en composición reportándose valores de biomasa por debajo de 5 g/L (Nieto y Sánchez, 1997). Los pellets obtenidos durante el crecimiento micelial, típico del cultivo sumergido con agitación, resultaron bastante homogéneos; siendo pequeños y abundantes en los primeros 5 días (0.2-0.3 cm).

La producción de lacasa está directamente relacionada con la cantidad de biomasa producida, al igual que de otras especies de *Pleurotus* (Das y col., 1997). En contraste con otros hongos ligninolíticos en los que la actividad ligninolítica se expresa e incrementa en concentraciones limitantes de nutrimentos en el cultivo, ej. las actividades lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa de *Phanerochaete chrysosporium*, en *Pleurotus* la lacasa no es regulada por condiciones limitantes de nutrimentos; pues cantidades suficientes o en exceso de estos estimulan esta actividad y la producción de biomasa.

Como se aprecia al comparar la actividad lacasa y la actividad peroxidasa, se observa mayor actividad de la primera en el medio conteniendo residual y perfiles diferentes de excreción (Fig.2). En medio sintético hay una actividad creciente de lacasa, mientras que en el medio no convencional la actividad presenta un pico y luego decrece.

En este medio con ELP se obtiene un pico de actividad lacasa alrededor del 9no día. Las mayores actividades fueron obtenidas en el medio con ELP (8.53 U/mL) comparado con el medio sintético (1.5 U/mL).

Como se observa en la Fig.2 hay una disminución de la carga contaminante de este residuo, se reduce la DQO, lo que ratifica la capacidad remediadora de esta cepa de *Pleurotus*.

Similar comportamiento de la actividad lacasa ha sido evidenciado en estudios con hongos de pudrición blanca productores de lacasa-MnP (Kerem y col., 1992).

IV.2. Excreción de la lacasa de *Pleurotus sp.* en FES.

Previo a la determinación de la actividad enzimática como resultado del crecimiento del hongo en pulpa de café, se requiere proceder a la extracción de la misma en dicho medio, pues las determinaciones se efectúan en fase acuosa. Resulta de vital importancia elaborar un método que permita obtener mayor cantidad del producto a detectar y de forma activa.

En el transcurso del crecimiento del hongo *Pleurotus sp.* se siguió la excreción de la enzima lacasa durante un tiempo de fermentación de 60 días, hasta la etapa de fructificación, donde se observa un aumento de producción de enzima en la etapa de colonización, obteniéndose los mayores valores a los 14 días y luego un descenso después de la etapa de colonización. Como se muestra en la figura.3. se obtiene un pico de actividad lacasa alrededor del 14 día frente al ABTS 2.41 U.g⁻¹ y luego decrece la actividad enzimática. Las mayores actividades fueron obtenidas en guayacol 5.92 U.g⁻¹, 8.48 U.g⁻¹ y 8.24 U.g⁻¹ de los tiempos 14, 21 y 35 días respectivamente. En las mediciones la actividad

frente al sustrato ABTS ha sido disminuida, a pesar de que es el sustrato más utilizado para la determinación de la lacasa debido a su alta afinidad y especificidad (Palmieri y col., 1997). Sin embargo el guayacol resulta exhibir mayores valores de actividad lacasa en comparación al ABTS, por tener una alta afinidad por los compuestos de estructuras fenólicas y de algunas fenoloxidasas que no sean las lacasas, puede estar subvalorando la actividad enzimática con el ABTS.

También esto puede ser provocado por otros factores, tales como el cambio de especificidad al sustrato o la aparición de un tipo de isoenzima de la lacasa, y/o una sobreestimación de la actividad, debido a la interferencia de los taninos y otras sustancias fenólicas, las cuales son comúnmente usadas como inductores de lacasa fúngica y se ha demostrado que bajo condiciones de reacción con la ausencia de enzima, el ácido tánico (TA) es capaz de llevar a cabo de una reducción química de ABTS^+ (Terrón, M.C, y col 1997). Mientras con el guayacol la actividad específica aumenta de la misma manera en que aumenta la producción de proteína extracelular (0,90 U/mg y 8,80 mg/mL) respectivamente y ocurre una caída a los 21 días de la fermentación.

Esto corrobora los datos obtenidos por (Kerem y col, 1992; Martirani y col, 1996) con *Pleurotus ostreatus* sobre biomasa de pseudotallo, el cual fue observado a los 10 días de fermentación (lacasa $0.47 \times 10^{-3} \text{ Ug}^{-1}$). Otros autores reportan picos máximos de actividad lacasa en 8 y 20 días de FES de bagazo con *F. velutipes* (Pal y col., 1995) y con *Pleurotus pulmonarius* se reporta un máximo a los 7 días (Nerud y col., 1991). Por lo que esa etapa resulta ser óptima para la cuantificación de la enzima.

Se obtuvieron niveles inferiores de excreción de lacasa con esta misma cepa en pulpa de café ($7.47 \times 10^{-2} \text{ Ug}^{-1}$) a los 60 días (Kourouma, 2005) y a los 40 días de incubación sobre residuos cañeros ($12.5 \times 10^{-2} \text{ Ug}^{-1}$) (Ortega y col., 2001). Conociendo que la actividad lacasa se induce en estos residuos por la presencia de compuestos lignocelulósicos o derivados fenólicos, es posible

inferir que el decrecimiento paulatino de la actividad durante el período de degradación, es debido a la limitación de la fuente carbonada; conociendo además que la lacasa de *Pleurotus* no está regulada por condiciones limitantes de nutrientes, por lo que se ve favorecida la producción de la misma durante la primera etapa del crecimiento micelial (Rodríguez y col., 2003). Por lo que se infiere que para el tiempo de fermentación ensayado la producción de lacasa disminuye.

Continuando con la evaluación de la cepa CCEBI 3024 en cuanto a excreción de la lacasa y la producción de proteína, se muestra un aumento de la producción de proteína y un aumento de la actividad específica al final de la etapa de colonización frente al sustrato guayacol, 0.9 U/mg de enzima, y 8.80 mg/mL de proteína, luego de los 21 días hay un decrecimiento paulatino durante la etapa de fructificación (Fig.4), eso se corrobora en otros trabajos (Ortega, 2001). Sin embargo frente al ABTS solo observa un máximo a los 14 día y luego decrece.

Comparando el segundo tiempo de fermentación hasta 14 días, se observa un comportamiento similar con la producción de proteína y la detección de la actividad lacasa con el guayacol, después un máximo de actividad específica 0.506 U/mg y 13.044 mg/mL de proteína a los 10 día y luego decrece. Sin embargo con el ABTS se ha mantenido durante todo el crecimiento del hongo hasta el final de la cinética, con valores aun menores en comparación con el guayacol, 0.0999U/mg actividad específica (Fig.5).

Por otra parte y de acuerdo a estudios previos (Velásquez-Cedeño, M y col 2002) que demuestran el potencial que representa la excreción de lacasa durante la colonización del sustrato, indica un incremento de la actividad enzimática en la etapa vegetativa del hongo y luego una disminución de la actividad en la etapa de fructificación, así como para la defensa del hongo (Savoie y col., 1998).

Aunque en otros trabajos se emplearon cepas de *P. ostreatus* y *P. pulmonarius* que presentaron producción de la enzima lacasa en las condiciones evaluadas, especialmente en el medio de AEM (Agar Extracto de Malta), los valores alcanzados fueron marcadamente menores a los producidos por las cepas de *P. djamor* y *pulmonarius*, esta última especie se había citado la producción de la enzima durante su ciclo de cultivo (Nieto y col 1997), pero no se tenían estudios comparativos a nivel de laboratorio con otras especies de *Pleurotus* comerciales, las actividades de las cepas de *P. djamor* cultivadas en AEM variaron de 1.7 a 9.1 U/disco en C1, y de 1.9 a 9.5 U/disco en C2, con promedios de 4.5 y de 3.5 U/disco.; mientras que en nuestro trabajo con este género *Pleurotus sp.* sobre pulpa de café obtuvimos mayor actividad de la enzima sin suplemento, y consecuentemente, se logra inhibir el crecimiento de otros microorganismos competidores (Alvarado, O., Z. 2003). Por lo tanto, se considera que la inducción de la lacasa favorece una más rápida adaptación a un nuevo sustrato y una mayor competitividad con otros microorganismos. En la Fig. 4a se presentan los cuerpos fructíferos obtenidos en la fructificación del experimento VI.2. Como se puede ver, las setas poseen las características adecuadas, lo mismo resultó desde el punto de vista organoléptico.

IV.3. Purificación de la enzima por Cromatografía de intercambio iónico.

La cromatografía de intercambio iónico del crudo a los 10 días de fermentación resolvió tres isoenzimas de lacasa frente a ABTS (Fig.6) designadas como A, B. y C, de las cuales la isoenzima B fue la que presentó mayor actividad y más estabilidad durante los pasos posteriores de purificación para el sustrato ABTS y para el guayacol resultó una sola isoenzima C que fue la que presentó mayor actividad de todas con 8.84 U/mL referida a la fracción 18 (Fig.7) y que coincide con el pico C detectado con el ABTS..

Sin embargo la purificación del crudo a los 14 días, como se observa en las (Figuras 8 y 9). hay una coincidencia de los picos de las fracciones 19 y 21

correspondientes 0.65 U/mL y 0.21 U/mL actividad con el ABTS y 19.29 U/mL y 2.77 U/mL actividad con el guayacol siendo superior con el guayacol.

Durante la purificación con Q-Sepharose Fast Flow, las isoenzimas A y C perdieron mucha actividad, lo cual impidió realizar la caracterización espectroscópica de manera efectiva y observar los picos minuciosamente. La isoenzima C fue purificada y fue la única de las isoenzimas de la lacasa obtenida a la cual se le realizó la caracterización cinética y espectroscópica cerca a la región del visible a 660 nm aproximadamente (Fig.10), y se refiere a una lacasa tipo I; que es la responsable del color azul de la enzima. Tiene una alta absorbancia en esta región por la unión covalente cobre-cisteína (Shin et al., 1996; Yaropolov et al., 1994). Debido al alto potencial redox de este cobre en el sitio donde ocurre la oxidación del sustrato.

IV.3.1. Elución de las isoenzimas.

En la purificación del crudo enzimático en la columna Q-Sepharose Fast Flow se observa una elución definida de las isoenzimas, ver Fig. 6; 7 y 8;9. y aparecen las fracciones correspondientes a las isoenzimas para actividad lacasa, ellas fueron colectadas por separado frente a diferentes sustratos.

En el caso del ABTS se aplicó un gradiente discontinuo de NaCl y la fracción correspondiente al pico menor, la isoenzima A; eluyó con el buffer de lavado; los picos correspondientes a las isoenzimas B y C se eluyeron entre 0.3 a 0.5 M NaCl para la purificación del crudo enzimático de 10 días, ese mismo comportamiento ocurre para la purificación del crudo a los 14 días (ver Fig.6 y 8).

Sin embargo frente al sustrato guayacol la fracción correspondiente al pico C (Fig.7) eluyó en el intermediario del gradiente de concentración de 0.3-0.5, fue el único pico detectado para ese tiempo de fermentación. En tanto en la Fig.9, se observan dos picos bien definidos y se eluyeron entre 0.3 a 0.5 M NaCl para la purificación del crudo enzimático de los 14 días. Pero el pico C para

ambos tiempos de fermentación eluyeron prácticamente con la misma concentración del gradiente.

Las lacasas purificadas de acuerdo al procedimiento planteado, se obtuvieron con un porciento de recobrado de 0.865% y 0.149% y un grado de pureza de 0.631% y 0.106 frente a los sustratos guayacol y ABTS respectivamente para la purificación del crudo enzimático del día 10 (Tabla. 1 y 2); y para los 14 días con un porciento de recobrado de 0.327% y 0.280 % y un grado de pureza de 1.687% y 5.16% frente a los sustratos guayacol y ABTS respectivamente (Tabla. 3 y 4).

Las sales remanentes del crudo se eliminaron por diálisis utilizando una membrana Amicon PM-10.

Es necesario completar la caracterización con el estudio electroforético.

IV.4. Caracterización cinética de la enzima.

Determinación de constantes cinéticas

Se ensayaron diferentes concentraciones del ABTS y del guayacol y se determinaron las actividades (A.E) de lacasa fijando 3 minutos como tiempo de ensayo para el guayacol y 1 minuto para el ABTS. Luego se realizó la determinación de los inversos de las A.E y de la concentración de los sustratos por la transformación de ecuación de Michealis-Menten para obtener la denominada representación de Lineweaver-Burk. Cada punto constituye la media de tres mediciones y se tomaron dos réplicas del cultivo. El extracto enzimático proviene de un cultivo de 14 días de fermentación.

Los valores obtenidos fueron transformados mediante los gráficos de Lineweaver-Burk para obtener los valores correspondientes de la K_M aparente de $1,59 \cdot 10^{-3}$ mol/L y $5,12 \cdot 10^{-3}$ mol/L para guayacol y ABTS respectivamente, encontrándose en el orden permitido (Aehle, 2004). De estos valores se infiere que la isoenzima C tiene más afinidad con el guayacol. Los valores de $V_{m\acute{a}x}$

aparente de 0,736 U/min y 243,90 U/min para guayacol y ABTS respectivamente (Fig.12 y 13).

V. Conclusiones

1. La pulpa de café y el residual de la pasteurización de la pulpa de café, resultan beneficiosos para el cultivo y excreción de la enzima lacasa con la cepa CCEBI 3024.
2. Se establecieron las condiciones de extracción y purificación de las lacasas en los residuales del café.
3. La producción de la lacasa aumenta en la etapa vegetativa de la FES, y resulta la mejor etapa para la obtención de esta enzima.
4. Se detectó la excreción de tres isoenzimas de lacasa, se caracteriza una de ellas como lacasa de tipo I.

VI. Recomendaciones:

- Continuar el estudio y la caracterización de las lacasas, en particular el estudio electroforético.

VII. Bibliografía

- Addleman, K., Archibald, F. 1993. Kraft pulp bleaching and delignification by dikaryons and monokaryons of *trametes versicolor*. Appl. Environ. Microbiol. 59. 266-273.
- Aehle, W. 2004. Enzymes in Industry. Production and applications. 2nd Ed. Wiley-VCH, p13-35.
- Alvarado Olivares, Z., 2003. Efecto de mohos antagonistas *Trichoderma* y *Monilia* en el género *Pleurotus* cultivados en pulpa de café y su producción de lacasa *in vitro*. Tesis de licenciatura, Universidad Veracruzana, México.
- Álvarez, H. 2004. Evaluación de la biodegradación del extracto líquido de pulpa de café con *Pleurotus sp.* Tesis de Maestría en Biotecnología. CEBI. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba.
- APHA,.1998. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 20th Edition, Washington D.C, USA: 1124.
- Arora, D. S., P. K. Gill, 2000. Laccase production by some white rot fungi under different nutritional condition. Bioresource Technology 73:283-285.
- Cliffe, S.; Fawer, M. S.; G.; Takara. and G. Ritter 1994. Enzyme Assays for the Phenolic Content of Natural Juices. Journal of Agricultural and Food Chemistry 42, 1824-1828.
- Bello, R. 1999. Digestion Anaerobia de Residuales del Cultivo de Setas comestibles. W.J. Microbial. Biotecnology 33.357.359.

- Bermúdez, R. C; N. García; P. Gross; M. Serrano.2001. Cultivation of *Pleurotus* on Agricultural Substrates in Cuba. *Micologia Aplicada International*,13(1),pp.25-29
- Bezalel, L., Hadar, Y., Cerniglia, C. 1996.Mineralization of PAH by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environm. Microbiol.* 62:292-295.
- Braham, J. ;Bressani, R. 1978.Pulpa de café. Composición, tecnología y utilización. INCAP.152p.
- Bressani, R. 1989. The proteins of grain amaranth. *Foods Reviews International.* 51: 1338.
- Bressani, R.; A. Sanchez Maroquin; y E. Morales. 1992. "Chemical composition of grain amaranth cultivars and effect of processing on their nutritional quality". *Food Rev. Int.* 8(1): 23-49,
- Crecchio C., Ruggiero P., Pizzigallo M. D. R. 1995 Polyphenoloxidases Immobilized in Organic Gels: Properties and Applications in the Detoxification of Aromatic Compounds. *Biotechnology and Bioengineering*; 48: 585-591.
- Das N., Sengupta S., Mukherjee M. 1997. Importante of laccase in vegetative growth of *Pleurotus florida*. *Appl. Environ. Microbiol*; 63:4120-4122.
- D'Souza, T., Boominathan, K., Reddy, C. 1996. Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3739-3744.
- Fan, L., A. Soccol., A., Pandey, C. R. Soccol, 2003. Cultivation of *Pleurotus* mushrooms on brazilian coffee husk and effects of caffeine and tannic acid. *Micología Aplicada International* 15(1):15-21.
- García N., 1999. Producción de setas comestibles *Pleurotus ostreatus* sobres subproductos del café y el cacao. Tesis de maestría en Biotecnología, CEBI. Universidad de Oriente.
- Guillén G., Márquez F, Sánchez J. 1998. Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Rev. Iberoam. Micol.*, 15:302-306.

- Herrera, Y. 1997. Oxidación enzimática de compuestos tóxicos en medio acuoso. Memorias VII Congreso Nacional de Biotecnología y Ingeniería y II Simposio Internacional Sobre Ingeniería de Procesos. Veracruz, México.
- Homolka, L., J. Paltiel, I. Voláková, F. Nerud, Y. Hadar, 1997. The effect of growth conditions and genetic background on laccase production by the fungus *Pleurotus ostreatus*. Folia Microbiology 42 (5):527-529.
- Jönsson L. y otros. 1998. Detoxification of wood hydrolysates laccase and peroxidase from the white – rot fungus *Trametes versicolor*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 49:pp. 691-697.
- Kerem Z., Friesem D., Hadar Y. 1992 Lignocellulose degradation during solid-state fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol; 58 (4): 1121-1127.
- Kersten, P.J., Kalyanaraman, B., Hammel, K.E., Reinhammar, B. and T.K. Kirk. 1990 Comparison of Lignin Peroxidase, Horseradish Peroxidase and Laccase in the Oxidation of Methoxybenzenes. Biochemical Journal; 268: 475-480.
- Kourouma, A. 2005. Determinación de enzimas ligninolíticas de *Pleurotus sp.* en residuales de café. Tesis de Diploma. CEBI .Universidad de Oriente.
- Lelley, J. 1987. Edible mushrooms as a vapon against starvation. The Mushroom Journal. 173. 170.
- Leonowicz, A., J. Rogalski, M. Jaszek, J. Luterek, M. Wojtas-Wasilewska, E. Malarczyk, G. Ginalska, M. Fink-Boots, N.-S. Cho, 1999. Cooperation of fungal laccase and glucose 1-oxidase in transformation of björkman lignin and some phenolic compounds. Holzforschung 53: 376-380.
- Lonsane, B.K. 1991. In Short Term Course on Solid State Fermentation, CFTRI, Mysore (India) 11-28 February, pp.14.1.
- Martinez-Carrera D. 1986. Simple technology to cultivate *Pleurotus* on coffe pulp in the tropics. Mushroom science. 12: 169-178.

- Martirani L., Giardina P, Mrzullo L., Sannia G. 1996. Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. Water Research, 30: 1914-1918.
- Mayer, A., Stapes, R. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. Phytochemistry 60:551-565.
- Medeiros, M. B., A. V. Bento, A. L. Nunes, S. C. Oliveira, 1999. Optimization of some variables that affect the synthesis of laccase by *Pleurotus ostreatus*. Bioprocess Engineering 21: 483-487.
- Miller, G.L. 1959 use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry 31, pp. 426-428.
- Nerud, F. y otros. 1992. Extracellular lignolytic enzymes of different white rot-fungi. Lignocellulosics, 67, pp.71-77.
- Nieto López, C., J. E. Sánchez Vázquez, 1997. Mycelial growth of *Pleurotus* and *Auricularia* in agroindustrial effluents. Micología Neotropical Aplicada 10: 47-56.
- Oldair . D. Orlando; and Aneli de M. Barbosa^b 2003. Determination of Catecholamines in Pharmaceutical Formulations Using a Biosensor Modified With a crude Extract of Fungi Laccase (*Pleurotus ostreatus*). Vol.14,No.2,297-303.
- Ortega, G; M. Otero. 2001. Cinética de degradación de residuos cañeros por *Pleurotus ostreatus* –*pulmonarius* .Rev. ICIDCA, 2-3,pp.35-41
- Pal, M.; Calvo, AM. ; Terrón, MC y González AE. 1995. Solid state fermentation of sugarcane with *Flammulina velupes* and *Trametes versicolor* .World J. Microbiol. Biotechnol.11, pp.541-545.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Scaloni, A., Capasso, A., Sannia, G. 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. J. Biol. Chem. 272: 31301-31307.
- Pandey A. (1991). Aspects of Fermenter Design for Solid-State Fermentations. Regional Research Laboratory (CSIR) Trivandrum-695019, India.

- Pérez Guerra, N, 2003. Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. *EJEAFChe*. pp. 343-350.
- Pointing, S. B. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biofechnol.*; 57: 20-23.
- Rajarthanam, S., M. N. Shashirekha, Z. Bano, 1998. Biodegradation and biosynthesis capacities of mushrooms: present and future strategies. *Critical Review in Biotechnology* 18 (283): 91- 236.
- Ramesh M.V. & Lousane, B.K., 1987. *Biotechnol. Lett.*, 9. 49-52.
- Ramesh M.V. & Lousane, B.K., 1989. *Biotechnol. Lett.*, 11. 49-52.
- Reid, I., Paice, M. 1994. Biological bleaching of kraft pulps by white-rot fungi and their enzymes. *FEMS Microbiol. Rev.* 13:369-375.
- Rodríguez, S; Sanromán, Ma. 2005. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochem. Eng. J.* 22, pp. 211-219.
- Rodríguez S., Fernández M., Bermúdez R.C., Morris H. 2003. Tratamiento de efluentes coloreados con *Pleurotus spp.* *Rev. Iberoam Micol* 2003; 20:164-168.
- Rodríguez S., 2006 "Decoloración de los residuales de la pasteurización de la pulpa de café y la vinaza por *Pleurotus sp.*" Tesis Doctoral. CEBI. Universidad de Oriente.
- Salmones, D., Z. Durán-Barradas, 2001. Obtaining and selecting highly productive strains of *Pleurotus pulmonarius* under warm environmental conditions. *Mushroom Research* 10(2): 59-65.
- Salmones, D., R. Gaitán-Hernández, R. Pérez, G. Guzmán, 1997. Estudios sobre el género *Pleurotus* VII: Interacción entre crecimiento micelial y productividad. *Revista Iberoamerica de Micología* 14: 108-110.
- Sánchez, J., E. Royse, D., J. 2002. La biología y el cultivo de *Pleurotus spp.* Ed. Limusa, México. 290p.

- Savoie, J. M., G. Mata, C. Billette, 1998. Extracellular laccase production during hyphal interactions between *Trichoderma* sp. and shiitake, *Lentinula edodes*. Applied Microbiology and Biotechnology 49: 589-593.
- Schliephake K., Lonergan G. T. 1996 Laccase variation during dye decolourisation in a 200 L packed-bed bioreactor. Biotechnol. Lett.; 18: 881-886.
- Shin, W., Sundaran U., Cole J., Zhang M., Hedman B., Hodgson K., Solomon E. 1996. Chemical and spectroscopic definition of the peroxide level intermediate in the multicopper oxidases. Relevante to the catalytic mechanism of dioxygen reduction of water. J. Am. Chem. Society 118: 3202-3215.
- Terrón, M.C., López-Fernández, M., Carbajo, J.M., Junca, H., Téllez, A., Yagüe, S., Arana-Cuenca, A., González, T., Yagüe, S. and González, A.E. 1997 Tannic acid interferences with the commonly used laccase-detection assay based on ABTS as the substrate. Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, E-28040, Madrid, Spain..
- Thurston, C 1994. The structure and function of fungal laccases. Microbiology. 140: 19-26.
- Velázquez-Cedeño, M. A., G. Mata, G., J. M Savoie, 2002. Waste reducing of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulp, changes in the production of some lignocellulolytic enzymes. World Journal of Microbiology and Biotechnology 18:201-207.
- Wolfenden E.S., Wilson R.L. 1982. Radical-cations as referente chromogens in the kinetics studies of one-electron transfer reactions. J. Chem. Soc. Perkin trans. 2: 805-812.
- Xu, F., Berka, R., Wahleithner, J., Nelson, B., Shuster, J., Brown, S. 1998. Site-directed mutations in fangal laccase: effect on redox potencial, activity and pH profile. Biochem. J. 334:63-70.
- Yaropolov, A., Skorobogatko O., Vartanov S., Varfolomeyev S. Varfolomeyev S. 1994. Laccase-properties, catalytic mechanism, and applicability. Appl. Biochem. Biotech. 49:257-280.

- Zouari, N.; Romette, J.L.; D. Thomas 1994 "Laccase Electrode for the Continuous-Flow Determination of Phenolic Compounds". *Biotechnology Techniques* 8, 503-508.

Tabla 1. Purificación I de la lacasa de la Cepa CCEBI 3024 (10 días)

Paso de la purificación	Actividad Lacasa U/mL	Actividad Lacasa total (U/mL)	C(x) de Proteína (mg/mL)	Actividad Especifica (U/mg)	% de Recobrado	Grado de Pureza (%)
1. Caldo inicial (Vol. 100mL)	0.361	72.2	1.675	0.216		
2. precipitación por salado (Vol. 40mL)	13.63	817.8	22.45	0.607	11.33	2.8
3.(Vol.31mL) Cromatografía de intercambio iónico						
Pool I.	0.000	0.000	0.725	0.000	0.000	0.000
Pool II.	0.008	0.464	1.45	0.006	0.0064	0.027
Pool III.	0.175	10.15	11.23	0.016	0.141	0.074
Pool U.	0.003	0.174	2.33	0.001	0.0024	0.005
Total	0.186	10.786	15.735	0.023	0.1498	0.106

La actividad lacasa fue medida usando como sustrato el ABTS.

Tabla 2. Purificación I de la lacasa de la Cepa CCEBI 3024 (10 días)

Paso de la purificación	Actividad Lacasa U/mL	Actividad Lacasa total (U/mL)	C(x) de Proteína (mg/mL)	Actividad Especifica (U/mg)	% de Recobrado	Grado de Pureza (%)
1. Caldo inicial (Vol. 100mL)	1.097	219.4	1.675	0.655		
2. precipitación por salado (Vol. 40mL)	30.19	1811.4	22.45	1.345	8.26	2.05
3.(Vol.31mL) Cromatografía de intercambio iónico						
Pool I.	0.030	1.74	0.725	0.041	0.0079	0.063
Pool II.	0.096	5.568	1.45	0.025	0.025	0.102
Pool III.	3.071	178.12	11.45	0.274	0.813	0.418
Pool U.	0.074	4.29	2.325	0.032	0.019	0.048
Total	3.271	189.72	15.95	0.372	0.865	0.631

La actividad lacasa fue medida usando como sustrato el guayacol.

Tabla 3. Purificación II de la lacasa de la Cepa CCEBI 3024 (14 días)

Paso de la purificación	Actividad Lacasa U/mL	Actividad Lacasa total (U/mL)	C(x) de Proteína (mg/mL)	Actividad Especifica (U/mg)	% de Recobrado	Grado de Pureza (%)
1. Caldo inicial (Vol. 100mL)	1.321	132.1	11.03	0.120		
2. precipitación por salado (Vol. 40mL)	1.76	70.4	20.85	0.084	0.533	0.7
3.(Vol.31mL) Cromatografía de intercambio iónico						
Pool I.	0.596	18.48	1.36	0.437	0.14	3.64
Pool II.	0.211	6.54	8.90	0.024	0.05	0.2
Pool III.	0.211	6.54	3.20	0.066	0.05	0.55
Pool U.	0.165	5.12	1.78	0.093	0.04	0.77
Total	1.035	36.68	15.24	0.622	0.28	5.16

La actividad lacasa fue medida usando como sustrato el ABTS.

Tabla 4. Purificación II de la lacasa de la Cepa CCEBI 3024 (14 días)

Paso de la purificación	Actividad Lacasa U/mL	Actividad Lacasa total (U/mL)	C(x) de Proteína (mg/mL)	Actividad Especifica (U/mg)	% de Recobrado	Grado de Pureza (%)
1. Caldo inicial (Vol. 100mL)	8.806	880.6	11.03	0.799		
2. precipitación por salado (Vol. 40mL)	7.28	291.2	20.85	0.35	0.331	0.44
3.(Vol.31mL) Cromatografía de intercambio iónico						
Pool I.	7.374	228.59	1.36	5.412	0.26	6.77
Pool II.	1.128	34.97	8.90	0.127	0.04	0.16
Pool III.	0.705	21.86	3.20	0.220	0.02	0.28
Pool U.	0.185	5.74	1.78	0.104	0.007	0.130
Total	9.392	291.10	15.24	5.863	0.327	1.687

La actividad lacasa fue medida usando como sustrato el guayacol.

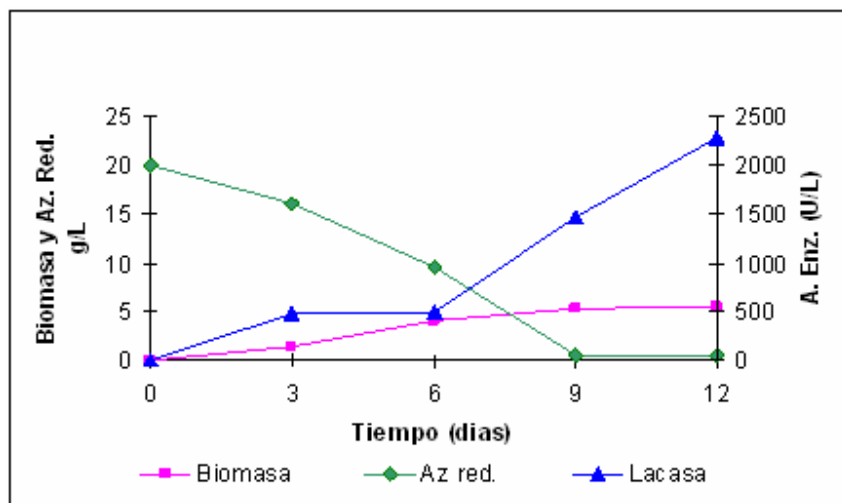


Figura 1. Cinética de crecimiento y excreción de lacasa en medio sintético de de la cepa CCEBI 3024. en FS.

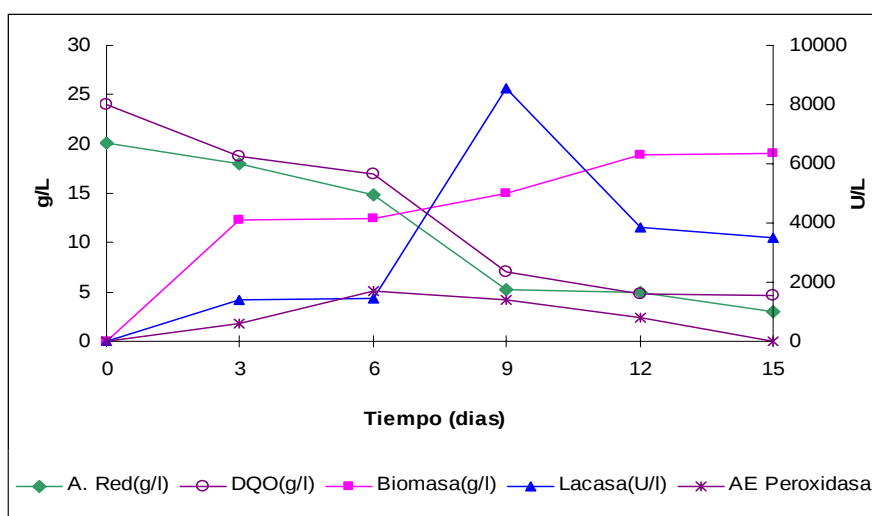


Figura 2. Cinética de crecimiento de la cepa CCEBI 3024 en ELP, excreción de las enzimas., y su influencia en la reducción de los azúcares reductores y DQO.

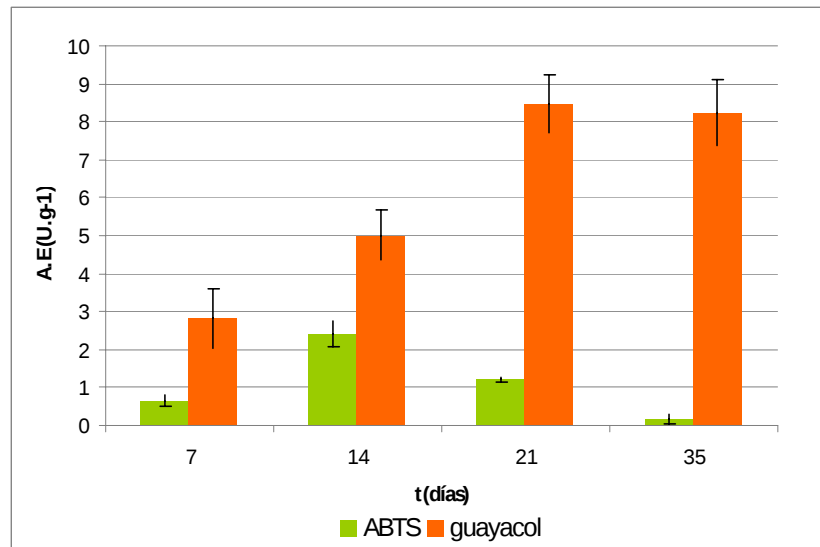


Figura 3. Producción de la enzima lacasa de la cepa CCEBI 3024 en FES.

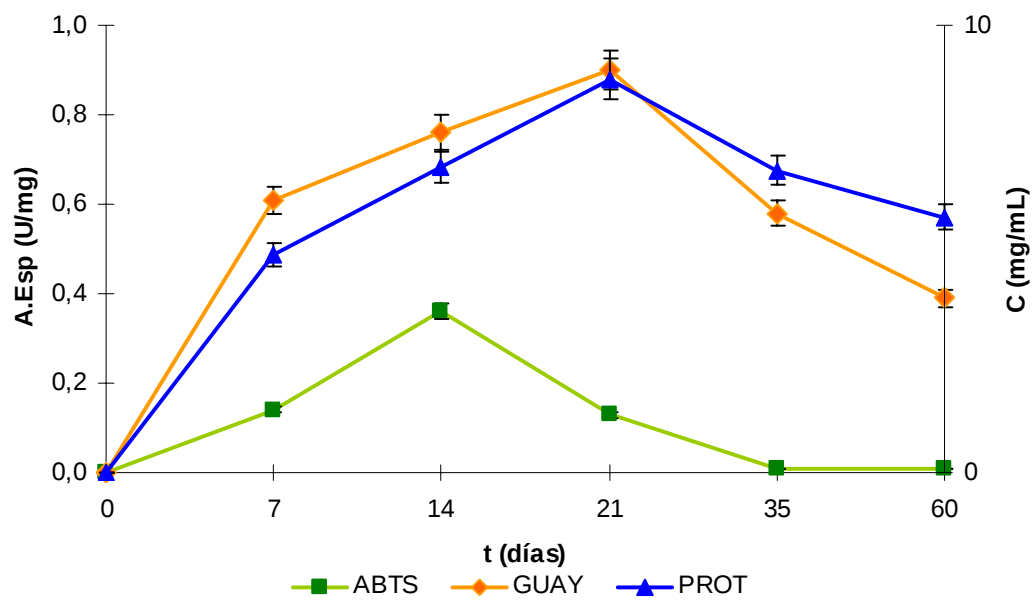


Figura 4. Cinética de crecimiento y excreción de lacasa en FES durante 60 días de fermentación. Cada punto es el valor promedio de tres mediciones.

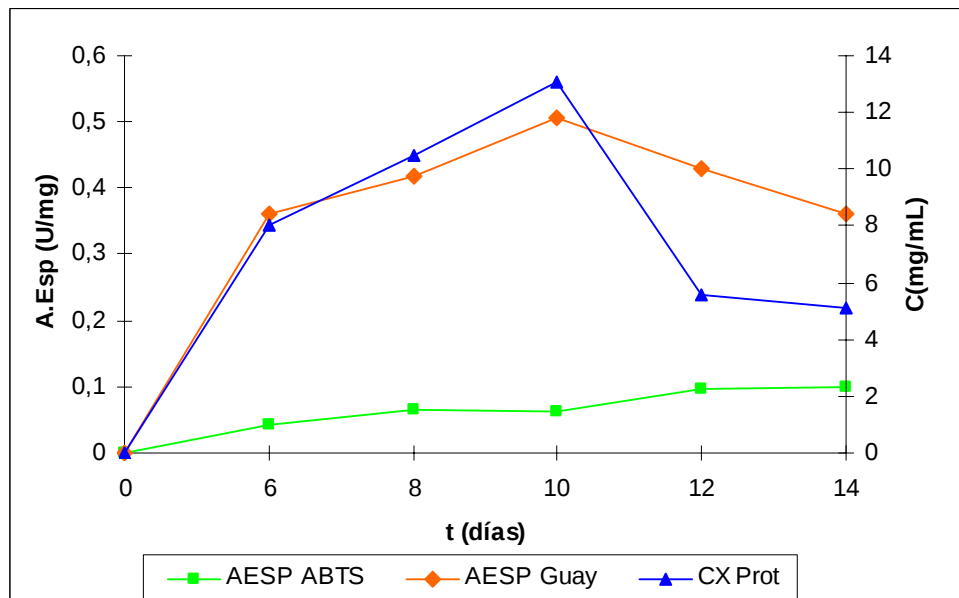


Figura 5. Cinética de crecimiento y excreción de lacasa en FES durante 14 días de fermentación. Cada punto es el valor promedio de tres mediciones

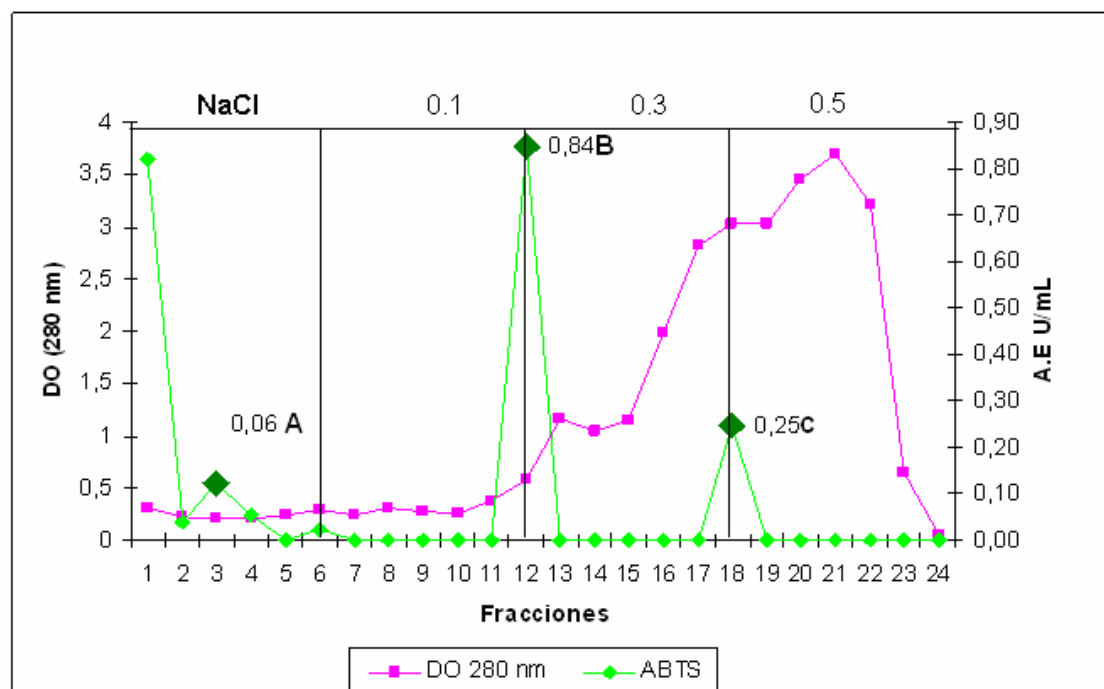


Figura 6. Cromatograma del crudo enzimático de las lacasas para 10 días de fermentación, empleando ABTS como sustrato.

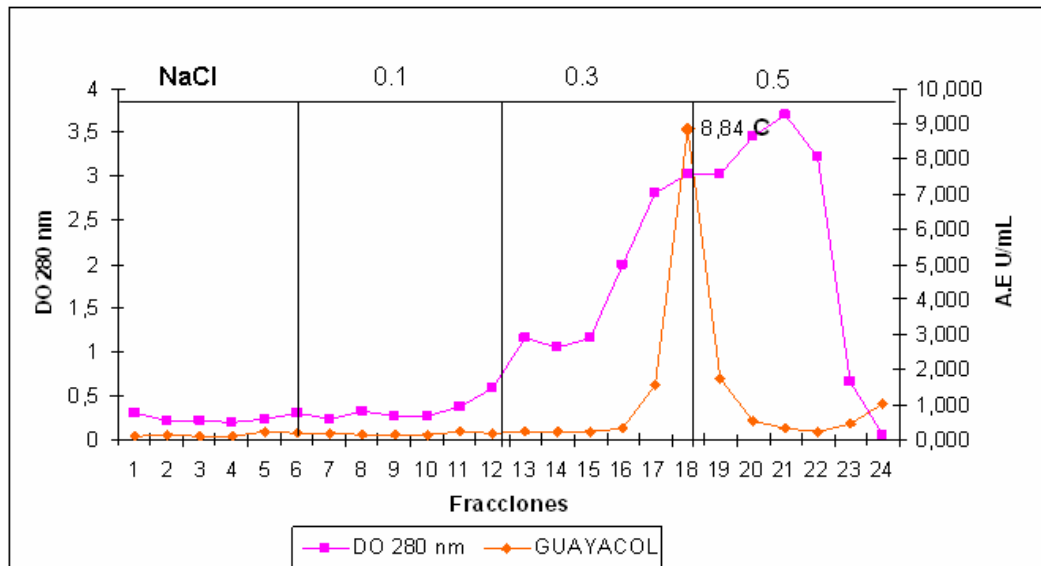


Figura 7. Cromatograma del crudo enzimático de las lacasas para 10 días de fermentación, empleando Guayacol como sustrato.

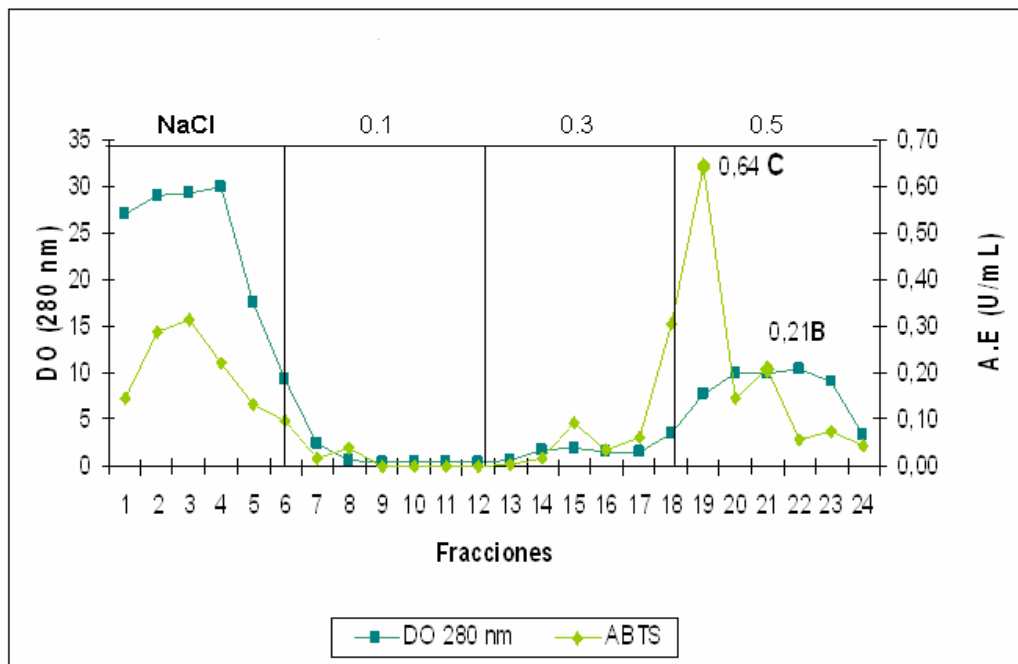


Figura 8. Cromatograma del crudo enzimático de las lacasas para 14 días de fermentación, empleando ABTS como sustrato.

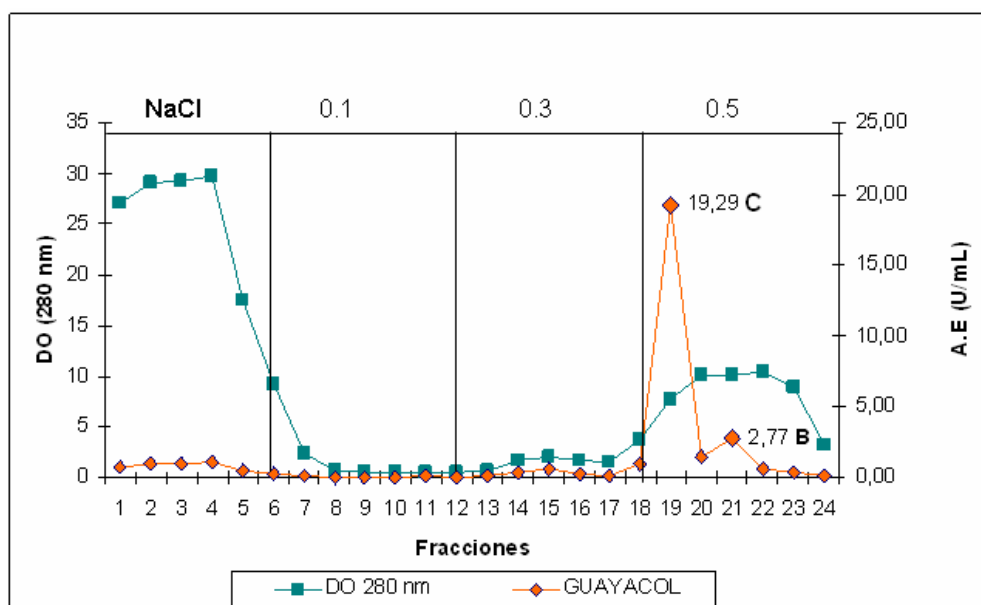


Figura 9. Cromatograma del crudo enzimático de las lacasas para 14 días de fermentación, empleando Guayacol como sustrato.

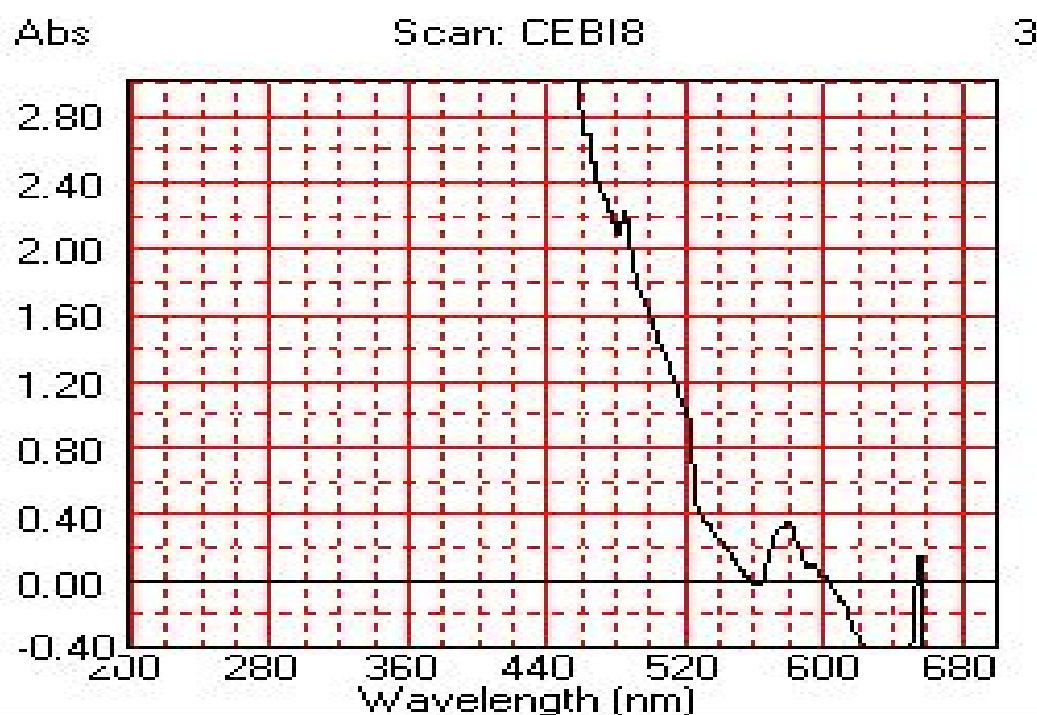


Figura 10. El espectro de la isoenzima C frente a guayacol (Lac I) se observa un pico cerca 660nm en la región del visible.

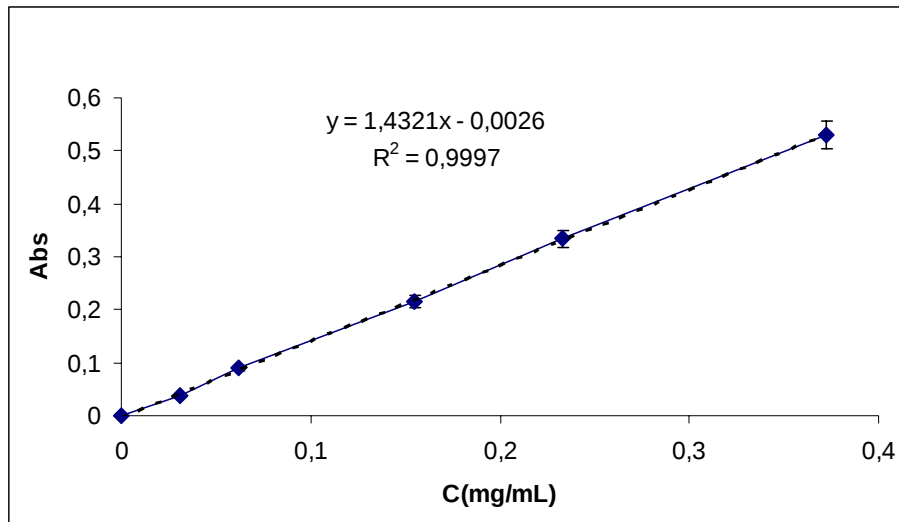


Figura .11. Curva patrón de BSA para la determinación de la concentración de proteína. Se utilizó una concentración de BSA de (10mg/10mL) y se midió la absorbancia contra blanco de agua destilada.

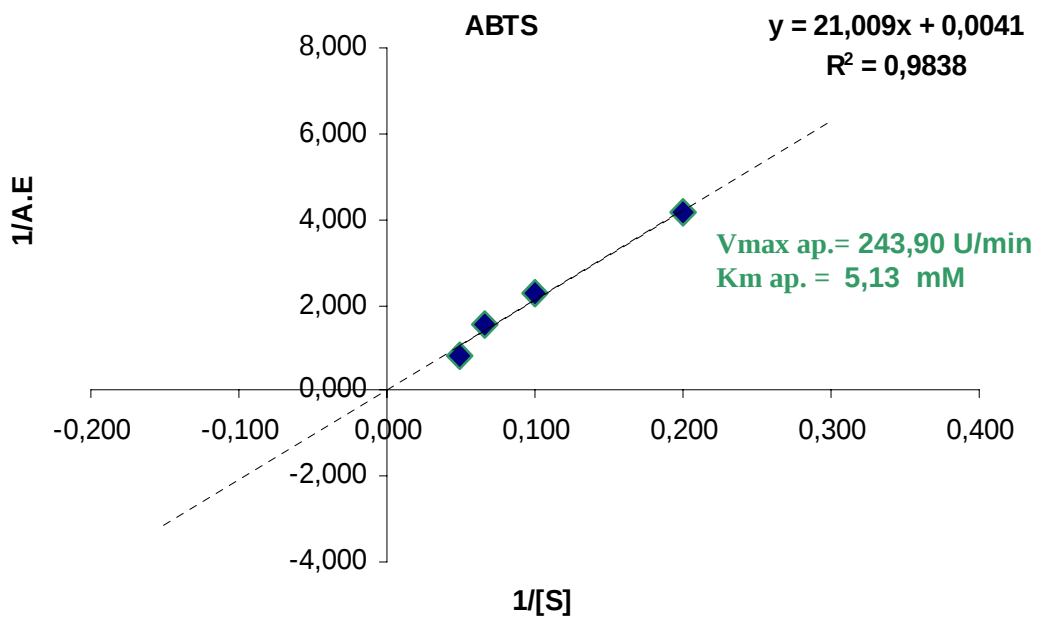


Figura 12. Gráfico de Lineweaver-Burk para la isoenzima C(Lac I) , empleando ABTS como sustrato.

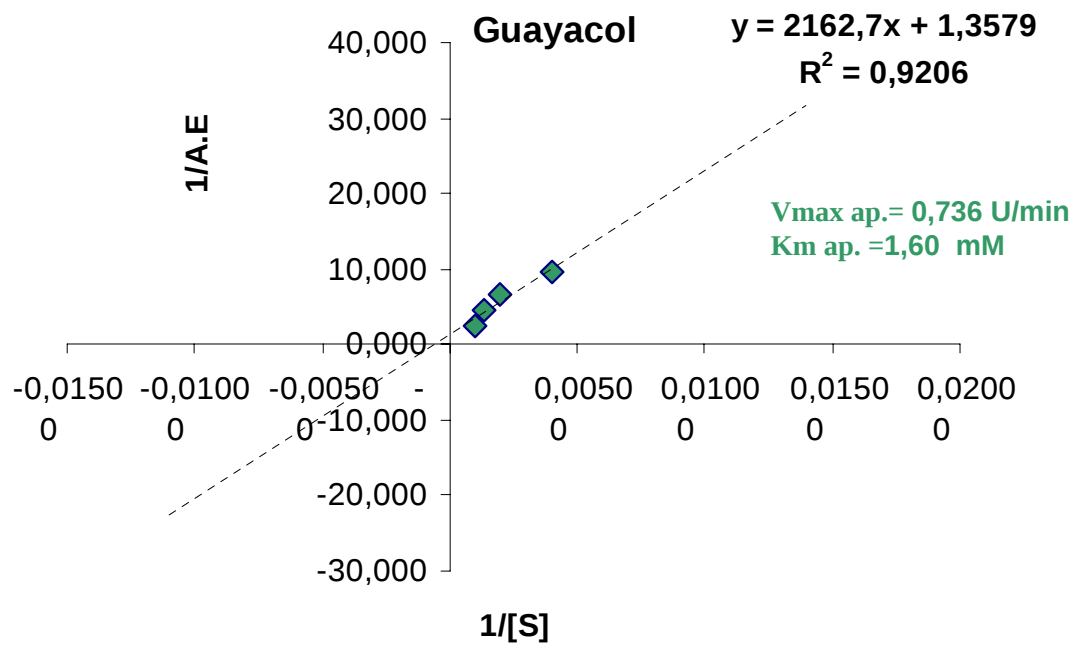


Figura 13. Gráfico de Lineweaver-Burk para la isoenzima C(Lac I) , empleando guayacol como sustrato.



Figura 4a. Cuerpos fructíferos de la cepa CCEBI 3024 a los 60 días de fermentación.