



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Producción, purificación e inmovilización de
lacasa obtenida a partir de un proceso
optimizado de fermentación en estado sólido**

Carolina Velásquez Quintero

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias
Medellín, Colombia
2021

Producción, purificación e inmovilización de lacasa obtenida a partir de un proceso optimizado de fermentación en estado sólido

Carolina Velásquez Quintero

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Ciencias – Biotecnología

Directora:

Dr. rer. nat. Angelina Hormaza Anaguano

Codirector:

MSc. Orlando Simón Ruiz Villadiego

Línea de Investigación:

Biotecnología ambiental

Grupo de Investigación:

Síntesis, Reactividad y Transformación de Compuestos Orgánicos, SIRYTCOR

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias

Medellín, Colombia

2021

A Dios, sobre todo.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Carolina Velásquez Quintero

Fecha 24/07/2021

Agradecimientos

Me gustaría agradecerle a mi madre su amor y paciencia, su extremo entusiasmo que me inspiró todos los días a hacer las cosas de la mejor manera; a mi padrastro, que con su humildad me enseñó a servir a los otros desinteresadamente, y a mi hermano que siempre sabe cómo alegrarme la vida.

A mi directora de tesis, Dr. rer. nat. Angelina Hormaza, por acompañarme a lo largo de todos estos años en mi formación académica, profesional y personal; y enseñarme con su ejemplo lo que significa la disciplina.

A mi codirector de tesis, MSc Orlando Ruiz, por aceptar hacer parte de este proyecto y transmitirme tantos conocimientos valiosos.

Al grupo de investigación en Síntesis, Reactividad y Transformación de Compuestos Orgánicos, SIRYTCOR, por los aprendizajes y las experiencias investigativas que me permitieron alcanzar este logro, pero sobre todo, por los amigos que me regaló y que la vida aún me permite conservar.

A la Universidad Nacional de Colombia y al Sistema Nacional de Becas de Posgrado por financiar mis estudios de maestría a través de la Beca Grado de Honor. Asimismo, al Área Curricular de Biotecnología por su asesoría permanente.

A mis amigos, por quedarse conmigo siempre que lo necesité.

Resumen

Producción, purificación e inmovilización de lacasa obtenida a partir de un proceso optimizado de fermentación en estado sólido

Las enzimas ligninolíticas, llamadas así por su capacidad de oxidar el polímero de la lignina, han cobrado importancia en el campo de la biotecnología en vista de la habilidad que demuestran para oxidar a su vez otro tipo de moléculas orgánicas estructuralmente más sencillas. Esta característica ha potencializado indudablemente su implementación en diversas aplicaciones industriales entre las que se destaca la deslignificación de la pulpa en el procesamiento del papel, el aprovechamiento de residuos agroindustriales para la generación de biocombustibles o enmiendas orgánicas y el tratamiento de efluentes contaminados con compuestos recalcitrantes, tales como los colorantes sintéticos, entre otras.

La lacasa, particularmente la proveniente de los conocidos hongos de podredumbre blanca (HPB), pertenece a este grupo de enzimas ligninolíticas y es de especial interés debido a que es producida en gran cantidad y de manera extracelular.

Bajo este contexto, el grupo de investigación en Síntesis, Reactividad y Transformación de Compuestos Orgánicos (SIRYTCOR) ha desarrollado una línea de investigación enfocada en la producción de enzimas ligninolíticas mediante fermentación en estado sólido (FES). Así, el presente estudio buscó fortalecer dicha línea investigativa a través de la evaluación de las condiciones más adecuadas para la producción, extracción y cuantificación de lacasa obtenida del proceso de FES sobre un soporte orgánico. Adicionalmente, reconociendo algunas de las limitaciones encontradas en la perspectiva de emplear la lacasa a una mayor escala, se evaluó la purificación e inmovilización de esta enzima y se llevó a cabo un estudio en el que se estimó su capacidad para decolorar un tinte sintético.

En principio, se evaluó la producción de lacasa a partir de las cuatro especies de HPB *Trametes pubescens*, *Phanaerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius* durante un periodo de 7, 10 y 13 días de FES sobre el residuo agrícola tusa de maíz. *Pleurotus ostreatus* fue seleccionada para llevar a cabo la optimización de las condiciones fermentativas mediante un diseño central compuesto, del cual se estableció que la producción de lacasa se maximiza utilizando el extracto de malta como fuente de carbono, a una concentración de 18.2 g/L; el extracto de levadura como fuente de nitrógeno, ajustando la proporción carbono-nitrógeno a un valor de 5.15:1; el tween 80 como inductor, a una concentración de 0.17% v/v; y el contenido de humedad en 85.0%.

Como etapa siguiente, se implementaron diversos diseños factoriales que permitieron seleccionar al buffer acetato de sodio 50 mM, a pH de 6.00 y pH de 4.00, como mejores condiciones para llevar a cabo los procesos de extracción y cuantificación enzimática, respectivamente. Una vez concluida esta fase, se realizó un seguimiento diario de la cinética de actividad enzimática y actividad específica durante 18 días; este estudio permitió concluir que la lacasa producida bajo las condiciones previamente seleccionadas, alcanza su primer pico de actividad al octavo día de fermentación.

Con respecto a la actividad enzimática alcanzada, cabe señalar que se obtuvo un incremento de seis veces con respecto al valor reportado al inicio de la investigación ($8.6 \pm 0.8 \text{ U/g}_{\text{ss}}$), como resultado de la optimización de las condiciones fermentativas, así como del estudio de los procesos de extracción y cuantificación, y la construcción de las curvas cinéticas.

Asimismo, se evaluó la purificación del extracto crudo obtenido, seguido de la inmovilización del extracto purificado. Para la purificación, se evaluaron dos metodologías consecutivas: precipitación con sulfato de amonio y separación por sistemas bifásicos acuosos. Por su parte, para la inmovilización se evaluó una metodología estándar que permitió la síntesis de micropartículas de quitosano funcionalizadas con glutaraldehído.

El sistema final, resultante de la precipitación con sulfato de amonio a una concentración de saturación del 70% y la inmovilización de acuerdo con el método enunciado, se aplicó

en la decoloración del tinte rojo allura AC (RA), cuyo uso se extiende a industrias como la textil y alimentaria en sus procesos de tinción. En esta última sección, se incluyeron evaluaciones comparativas con varios sistemas, encontrando los mejores resultados del proceso decolorativo con una lacasa comercial, el extracto crudo y el extracto precipitado respectivamente.

Palabras clave: fermentación en estado sólido, hongos de la podredumbre blanca, enzimas ligninolíticas, lacasa, extracción enzimática, purificación e inmovilización enzimática, colorantes sintéticos.

Abstract

Production, purification and immobilization of laccase obtained from an optimized solid-state fermentation process.

Ligninolytic enzymes, named for their ability to oxidase the lignin polymer, have gained importance in the field of biotechnology because of their demonstrated ability to also oxidase other types of structurally simpler organic molecules. This feature has undoubtedly promoted their implementation in multiple industrial applications, highlighting pulp delignification in paper processing, agro-industrial waste use for the generation of biofuels and organic amendments, and treatment of effluents contaminated with recalcitrant compounds as synthetic dyes, among others.

Laccase, particularly from the well-known white-rot fungi (WRF), belongs to this group of ligninolytic enzymes and is especially important because it is produced in large amounts and in an extracellular way.

In this context, the research group on Synthesis, Reactivity and Transformation of Organic Compounds (SIRYTCOR for its acronym in Spanish) has developed a research line focused on ligninolytic enzymes production through solid-state fermentation (SSF). Thus, the present study aimed at strengthening that research line by evaluating the most suitable conditions for the production, extraction and quantification of laccase, which was obtained from the SSF process onto an organic support. Furthermore, taking into account some of the limitations found in the perspective of using laccase on a larger scale, the purification and immobilization of this enzyme were evaluated, and a study to determine its capability to decolorize a synthetic dye was carried out.

In the first place, laccase production by the four WRF *Trametes pubescens*, *Phanaerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* was evaluated during 7, 10 and 13 days of a SSF onto the agricultural by-product corncob. *Pleurotus ostreatus* was selected to carry out an optimization of the fermentative conditions through a central composite design. It was found that laccase production is maximized using malt extract as carbon source (18.2 g L⁻¹), yeast extract as nitrogen source fitting carbon-nitrogen ratio at 5.15:1, tween 80 as inducer (0.17 % v v⁻¹) and a moisture content of 85%.

Subsequently, several factorial designs allowed to select the 50 mM sodium acetate buffer pH = 6.00 and pH = 4.00 as the best conditions to carry out the enzymatic extraction and quantification processes, respectively. Once this phase was completed, a study of the kinetics of enzymatic activity and specific activity was performed during 18 days on a daily basis. This study allowed to conclude that the laccase produced under the previously selected conditions reaches its first peak of activity on the 8th day of fermentation.

Regarding the enzymatic activity obtained, it is worth mentioning that it was observed a six-fold increase with respect to the value reached at the beginning of the research (8.6 ± 0.8 U/g_{ss}), as a result of the optimization of fermentation conditions, as well as the study of the extraction process, quantification process and the construction of kinetic curves.

Likewise, the purification of the crude extract obtained was evaluated, followed by the immobilization of the purified extract. The enzymatic purification was carried out through two consecutive methodologies: ammonium sulfate precipitation and aqueous two-phase system. For its part, enzymatic immobilization was performed using a standard methodology that allowed the synthesis of chitosan microparticles functionalized with glutaraldehyde.

The final system, resulting from the ammonium sulfate precipitation with 70% of salt saturation and the immobilization according to the stated method, was evaluated in the decolorization of allura red AC, a synthetic dye extensively used in the textile and food industry in their dyeing processes. In this last section, several systems were considered for comparative purposes. The results show that the best decolorative systems were a commercial laccase, the crude extract and the precipitated extract, respectively.

Keywords: solid-state fermentation, white-rot fungi, ligninolytic enzymes, laccase, enzymatic extraction, enzymatic purification and immobilization, synthetic dyes.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras.....	XVIII
Lista de tablas	XIX
Lista de ilustraciones.....	XXII
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XXIII
1. Introducción.....	1
2. Planteamiento del problema.....	4
3. Justificación	7
4. Objetivos.....	10
4.1 Objetivo general.....	10
4.2 Objetivos específicos	10
5. Marco teórico.....	11
5.1 Hongos de podredumbre blanca	11
5.2 Enzimas ligninolíticas.....	11
5.2.1 Peroxidasas.....	12
5.2.2 Lacasas.....	13
5.3 Fermentación en estado sólido	15
5.3.1 Tipo de inóculo	16
5.3.2 Contenido de humedad	17
5.3.3 pH	17
5.3.4 Temperatura.....	18
5.3.5 Sustrato.....	18
▪ Residuos agroindustriales.....	19
5.3.6 Aireación	20
5.3.7 Agitación	20
5.3.8 Factores nutricionales	20
5.3.9 Inductores enzimáticos	21
5.4 Tusa de maíz	21
5.5 Purificación e inmovilización enzimática	22
5.5.1 Purificación enzimática.....	23
5.5.2 Inmovilización enzimática.....	24

5.6 Colorantes sintéticos	27
5.6.2 Rojo allura AC.....	27
6. Metodología.....	31
6.1 Equipos	31
6.2 Conservación de especies.....	31
6.3 Preparación del inóculo para la fermentación	32
6.4 Preparación del sustrato.....	32
6.5 Extracción enzimática.....	32
6.6 Cuantificación de actividad enzimática de la lacasa	32
6.7 Selección de la especie fúngica y el tiempo de fermentación	33
6.7.1 Condiciones de la FES para la selección de la especie y el tiempo de fermentación	33
6.7.2 Diseño estadístico de experimentos para la selección de la especie y el tiempo de fermentación	34
6.8 Determinación de las condiciones óptimas para la producción enzimática	34
6.8.1 Condiciones de la FES para la producción enzimática.....	34
6.8.2 Diseño estadístico de experimentos para la producción enzimática.....	35
6.9 Determinación de las condiciones más adecuadas para la extracción enzimática.....	36
6.9.1 Condiciones de la FES para la extracción enzimática.....	36
6.9.2 Diseño estadístico de experimentos para la extracción enzimática	36
6.10 Determinación de las condiciones más adecuadas para la cuantificación enzimática	38
6.10.1 Condiciones de la FES para la cuantificación enzimática.....	38
6.10.2 Diseño estadístico de experimentos para la cuantificación enzimática.....	38
6.11 Construcción de curvas cinéticas para la determinación del día de máxima actividad	39
6.12 Purificación enzimática	39
6.12.1 Preparación del extracto crudo.....	40
6.12.2 <i>Salting out</i> – Precipitación con sulfato de amonio	40
6.12.3 Separación por sistemas bifásicos acuosos – ATPS.....	41
6.13 Inmovilización enzimática sobre micropartículas de quitosano	44
6.14 Evaluación de la decoloración del colorante sintético rojo allura AC.....	45
6.15 Análisis estadístico	46
7. Resultados y discusión	49
7.1 Selección de la especie fúngica y el tiempo de fermentación	49
7.2 Determinación de las condiciones óptimas para la producción enzimática	53
7.3 Determinación de las condiciones más adecuadas para la extracción enzimática.....	63
7.4 Determinación de las condiciones más adecuadas para la cuantificación enzimática	70
7.5 Construcción de curvas cinéticas para la determinación del día de máxima actividad	76
7.6 Purificación enzimática	79
7.6.1 <i>Salting out</i> - Precipitación con sulfato de amonio	79
7.6.2 Separación por sistemas bifásicos acuosos – ATPS.....	82
7.7 Inmovilización enzimática sobre micropartículas de quitosano	92
7.8 Evaluación de la decoloración del colorante sintético rojo allura AC.....	96
8. Conclusiones y recomendaciones	103

8.1 Conclusiones	103
8.2 Recomendaciones	105
A. Anexo: Curva de humedad del sustrato sólido tusa de maíz.....	107
B. Anexo: Diseño central compuesto para selección de condiciones que optimizan la producción de lacasa. Modelos ajustados.....	109
C. Anexo: Resultados actividad enzimática – Optimización de las condiciones fermentativas para la producción enzimática. Sistema seleccionado.....	112
D. Anexo: Resultados cinética de actividad enzimática y actividad específica ...	115
E. Anexo: Resultados purificación mediante el sistema ATPS	117
F. Anexo: Resultados evaluación de la decoloración del colorante rojo allura AC	120
G. Anexo: Registro fotográfico	121
Bibliografía	125

Lista de figuras

	Pág.
Figura 5-1: Estructura química del grupo hemo.....	13
Figura 5-2: Mecanismo catalítico de la lacasa. S: sustrato.	14
Figura 5-3: Métodos de inmovilización enzimática.....	25
Figura 5-4: Estructura química del colorante sintético rojo allura AC.....	28
Figura 7-5: Resumen de resultados. Selección de la especie fúngica y el tiempo de fermentación.	51
Figura 7-6: Gráfica de contorno estimada para la actividad enzimática. Porcentaje de humedad = 85%. Proporción Carbono – Nitrógeno = 5.150 : 1.	56
Figura 7-7: Cinética de actividad enzimática.	77
Figura 7-8: Cinética de actividad específica.	77
Figura 7-9: Diagrama de Pareto para el factor de purificación en la fase inferior.....	83
Figura 7-10: Curva de calibración del colorante sintético rojo allura AC.	96
Figura 7-11: Resultados evaluación de la decoloración del tinte sintético rojo allura AC.	97
Figura A-12: Curva de humedad del sustrato sólido tusa de maíz.	107

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 5-1: Ventajas y desventajas de los métodos de inmovilización.....	25
Tabla 5-2: Propiedades del colorante sintético rojo allura AC	28
Tabla 6-3: Factores del diseño central compuesto evaluados en la optimización de la producción enzimática.....	35
Tabla 6-4: Combinaciones fuente de carbono/ fuente de nitrógeno/ inductor evaluadas en el diseño central compuesto.....	35
Tabla 6-5: Parámetros del diseño factorial 2^3 para la extracción enzimática. Buffers acetato de sodio y citrato de sodio.....	37
Tabla 6-6: Parámetros del diseño factorial 2^2 para la extracción enzimática. Buffer McIlvaine	37
Tabla 6-7: Parámetros del diseño factorial 2^2 para la cuantificación enzimática. Buffers acetato de sodio y citrato de sodio.....	38
Tabla 6-8: Parámetros del diseño unifactorial para la cuantificación enzimática. Buffer McIlvaine	39
Tabla 6-9: Cantidad de sulfato de amonio adicionada a 10 mL de extracto crudo para alcanzar el respectivo porcentaje de saturación a 4°C.....	40
Tabla 6-10: Parámetros del diseño Plackett Burman para la purificación enzimática mediante la metodología ATPS.....	41
Tabla 6-11: Parámetros del diseño central compuesto para la primera optimización de la purificación enzimática mediante la metodología ATPS.....	42
Tabla 6-12: Parámetros del diseño central compuesto para la segunda optimización de la purificación enzimática mediante la metodología ATPS.....	42
Tabla 7-13: Actividad enzimática promedio para <i>Pleurotus ostreatus</i> a los 7, 10 y 13 días de fermentación.....	49
Tabla 7-14: Actividad enzimática promedio para <i>Pleurotus pulmonarius</i> a los 7, 10 y 13 días de fermentación.....	50
Tabla 7-15: Actividad enzimática promedio para <i>Trametes pubescens</i> a los 7, 10 y 13 días de fermentación.....	50
Tabla 7-16: Actividad enzimática promedio de <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Pleurotus pulmonarius</i> y <i>Trametes pubescens</i> a los 7 días de fermentación.....	51
Tabla 7-17: Condiciones de la FES que maximizan la actividad enzimática.....	54
Tabla 7-18: Valores máximos teóricos de actividad enzimática.....	54

Tabla 7-19:	Valores de actividad enzimática promedios obtenidos bajo condiciones de FES optimizadas.....	55
Tabla 7-20:	Resultados del ANOVA para la actividad enzimática promedio de los sistemas optimizados.....	55
Tabla 7-21:	Resultados del ANOVA para el diseño central compuesto seleccionado... ..	57
Tabla 7-22:	Resultados del diseño factorial para la extracción enzimática. Buffer citrato de sodio.....	64
Tabla 7-23:	Resultados del ANOVA para el diseño factorial. Extracción enzimática, buffer citrato de sodio.....	64
Tabla 7-24:	Resultados del diseño factorial para la extracción enzimática. Buffer acetato de sodio.....	66
Tabla 7-25:	Resultados del ANOVA para el diseño factorial. Extracción enzimática, buffer acetato de sodio.....	67
Tabla 7-26:	Resultados del diseño factorial para la extracción enzimática. Buffer Mcllvaine.	68
Tabla 7-27:	Resultados del ANOVA para el diseño factorial. Extracción enzimática, buffer Mcllvaine.....	69
Tabla 7-28:	Resultados del diseño factorial para la cuantificación enzimática. Buffer citrato de sodio.....	70
Tabla 7-29:	Resultados del ANOVA para el diseño factorial. Cuantificación enzimática, buffer citrato de sodio.....	71
Tabla 7-30:	Resultados del diseño factorial para la cuantificación enzimática. Buffer acetato de sodio.....	72
Tabla 7-31:	Resultados del ANOVA para el diseño factorial. Cuantificación enzimática, buffer acetato de sodio.....	72
Tabla 7-32:	Resultados del diseño unifactorial para la cuantificación enzimática. Buffer Mcllvaine.	73
Tabla 7-33:	Resultados del ANOVA para el diseño factorial. Cuantificación enzimática, comparación entre buffers.....	74
Tabla 7-34:	Resultados prueba de comparaciones múltiples para los tratamientos pertenecientes al grupo a.....	74
Tabla 7-35:	Resultados evaluación preliminar de la precipitación con sulfato de amonio.	79
Tabla 7-36:	Resultados evaluación de la precipitación con sulfato de amonio entre 60 y 80% de saturación de la sal.	80
Tabla 7-37:	Condiciones del sistema ATPS que maximizan el factor de purificación en la fase inferior. Resultados primera optimización.	86
Tabla 7-38:	Condiciones del sistema ATPS que maximizan el factor de purificación en la fase inferior. Resultados segunda optimización.....	87
Tabla 7-39:	Factor de purificación promedio obtenido bajo el sistema ATPS optimizado.	88

Tabla 7-40:	Separación de lacasa hacia la fase salina de un sistema ATPS – Resumen de estudios.....	89
Tabla 7-41:	Resultados inmovilización enzimática sobre micropartículas de quitosano.	93
Tabla A-42:	Resultados actividad enzimática para el diseño central compuesto del sistema seleccionado: Fuente de carbono – Extracto de malta; Fuente de nitrógeno – Extracto de levadura; Inductor – Tween 80.	112
Tabla A-43:	Resultados cinética de actividad enzimática	115
Tabla A-44:	Resultados cinética de actividad específica.....	116
Tabla A-45:	Resultados factor de purificación en la fase inferior – Diseño Plackett Burman.	117
Tabla A-46:	Resultados factor de purificación en la fase inferior – Primer diseño de optimización central compuesto.	117
Tabla A-47:	Resultados factor de purificación en la fase inferior – Segundo diseño de optimización central compuesto.	118
Tabla A-48:	Porcentaje de decoloración del rojo allura AC.	120

Lista de ilustraciones

	Pág.
Ilustración A-1: Diseño central compuesto para selección de condiciones que optimizan la producción de lacasa. Resultados al séptimo día.....	121
Ilustración A-2: Resumen obtención de extracto crudo y extracto precipitado.	122
Ilustración A-3: Resumen obtención de micropartículas e inmovilización enzimática (Sección 6.13).	122
Ilustración A-4: Decoloración del tinte sintético rojo allura AC luego de 18 h de iniciado el proceso.	123

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
<i>A</i>	Absorbancia	1	
<i>C</i>	Concentración de la fuente de carbono	g/L	
<i>C:N</i>	Proporción carbono:nitrógeno	1	
<i>D</i>	Decoloración	0.01	Ec. 6.5
<i>Di</i>	Dilución	1	
<i>FP</i>	Factor de purificación	1	Ec. 6.3
<i>H</i>	Porcentaje de humedad	0.01	Anexo
<i>I</i>	Concentración de inductor	mM, %v/v	
<i>l</i>	Longitud de la celda	cm	
<i>m</i>	Masa de proteína total	mg	
<i>R</i>	Rendimiento en porcentaje	0.01	Ec. 6.4
<i>t</i>	Tiempo	min	
<i>V</i>	Volumen	mL	
<i>W</i>	Masa de sustrato seco fermentado	g	

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
ϵ	Coefficiente de extinción molar	$L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	
λ	Longitud de onda	nm	

Subíndices

Subíndice	Término
e	Extracción
f	Final de la cubeta
i	Inicial
m	Muestra
ss	Sustrato seco
t	Tiempo de monitoreo

Abreviaturas

Abreviatura	Término
--------------------	----------------

<i>ATPS</i>	Separación por sistemas bifásicos acuosos
<i>FES</i>	Fermentación en estado sólido
<i>HPB</i>	Hongos de podredumbre blanca
<i>LiP</i>	Lignino peroxidasa
<i>MnP</i>	Manganeso peroxidasa
<i>P</i>	Precipitado
<i>RA</i>	Rojo allura AC
<i>S</i>	Sobrenadante
<i>SSF</i>	Solid-state fermentation
<i>TM</i>	Tusa de maíz
<i>WRF</i>	<i>White rot fungi</i>

1. Introducción

Desde el punto de vista químico, la lacasa corresponde al 1,2-benzenediol: oxígeno oxidorreductasa EC 1.10.3.2, y es una enzima perteneciente al grupo de las oxidasas azules, capaz de oxidar una gran variedad de compuestos orgánicos, entre los que se destaca la lignina, los orto- y para- fenoles, aminofenoles, polifenoles, poliaminas y diaminas, así como algunos iones inorgánicos, tales como el $\text{Mo}(\text{CN})_8^{4-}$, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, $\text{Os}(\text{CN})_6^{4-}$ y $\text{W}(\text{CN})_8^{4-}$ [1], [2].

Dada su capacidad de descomponer la lignina, un biopolímero aromático altamente recalcitrante, la lacasa ha sido catalogada como una “enzima ligninolítica” y ha sido utilizada en múltiples aplicaciones industriales como la deslignificación de la pulpa en el procesamiento del papel, el aprovechamiento de residuos agroindustriales para generación de biocombustibles o enmiendas orgánicas, la modificación y blanqueo de fibras textiles, la remoción de compuestos fenólicos durante el procesamiento de bebidas, el tratamiento de aguas contaminadas con colorantes sintéticos, fármacos, hormonas esteroideas, pesticidas y herbicidas clorados, entre otras [3].

De acuerdo con Barr & Aust (1994), el mecanismo de acción de estas enzimas ligninolíticas se basa en un sistema de formación de radicales libres a partir de diferentes reacciones en cadena [4], es decir, al romper los enlaces carbono-carbono y carbono-oxígeno de la molécula a oxidar, se forman radicales libres que actúan ya sea como oxidantes secundarios de otros compuestos apartados de los sitios activos de las enzimas, o como formadores de otros radicales [4], [5].

Ahora bien, un elemento importante al momento de considerar el uso de la lacasa en procesos industriales es la disponibilidad de esta enzima, la cual es producida por un gran número de organismos que incluyen plantas, insectos, hongos y bacterias [6]. Sin embargo, son las lacasas fúngicas, y en especial las provenientes de los hongos de

podredumbre blanca (HPB), el objeto de interés de la mayoría de estudios debido tanto a la transformación de manera natural y eficiente de lignina, celulosa y hemicelulosa a dióxido de carbono [6], como al hecho de que son producidas de manera extracelular y en gran cantidad [7].

En concordancia con lo anterior, un aspecto determinante en la producción de lacasas mediante HPB es el tipo de fermentación implementado [6], [7]. Tradicionalmente, se ha utilizado la fermentación en sumergido debido a la amplia disponibilidad de información con relación al control de los parámetros de proceso más importantes como agitación, aireación, temperatura y pH. Aunque esta metodología ha generado grandes aportes y resultados positivos en cuanto a la producción de lacasa, no es óptima para los hongos ya que difiere en demasía de las condiciones naturales en las cuales realizan sus procesos metabólicos [8]. Por lo tanto, en procura de reproducir el ambiente natural de estos microorganismos, se ha utilizado la fermentación en estado sólido (FES) y, se ha recurrido específicamente al aprovechamiento de residuos agroindustriales como material de soporte.

Es valioso mencionar que, en vista de los numerosos beneficios operativos que proveen los biocatalizadores, su uso ha sido cada vez más extensivo a diferentes procesos industriales. En este sentido, las enzimas son agentes de naturaleza biodegradable que típicamente requieren condiciones sencillas en términos de temperatura y pH apropiados para llevar a cabo las reacciones. Adicionalmente, la diversidad de los microorganismos productores, les confiere la capacidad de transformar un amplio rango de sustratos [3]. Asimismo, aportan facilidad en el manejo, control y estandarización de las condiciones de la reacción [9].

No obstante lo anterior, aún resta un importante número de retos a superar en la perspectiva de escalar dicho proceso a nivel industrial. A continuación se especifican los tres desafíos hacia los cuales se dirigió este estudio:

1. Producción de la enzima en grandes cantidades mediante FES.
2. Purificación de la enzima en procura de incrementar su eficiencia.

3. Inmovilización de la enzima dado que el uso en su forma soluble dificulta la recuperación y reutilización de la misma, a la vez que impide su uso en modo continuo [3], [10].

Bajo este contexto, la presente investigación se enfocó en el establecimiento de un sistema eficiente de producción de lacasa a partir de un proceso optimizado de FES sobre el residuo agrícola tusa de maíz y la posterior purificación e inmovilización enzimática. Adicionalmente, se efectuó una evaluación preliminar de la posible aplicación de dicha enzima en la decoloración del tinte sintético rojo allura AC (RA), dado que esta molécula es de extenso uso en industrias importantes como la textil y la alimentaria.

2. Planteamiento del problema

Es ampliamente conocido que las tendencias actuales en materia de biotecnología han promovido la búsqueda de alternativas biológicas para la resolución de problemáticas ambientales, ya que estas metodologías han demostrado ser no solo muy eficientes, sino también opciones sostenibles y ecoamigables.

En ese sentido, surge la implementación de enzimas ligninolíticas y muy en particular de lacasa, como una propuesta potencial. Este enfoque basado en sistemas mediados por enzimas está comenzando a reemplazar los procesos tradicionales, sobre todo por el hecho de que estos últimos presentan características indeseadas. A continuación se mencionan algunas de ellas:

En la industria textil, típicamente se utilizan métodos físico-químicos como la adsorción, coagulación, filtración, oxidación electroquímica y ozonización para el tratamiento de los efluentes contaminados con colorantes sintéticos; sin embargo, se ha observado que estas metodologías generan productos secundarios extremadamente tóxicos, y que además implican altos costos de operación/mantenimiento y dificultan el manejo de grandes cantidades de material residual [3], [11], [12].

En la industria papelera, se reporta que la etapa de pulpeo ha sido realizada de manera rutinaria mediante dos procesos: pulpeo mecánico y pulpeo químico, encargados de producir el 25% y el 75% de la pulpa de celulosa en el mundo, respectivamente [13]. El problema con estas metodologías radica en que, la primera requiere gran gasto energético, mientras que la segunda presenta bajas conversiones (cercasas al 45%), generando así implicaciones tanto económicas como ambientales [14], [15].

Así, la industria textil y papelera son ejemplos donde se ha incursionado en la implementación de procesos con un enfoque biológico. Respecto a la primera, múltiples estudios ratifican la eficiencia de la lacasa en la decoloración de un considerable número de tintes sintéticos como el carmín de índigo, cristal violeta, azul brillante de remazol R, naranja de metilo, entre muchos otros [16]–[19]; los autores señalan que puede ser un proceso “simple”, con grandes ventajas en costos operacionales y sin la aparición de compuestos secundarios más tóxicos que los inicialmente presentes. En cuanto a la segunda, Singh & Kumar-Arya (2019) reportan que el rol de la lacasa incluye la acción sinérgica de otras enzimas oxidasas para descomponer la lignina y así lograr un proceso de producción de pulpa de celulosa más eficiente, ecoamigable y limpio [14].

Ahora bien, estas son tan solo dos aplicaciones reportadas en las que se ha implementado la lacasa de manera exitosa; sin embargo, existen muchos otros casos en los que puede ser utilizada, tales como: la oxidación de moléculas orgánicas para el tratamiento de aguas contaminadas con agentes xenobióticos, el aprovechamiento de residuos agroindustriales para generación de biocombustibles o enmiendas orgánicas, la modificación y blanqueo de fibras textiles y la remoción de compuestos fenólicos en el procesamiento de bebidas, entre otras [3].

Con el contexto anterior en mente, la lacasa se define como una enzima oxidorreductasa capaz de oxidar un gran número de compuestos fenólicos y no fenólicos, a la par que reduce el oxígeno a agua. En particular, la lacasa de origen fúngico ha resaltado sobre las de origen bacteriano, vegetal y animal debido a que los hongos, y en especial los HPB, son capaces de producirla en gran cantidad y de manera extracelular [6], [7]. Estas dos características fundamentales han promovido su utilización en la mayoría de las aplicaciones descritas.

No obstante, en la perspectiva de impulsar el uso de la lacasa a nivel industrial, resta un gran número de retos a superar de los cuales se resaltan principalmente la producción en baja cantidad de la enzima, condiciones fermentativas para su obtención a veces costosas, la utilización de extractos donde la enzima se encuentra diluida y el uso de enzimas libres, cuya disposición impide su recuperación y reutilización [3], [10].

Bajo este panorama, la presente investigación se orientó a establecer un proceso conjunto de producción, purificación e inmovilización de la enzima lacasa, obtenida a partir de la fermentación en estado sólido del residuo tusa de maíz. Para llevar a cabo este trabajo se plantearon las siguientes preguntas de investigación, hacia cuyas respuestas se encaminó el desarrollo de la presente tesis, a saber: ¿qué especie de hongo de podredumbre blanca es más adecuada para la producción de lacasa?, ¿cuáles son las condiciones fermentativas que optimizan la producción de la misma?, ¿cuál es el mejor sistema para extraer y cuantificar la enzima?, ¿cómo se comporta la cinética de actividad enzimática del microorganismo?, ¿qué metodología de purificación permite recuperar la mayor cantidad de lacasa, de manera económica, sin alterar notablemente su actividad?, ¿bajo qué condiciones se logra una adecuada inmovilización de la enzima?, ¿es posible implementar eficientemente un sistema de producción, purificación e inmovilización de lacasa en la decoloración de un tinte?

Los resultados de esta investigación representan un valioso aporte a la biotecnología a nivel aplicado, dado que permiten ofrecer una metodología novedosa, eficiente y sostenible que abarcó a profundidad un conjunto de importantes aspectos, tales como la producción, extracción, cuantificación, purificación e inmovilización enzimática para múltiples y futuras aplicaciones en los distintos campos de acción. Adicionalmente, en este trabajo se llevó a cabo un primer acercamiento del sistema enzimático obtenido a su utilización en la decoloración de un tinte sintético de uso generalizado en procesos de la industria textil y alimentaria.

3. Justificación

Diversos procesos industriales tales como el tratamiento de efluentes hídricos contaminados, la producción de pulpa de celulosa a partir de madera y el blanqueo de fibras textiles, han sido tradicionalmente llevados a cabo mediante diversas metodologías físico-químicas que a pesar de su alta eficiencia, presentan graves desventajas, como los altos costos energéticos o la generación de compuestos tóxicos [3], [11], [12], [14], [15], que deben ser tomadas en consideración, sobre todo en la época actual, donde las tendencias ecoamigables han empezado a tomar fuerza.

Como alternativa promisoría a dichas metodologías, desde la biotecnología surge la utilización de lacasa en los diferentes tipos de procesos, aportando no solo grandes rendimientos, sino también costos moderados y beneficios ambientales significativos [3]. En particular, los HPB han sido de mayor importancia en aplicaciones biológicas gracias a la diversa maquinaria enzimática que poseen, la cual emplean en sus procesos naturales relacionados con la degradación de la lignina [6].

En este sentido, la FES ha demostrado ser la metodología más adecuada en la producción de enzimas por los HPB, debido principalmente a que recrea las condiciones naturales bajo las cuales dichos organismos llevan a cabo sus actividades metabólicas [8]. Por otro lado, un aspecto a resaltar es el aprovechamiento de residuos agroindustriales como soporte de la fermentación, lo cual permite estructurar una estrategia de impacto ambiental favorable que posibilita a su vez la generación de un material de valor agregado y, contribuye a solucionar los inconvenientes asociados con la disposición de grandes cantidades de dichos subproductos agrícolas [7], [8].

En particular, la tusa de maíz es un residuo altamente disponible debido a que este cereal es producido y consumido en todo el mundo en cantidades que superan las mil millones

de toneladas métricas al año [20]. Solo en Colombia, en el 2017 se estimó una producción de casi 1.2 millones de toneladas [21], [22], las cuales representan en un 50% materiales de desecho como la hoja de la mazorca y la tusa del maíz [23]. Estas cifras, junto con el bajo costo asociado a la obtención de la tusa de maíz específicamente, y su alto contenido de polisacáridos de interés como la lignina, la hemicelulosa y la celulosa, señalan la pertinencia de usarla como soporte de la fermentación en el proceso de producción de enzimas ligninolíticas, y en especial de lacasas.

Ahora bien, entre el gran número de enzimas secretadas por los HPB, las de real importancia para la presente investigación son aquellas producidas de manera extracelular y que, además, tengan la capacidad de degradar moléculas de manera inespecífica, tales requerimientos son cumplidos por la manganeso peroxidasa, la lignino peroxidasa y la lacasa. Además, esta última, al presentar menores requerimientos para llevar a cabo la catálisis, ha sido mayormente estudiada e implementada en diversas aplicaciones biotecnológicas [6], [7]. No obstante, con miras a generar un proceso biológico a gran escala, se deben abordar aquellos inconvenientes asociados en primer lugar a la producción de grandes cantidades de la enzima mediante condiciones fermentativas favorables; en segundo lugar, la utilización de extractos diluidos de la enzima que implican considerables volúmenes de dicho extracto y, en tercer lugar, el uso de enzimas solubles que dificultan la recuperación y reutilización de las mismas [3], [10].

Bajo este contexto, se observa la necesidad de establecer una estrategia eficiente de producción, purificación e inmovilización de lacasa, la cual se abordó en esta investigación mediante un proceso optimizado de FES utilizando como soporte el residuo agroindustrial tusa de maíz, seguido del estudio de la extracción, cuantificación, purificación y posterior inmovilización enzimática. Por último, se evaluó la decoloración del tinte sintético rojo allura AC, como primer acercamiento hacia una de las potenciales aplicaciones en las que el sistema puede ser implementado y cuyos resultados beneficiarían en gran medida a la solución de la problemática ambiental asociada al tratamiento de efluentes industriales contaminados con colorantes sintéticos.

Cabe señalar que los resultados del presente trabajo fortalecen la línea de investigación enfocada al “Tratamiento biológico mediante Fermentación en Estado Sólido” del grupo de investigación SIRYTCOR, al ofrecer una estrategia compacta que permite una alta

producción enzimática para su posterior extracción e inmovilización, constituyendo sistemas biológicos de potencial aplicación en diferentes procesos productivos. Estos hallazgos a su vez, consolidan la base de la más reciente línea de investigación centrada en la producción enzimática y su perspectiva de escalamiento, dando respuesta así a las coyunturas investigativas del momento y señalando los grandes alcances de la biotecnología aplicada.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Establecer un sistema eficiente de producción de lacasa a partir de un proceso optimizado de fermentación en estado sólido sobre el residuo agrícola tusa de maíz y realizar la posterior extracción, purificación e inmovilización enzimática. Adicionalmente, efectuar una evaluación preliminar de su posible aplicación en la decoloración de un tinte sintético.

4.2 Objetivos específicos

1. Establecer las condiciones fermentativas óptimas para la producción de lacasa mediante un diseño de superficie de respuesta con los factores más importantes. Cabe señalar, que inicialmente se realizará un diseño factorial para seleccionar el hongo de podredumbre blanca más apropiado.
2. Determinar mediante diseños factoriales las condiciones más adecuadas tanto para la extracción como para la medición de la enzima lacasa. Posteriormente, realizar un monitoreo de la actividad enzimática durante un período establecido.
3. Definir un método eficiente y de bajo costo tanto para el proceso de purificación de la enzima lacasa como para su subsecuente inmovilización.
4. Realizar una evaluación preliminar de la posible aplicación de la lacasa en la decoloración de un tinte, comparando la enzima no inmovilizada con la enzima inmovilizada.

5. Marco teórico

5.1 Hongos de podredumbre blanca

Los hongos de podredumbre blanca pertenecen a los *phylums* Basidiomycota y Ascomycota y se caracterizan por utilizar la celulosa y hemicelulosa presente en materiales orgánicos en descomposición, como fuente de carbono y energía para sus procesos metabólicos naturales [24]. Sin embargo, dado que dichos sustratos no están disponibles debido a la presencia de la lignina, un polímero aromático altamente recalcitrante que los “envuelve” y que se encarga de conferirle dureza y resistencia a las células vegetales, los HPB secretan una amplia variedad de enzimas extracelulares que oxidan la lignina, accediendo de esta forma a los compuestos asimilables [24], [25]. Estas biomoléculas, conocidas como enzimas ligninolíticas, son sistemas muy estables posiblemente en respuesta al hecho de que estos organismos tienen la capacidad de tolerar condiciones ambientales variables en términos de temperatura, pH y niveles de humedad [5]

5.2 Enzimas ligninolíticas

Como se mencionó anteriormente, los HPB han sido reconocidos por su capacidad de degradar la lignina mediante la producción de enzimas ligninolíticas; las cuales se presume son sintetizadas a medida que el micelio del hongo se extiende para colonizar el sustrato, hecho que a su vez facilita la penetración del organismo en el polímero a degradar [5].

Si bien la producción de enzimas ligninolíticas varía entre especies de hongos, las dos grandes familias que se cree están involucradas, de manera general, en la oxidación de la lignina son las peroxidasas y las lacasas [5], [24], [25]. De acuerdo con Barr & Aust (1994), su mecanismo de acción se basa en un sistema de formación de radicales libres a partir de diferentes reacciones en cadena [4], es decir, al romper los enlaces carbono-carbono y carbono-oxígeno de la molécula, forman radicales libres que actúan ya sea como oxidantes

secundarios de otros compuestos apartados de los sitios activos de las enzimas, o como formadores de otros radicales [4], [5]. Por otro lado, es valioso mencionar que, según varios autores, la producción de estas enzimas ocurre principalmente durante el metabolismo secundario de los hongos, como respuesta a la carencia de nutrientes, tales como el carbono y el nitrógeno [4], [5].

Ahora bien, se ha planteado que si estas enzimas son capaces de oxidar un polímero tan complejo como la lignina, el cual posee diferentes tipos de subunidades ensambladas aleatoriamente en una estructura tridimensional [24], podrían de igual manera oxidar otros compuestos estructuralmente más simples, que son de interés en diferentes procesos industriales. En tal sentido, estas biomoléculas han ganado importancia en el campo de la biotecnología por su creciente uso en aplicaciones como la remediación de aguas contaminadas con compuestos orgánicos como colorantes [26], pesticidas [27], fármacos [28], dioxinas [29]; la deslignificación de la pulpa en el procesamiento del papel; el aprovechamiento de residuos agroindustriales para generación de biocombustibles o enmiendas orgánicas; la modificación y blanqueo de fibras textiles; la remoción de compuestos fenólicos en el procesamiento de bebidas, entre otras [3].

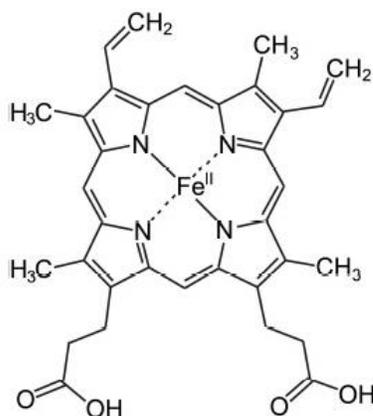
En particular, las enzimas ligninolíticas procedentes de los HPB presentan dos características fundamentales que les ha permitido ganar importancia en dichos procesos, la primera se relaciona con su producción de forma extracelular y la segunda con su acción catalítica no selectiva. El hecho de que sean producidas de manera extracelular tiene importantes ventajas a saber: 1) el microorganismo no necesita transportar los sustratos al interior de la célula para oxidarlos, 2) tienen la capacidad de oxidar compuestos de baja solubilidad y, 3) la extracción enzimática es relativamente fácil y rápida [5]. Por otro lado, ser catalizadores no selectivos les confiere a estas enzimas la habilidad de transformar diferentes sustratos, cubriendo así variadas aplicaciones en diversas industrias [5], [24]

5.2.1 Peroxidasas

La manganeso peroxidasa (MnP) y la lignino peroxidasa (LiP) son enzimas glicosiladas que utilizan el peróxido de hidrógeno como agente oxidante para llevar a cabo la catálisis. En cuanto a la primera, se sabe que oxida el Mn^{2+} a Mn^{3+} , utilizando como cofactor el grupo

hemo (ver Figura 5-1), y es extensamente reconocida por catalizar la reacción de oxidación de un amplio rango de sustratos fenólicos mediante la formación de quelatos de manganeso, para lo cual requiere de un agente quelante, típicamente un ácido orgánico, que estabilice el metal. En cuanto a la LiP, ha resaltado por su capacidad de oxidar compuestos no fenólicos y se reporta que tiene similitudes con la MnP en cuanto a los residuos aminoácidos presentes en el sitio activo y en la utilización del grupo hemo como cofactor enzimático [30]. Además, es importante mencionar que, de acuerdo con Hatakka & Hammel (2010), es más común en los HPB la producción de MnP que de LiP [31].

Figura 5-1: Estructura química del grupo hemo.



De acuerdo a lo anteriormente descrito, las peroxidasas requieren de la presencia de peróxido de hidrógeno para llevar a cabo la reacción de oxidación, por lo que su adición podría representar costos que pueden llegar a ser innecesarios si se usan las lacasas, enzimas que únicamente precisan de oxígeno para efectuar la catálisis. Estos bajos requerimientos sumados a que pueden tanto degradar compuestos fenólicos como no fenólicos, hacen de las lacasas enzimas promisorias en aplicaciones biotecnológicas [7], [9], [32].

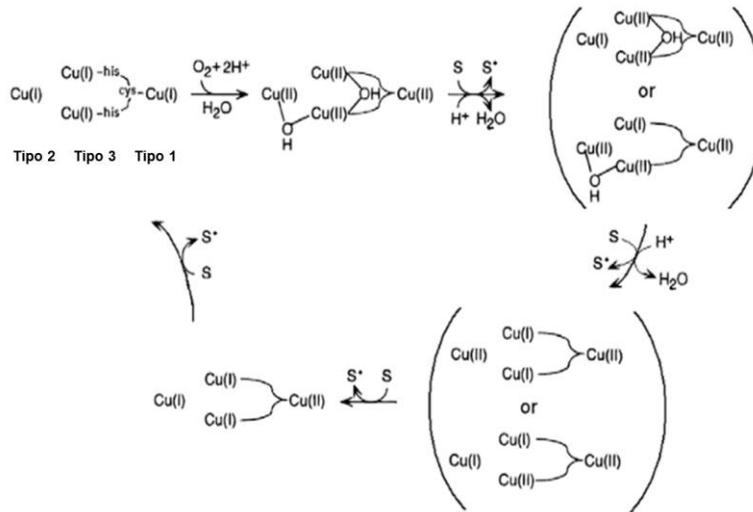
5.2.2 Lacasas

La lacasa, 1,2-benzenediol: oxígeno oxidoreductasa EC 1.10.3.2, es una enzima perteneciente al grupo de las oxidasas azules que contiene cuatro átomos de cobre, denominados tipo I, II y III, en el sitio activo de la proteína. Estas enzimas catalizan la oxidación de un gran número de compuestos aromáticos, a la vez que reducen completamente el oxígeno a agua [33]; y adicionalmente han demostrado la capacidad de

extender su rango de reacciones a sustratos no aromáticos en la presencia de mediadores, los cuales son estructuras de bajo peso molecular fácilmente oxidables que actúan como intermediarios redox entre el sitio activo de la enzima y el sustrato no aromático [7], [30].

En cuanto al mecanismo de acción de esta enzima (Figura 5-2), de manera general se tiene que, en su forma nativa, los cuatro átomos de cobre se encuentran en estado monovalente como Cu^+ , cuando el oxígeno se une al clúster formado por el cobre tipo II y los dos cobres tipo III, los cuatro átomos se oxidan a Cu^{2+} y el oxígeno es entonces reducido para formar agua. Por su parte, la oxidación del sustrato siempre es llevada a cabo por el cobre tipo I mediante la transferencia de uno o más electrones desde dicho sustrato al clúster ya mencionado [7].

Figura 5-2: Mecanismo catalítico de la lacasa. S: sustrato.



Nombre de la fuente: Tomada de [19].

Si bien las lacasas fúngicas son el grupo más estudiado de estas enzimas para aplicaciones industriales, debido a que son producidas en gran cantidad y de manera extracelular, se ha reportado que bacterias, plantas e insectos son también productores de lacasas [7]. Sin embargo, las bacterianas tienen la gran desventaja de producirse de manera intracelular, mientras que las provenientes de plantas e insectos son sintetizadas en baja cantidad y aún no han sido lo suficientemente estudiadas [7], [34]. Estos factores son claramente limitantes, y, debido a que los hongos han podido superarlos, las lacasas

fúngicas se consolidan como indudables agentes biológicos en el campo de la biotecnología.

5.3 Fermentación en estado sólido

Uno de los factores más determinantes en la producción de lacasas fúngicas es el tipo de fermentación implementado [6], [7]. Tradicionalmente, se ha utilizado la fermentación en sumergido debido a la amplia disponibilidad de información en cuanto al control de parámetros como agitación, aireación, temperatura y pH. Sin embargo, aunque los porcentajes de producción han sido bastante altos [35]–[37], esta metodología no es apropiada para el trabajo con hongos, ya que difiere en demasía de las condiciones naturales bajo las cuales estos realizan sus procesos metabólicos [8]. En este contexto, ha surgido la fermentación en estado sólido como potencial estrategia en la biorremediación de xenobióticos que permite además reproducir el ambiente natural de los microorganismos en cuestión.

La FES ha sido típicamente definida como un proceso en el cual los microorganismos crecen sobre un soporte sólido en presencia mínima de agua libre, donde el nivel de humedad requerido para garantizar la actividad biológica de los microorganismos, se encuentra absorbido o acompanyado en el soporte sobre el cual se lleva a cabo la fermentación [38].

Algunos autores reconocen una clasificación del proceso en dos categorías, de acuerdo con la naturaleza de dicha matriz sólida: 1) fermentación sobre materiales inertes, los cuales actúan únicamente como soporte y, 2) fermentación sobre materiales no inertes, los cuales no solo funcionan como soporte, sino que también aportan parte de los nutrientes necesarios para el crecimiento del hongo [39]. Respecto a este último tipo de proceso, es importante mencionar que suele ser denominado “fermentación en sustrato sólido”, sin embargo, su uso intercambiable con el término “fermentación en estado sólido” es generalizado y, por lo tanto, en el presente apartado se utilizará esta última notación.

Como se mencionó previamente, la principal razón por la que se selecciona la FES para procesos de producción enzimática a partir de HPB, en lugar de la convencional fermentación en sumergido, es el hecho de que la primera recrea las condiciones naturales

bajo las cuales dichos organismos llevan a cabo sus procesos metabólicos. Sin embargo, se han identificado ventajas adicionales en relación a los procesos en medio sólido, las cuales se enuncian a continuación (tomadas de [40]–[42]):

- Presentan menores requerimientos en cuanto a la esterilización debido a que la actividad del agua es mucho menor que en procesos en sumergido.
- Permiten mayor productividad enzimática.
- Son menos susceptibles a inhibición por sustrato permitiendo la obtención de productos en mayor concentración.
- Pueden ser llevados a cabo sobre residuos agroindustriales con grandes impactos positivos de carácter económico y ambiental.
- Reducen el gasto y la contaminación de agua, debido a la pequeña cantidad requerida.
- Disminuyen los costos asociados a la concentración del producto final, dado que no se encuentran diluidos en una matriz líquida.

Ahora bien, al ser la FES un proceso fermentativo, es de esperarse que su eficiencia esté supeditada a diversos parámetros determinantes, no solo en el crecimiento y desarrollo del del microorganismo, sino también en la producción de metabolitos secundarios como lo son las enzimas ligninolíticas. Entre dichos factores se identifican el tipo de inóculo, contenido de humedad, pH, temperatura, sustrato, tamaño de partícula, aireación, agitación, factores nutricionales y presencia de inductores, entre otros [38], los cuales serán discutidos a posteriori.

5.3.1 Tipo de inóculo

Tanto esporas como células vegetativas han sido reportados entre los tipos de inóculo para el proceso de FES [38], [43], cada uno de los cuales presenta pros y contras al momento de su implementación.

Respecto a las esporas, se identifican tres grandes ventajas de su uso: 1) mayor flexibilidad en cuanto a la preparación del inóculo, 2) facilidad de almacenamiento por largos períodos de tiempo sin perder actividad, y 3) mayor resistencia al manejo que pueda ocurrir durante

la transferencia de un medio a otro. Ahora bien, entre sus desventajas más remarcables se encuentran las prolongadas fases de adaptación dado que al constituir sistemas metabólicamente latentes, su actividad biológica debe ser inducida; adicionalmente, poseen condiciones óptimas diferentes para la germinación y el crecimiento micelial y requieren de grandes volúmenes de inóculo para su uso [43].

En cuanto a las células vegetativas, se ha encontrado que estas presentan mayores rendimientos en la producción enzimática, debido probablemente al inicio inmediato o casi inmediato de sus procesos metabólicos, así como al pronto aprovechamiento del sustrato [43].

5.3.2 Contenido de humedad

El contenido de humedad es un parámetro fundamental al momento de realizar un proceso de FES debido a que el agua es un componente indispensable en el desarrollo de los procesos metabólicos de los hongos. Sin embargo, es importante aclarar que ni el exceso de agua ni la carencia de esta favorece el proceso [38]. Si ocurre lo primero, puede darse una aglomeración de las partículas del sustrato, así como una limitación en la transferencia de gases, como por ejemplo el oxígeno, y una competencia con bacterias, las cuales sí se ven favorecidas ante la abundancia del agua [44]. En contraste, si ocurre lo segundo se puede reducir la difusión de nutrientes, limitar el crecimiento del hongo y minimizar la estabilidad de la enzima [45].

En general, el contenido de humedad en los procesos de FES varía entre 30 y 85% y, específicamente para los hongos filamentosos, se ha reportado su habilidad de crecimiento en un amplio intervalo que va desde un 20% hasta un 70% de humedad [38].

5.3.3 pH

Con relación al pH, se han reportado diferentes razones por las cuales este parámetro puede cambiar en un proceso de FES, entre ellas se resaltan la producción de ácidos orgánicos por parte de los hongos y la hidrólisis de la urea cuando esta es usada como fuente de nitrógeno para el crecimiento fúngico [38]. Ahora bien, los hongos filamentosos han demostrado un buen crecimiento a lo largo de un amplio rango de pH que va desde 2.0 hasta 9.0, con un rango óptimo entre 3.8 y 6.0, lo cual no solo señala una gran

versatilidad que puede ser aprovechada en favor de la inhibición del crecimiento bacteriano [38], sino que también los favorece en su implementación para una importante variedad de procesos biotecnológicos.

5.3.4 Temperatura

La temperatura es quizá el parámetro fisicoquímico más importante a considerar en un proceso de FES, debido a que influye fuertemente tanto en el crecimiento del hongo como en la producción enzimática [38]. Al respecto, cabe señalar que los hongos tienen la capacidad de crecer bajo un amplio intervalo de temperaturas que varía entre 20 y 50 °C, siendo la óptima dependiente de factores como el producto de formación y la especie fúngica [38].

5.3.5 Sustrato

En cuanto al tipo de sustrato, previamente se comentó sobre la versatilidad de la FES en relación al uso de materiales tanto inertes como no inertes. Respecto a los primeros, estos son poco usados y funcionan únicamente como un anclaje para el organismo, razón por la cual es necesaria la adición de un medio líquido rico en nutrientes, que representa un aumento en los costos del proceso.

Por lo anterior, los de mayor interés a nivel biotecnológico son los no inertes, debido a que no solo actúan como soporte para llevar a cabo la fermentación, sino que también aportan nutrientes que son aprovechados por el hongo para el crecimiento y la producción enzimática. La base estructural de este tipo de sustratos se fundamenta en polisacáridos como la celulosa y la lignina, típicamente encontrados en los productos residuales de diferentes procesos agroindustriales [38].

Sin embargo, la naturaleza del sustrato no es el único factor determinante con relación a este parámetro, el acondicionamiento y/o pretratamiento del mismo son indispensables en la medida en que convierten el material crudo en una forma asimilable para los microorganismos. Estos procesos de acondicionamiento y pretratamiento incluyen (tomados de [46]):

- Reducción de tamaño mediante molienda, raspado o picado.
- Hidrólisis física, química o enzimática de polímeros para aumentar la disponibilidad de los nutrientes de interés.
- Suplementación del sustrato con nutrientes.
- Ajuste de pH y contenido de humedad.

Con respecto al tamaño de partícula, este factor determina la capacidad que tiene el sistema para realizar los procesos de transferencia de calor y masa entre el microorganismo y el sustrato, y entre el sustrato y el medio circundante. Por un lado, un tamaño de partícula muy grande, aunque representa mayores tasas de respiración y aireación, provee bajas áreas superficiales para la acción fúngica. No obstante, un tamaño de partícula muy pequeño, si bien presenta una gran área superficial, puede resultar en la aglomeración del sustrato y con esto interferir negativamente en los procesos respiratorios del hongo [38]. En este sentido, es importante evaluar el tamaño de partícula que optimiza la producción del metabolito de interés para cada caso particular de FES.

▪ Residuos agroindustriales

La selección del sustrato sólido sobre el cual se lleva a cabo el proceso fermentativo es un aspecto crucial. En este sentido, los residuos agroindustriales se han posicionado como una alternativa eficiente dada su amplia disponibilidad, su alto contenido de nutrientes y su composición similar a la de los sustratos naturales de los hongos, los cuales son ricos en polisacáridos como la celulosa, la hemicelulosa y la lignina [8].

Entre los residuos agrícolas que se han utilizado para procesos de FES, se encuentran el bagazo de caña de azúcar, paja de trigo, tusa de maíz, paja de arroz, cáscara de banano, cascarilla de arroz, cascarilla de café y residuos de flores, entre otros, los cuales han sido empleados en una amplia variedad de procesos biotecnológicos asociados a la producción de enzimas, ácidos orgánicos, etanol, y en general, de metabolitos de interés industrial [38].

5.3.6 Aireación

Una correcta aireación es importante debido a que cumple con las siguientes funciones indispensables en una FES (tomadas de [46]): 1) mantiene las condiciones aeróbicas, 2) remueve el dióxido de carbono, 3) contribuye en el control de la temperatura del sustrato y 4) regula los niveles de humedad, aspectos que a su vez influyen tanto en el crecimiento de la biomasa como en la producción enzimática.

Entre los principales factores que determinan la tasa de aireación en un proceso de FES, están los requerimientos propios para el crecimiento de cada microorganismo, la producción de metabolitos gaseosos y volátiles, la evolución de los perfiles de calor, la profundidad del lecho de sólidos a fermentar y el contenido de humedad del medio, entre otros [38]. A pesar de tantos elementos influyentes, Raimbault (1998) señala que el control de este proceso es bastante simple y práctico debido a que no existen limitaciones asociadas a la difusión del oxígeno, a diferencia de lo que ocurre en los procedimientos en sumergido [46].

5.3.7 Agitación

Es un parámetro de gran importancia sobre todo en fermentaciones aeróbicas ya que asegura homogeneidad en términos de temperatura, disponibilidad de oxígeno y adición de agua. Con respecto a este último aspecto es relevante mencionar que, de la distribución homogénea del agua adicionada, depende la correcta compensación del agua perdida a causa de la evaporación [38].

Cabe señalar que el elemento quizá más importante a discutir en relación a la agitación está asociado con posibles daños al micelio fúngico debido a los esfuerzos cortantes [47], por tal razón, se ha encontrado más adecuado agitar este tipo de sistemas de manera intermitente en lugar que continua [38].

5.3.8 Factores nutricionales

Diferentes nutrientes incluyendo fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, minerales, vitaminas y cofactores, son decisivos para el eficiente desarrollo de un proceso de FES.

Por un lado, la fuente de carbono representa el medio a partir del cual el microorganismo obtiene la energía que requiere para su crecimiento. Esta fuente puede ser tanto definida, como es el caso de la glucosa y la lactosa, o compleja, como es el caso de la celulosa y el almidón. No obstante, existe una amplia variedad de fuentes de carbono tales como la sacarosa, rafinosa, maltosa, celobiosa y extracto de malta [38]. Por otro lado, la fuente de nitrógeno estimula la conidiación fúngica y se reportan compuestos como el tartrato de amonio, oxalato, urea, aminoácidos y peptonas, entre otros [38].

Ahora bien, minerales como el sodio, calcio, cobre, hierro, manganeso, magnesio, potasio, zinc, y compuestos orgánicos como tiamina, biotina y ácido fólico, han demostrado incrementar la esporulación cuando son adicionados al medio de cultivo [38].

Bajo esta gran variedad de nutrientes que pueden ser adicionados, es claro que no existe una formulación óptima que favorezca la producción de lacasa por parte de los HPB, debido a que estas varían de una especie a otra. Por lo anterior, se deben realizar estudios detallados ligados a la cepa y el sustrato a utilizar.

5.3.9 Inductores enzimáticos

De acuerdo a lo citado por Bertrand *et al.* (2013), las lacasas pueden ser expresadas constitutivamente o bien pueden ser inducidas por diferentes compuestos [48]. Con respecto al segundo caso, se estima que diferenciaciones en los procesos de inducción pueden dar resultado a la producción de isoformas de la enzima por una misma especie [48], señalando la importancia de estudiar la adición de inductores al medio.

5.4 Tusa de maíz

El maíz (*Zea Mays L.*) es un cereal perteneciente a la familia de las gramíneas o poáceas, usado alrededor del mundo no solo como fuente de alimento para humanos y animales, sino también como sustrato para la producción de biocombustibles; consolidándose así como el cereal más importante en términos de producción, aún por encima del arroz y el trigo. En este sentido, se reporta que para el 2016, a nivel mundial, su producción excedió las mil millones de toneladas métricas, contando con un área de cultivo de casi doscientos millones de hectáreas [20].

En el contexto nacional, se estimó que para el año 2017 Colombia produjo, en casi 214.000 hectáreas, más de 1.2 millones de toneladas, de las cuales el 60% correspondió a maíz amarillo y el restante a maíz blanco, destinados, en primer lugar, al consumo humano [21], [22]. De estas cifras se espera por consiguiente una alta cantidad de desechos, de hecho se cree que el 50% corresponde a residuos, constituidos principalmente por la hoja de la mazorca y la tusa del maíz (TM) [23].

La amplia disponibilidad de la tusa de maíz, su bajo costo y su alto contenido de polisacáridos de interés como la lignina, la hemicelulosa y la celulosa, señalan la pertinencia de usar este residuo como sustrato para la producción de enzimas ligninolíticas, y en especial de lacasas, a partir de un proceso de FES usando HPB

5.5 Purificación e inmovilización enzimática

A pesar del reporte de varios trabajos en los cuales se implementó a escala de laboratorio el uso de lacasa fúngica para diversas aplicaciones [14], [37], [49]–[53], resta un importante número de desafíos a superar en la perspectiva de escalar dicho proceso a nivel industrial. A continuación se listan los más relevantes (tomados de [3], [10], [54]):

- Necesidad de producir grandes cantidades de lacasa.
- Altos costos asociados a la producción enzimática a gran escala.
- Bajos tiempos de utilidad de la enzima.
- Uso de enzimas solubles que dificultan la recuperación y reutilización de las mismas.
- Uso de enzimas libres que impiden su operación en modo continuo.

Bajo este panorama ha surgido la inmovilización enzimática como una herramienta apropiada para contribuir a la superación de algunos de estos inconvenientes. Sin embargo, es importante antes de realizar este procedimiento, efectuar una purificación previa de la enzima, con el propósito de obtener resultados eficientes. Así, se procede a discutir acerca del fundamento tanto de la purificación como de la inmovilización enzimática.

5.5.1 Purificación enzimática

Para la purificación enzimática se han documentado numerosas técnicas, cada una con diferente nivel de complejidad, implicaciones económicas y grado de eficiencia para cada aplicación específica [55], [56].

Dado que se busca contribuir a la superación de los retos descritos anteriormente, en el presente estudio se evaluará el acoplamiento de las técnicas *Salting out* (precipitación con sal) y separación por sistemas bifásicos acuosos, en vista de que son métodos de purificación económicos y a la vez eficientes.

▪ ***Salting out* – Precipitación con sal**

La precipitación con sal, también conocida como *Salting out*, es un método de separación basado en el incremento de la fuerza iónica de una solución donde se encuentra diluido el soluto de interés, que para este caso es la lacasa. Dicho aumento se logra adicionando una sal a concentraciones tales que disminuyan la solubilidad de la enzima, lo cual resulta en su precipitación [57].

El fenómeno ocurre debido a que la sal disuelta compite con la proteína por las moléculas de agua, aumentando con esto la tensión superficial de la misma y generando, por consiguiente, un mayor plegamiento del péptido. Dicho plegamiento disminuye las interacciones proteína-agua, haciendo que la primera se agregue y precipite [57].

La precipitación con sal, en particular con sulfato de amonio, ha sido utilizada en procesos de separación de sistemas biológicos y, especialmente, en la purificación de enzimas de diversos tipos [58]–[61]. A continuación se mencionan las ventajas más relevantes de esta metodología (tomadas de [57]):

- Es un proceso de bajo costo ya que solo requiere de la adición de sal.
- Debido a que solo se afecta la solubilidad de la enzima, no hay alteración en ninguna propiedad asociada a su estabilidad, lo cual es muy conveniente y permite que se conserven sus características catalíticas.
- Es altamente selectivo, sobre todo cuando se implementa la denominada precipitación fraccionada, que consiste en dos pasos secuenciales de precipitación;

en el primero se separan moléculas no deseadas, posteriormente se recupera el sobrenadante y se realiza un segundo paso, donde se precipita el soluto de interés.

▪ **Sistemas bifásicos acuosos**

La separación por sistemas bifásicos acuosos, ATPS por sus siglas en inglés, es un método utilizado para la purificación de una amplia variedad de productos que incluyen enzimas, organelos celulares y virus, entre otros. Como su nombre lo sugiere, consiste en la formación de dos fases líquidas a partir de la mezcla de dos constituyentes hidrofílicos que, a una concentración crítica, son incompatibles y por tanto se separan; las fases formadas difieren en polaridad, carga y volumen, permitiendo el fraccionamiento selectivo de un determinado metabolito [62], [63].

Los sistemas ATPS cuentan con importantes ventajas, a saber: 1) el solvente principal en ambas fases es el agua, constituyendo con esto un método de purificación altamente compatible con la mayoría de los compuestos biológicos producidos bajo procesos fermentativos; 2) los componentes utilizados para la formación de las fases, tales como polímeros, sales y alcoholes de bajo peso molecular, son relativamente económicos y pueden ser reutilizados, lo cual hace que esta técnica sea costo-efectiva; 3) los sistemas ATPS pueden ser fácilmente utilizados en separaciones a gran escala, extendiendo con esto su campo de aplicación [62], [63].

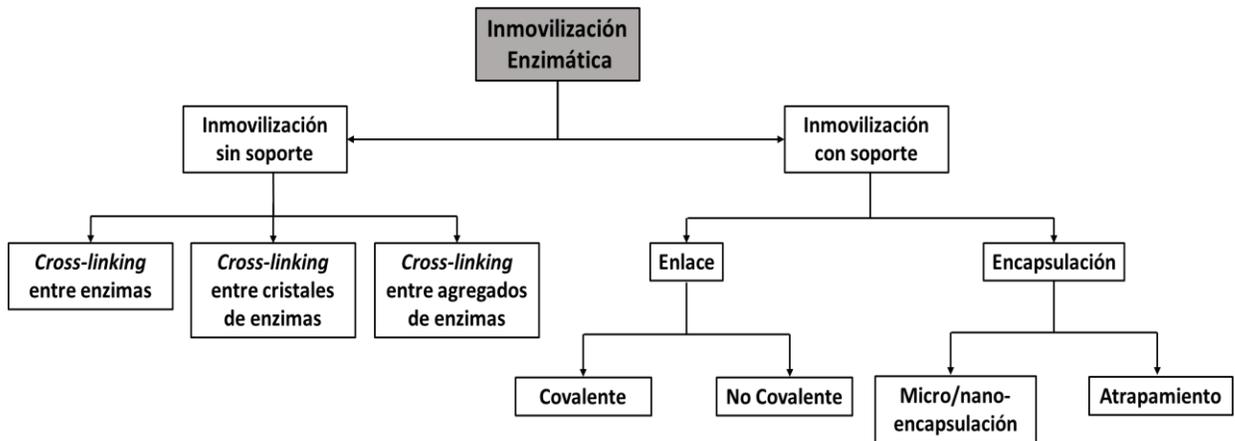
5.5.2 Inmovilización enzimática

Una vez la lacasa ha sido producida y purificada, es posible inmovilizarla. La inmovilización enzimática en general, se lleva a cabo con el propósito de facilitar la reutilización de dicha enzima a lo largo de varios ciclos de trabajo, y con esto disminuir considerablemente los costos asociados a una producción continua de la misma [64]. Adicionalmente, se ha reportado que este procedimiento extiende el rango, en términos de pH y temperatura, en el cual la enzima es estable [64], [65].

La inmovilización, como su nombre lo sugiere, consiste en reducir la movilidad de la enzima, y puede llevarse a cabo de diferentes maneras de acuerdo a las interacciones que ocurren, ya sea entre la proteína y el soporte, o dentro de la proteína, dependiendo si es

inmovilización con soporte o inmovilización sin soporte (auto agregación enzimática), respectivamente [64]. A su vez, cada uno de estos dos grandes grupos puede clasificarse con base en las categorías presentadas en la Figura 5-3. En la Tabla 5-1 se presentan las principales ventajas y desventajas de cada uno de estos métodos.

Figura 5-3: Métodos de inmovilización enzimática.



Nombre de la fuente: Adaptada de [64].

Tabla 5-1: Ventajas y desventajas de los métodos de inmovilización.

Método de inmovilización	Ventajas	Desventajas
Inmovilización con soporte		
Covalente	Aumenta la estabilidad de la enzima. Permite la reutilización de la enzima.	Puede ser ineficiente debido al impedimento estérico.
No covalente	Facilidad en la operación. Permite la recuperación y reutilización del soporte. Altos rendimientos de inmovilización.	No permite la reutilización de la enzima. La actividad enzimática se ve fuertemente afectada por las condiciones ambientales.

Microencapsulación y nanoencapsulación	Las condiciones ambientales no afectan la actividad debido a que la enzima se aísla del medio.	Limitaciones difusionales en la entrada de sustratos y salida de productos.
Atrapamiento	Las moléculas de enzima son homogéneamente dispersadas en la matriz.	La catálisis es llevada a cabo en la interfase enzima-sustrato.
Inmovilización sin soporte		
Cross-linking entre enzimas	Alta robustez Técnica simple Reutilización a largo plazo del catalizador.	Limitaciones en la transferencia de masa. Método poco estudiado.
Cross-linking entre cristales de enzimas	Alta estabilidad y actividad enzimática bajo condiciones ambientales desfavorables.	Metodología especializada.
Cross-linking entre agregados de enzimas	Altos rendimientos. Facilidad en la operación. No requiere pasos previos de purificación.	Requiere métodos robustos de purificación previos a su implementación.

Nombre de la fuente: Tomada de [64].

La metodología que se implementará en la presente investigación consiste en una inmovilización covalente, que se basa en la unión mediante un enlace covalente de la enzima a un compuesto químico bifuncional, el cual se encuentra a su vez unido al soporte. En adición a lo descrito en la tabla anterior, este procedimiento ofrece dos ventajas fundamentales por las cuales fue escogido (tomadas de [64]):

- Alto grado de inmovilización debido a la unión de la enzima al compuesto bifuncional en diferentes puntos, los cuales están determinados por la presencia de distintos aminoácidos localizados fuera del sitio activo.
- La presencia de un compuesto “espaciador” entre la enzima y el soporte mejora la actividad debido a que se aumenta la naturaleza dinámica del catalizador.

5.6 Colorantes sintéticos

Los colorantes sintéticos son compuestos orgánicos, de naturaleza aromática, que imparten color a un sustrato debido a la absorción selectiva de la luz [66]. Por su condición de alta solubilidad en el agua, estas moléculas son ampliamente usadas en diferentes procesos industriales asociados a la tinción de fibras textiles, alimentos y cosméticos, entre otros [67], [68]. Se estima que actualmente existen más de 100.000 colorantes comerciales con una producción superior a 1×10^6 toneladas por año [69]–[71]; desafortunadamente, alrededor del 15% de los colorantes usados en los procesos de tinción son descargados en los cuerpos de agua [72], ocasionando una grave problemática de orden económico, ambiental y social [5]. Los impactos más alarmantes involucran tanto el equilibrio del ecosistema acuático como la estética del paisaje, mediante la disminución de la solubilidad del oxígeno, alteración en la fotosíntesis y aumento de la toxicidad para la biota presente [73].

Para la clasificación de los colorantes sintéticos, se han establecido diferentes criterios tales como origen, color, solubilidad, estructura química y método de aplicación sobre el sustrato. Sin embargo, los dos últimos son más utilizados y, en especial, el método de aplicación debido a la sencillez por la no utilización de nomenclatura IUPAC [74]. En este último grupo se encuentran los colorantes reactivos, dispersos, ácidos, básicos y directos, mientras que en la clasificación por estructura química se tienen los colorantes azoicos, antraquinónicos, indigoides, tipo ftalocianina, sulfurosos, nitros y nitrosos [75].

5.6.2 Rojo allura AC

El rojo allura AC es un colorante ácido perteneciente al grupo de los azoderivados, comercializado como un polvo de color rojo oscuro que al ser diluido adquiere una coloración rojo brillante atractiva para diferentes procesos industriales. Entre las aplicaciones de este colorante se encuentran la tinción de productos de consumo humano directo, tales como bebidas, jarabes, dulces, algodones de azúcar, alimentos horneados, edulcorantes, productos farmacéuticos, pasta de dientes, protector solar, productos de higiene oral, productos cosméticos y fibras de queratina; asimismo, es usado como ingrediente inactivo en aplicaciones médicas [76]. En la Figura 5-4 se presenta la estructura química del colorante rojo allura AC; el grupo cromóforo corresponde al enlace azo, el cual se conecta a los grupos hidroxilo y metoxi del auxocromo por medio de un sistema de anillos

aromáticos [77]. En la Tabla 5-2 se enuncian otras propiedades específicas del colorante en mención.

Figura 5-4: Estructura química del colorante sintético rojo allura AC

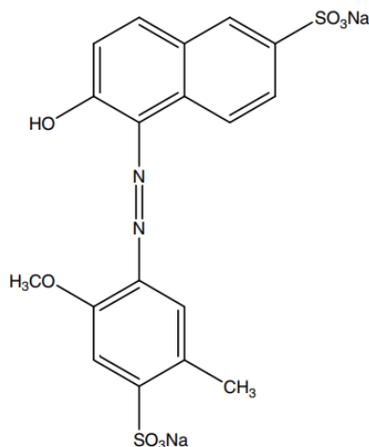


Tabla 5-2: Propiedades del colorante sintético rojo allura AC

Nombre IUPAC	2-hidroxi-1-(2-metoxi-5-metil-4-sulfonato-fenilazo)-naftaleno- 6-sulfonato disódico.
Otros nombres	Rojo allura 40, rojo No. 40, rojo alimentario 7, FD&C Rojo 40
Fórmula molecular	C ₁₈ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ S ₂
Tipo de colorante de acuerdo a la estructura química	Azoíco
Tipo de colorante de acuerdo al método de aplicación	Ácido
Absorción (λ_{máximo})	500 nm
Peso molecular	496.42 g/mol
C.I (Color Index)	16035
Código como aditivo alimentario	E 129
Solubilidad	Soluble en agua, etanol
Punto de fusión	>300°C

Cabe mencionar que, a pesar de los daños reportados sobre el ser humano por el consumo del colorante rojo allura AC [76], este compuesto tiene un uso extensivo en muchos países, incluyendo Estados Unidos y Colombia, como parte de una gran variedad de procesos industriales.

6. Metodología

En primer lugar, se describen los procedimientos transversales al desarrollo de la investigación, los cuales incluyeron conservación de las especies fúngicas, preparación del inóculo para la FES, preparación del sustrato, extracción enzimática y medición de actividad lacasa. Posteriormente se detallan las actividades realizadas para dar cumplimiento a los objetivos enunciados.

6.1 Equipos

Espectrofotómetro UV/Vis Lambda 35, Perkin Elmer; Molino triturador forrajero JTRF 700, Trapp; Shaker con control de temperatura Inkubator 1000, Heidolph; Cabina de flujo laminar horizontal, Streamline; Incubadora, Binder; Centrífuga Z 326 K, Hermle; Refrigerador, Haceb; Horno de secado, E&Q; Planchas de calentamiento y agitación con termocupla, Velp Científica; Balanzas analíticas, Precisa y Ohaus; Juego de pesas de calibración; Lexus Analizador de humedad, Adam; pH-metro portable D-71/D-72 LaquaAct, Horiba Scientific; Autoclave automática ST-85G, Labcompanion; Desionizador Regenerable D-1, E&Q; Conductivímetro Pronto EC, Hanna; Destilador, Tuttnauer; Molino microfino, IKA; Espectrómetro IR, Perkin Elmer; Tamizadora eléctrica, Gilson; Micropipetas de volumen variable, Brand y Boeco.

6.2 Conservación de especies

Las especies *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quéel y *Trametes pubescens* (Schumach.) Pilát fueron adquiridas en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de Antioquia (Medellín, Colombia). La especie *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 fue obtenida de la colección de cultivos del grupo de Biotecnología Ambiental de la Universidad de Santiago de Compostela (Santiago de Compostela, España). Para la conservación de los organismos, estos fueron subcultivados cada 30 días en agar papa dextrosa y preservados a 4°C.

6.3 Preparación del inóculo para la fermentación

El medio para la preparación del inóculo utilizado en la FES fue el agar salvado de trigo, el cual contiene 10 g L⁻¹ de glucosa, 5.0 g L⁻¹ de peptona, 2.0 g L⁻¹ de extracto de levadura, 0.1 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 0.05 g L⁻¹ de MgSO₄·7H₂O, 0.076 g L⁻¹ de MnSO₄·H₂O, extracto de salvado de trigo y 18.0 g L⁻¹ de agar-agar [78]. Una vez los organismos fueron incubados en dicho medio durante 7 días a 28 °C, se tomaron discos de micelio (diámetro 1.0 cm) de la zona de crecimiento exponencial y se transfirieron al soporte sólido. Las condiciones para la preparación del inóculo fueron optimizadas en estudios anteriores [79].

6.4 Preparación del sustrato

El residuo agrícola TM fue obtenido en una plaza de mercado de la ciudad de Medellín. El pretratamiento del material incluyó su reducción de tamaño por medio de un molino triturador forrajero, molienda en un molino microfino de aspas y tamizado. Una vez el tamaño de partícula fue homogéneo (entre 300 y 700 µm), el material fue lavado con peróxido de hidrógeno al 1% y con agua destilada, finalmente, fue secado a 80 °C durante 24 h y almacenado en recipientes herméticos para su adecuada conservación.

6.5 Extracción enzimática

Para obtener el extracto enzimático de la FES, a cada Erlenmeyer se le adicionaron 10 mL de buffer acetato de sodio 100 mM, pH = 5.0, se homogenizó el material y se sometió a agitación en baño de hielo durante 1 h a 180 rpm. Posteriormente se extrajo la fase líquida y se centrifugó a 3000 rcf y 4 °C durante 10 min en una centrífuga Z 326 K, marca HERMLE.

6.6 Cuantificación de actividad enzimática de la lacasa

La actividad enzimática se reportó en unidades internacionales (U), las cuales se definen como la cantidad de enzima requerida para catalizar la conversión de una µmol de sustrato en un minuto. Este valor se presentó ya sea como actividad por gramo de sustrato seco fermentado (ss), o como actividad específica, es decir, por miligramo de proteína total presente en el extracto, en cuyo caso se determinó por el método de Bradford [80], tomando como proteína de referencia la albúmina de suero bovino.

Para la actividad lacasa se utilizó el ácido 2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico], ABTS, como sustrato. La reacción de oxidación de este se llevó a cabo mediante la adición de 100 μL de extracto enzimático a una mezcla de 500 μL de ABTS (0.4 mM) y 1400 μL de buffer McIlvaine, pH = 4.00. Se midió el cambio en la absorbancia durante 1 min en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV-Vis Lambda 35 a una longitud de onda de $\lambda = 420 \text{ nm}$ (protocolo adaptado de [81]) y se determinó la actividad enzimática y la actividad específica con las siguientes ecuaciones basadas en la ley de Lambert- Beer:

$$\text{Actividad enzimática } \left[\frac{\text{U}}{\text{g}_{\text{ss}}} \right] = \frac{\frac{\Delta A}{t} * Di * V_f * \frac{10^6 \mu\text{mol}}{\text{mol}} * V_e}{V_m * \epsilon * l * W} \quad (6.1)$$

$$\text{Actividad específica } \left[\frac{\text{U}}{\text{mg}} \right] = \frac{\frac{\Delta A}{t} * Di * V_f * \frac{10^6 \mu\text{mol}}{\text{mol}} * V_e}{V_m * \epsilon * l * m} \quad (6.2)$$

Donde $\frac{\Delta A}{t}$ es el cambio de absorbancia durante 1 min [min^{-1}], Di es el factor de dilución de la muestra, V_f es el volumen final de la cubeta [mL], V_e es el volumen de extracción [mL], V_m es el volumen de la muestra [mL], ϵ es el coeficiente de extinción molar que corresponde a $36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [82], l es el ancho de la celda [cm], W es la masa de sustrato seco fermentado [g] y m es la cantidad de proteína total [mg].

6.7 Selección de la especie fúngica y el tiempo de fermentación

6.7.1 Condiciones de la FES para la selección de la especie y el tiempo de fermentación

Se evaluó la producción de lacasa a partir de 4 especies de HPB: *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius*, *Trametes pubescens* y *Phanerochaete chrysosporium*, en diferentes días de fermentación. La FES se realizó en Erlenmeyers de 50 mL con $500.0 \pm 0.1 \text{ mg}$ de sustrato pretratado, a cada uno de ellos se le adicionaron 2 discos de micelio de la especie a evaluar. La temperatura del proceso se fijó en $25 \text{ }^\circ\text{C}$, la proporción carbono-nitrógeno (C:N) en 30:1, la humedad en 75% y se le adicionó como fuente de carbono glucosa a una concentración de 5 g/L.

Para fijar la proporción C:N se tuvo en cuenta el análisis bromatológico de la TM, el cual indicó, en base seca, un 46.9% de celulosa, 38.5% de hemicelulosa y 9.1% de lignina. Teniendo en cuenta entonces el carbono aportado por el residuo y el carbono aportado por la glucosa adicionada, se calculó la cantidad de nitrógeno a agregar, como extracto de levadura, para alcanzar una proporción C:N de 30:1.

Para fijar el porcentaje de humedad, se realizó una curva de humedad con un analizador de humedad marca Adam, para esto se tomaron 4.0 g de TM y se le adicionaron volúmenes crecientes de agua destilada, con el fin de determinar los porcentajes de humedad equivalentes.

6.7.2 Diseño estadístico de experimentos para la selección de la especie y el tiempo de fermentación

Se realizó un diseño unifactorial para cada una de las especies *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius*, *Trametes pubescens* y *Phanerochaete chrysosporium*, en donde se evaluó el efecto del tiempo de fermentación (7, 10 y 13 días) en la producción de lacasa. En cada caso, los tratamientos se llevaron a cabo por quintuplicado, para un total de 15 unidades experimentales por diseño.

6.8 Determinación de las condiciones óptimas para la producción enzimática

6.8.1 Condiciones de la FES para la producción enzimática

Para determinar las condiciones más adecuadas para la producción enzimática, se realizaron fermentaciones en Erlenmeyers de 50 mL con 500.0 ± 0.1 mg de sustrato pretratado y con 2 discos de micelio de la especie seleccionada previamente. Estas fermentaciones se dejaron el número de días establecido en la actividad anterior.

Dado que se pretendía evaluar las mejores condiciones para obtener un alto rendimiento de la FES, únicamente se fijaron las variables temperatura en 25 °C y pH del medio en el valor predeterminado por la preparación de la solución de nutrientes.

6.8.2 Diseño estadístico de experimentos para la producción enzimática

Los factores proporción carbono-nitrógeno, porcentaje de humedad, concentración de la fuente de carbono y concentración de inductor fueron evaluados a través de un diseño de superficie de respuesta central compuesto con 3 bloques incompletos, para un total de 39 unidades experimentales, teniendo como variable de respuesta la actividad enzimática. El estudio contempló 5 niveles para cada factor (Tabla 6-3), los cuales fueron seleccionados según revisión bibliográfica y estudios anteriores. El diseño de experimentos se realizó con el Software Statgraphics Centurion XV.II versión 16.1.18, edición de evaluación gratuita.

Adicionalmente se evaluaron 2 fuentes de carbono (glucosa y extracto de malta), 2 fuentes de nitrógeno (extracto de levadura y peptona) y 2 tipos de inductores (sulfato de cobre y tween 80), para un total de 8 combinaciones fuente de carbono/ fuente de nitrógeno/ inductor consideradas (Tabla 6-4). A cada una de dichas combinaciones se le aplicó el diseño de experimentos descrito.

Tabla 6-3: Factores del diseño central compuesto evaluados en la optimización de la producción enzimática.

Niveles	Axial Bajo	Bajo	Central	Alto	Axial Alto
Factores					
Proporción C:N	5.00:1	15.00:1	25.00:1	35.00:1	45.00:1
Porcentaje de humedad [%]	65.0	70.0	75.0	80.0	85.0
Concentración de la fuente de carbono [g/L]	5.0	10.0	15.0	20.0	25.0
Concentración de sulfato de cobre [mM]	0.00	0.25	0.50	0.75	1.00
Concentración de Tween 80 [%v/v]	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25

Tabla 6-4: Combinaciones fuente de carbono/ fuente de nitrógeno/ inductor evaluadas en el diseño central compuesto.

	Extracto de levadura		Peptona	
	Sulfato de cobre	Tween 80	Sulfato de cobre	Tween 80
Glucosa	Glucosa- Extracto de levadura- Sulfato de cobre	Glucosa- Extracto de levadura- Tween 80	Glucosa- peptona- Sulfato de cobre	Glucosa- peptona- Tween 80
Extracto de malta	Extracto de malta- Extracto de levadura- Sulfato de cobre	Extracto de malta- Extracto de levadura- Tween 80	Extracto de malta- peptona- Sulfato de cobre	Extracto de malta- peptona- Tween 80

Finalmente, se validaron las condiciones óptimas arrojadas por el modelo mediante el montaje de fermentaciones bajo dichas condiciones.

El conjunto de condiciones seleccionado en este apartado fue utilizado para los pasos siguientes de la investigación.

6.9 Determinación de las condiciones más adecuadas para la extracción enzimática

6.9.1 Condiciones de la FES para la extracción enzimática

Para determinar las condiciones más adecuadas para la extracción enzimática se realizaron fermentaciones homogéneas de acuerdo a los parámetros establecidos previamente, en Erlenmeyers de 50 mL con 500.0 ± 0.1 mg de sustrato pretratado. Los factores evaluados fueron aquellos que, según lo reportado en la literatura, determinan la concentración y estabilidad de la enzima en los extractos de dichas fermentaciones.

6.9.2 Diseño estadístico de experimentos para la extracción enzimática

Los buffers acetato de sodio, citrato de sodio y McIlvaine se evaluaron cada uno a través de un diseño estadístico de experimentos, tomando como variable de respuesta la actividad enzimática. El protocolo empleado para realizar la extracción fue descrito en el

apartado 6.5, incorporando las condiciones de los factores descritas en las Tablas 6-5 y 6-6.

Para los buffers acetato de sodio y citrato de sodio, se consideraron los factores concentración del buffer, pH y tiempo de contacto mediante un diseño factorial 2^3 con un punto central, siguiendo un esquema de aleatorización en bloques completos al azar con 3 repeticiones, para un total de 27 unidades experimentales. Para el buffer McIlvaine, se consideraron los factores pH y tiempo de contacto mediante un diseño factorial 2^2 con un punto central, siguiendo un esquema de aleatorización en bloques completos al azar con 3 repeticiones, para un total de 15 unidades experimentales.

En las Tablas 6-5 y 6-6 se presentan los intervalos de valores que se evaluaron para cada variable, los cuales fueron seleccionados según revisión bibliográfica y estudios anteriores.

Tabla 6-5: Parámetros del diseño factorial 2^3 para la extracción enzimática. Buffers acetato de sodio y citrato de sodio.

Factores \ Niveles	Bajo	Central	Alto
Concentración del buffer [mM]	50	100	150
Tiempo de contacto [h]	0.5	1.0	1.5
pH del buffer	4.00	5.00	6.00

Tabla 6-6: Parámetros del diseño factorial 2^2 para la extracción enzimática. Buffer McIlvaine

Factores \ Niveles	Bajo	Central	Alto
Tiempo de contacto [h]	0.5	1.0	1.5
pH del buffer	4.00	5.00	6.00

Las condiciones seleccionadas para la extracción de lacasa fueron implementadas a lo largo de los apartados posteriores.

6.10 Determinación de las condiciones más adecuadas para la cuantificación enzimática

6.10.1 Condiciones de la FES para la cuantificación enzimática

Para determinar las condiciones más adecuadas para la cuantificación enzimática se realizaron fermentaciones homogéneas de acuerdo a los parámetros establecidos previamente, en Erlenmeyers de 50 mL con 500.0 ± 0.1 mg de sustrato pretratado. Los factores evaluados fueron aquellos que, según lo reportado en la literatura, determinan la estabilidad de la enzima al momento de llevar a cabo su medición.

6.10.2 Diseño estadístico de experimentos para la cuantificación enzimática

Los buffers acetato de sodio, citrato de sodio y McIlvaine se evaluaron cada uno a través de un diseño estadístico de experimentos, tomando como variable de respuesta la actividad enzimática. El protocolo empleado para realizar la cuantificación fue descrito en el apartado 6.6, incorporando las condiciones de los factores descritas en las Tablas 6-7 y 6-8.

Para los buffers acetato de sodio y citrato de sodio, se consideraron los factores concentración del buffer y pH mediante un diseño factorial 2^2 con un punto central, siguiendo un esquema de aleatorización en bloques completos al azar con 3 repeticiones, para un total de 15 unidades experimentales. Para el buffer McIlvaine, se consideró únicamente el pH mediante un diseño unifactorial con 3 niveles, cada uno evaluado por triplicado, para un total de 9 unidades experimentales.

En las Tablas 6-7 y 6-8 se presentan los intervalos de valores que se consideraron para cada variable, los cuales fueron seleccionados según revisión bibliográfica y estudios anteriores.

Tabla 6-7: Parámetros del diseño factorial 2^2 para la cuantificación enzimática. Buffers acetato de sodio y citrato de sodio.

Niveles	Bajo	Central	Alto
Factores			
Concentración del buffer [mM]	50	100	150
pH del buffer	4.00	5.00	6.00

Tabla 6-8: Parámetros del diseño unifactorial para la cuantificación enzimática. Buffer McIlvaine

Niveles	Bajo	Medio	Alto
Factores			
pH del buffer	4.00	5.00	6.00

Las condiciones seleccionadas para la cuantificación de lacasa fueron implementadas a lo largo de los apartados posteriores.

6.11 Construcción de curvas cinéticas para la determinación del día de máxima actividad

La producción de la lacasa a partir de las condiciones de fermentación, extracción y cuantificación previamente estudiadas y estandarizadas, se monitoreó cada 24 horas durante 18 días. A partir de esta información, se construyeron tanto la curva cinética de actividad enzimática como la curva cinética de actividad específica que permitieron determinar el día en que se presentó la mayor actividad de la enzima. Cada evaluación diaria fue el resultado de promediar cinco fermentaciones homogéneas.

6.12 Purificación enzimática

Para la purificación enzimática, se evaluaron dos metodologías de manera consecutiva: precipitación con sulfato de amonio seguida de una separación por sistemas bifásicos acuosos. A continuación se describe el protocolo implementado para llevar a cabo ambas metodologías.

6.12.1 Preparación del extracto crudo

Una vez obtenido el extracto enzimático, este fue filtrado a través de un papel filtro de 8 – 12 µm. Dicho extracto fue denominado “extracto crudo” y se caracterizó en términos de actividad específica.

6.12.2 *Salting out* – Precipitación con sulfato de amonio

En primer lugar, se realizó un experimento previo para determinar el rango de saturación del sulfato de amonio en el que precipitaba la mayor cantidad de lacasa. Para esto, se tomó 10 mL del extracto crudo y se le adicionó la cantidad requerida de la sal para alcanzar una saturación del 10%, se dejó en reposo durante 2 horas a 4°C y posteriormente se centrifugó a 3000 rcf por 10 minutos a 4°C. Si se observó precipitado, se extrajo el sobrenadante y el precipitado se re-suspendió en 5 mL de buffer acetato de sodio pH = 6.00, de concentración 50 mM. El sobrenadante y el precipitado re-disuelto se caracterizaron en términos del factor de purificación (FP) y el rendimiento (%R) de la enzima, a partir de las siguientes ecuaciones:

$$FP = \frac{\text{Actividad específica de la muestra } \left[\frac{U}{mg}\right]}{\text{Actividad específica del extracto crudo } \left[\frac{U}{mg}\right]} \quad (6.3)$$

$$\%R = \frac{\text{Actividad total de la muestra } [U]}{\text{Actividad total del extracto crudo } [U]} * 100 \quad (6.4)$$

El procedimiento anterior se repitió para saturaciones del 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% y 80% respectivamente. En la Tabla 6-9 se presenta la cantidad de sal que se adicionó en cada caso:

Tabla 6-9: Cantidad de sulfato de amonio adicionada a 10 mL de extracto crudo para alcanzar el respectivo porcentaje de saturación a 4°C.

Saturación [%]	10	20	30	40	50	60	70	80
Cantidad de (NH ₄) ₂ SO ₄ [g]	0.53	1.10	1.70	2.33	3.01	3.73	4.50	5.33

De acuerdo con los resultados del experimento previo, se implementó el mismo protocolo en el rango en el que se observó que la enzima precipitaba de manera preferencial. En este caso, cada tratamiento se evaluó por triplicado.

Al extracto obtenido en esta primera etapa de purificación, se le denominó “extracto precipitado” y se caracterizó en términos de actividad específica.

6.12.3 Separación por sistemas bifásicos acuosos – ATPS

- **Diseño estadístico de experimentos para la purificación enzimática mediante la metodología ATPS**

Para comenzar, se realizó un diseño Plackett Burman con el fin de determinar el efecto de los parámetros más importantes en la separación de la enzima. Para esto, se evaluaron seis factores, cada uno en dos niveles, de acuerdo con lo especificado en la Tabla 6-10. El estudio se realizó por triplicado, para un total de 36 unidades experimentales, tomando como variable de respuesta el factor de purificación enzimática en la fase inferior (fase rica en sal).

El polímero y la sal seleccionados para la formación del sistema bifásico fueron el polietilenglicol (PEG) y el sulfato de sodio (Na_2SO_4), respectivamente.

Tabla 6-10: Parámetros del diseño Plackett Burman para la purificación enzimática mediante la metodología ATPS.

Factores	Niveles	Bajo	Alto
	Peso molecular del PEG		3000
Concentración del PEG [%p/p]		15.00	25.00
Concentración del Na_2SO_4 [%p/p]		8.00	11.00
Concentración del extracto precipitado [%p/p]		5.00	10.00
pH		4.00	7.00
Concentración de NaCl [%p/p]		0.00	5.00

De acuerdo con los resultados del diseño Plackett Burman, se seleccionaron los tres factores más determinantes en el proceso de purificación y se buscó optimizarlos mediante un diseño de superficie de respuesta central compuesto, tomando como variable de respuesta el factor de purificación enzimática en la fase inferior. El estudio contempló cinco niveles para cada factor (Tabla 6-11) y un punto central evaluado por sextuplicado, para un total de 20 unidades experimentales.

Tabla 6-11: Parámetros del diseño central compuesto para la primera optimización de la purificación enzimática mediante la metodología ATPS.

Factores \ Niveles	Axial Bajo	Bajo	Central	Alto	Axial Alto
Concentración del Na ₂ SO ₄ [%p/p]	7.32	8.00	9.00	10.00	10.68
Concentración del extracto precipitado [%p/p]	3.30	5.00	7.50	10.00	11.70
pH	4.32	5.00	6.00	7.00	7.68

Con el propósito de afinar la búsqueda de las condiciones que maximizan la purificación de la enzima, se realizó una segunda optimización considerando los factores concentración del Na₂SO₄ y concentración del extracto. Se contemplaron cinco niveles para cada factor (Tabla 6-12) y un punto central evaluado por sextuplicado, para un total de 14 unidades experimentales.

Tabla 6-12: Parámetros del diseño central compuesto para la segunda optimización de la purificación enzimática mediante la metodología ATPS.

Factores \ Niveles	Axial Bajo	Bajo	Central	Alto	Axial Alto
Concentración del Na ₂ SO ₄ [%p/p]	5.38	6.00	7.50	9.00	9.62
Concentración del extracto [%p/p]	32.93	35.00	40.00	45.00	47.07

Finalmente, se validaron las condiciones óptimas arrojadas por el modelo mediante el montaje del respectivo sistema ATPS.

Es necesario señalar que, para cada tratamiento evaluado a lo largo del experimento, se incluyó un blanco que constó exactamente de las mismas condiciones del sistema, sin adición del extracto enzimático; en su lugar, se agregó un volumen igual del buffer de extracción (buffer acetato de sodio 50 mM, pH = 6.00).

▪ **Montaje del sistema de purificación enzimática - ATPS**

El montaje de los sistemas ATPS se realizó en tubos falcon de 50 mL. De acuerdo con las condiciones de cada tratamiento, se pesó la cantidad necesaria de PEG, Na₂SO₄, NaCl y extracto enzimático y se ajustó a un peso final de 20 g con buffer citrato de sodio 50 mM. Una vez todos los componentes se encontraban totalmente diluidos, se centrifugó a 3000 rcf durante 10 minutos a 25°C para obtener las dos fases acuosas. Estas fases fueron separadas cuidadosamente y caracterizadas en términos de volumen y actividad específica.

A continuación se detallan algunas anotaciones técnicas que se tuvieron en cuenta al momento de realizar el montaje de los sistemas ATPS:

- El PEG se diluyó previamente al 50% p/p. Este factor de dilución fue tomado en cuenta al momento de calcular la cantidad de polímero que se requería en cada sistema.
- Para el ajuste del pH se utilizó un buffer citrato de sodio 50 mM, al pH deseado. Con este buffer se diluyó el PEG al 50% y se ajustó el peso final del sistema a 20 g.
- Todos los reactivos utilizados en las evaluaciones fueron de grado analítico, con el propósito de no incorporar sustancias contaminantes al sistema.
- El Na₂SO₄ y el NaCl fueron pesados directamente en el falcon. No se realizó dilución previa debido a que la solubilidad de ambas sales no permite la preparación de soluciones madre concentradas.

6.13 Inmovilización enzimática sobre micropartículas de quitosano

La inmovilización enzimática fue evaluada mediante la producción de micropartículas de quitosano funcionalizadas con glutaraldehído. Para este propósito, se llevó a cabo el siguiente protocolo definido con base en una extensa revisión bibliográfica:

Inicialmente se preparó una solución de quitosano, disolviendo 2.5 g del material en 100 mL de una solución de ácido acético al 1.5% v/v en agua. Para la formación de las micropartículas, esta preparación fue goteada, lentamente y bajo constante agitación, en 250 mL de una solución de KOH 1.0 M, endureciéndose durante 2 h. Transcurrido este lapso de tiempo, las perlas se lavaron con abundante agua potable, seguido de un lavado con agua destilada y un posterior lavado con el buffer de extracción (buffer acetato de sodio 50 mM, pH = 6.00). Por último, las micropartículas se filtraron al vacío durante 10 min para eliminar el exceso de humedad.

Ahora bien, para funcionalizar las perlas, estas se incubaron durante 4 h, a temperatura ambiente y con agitación vigorosa, en una solución de glutaraldehído al 1.5% v/v; la proporción utilizada para la incubación fue de 2.5% w/v, en base seca del material. Una vez finalizada esta etapa, las micropartículas fueron lavadas con abundante agua potable, seguido de un lavado con agua destilada, un lavado con el buffer de extracción y una posterior filtración al vacío durante 10 min.

Para finalizar el proceso de inmovilización enzimática, se sumergieron las perlas funcionalizadas en el extracto precipitado durante 24 h, a 4°C y con agitación leve; la proporción utilizada para la incubación fue de 2.3% w/v, en base seca del material. Por último, las micropartículas fueron lavadas con el buffer de extracción para eliminar la enzima no inmovilizada, y filtradas al vacío durante 5 minutos.

Las perlas fueron caracterizadas en términos de la actividad específica a fin de comparar el desempeño de la enzima libre con la obtenida mediante la precipitación fraccionada. Por lo tanto, para conocer la cantidad de proteína inmovilizada, se determinó la proteína presente inicialmente en el extracto enzimático y la proteína restante luego de las 24 h de

incubación; por diferencia se cuantificó la proteína inmovilizada. En cuanto a la actividad enzimática de la lacasa, se implementó la metodología de cuantificación definida en la sección 6.10, pero en lugar de adicionar 100 μ L de extracto enzimático, se agregaron 0.05 g de micropartículas.

6.14 Evaluación de la decoloración del colorante sintético rojo allura AC

Como última etapa del estudio, se realizó un montaje comparativo entre la enzima libre, la enzima inmovilizada y una lacasa comercial para evaluar la decoloración del rojo allura AC.

Se prepararon diferentes sistemas con una concentración final del colorante de 35 ppm, usando como solvente el buffer empleado para la cuantificación enzimática, es decir, el buffer acetato de sodio 50 mM, pH 4.00. A continuación se listan los tratamientos considerados en el experimento, los cuales fueron evaluados por triplicado:

1. Decoloración con el extracto crudo – obtenido de acuerdo a los resultados de la sección 6.9.
2. Decoloración con la fracción enzimática precipitada con sulfato de amonio – obtenida de acuerdo a los resultados de la sección 6.12.2.
3. Decoloración con enzima inmovilizada – micropartículas obtenidas de acuerdo al protocolo descrito en la sección 6.13.
4. Decoloración con lacasa comercial: Laccase from *Trametes versicolor* de Sigma-Aldrich, Número CAS 80498-15-3.
5. Solución de colorante sin adición de enzima.

Se realizó un montaje adicional con la enzima inmovilizada y posteriormente desnaturalizada por la acción de una alta temperatura ($> 80^{\circ}\text{C}$ en baño maría). Este ensayo se incluyó en el estudio con el objetivo de evaluar la adsorción del rojo allura AC en las micropartículas y, de esta manera, calcular correctamente el porcentaje de decoloración en el tratamiento 3. Por su parte, el tratamiento 5 se tomó como control, esperando un valor constante en la absorbancia como resultado de la ausencia de agentes catalizadores.

En todos los casos se incluyeron blancos sin colorante para corregir los valores cuantificados.

Los ensayos fueron realizados bajo oscuridad, a temperatura ambiente y con agitación orbital constante de 120 rpm. Para cada tratamiento, se tomó una muestra de 2 mL de la solución y se cuantificó la absorbancia a 500 nm; el porcentaje de decoloración (%D) se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% D = \frac{RA_i - RA_t}{RA_i} * 100 \quad (6.5)$$

Donde RA_i corresponde a la concentración inicial del colorante (35 ppm) y RA_t a la concentración del colorante en la solución luego de 1, 3, 5, 6 y 18 h de monitoreo del proceso; estas concentraciones fueron calculadas mediante la curva de calibración del rojo allura AC.

La dosificación de la enzima se realizó de manera que los tratamientos fueran comparables entre sí, por lo tanto, en los casos de la enzima libre (tratamientos 1, 2 y 5) se adicionó la cantidad de extracto requerida para alcanzar una actividad de 0.15 U/mL en el volumen final de la solución de colorante. Mientras que en el caso de la enzima inmovilizada (tratamientos 3 y 4), se adicionaron 100 mg de perlas húmedas y se calculó el volumen necesario para obtener la misma actividad (0.15 U/mL). Cabe destacar que para alcanzar esta dosificación de enzima, el volumen final de los tratamientos 1, 2 y 5 fue diferente al de los tratamientos 3 y 4; sin embargo, en todos los casos, la concentración inicial de colorante fue de 35 ppm.

6.15 Análisis estadístico

Las pruebas estadísticas se evaluaron con un 95% de confianza. Para comparar resultados se implementaron análisis de varianza (ANOVA) seguidos de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Ahora bien, con el fin de determinar la validez de los análisis de varianza, se realizaron pruebas de Levene, Shapiro-Wilk y aditividad de Tukey para verificar los supuestos de homocedasticidad, normalidad y aditividad, respectivamente. En cuanto a la independencia, esta se propició mediante la asignación aleatoria de los tratamientos a las unidades experimentales. Todos los resultados se

reportan como la media de las mediciones realizadas más o menos (\pm) la desviación estándar

7. Resultados y discusión

7.1 Selección de la especie fúngica y el tiempo de fermentación

Con el objetivo de seleccionar tanto la especie fúngica como el tiempo de fermentación que se utilizará en los apartados siguientes de la investigación, se valoró la producción de lacasa por parte de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius*, *Trametes pubescens* y *Phanerochaete chrysosporium* durante 7, 10 y 13 días, bajo las condiciones descritas en la sección 6.7.

En las Tablas 7-13 a 7-15 se presentan los resultados de la actividad enzimática promedio obtenida para cada una de las especies a los 7, 10 y 13 días de fermentación. La especie *Phanerochaete chrysosporium* no presentó actividad enzimática cuantificable.

Para cada especie se realizó un ANOVA seguido de una prueba de comparaciones múltiples con el método de Tukey, esto con el fin de determinar el tiempo de fermentación más adecuado. Los grupos homogéneos arrojados por el análisis estadístico se observan en las Tablas 7-13 a 7-15 como superíndices de la actividad enzimática promedio.

Tabla 7-13: Actividad enzimática promedio para *Pleurotus ostreatus* a los 7, 10 y 13 días de fermentación.

Tiempo de fermentación [Días]	7	10	13
Actividad enzimática [U/g _{ss}]	8.6 ± 0.8 ^a	9.7 ± 1.8 ^a	10.1 ± 2.8 ^a

Tabla 7-14: Actividad enzimática promedio para *Pleurotus pulmonarius* a los 7, 10 y 13 días de fermentación.

Tiempo de fermentación [Días]	7	10	13
Actividad enzimática [U/g _{ss}]	5.9 ± 1.2 ^a	2.6 ± 0.4 ^b	2.9 ± 0.8 ^b

Tabla 7-15: Actividad enzimática promedio para *Trametes pubescens* a los 7, 10 y 13 días de fermentación.

Tiempo de fermentación [Días]	7	10	13
Actividad enzimática [U/g _{ss}]	3.3 ± 1.4 ^a	2.0 ± 0.7 ^{a,b}	1.0 ± 0.1 ^b

Para las especies *Pleurotus ostreatus* y *Trametes pubescens*, la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ubica el día 7 y el día 10 de fermentación en el grupo homogéneo a, indicando que para las condiciones bajo las cuales se realizó la FES, la actividad enzimática promedio de estas especies al día 7 no difiere significativamente de la actividad enzimática promedio al día 10, con un nivel de confianza del 95%. Con respecto a la especie *Pleurotus pulmonarius*, se observa que el día 7 es el único ubicado en el grupo a. Con base en estos resultados y dado que se busca consolidar un proceso eficiente de producción de lacasa en corto tiempo, se determinó para las futuras etapas de la investigación una duración de la fermentación de 7 días.

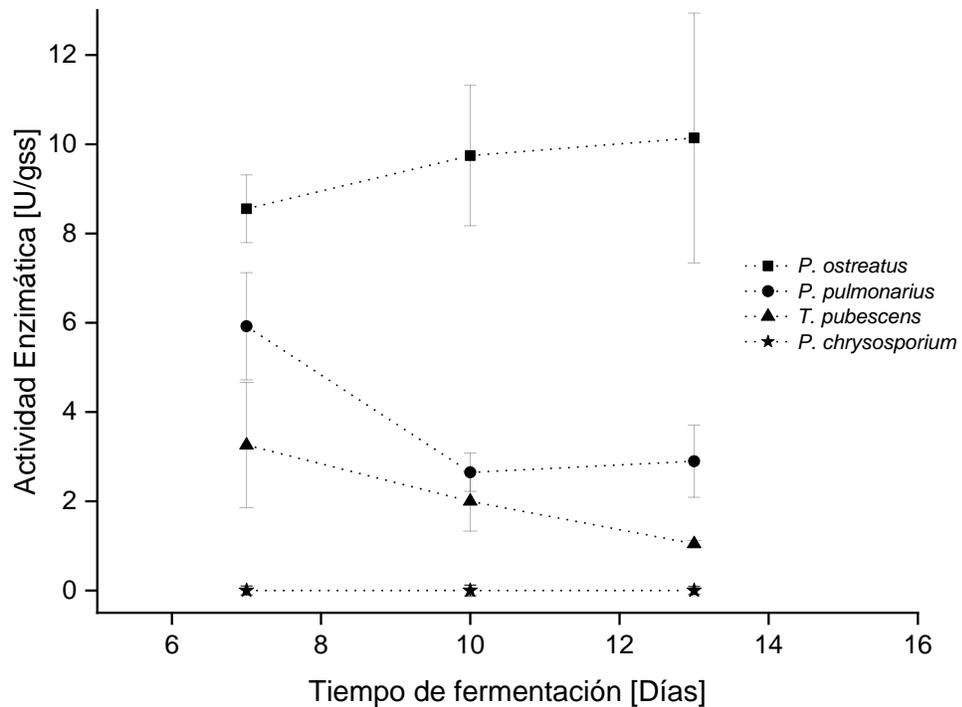
Ahora bien, para seleccionar la especie más adecuada se realizó un ANOVA seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey con la actividad promedio de las especies *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Trametes pubescens* al día 7 de fermentación. Los resultados presentados en la Tabla 7-16 señalan que, bajo las condiciones fermentativas contempladas, la especie con mayor producción de lacasa es *Pleurotus ostreatus*, siendo esta la única ubicada en el grupo homogéneo a.

Tabla 7-16: Actividad enzimática promedio de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Trametes pubescens* a los 7 días de fermentación.

Especie	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	<i>Trametes pubescens</i>
Actividad enzimática [U/g _{ss}]	8.6 ± 0.8 ^a	5.9 ± 1.2 ^b	3.3 ± 1.4 ^c

Se establece entonces que el proceso de producción de lacasa será llevado a cabo con la especie *Pleurotus ostreatus* durante 7 días de fermentación. Los resultados de esta sección se resumen en la Figura 7-5.

Figura 7-5: Resumen de resultados. Selección de la especie fúngica y el tiempo de fermentación.



Estos hallazgos evidencian que la producción de lacasa depende de una amplia variedad de factores, entre los que se destacan el tiempo de fermentación y la especie. Al respecto,

se registra un gran número de investigaciones en la producción de enzimas ligninolíticas, como la lacasa, en las cuales se han utilizado diversas especies de HPB a diferentes días e incluso semanas de proceso.

En lo concerniente al tiempo de fermentación, es importante resaltar que en algunos casos, como el de *Pleurotus pulmonarius* (Tabla 7-14), la actividad enzimática puede disminuir significativamente en un período breve de tiempo, comportamiento que es explicado por el hecho de que los HPB pueden producir de manera simultánea proteasas extracelulares que degradan la lacasa [83]. Por esta razón, para determinar el día exacto en que se produce la mayor cantidad de enzima, es necesario realizar un estudio cinético, a lo sumo diario, de la producción enzimática. Esto se realizó para la cepa seleccionada en etapas posteriores de la investigación.

En el caso de la especie *Phanerochaete chrysosporium*, resultados similares a los obtenidos son reportados por Risdianto *et al.* (2012) y Rodriguez-Couto *et al.* (1999), quienes para esta especie y bajo condiciones comparables de fermentación del residuo tusa de maíz registran la ausencia de lacasa [84], [85]. Sin embargo, este último autor encontró valores considerables de actividad enzimática al séptimo día de fermentación, cuando el medio fue suplementado con alcohol veratrílico, señalando que la producción de lacasa por *Phanerochaete chrysosporium* es dependiente de la presencia de ciertos inductores, los cuales no se evaluaron en esta etapa de la investigación.

Por su parte, la especie *Trametes pubescens* presentó su mayor actividad enzimática promedio (3.3 U/g_{ss}) al séptimo día de fermentación. Si bien este valor es significativamente menor que el presentado por las especies *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius* (Tabla 7-16), es bastante mayor comparado con los resultados obtenidos por diversos autores tales como Gonzalez *et al.* (2013) y Elisashvili *et al.* (2008), quienes obtuvieron valores cercanos a 0.3 U/g_{ss} y 1.8 U/g_{ss} luego de fermentar durante aproximadamente 8 días los residuos cascarilla de café y cáscara de manzana, respectivamente [86], [87]. Cabe mencionar que las condiciones de humedad, concentración y naturaleza de la fuente de carbono utilizadas por estos autores son muy similares a las utilizadas en la presente investigación.

En cuanto a las especies *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius*, la gran cantidad de información reportada sugiere que este género tiene un enorme potencial en la producción de lacasa bajo condiciones de FES. En particular, dos Santos Bazanella *et al.* (2013) reporta para la especie *Pleurotus pulmonarius* al décimo día de fermentación de tusa de maíz, una actividad lacasa de 4.5 U/g_{ss} [88], valor comparable con el 5.9 U/g_{ss} obtenido en la presente investigación para la misma especie al séptimo día del proceso. Por otro lado, An *et al.* (2016), registra para la especie *Pleurotus ostreatus* una actividad de 1.3 U/g_{ss} al octavo día de FES de tusa de maíz bajo condiciones similares (porcentaje de humedad del 78%, concentración de glucosa de 5 g/L, extracto de levadura como fuente de nitrógeno) [89], valor significativamente menor que el obtenido en este trabajo al séptimo día de la fermentación, que corresponde a 8.6 U/g_{ss}. Estos resultados confirman que las condiciones implementadas en esta investigación permitieron obtener resultados favorables en comparación con los encontrados en la literatura.

En particular para la especie seleccionada, *Pleurotus ostreatus*, es valioso destacar el efecto del sustrato en la producción de lacasa. En este sentido, Elisashvili *et al.* (2008) reportó un valor máximo de 2.1 U/g_{ss} al fermentar paja de trigo durante aproximadamente 8 días, con un contenido de humedad del 75% [87]. Por su parte, Membrillo *et al.* (2008) reportó una actividad máxima menor a 0.1 U/g_{ss} al octavo día de la fermentación de bagazo de caña de azúcar, bajo una humedad del 80% y una proporción C:N de 20:1 [90]. Al comparar estos valores con los obtenidos en la presente investigación, se concluye que la tusa de maíz es un material promisorio, con gran potencial para la producción de lacasa, lo cual es explicado por su elevado contenido de nutrientes, principalmente en forma de celulosa y hemicelulosa.

7.2 Determinación de las condiciones óptimas para la producción enzimática

La producción de la enzima lacasa fue llevada a cabo por la especie fúngica *Pleurotus ostreatus*, durante 7 días, bajo las condiciones de fermentación en estado sólido del residuo tusa de maíz descritas en la sección 6.8.

En la Tabla 7-17 se resumen las condiciones que maximizan la actividad enzimática en cada uno de los sistemas evaluados.

Tabla 7-17: Condiciones de la FES que maximizan la actividad enzimática.

	Extracto de levadura		Peptona	
	Sulfato de cobre	Tween 80	Sulfato de cobre	Tween 80
Glucosa	C. 25.0	C. 5.0	C. 25.0	C. 17.8
	I. 1.00	I. 0.05	I. 0.99	I. 0.14
	%H 65.0	%H 85.0	%H 81.0	%H 85.0
	C:N 5.32:1	C:N 38.95:1	C:N 40.83:1	C:N 45.00:1
Extracto de malta	C. 25.0	C. 18.2	C. 5.0	C. 16.0
	I. 0.51	I. 0.17	I. 1.00	I. 0.05
	%H 85.0	%H 85.0	%H 83.6	%H 84.0
	C:N 5.00:1	C:N 5.15:1	C:N 5.00:1	C:N 45.00:1

C: fuente de carbono, [g/L]. I: inductor - Tween 80, [%v/v] Sulfato de cobre, [mM]. %H: porcentaje de humedad. C:N: proporción carbono-nitrógeno

Una vez conocidas las condiciones que maximizan la variable de respuesta con sus respectivos valores de actividad enzimática (Tabla 7-18), se procedieron a realizar los montajes de las fermentaciones a dichas condiciones, con el fin de comparar los valores teóricos con los valores reales.

Tabla 7-18: Valores máximos teóricos de actividad enzimática.

	Extracto de levadura		Peptona	
	Sulfato de cobre	Tween 80	Sulfato de cobre	Tween 80
Glucosa	48.0	27.9	9.7	10.9
Extracto de malta	38.8	11.4	18.6	10.8

En la Tabla 7-19 se presentan los valores de actividad enzimática promedio alcanzados de forma experimental bajo las condiciones de FES resumidas en la Tabla 7-17; para cada sistema evaluado, los datos se obtuvieron de promediar los resultados de 5 unidades experimentales.

Tabla 7-19: Valores de actividad enzimática promedios obtenidos bajo condiciones de FES optimizadas.

	Extracto de levadura		Peptona	
	Sulfato de cobre	Tween 80	Sulfato de cobre	Tween 80
Glucosa	9.6 ± 0.4 ^{d,e}	6.1 ± 0.8 ^f	14.2 ± 1.4 ^{b,c}	11.8 ± 1.7 ^{b,c,d}
Extracto de malta	15.8 ± 3.6 ^b	23.5 ± 1.0 ^a	11.6 ± 2.0 ^{c,d}	8.3 ± 1.4 ^{e,f}

Finalmente, para seleccionar la combinación fuente de carbono/ fuente de nitrógeno/ inductor que maximizara la producción de lacasa, se realizó un ANOVA. En la Tabla 7-20 se presentan los resultados del análisis, los cuales, dado que valor-P < 0.05, demuestran que el efecto de los tratamientos es significativo, es decir, existe una diferencia estadísticamente significativa entre al menos dos de las actividades enzimáticas comparadas. Por esta razón, se aplicó una prueba de comparaciones múltiples con el método de Tukey, encontrándose 6 grupos homogéneos, los cuales se observan como superíndices de la actividad enzimática promedio en la Tabla 7-19.

Tabla 7-20: Resultados del ANOVA para la actividad enzimática promedio de los sistemas optimizados.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor-P
Tratamientos	7	0.1252	0.0179	41.23	3.02*10 ⁻¹⁴
Error	32	0.0139	0.0004		

Nota: Previo al análisis, los datos fueron transformados usando una transformación Box-Cox con λ óptimo = 0.11.

Con base en los resultados de la Tabla 7-19, el máximo valor de actividad enzimática (23.5 ± 1.0 U/g_{ss}) fue alcanzado utilizando el extracto de malta como fuente de carbono, el extracto de levadura como fuente de nitrógeno y el tween 80 como inductor. Adicionalmente, debido a que ninguno de los demás sistemas evaluados se encontró en el mismo grupo homogéneo que el máximo, este último fue seleccionado para las futuras etapas de la investigación.

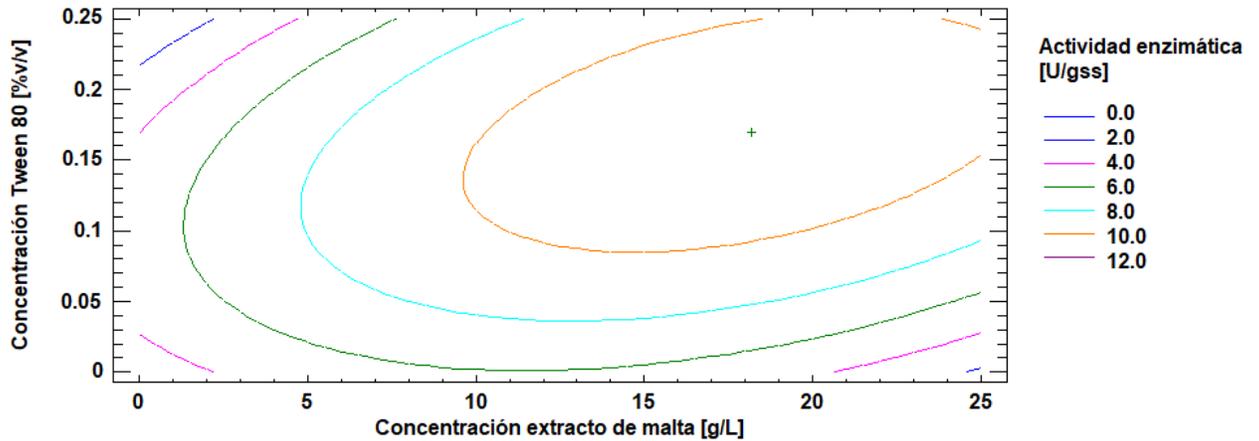
Es importante resaltar que cada diseño central compuesto realizado en este apartado de la investigación, permitió obtener el máximo de la actividad enzimática en la región contemplada. Por lo tanto, al comparar los sistemas entre sí, se están comparando las mejores condiciones de cada uno en dicha región.

La Ecuación 7.6 representa el modelo ajustado para el sistema previamente seleccionado; esta relaciona la actividad enzimática [U/g_{ss}] con los parámetros concentración de la fuente de carbono, C [g/L]; concentración de inductor, I [%v/v]; porcentaje de humedad, %H y proporción carbono-nitrógeno, C:N. En la Figura 7-6 se presenta la superficie de respuesta asociada al modelo.

El estadístico R² indica que el modelo ajustado explica el 50.28% de la variabilidad observada en la actividad enzimática. Por su parte, el estadístico R² ajustado, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, fue de 14.11%.

$$\begin{aligned} \text{Actividad lacasa} = & -55.8593 + 2.47429 * C - 196.077 * I + 1.26752 * \%H + 0.712019 * \\ & C:N - 0.02271 * C^2 + 1.77064 * C * I - 0.0226709 * C * \%H - 0.00560211 * C * C:N - \\ & 222.456 * I^2 + 2.75003 * I * \%H + 1.17174 * I * C:N - 0.00657835 * \%H^2 - 0.0116024 * \\ & \%H * C:N + 0.00117069 * C:N^2 \end{aligned} \quad (7.6)$$

Figura 7-6: Gráfica de contorno estimada para la actividad enzimática. Porcentaje de humedad = 85%. Proporción Carbono – Nitrógeno = 5.150 : 1.



Si bien el diseño estadístico ajustó un modelo para relacionar los factores evaluados con la variable de respuesta, dicho modelo demostró ser inadecuado en la predicción de la actividad enzimática bajo las condiciones óptimas (porcentaje de error de más del 100%). Sin embargo, dado que la actividad enzimática encontrada fue mucho mayor que la sugerida por el modelo, dicho porcentaje no representa un resultado negativo en términos de la eficiencia buscada en la presente investigación.

En la Tabla 7-21 se presentan los resultados del ANOVA para el diseño central compuesto seleccionado. Los efectos cuyo valor-P sea menor que el nivel de significancia de la prueba, es decir 0.05, se consideran significativos con un nivel de confianza del 95%. Se observa que el efecto lineal de la concentración de la fuente de carbono fue el único significativo.

Tabla 7-21: Resultados del ANOVA para el diseño central compuesto seleccionado.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor F	Valor-P
Bloques	2	42.23			
A: Concentración Carbono	1	28.57	28.57	5.10	0.0341
B: Concentración Inductor	1	0.03	0.03	0.01	0.9423
C: Porcentaje Humedad	1	2.39	2.39	0.43	0.5201

D: Proporción Carbono-Nitrógeno	1	0.15	0.15	0.03	0.8716
A²	1	10.67	10.67	1.91	0.1813
AB	1	3.14	3.14	0.56	0.4622
AC	1	5.14	5.14	0.92	0.3484
AD	1	1.26	1.26	0.22	0.6405
B²	1	10.24	10.24	1.83	0.1900
BC	1	7.56	7.56	1.35	0.2576
BD	1	5.49	5.49	0.98	0.3328
C²	1	0.90	0.90	0.16	0.6931
CD	1	5.38	5.38	0.96	0.3374
D²	1	0.45	0.45	0.08	0.7786
Error	22	123.18	5.60		
Total	38	247.73			

En la sección previa del presente estudio, se seleccionó la especie *Pleurotus ostreatus* por su alta producción de lacasa, la cual alcanzó un valor de actividad enzimática promedio de 8.6 U/g_{ss} al séptimo día de fermentación. No obstante, en procura de maximizar dicho valor por medio de la modificación de parámetros que regulan la síntesis de lacasa por parte del hongo, en esta sección se evaluaron diversos factores que finalmente permitieron incrementar el valor de actividad enzimática a 23.5 U/g_{ss} triplicando prácticamente la cantidad inicial obtenida. El efecto de estos factores será discutido a continuación.

La presencia de nitrógeno en el medio de la fermentación ha demostrado ser una variable determinante para la síntesis de lacasa por parte de los HPB, debido a que dicho nutriente es requerido por el microorganismo para llevar a cabo de manera satisfactoria sus procesos metabólicos [91]. En concordancia con este hecho, se encuentran reportados varios trabajos en donde se estudió tanto la naturaleza de la fuente que aporta el nitrógeno (orgánica o inorgánica), como su concentración. Respecto a las fuentes de nitrógeno, en la presente investigación se evaluaron dos, el extracto de levadura y la peptona, ambas de naturaleza orgánica; las cuales fueron escogidas en vista de que no solo aportan el nitrógeno requerido, sino también una amplia variedad de aditivos como aminoácidos y

vitaminas, que pueden tener efectos favorables en la producción de lacasa por parte del hongo [92].

La fuente de nitrógeno que permitió obtener la mayor cantidad de lacasa fue el extracto de levadura. Si bien no se conocen los componentes específicos responsables de la inducción enzimática, se presume que su contenido tanto de hidrolizados de proteínas como de algunas vitaminas hidrosolubles, puede incrementar la síntesis enzimática. De hecho, en varios estudios se ha reportado el extracto de levadura como buen inductor de enzimas ligninolíticas como la lacasa [91], [93], [94].

Los resultados de la Tabla 7-19 evidencian que, en presencia del extracto de malta como fuente de carbono, la producción de lacasa aumenta cuando se utiliza el extracto de levadura; sin embargo, en presencia de glucosa, la peptona es una fuente de nitrógeno más favorable, indicando una posible interacción entre la naturaleza de la fuente de carbono y la naturaleza de la fuente de nitrógeno. No obstante, el hecho de que las composiciones del extracto de malta, del extracto de levadura y de la peptona sean desconocidas, no permite estimar con claridad qué tipo de compuestos están sumando o restando sus efectos. Los resultados obtenidos en el presente estudio contrastan con los reportados por Das *et al.* (2016), donde encontraron que el efecto de la adición de extracto de levadura a una fermentación de paja de arroz y cascarilla de maíz con *Pleurotus ostreatus*, no difiere significativamente de la adición de peptona [94].

Otro factor evaluado fue la suplementación del medio con una fuente de carbono adicional. En este sentido, se consideró tanto la naturaleza de dicha fuente (definida o compleja), como su concentración. En cuanto a las fuentes de carbono definidas, como la glucosa, se consideran favorables porque facilitan la producción constitutiva de lacasa debido a que son fácilmente asimilables. Por su parte, las fuentes de carbono complejas, como el extracto de malta, cuentan con la ventaja de contener factores nutricionales adicionales que podrían facilitar la inducción de la enzima [95].

En el presente estudio la fuente de carbono que permitió obtener la mayor producción de lacasa fue el extracto de malta. Estos resultados pueden explicarse no solo por lo mencionado previamente con relación al aporte de factores nutricionales que pueden actuar como inductores, sino también por la conexión existente entre la fuente de carbono

y la adaptación del hongo al medio en los primeros días del proceso [96]. En este sentido, y sabiendo que el medio de donde se obtuvo el inóculo para la fermentación es el agar salvado de trigo, que es un medio indefinido muy rico en nutrientes, es posible que el extracto de malta haya “recreado” esas condiciones mejor que la glucosa, acortando la fase de adaptación del microorganismo y por tanto aumentando la producción de lacasa.

Ahora bien, es valioso destacar que el uso de residuos agroindustriales en los procesos de FES es favorable debido a que, al poseer propiedades nutricionales, estos materiales actúan no solo como soporte sino también como sustrato. En ese orden de ideas, se encuentra reportado que en ocasiones, la suplementación del medio con fuentes de carbono adicionales no tiene efecto significativo en la producción de lacasa [93]. Sin embargo, en este estudio se evidenció que, tanto la naturaleza de la fuente de carbono, como su concentración, tienen un impacto significativo en la actividad enzimática. Con relación a la última afirmación, los resultados de la Tabla 7-21 señalan que la concentración del extracto de malta es el único factor con efecto significativo, y la Figura 7-6 indica que su efecto es positivo. Así, se concluye que esta variable es la más influyente en la síntesis enzimática y que su acción es de carácter independiente. Además, los resultados obtenidos contrastan con la hipótesis de que un medio carente de nutrientes incrementa la producción de enzimas ligninolíticas como la lacasa, debido al favorecimiento del metabolismo secundario del hongo [38].

Como se mencionó anteriormente, los resultados señalan que la actividad enzimática se ve afectada por una presumible interacción entre la naturaleza de la fuente de carbono y la naturaleza de la fuente de nitrógeno. Sin embargo, otro factor fuertemente influyente es la relación entre las concentraciones de dichos nutrientes, ese factor es conocido como la proporción carbono-nitrógeno. Para el sistema seleccionado, se encontró que la proporción carbono-nitrógeno que maximiza la actividad lacasa es de 5.15:1. Estos resultados son respaldados por estudios en donde se reporta que proporciones bajas incrementan la producción de lacasa [94], [97].

Para explicar el efecto de la proporción carbono-nitrógeno es fundamental discutir acerca de la cantidad de nitrógeno adicionado al medio, debido a que estas dos variables son dependientes entre sí mediante una relación inversamente proporcional. En este sentido,

varios autores reportan que altas concentraciones de nitrógeno, asociadas a bajas proporciones carbono-nitrógeno, estimulan la producción de lacasa, dado que la alta disponibilidad de este nutriente reduce la fase de adaptación de los microorganismos y favorece por tanto la síntesis enzimática [91], [93], [97], [98]. Sin embargo, es importante tomar en consideración que el efecto de la adición de una fuente de nitrógeno no es generalizable a todas las especies del género *Pleurotus*, ni tampoco a todas las cepas de la especie *Pleurotus ostreatus*.

En particular, Das *et al.* (2016), llevó a cabo un proceso de FES con la cepa de *Pleurotus ostreatus* MTCC 142 usando una mezcla de dos sustratos (paja de arroz y cascarilla de maíz), en donde evaluó el efecto de diferentes proporciones carbono-nitrógeno, encontrando que la producción de lacasa se vio favorecida por un valor de 5:1, tal como lo encontrado en el presente estudio. Los autores usaron como fuente de carbono adicional la fructosa y como fuente de nitrógeno el nitrato de potasio [94].

Ahora bien, de acuerdo con D'Agostini *et al.* (2011), la proporción carbono-nitrógeno no solo tiene un efecto en la producción de lacasa, sino también en el crecimiento del hongo, reportando que con valores mayores de 30:1 el desarrollo micelial se ve favorecido, mientras que con valores menores de 30:1 se ve obstaculizado [97]. Esta información respalda los resultados obtenidos por el presente estudio, en donde se observó que para los sistemas cuya optimización señaló bajas proporciones carbono-nitrógeno, el crecimiento del hongo fue mínimo (ver Anexo B). Sin embargo, en algunos casos, el bajo desarrollo micelial no tuvo un efecto negativo en la producción de lacasa (véase el caso seleccionado extracto de malta/ extracto de levadura/ tween 80). No obstante, es valioso clarificar que lo anterior no implica que los sistemas con alta proporción carbono-nitrógeno presentaran los menores niveles de lacasa (véase el caso glucosa/ peptona/ tween 80, con valor óptimo de 45:1, cuya actividad enzimática se encontró compartiendo grupo estadístico con el segundo mejor tratamiento).

Este hallazgo en relación con el bajo crecimiento micelial permite concluir que la producción de lacasa no siempre está ligada al metabolismo secundario de los hongos como sugieren algunos autores [4], [5]. Al respecto, D'Agostini *et al.* (2011) reporta que, bajo proporciones carbono-nitrógeno menores de 30:1 la producción de lacasa se estimula como consecuencia de la activación de su síntesis, mientras que para proporciones

mayores de 30:1 la producción de lacasa se estimula por un mayor crecimiento micelial [97].

Por otra parte, la adición de inductores al medio de fermentación es una de las estrategias más exitosas para maximizar la producción de lacasa, entre estos compuestos resalta el sulfato de cobre, por sus efectos regulatorios tanto a nivel de inducción de expresión y transcripción de genes como a nivel de actividad y estabilidad de la enzima [99]–[101]. No obstante, en el presente estudio el sulfato de cobre no permitió obtener la mayor actividad enzimática, lo cual puede explicarse por varios factores: 1) la adición de tal inductor al medio debe realizarse una vez el hongo haya superado la fase de adaptación [92], [93]; 2) el efecto del inductor en la producción de lacasa tarda más de 7 días en observarse [93]; 3) el efecto del sulfato de cobre puede estar siendo anulado por el efecto de otro compuesto [101]; y 4) la concentración empleada fue tóxica para la cepa evaluada en este trabajo. Con respecto a esta última acotación, múltiples estudios para diferentes cepas de *Pleurotus ostreatus* han demostrado que la adición de sulfato de cobre a concentraciones como las utilizadas en esta investigación o incluso mayores, son favorables para la producción de lacasa [93], [94], [102], sin embargo, otros autores han reportado que la inducción ocurre a concentraciones del orden de 50-100 μM [96], [103], [104].

Para el presente estudio, el inductor que maximizó la actividad enzimática fue el tween 80. Este surfactante ha sido muy reportado en la inducción de la lacasa, y se presume que la realiza mediante un efecto en la membrana celular del hongo, aumentando la permeabilidad del oxígeno y el transporte de nutrientes al interior de las células, sobre todo aquellos que son menos solubles [105], [106]. Adicionalmente, de acuerdo con Akpınar *et al.* (2017) se presume que dicho compuesto puede proteger la estructura de la enzima de factores ambientales [103]. En tal sentido, varios autores respaldan los resultados obtenidos en este estudio, en donde reportan que la adición de tween 80 tuvo un efecto significativo en la producción de lacasa por parte de especies del género *Pleurotus*, a concentraciones que van desde 0.01% v/v hasta 0.1% v/v [91], [96], [103].

El último factor considerado en el diseño de experimentos fue el contenido de humedad. Este parámetro es de suma importancia en cualquier proceso fermentativo y está ligado íntimamente al tipo de microorganismo y al método de fermentación. En este caso, dado

que se está realizando una FES con un hongo filamentoso, Krishna (2005) sugiere una humedad máxima de 70% [38]; sin embargo, en el presente estudio se obtuvo el óptimo de actividad enzimática bajo una humedad del 85%. Los resultados encontrados son respaldados por los presentados por Dwivedi *et al.* (2011), donde evaluaron un rango de porcentajes de humedad que van desde 20% hasta 120%, encontrando que el valor más favorable corresponde a un 80% [107]. Cabe señalar que tales resultados fueron obtenidos para un proceso de FES empleando como sustrato una combinación 3:1 de bagazo de caña y cáscara de frijol negro, usando un consorcio fúngico entre *Penicillium oxalicum* y *Pleurotus ostreatus*.

Los resultados favorables obtenidos para la actividad enzimática bajo condiciones de alto contenido de humedad son explicados debido a la facilidad tanto de la difusión de nutrientes, como de los procesos de transferencia de calor, incrementando consecuentemente la productividad de las enzimas [45], [108].

En definitiva, el diseño experimental estableció que las condiciones óptimas para la producción de lacasa se alcanzan utilizando el extracto de malta como fuente de carbono, a una concentración de 18.2 g/L; el extracto de levadura como fuente de nitrógeno, ajustando la proporción carbono-nitrógeno a un valor de 5.15:1; el tween 80 como inductor, a una concentración de 0.17% v/v; y el contenido de humedad en 85.0%.

7.3 Determinación de las condiciones más adecuadas para la extracción enzimática

Una vez seleccionadas las condiciones que optimizan la producción de lacasa, se evaluó el proceso de extracción enzimática con los buffers acetato de sodio, citrato de sodio y McIlvaine a través de un diseño de experimentos para cada uno de dichos sistemas tomando como variable de respuesta la actividad enzimática (ver sección 6.9).

En la Tabla 7-22 se presentan los tratamientos evaluados para el buffer citrato de sodio, la actividad enzimática promedio alcanzada en cada uno de ellos y la agrupación estadística resultante de la aplicación de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Tabla 7-22: Resultados del diseño factorial para la extracción enzimática. Buffer citrato de sodio.

Tratamiento	Concentración [mM]	pH	Tiempo de contacto [min]	Actividad enzimática [U/g _{ss}]	Grupo
1	50	4.00	30	36.2 ± 12.7	a
2	150	4.00	30	23.1 ± 9.4	a,b
3	50	4.00	90	32.2 ± 8.3	a
4	150	4.00	90	25.6 ± 3.7	a,b
5	100	5.00	60	27.2 ± 4.7	a,b
6	50	6.00	30	8.0 ± 5.9	b
7	150	6.00	30	24.2 ± 2.8	a,b
8	50	6.00	90	38.3 ± 9.3	a
9	150	6.00	90	8.7 ± 1.3	b

En la Tabla 7-23 se presentan los resultados del ANOVA para el diseño factorial realizado. Los efectos cuyo valor-P sea menor que el nivel de significancia de la prueba, es decir 0.05, se consideran significativos con un nivel de confianza del 95%. Se observa que la concentración, el pH, la interacción concentración/tiempo de contacto y la interacción concentración/pH/tiempo de contacto resultaron significativos.

Tabla 7-23: Resultados del ANOVA para el diseño factorial. Extracción enzimática, buffer citrato de sodio.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor-P
Bloques	2	49.85			
A: Concentración	1	412.59	412.59	6.73	0.0212
B: pH	1	540.20	540.20	8.81	0.0102
C: Tiempo de contacto	1	66.17	66.17	1.08	0.3165
AB	1	14.09	14.09	0.23	0.6390
AC	1	577.29	577.29	9.42	0.0083

BC	1	100.10	100.10	1.63	0.2222
ABC	1	1031.07	1031.07	16.82	0.0011
Error	14	858.33	61.31		
Total	23	3649.65			

Se procederá a examinar la interacción significativa de mayor orden, es decir la interacción concentración/pH/tiempo de contacto. Una interacción significativa de este tipo ocurre cuando la interacción entre dos de los tres factores no es constante en todos los niveles del tercer factor, por tal razón se debe analizar el comportamiento de las interacciones concentración/pH, concentración/tiempo de contacto, y pH/tiempo de contacto en los dos niveles de los factores tiempo de contacto, pH y concentración, respectivamente.

Para ejemplificar el análisis conceptual se examinará el efecto de la interacción concentración/tiempo de contacto en los dos niveles del factor pH. Este propósito se puede cumplir mediante la evaluación de las siguientes comparaciones:

1. El promedio de la actividad enzimática de los tratamientos 1 y 3, correspondientes a la interacción concentración (50 mM) / tiempo de contacto a un pH de 4.00, y el promedio de la actividad de los tratamientos 6 y 8, correspondientes a la misma interacción a un pH de 6.00.
2. El promedio de la actividad enzimática de los tratamientos 2 y 4, correspondientes a la interacción concentración (150 mM) / tiempo de contacto a un pH de 4.00, y el promedio de la actividad de los tratamientos 7 y 9, correspondientes a la misma interacción a un pH de 6.00.
3. El promedio de la actividad enzimática de los tratamientos 1 y 2, correspondientes a la interacción concentración / tiempo de contacto (30 min) a un pH de 4.00, y el promedio de la actividad de los tratamientos 6 y 7, correspondientes a la misma interacción a un pH de 6.00.
4. El promedio de la actividad enzimática de los tratamientos 3 y 4, correspondientes a la interacción concentración / tiempo de contacto (90 min) a un pH de 4.00, y el promedio de la actividad de los tratamientos 8 y 9, correspondientes a la misma interacción a un pH de 6.00.

De estas cuatro comparaciones se concluye que, en general, la interacción concentración/tiempo de contacto permite obtener valores mayores de actividad enzimática cuando el pH del buffer es 4.00. Asimismo, de análisis similares para los dos casos restantes, se concluye que la interacción pH/tiempo de contacto permite obtener valores mayores de actividad enzimática cuando la concentración del buffer es 50 mM.

Con las dos conclusiones anteriores, es posible afirmar que para el buffer citrato de sodio, la actividad enzimática tiende a aumentar cuando la concentración y el pH disminuyen. Esta afirmación es respaldada por los tratamientos 1 y 3, los cuales cumplen con las condiciones mencionadas y se encuentran ubicados únicamente en el grupo homogéneo a.

Ahora bien, es valioso mencionar que la discusión anterior pretende dilucidar el comportamiento de los factores en relación con la actividad enzimática; sin embargo, para seleccionar las condiciones más favorables para la extracción, objetivo de esta sección, se ignora la estructura factorial de los datos y, con base a los resultados de la prueba de comparaciones múltiples, se analiza cada tratamiento como si fuera un nivel de un diseño unifactorial.

En la Tabla 7-24 se presentan los tratamientos evaluados para el buffer acetato de sodio, la actividad enzimática promedio alcanzada en cada uno de ellos y la agrupación estadística resultante de la aplicación de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Tabla 7-24: Resultados del diseño factorial para la extracción enzimática. Buffer acetato de sodio.

Tratamiento	Concentración [mM]	pH	Tiempo de contacto [min]	Actividad enzimática [U/g _{ss}]	Grupo
1	50	4.00	30	25.9 ± 5.2	a
2	150	4.00	30	25.9 ± 7.0	a
3	50	4.00	90	27.5 ± 4.7	a

4	150	4.00	90	24.9 ± 3.0	a
5	100	5.00	60	26.3 ± 9.0	a
6	50	6.00	30	33.2 ± 2.5	a
7	150	6.00	30	27.7 ± 1.1	a
8	50	6.00	90	36.3 ± 4.5	a
9	150	6.00	90	26.5 ± 2.7	a

En la Tabla 7-25 se presentan los resultados del ANOVA para el diseño factorial realizado. Se observa que la concentración y el pH son los únicos factores significativos.

Tabla 7-25: Resultados del ANOVA para el diseño factorial. Extracción enzimática, buffer acetato de sodio.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor-P
Bloques	2	13.813			
A: Concentración	1	122.004	122.004	6.33	0.0246
B: pH	1	144.139	144.139	7.48	0.0161
C: Tiempo de contacto	1	2.348	2.348	0.12	0.7322
AB	1	59.770	59.770	3.10	0.0999
AC	1	17.721	17.721	0.92	0.3537
BC	1	0.588	0.588	0.03	0.8638
ABC	1	1.003	1.003	0.05	0.8227
Error	14	269.621	19.259		
Total	23	631.008			

Para analizar el efecto de la concentración del buffer, basta con comparar los tratamientos 1 y 2, 3 y 4, 6 y 7, 8 y 9; donde se observa que este factor tiene un efecto de carácter negativo en la variable de respuesta, es decir que el aumento en la concentración del buffer causa una disminución en la actividad enzimática, independientemente del pH del buffer y del tiempo de contacto.

De manera similar, al comparar los tratamientos 1 y 6, 2 y 7, 3 y 8, 4 y 9, se concluye que el pH tiene un efecto de carácter positivo en la variable de respuesta, es decir que el aumento en el pH del buffer causa un aumento en la actividad enzimática, independientemente de la concentración del buffer y del tiempo de contacto.

En la Tabla 7-26 se presentan los tratamientos evaluados para el buffer Mcllvaine, la actividad enzimática promedio alcanzada en cada uno de ellos y la agrupación estadística resultante de la aplicación de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Tabla 7-26: Resultados del diseño factorial para la extracción enzimática. Buffer Mcllvaine.

Tratamiento	pH	Tiempo de contacto [min]	Actividad enzimática [U/g _{ss}]	Grupo
1	4.00	30	30.4 ± 8.2	a
2	4.00	90	18.2 ± 1.0	a
3	5.00	60	33.9 ± 9.8	a
4	6.00	30	21.6 ± 5.3	a
5	6.00	90	32.4 ± 7.7	a

En la Tabla 7-27 se presentan los resultados del ANOVA para el diseño factorial realizado. Se observa que la interacción pH/tiempo de contacto es el único factor significativo.

Esta interacción significativa indica que el efecto del tiempo de contacto depende del nivel del factor pH. Lo anterior se evidencia al comparar los tratamientos 1 y 2 con los tratamientos 4 y 5; en los primeros, correspondientes a un pH de 4.00, se observa que el tiempo de contacto tiene un efecto negativo sobre la actividad, mientras que en los segundos, correspondientes a un pH de 6.00, se observa un efecto positivo.

Similarmente, el efecto del pH depende del nivel del factor tiempo de contacto. Para un tiempo de contacto de 30 min (tratamientos 1 y 4), el efecto del pH es negativo mientras que para un tiempo de contacto de 90 min (tratamientos 2 y 5), el efecto es positivo.

Tabla 7-27: Resultados del ANOVA para el diseño factorial. Extracción enzimática, buffer Mcllvaine.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor-P
Bloques	2	113.357			
A: pH	1	21.891	21.891	0.95	0.3665
B: Tiempo de contacto	1	1.610	1.610	0.07	0.8000
AB	1	394.153	394.153	17.17	0.0061
Error	6	137.704	22.951		
Total	11	668.715			

Ahora bien, para comparar los buffers evaluados y seleccionar las condiciones más favorables para la extracción enzimática, se realizó un ANOVA entre los tratamientos pertenecientes al grupo a de cada uno de los tres diseños de experimentos ejecutados. Dado que el efecto de los tratamientos no resultó significativo, se estableció el siguiente protocolo para realizar la extracción enzimática en las etapas siguientes de la investigación: Adicionar 10 mL de buffer acetato de sodio 50 mM, pH = 6.00 a cada Erlenmeyer conteniendo 500.0 ± 0.1 mg de tusa de maíz fermentada, homogenizar el material y someterlo a agitación en baño de hielo durante 30 min a 180 rpm. Posteriormente extraer la fase líquida y centrifugar a 3000 rcf y 4 °C durante 10 min.

Las condiciones seleccionadas corresponden al tratamiento 6 de la Tabla 7-24. Este tratamiento fue escogido en virtud del poco tiempo que demanda para la extracción enzimática (30 min), sin afectar la eficiencia del proceso. Adicionalmente, al ser un pH de 6.00, cercano al pH natural del agua, se minimiza el gasto de ácido en el ajuste del mismo. Es valioso mencionar también que, a nivel económico, resulta más favorable usar el buffer acetato de sodio de menor concentración (50 mM), en comparación con los buffers citrato de sodio y Mcllvaine, debido al costo asociado a las sales propias de estos.

A modo de discusión, es bien sabido que la extracción es una de las etapas más críticas en la síntesis de un metabolito de interés a partir de un proceso de fermentación en estado sólido. Esto se debe a que, si dicho metabolito es producido satisfactoriamente, pero no

es recuperado en su totalidad, o es recuperado bajo condiciones que disminuyen su estabilidad, el rendimiento del proceso puede disminuir de manera significativa. En particular, pese a ser una etapa muy importante en la producción de lacasa, a la fecha no se encuentran reportes detallados al respecto. En este sentido, la presente investigación es pionera, apuntando al estudio del proceso de extracción enzimática a fin de seleccionar las condiciones más favorables bajo las cuales puede llevarse a cabo.

Al observar los resultados obtenidos, se concluye que la lacasa producida en este estudio es una enzima con alta estabilidad bajo una gran variedad de condiciones. Aunque el comportamiento de los factores concentración, pH del buffer y tiempo de contacto está íntimamente ligado al buffer que se utilice, es destacable que el proceso de extracción puede ser llevado a cabo de manera satisfactoria en tan solo 30 min. Adicionalmente, es muy valioso resaltar dos aspectos: 1) como resultado de la evaluación del proceso de extracción, la actividad enzimática aumentó de 23.5 U/g_{ss} a 33.2 U/g_{ss} que corresponde a un incremento de 1.4 veces el valor obtenido por la cepa *Pleurotus ostreatus* luego de la optimización de la FES y, 2) el valor de actividad alcanzado a las condiciones de extracción que se venían utilizando (26.3 U/g_{ss}), no presenta diferencia estadística significativa con el 23.5 U/g_{ss} que se registró en el ensayo previo, lo cual permite concluir en favor de la consistencia de los resultados a lo largo de la investigación.

7.4 Determinación de las condiciones más adecuadas para la cuantificación enzimática

Las condiciones para la cuantificación enzimática fueron evaluadas con los buffers acetato de sodio, citrato de sodio y Mcllvaine a través de un diseño de experimentos para cada sistema, tomando como variable de respuesta la actividad enzimática (ver sección 6.10).

En la Tabla 7-28 se presentan los tratamientos evaluados para el buffer citrato de sodio, la actividad enzimática promedio alcanzada en cada uno de ellos y la agrupación estadística resultante de la aplicación de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Tabla 7-28: Resultados del diseño factorial para la cuantificación enzimática. Buffer citrato de sodio.

Tratamiento	Concentración [mM]	pH	Actividad enzimática [U/g _{ss}]	Grupo
1	50	4.00	35.6 ± 0.8	a
2	150	4.00	35.9 ± 0.5	a
3	100	5.00	21.0 ± 0.3	b
4	50	6.00	11.3 ± 0.4	c
5	150	6.00	11.56 ± 0.4	c

En la Tabla 7-29 se presentan los resultados del ANOVA para el diseño factorial realizado. Los efectos cuyo valor-P sea menor que el nivel de significancia de la prueba, es decir 0.05, se consideran significativos con un nivel de confianza del 95%. Se observa que el pH es el único factor significativo.

Tabla 7-29: Resultados del ANOVA para el diseño factorial. Cuantificación enzimática, buffer citrato de sodio.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor-P
Bloques	2	0.16			
A: pH	1	1780.31	1780.31	4561.21	0.0000
B: Concentración	1	0.14	0.14	0.35	0.5742
AB	1	0.00	0.00	0.01	0.9211
Error	6	2.34	2.34		
Total	11	1782.95			

Los resultados obtenidos para este buffer señalan que el pH es un factor determinante en la cuantificación de la lacasa, y que, adicionalmente, presenta un efecto de carácter negativo sobre la actividad enzimática.

En la Tabla 7-30 se presentan los tratamientos evaluados para el buffer acetato de sodio, la actividad enzimática promedio alcanzada en cada uno de ellos y la agrupación

estadística resultante de la aplicación de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Tabla 7-30: Resultados del diseño factorial para la cuantificación enzimática. Buffer acetato de sodio.

Tratamiento	Concentración [mM]	pH	Actividad enzimática [U/g _{ss}]	Grupo
1	50	4.00	39.4 ± 1.1	a
2	150	4.00	35.8 ± 0.3	b
3	100	5.00	22.2 ± 0.3	c
4	50	6.00	12.6 ± 0.3	d
5	150	6.00	14.0 ± 0.4	d

En la Tabla 7- 31 se presentan los resultados del ANOVA para el diseño factorial realizado. Se observa que el pH, la concentración y la interacción entre estos dos factores resultaron significativos.

Tabla 7-31: Resultados del ANOVA para el diseño factorial. Cuantificación enzimática, buffer acetato de sodio.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor-P
Bloques	2	1.09			
A: pH	1	1770.85	1770.85	5169.43	0.0000
B: Concentración	1	3.69	3.69	10.78	0.0167
AB	1	18.38	18.38	53.67	0.0003
Error	6	2.06	0.34		
Total	11	1796.1			

La interacción de primer orden significativa indica que el efecto de la concentración del buffer depende del nivel del factor pH. Lo anterior se evidencia al comparar los tratamientos 1 y 2 con los tratamientos 4 y 5; en los primeros, correspondientes a un pH de 4.0, se

observa que la concentración del buffer tiene un efecto negativo sobre la actividad, mientras que en los segundos, correspondientes a un pH de 6.0, se observa un efecto positivo.

En la Tabla 7-32 se presentan los tratamientos evaluados para el buffer McIlvaine, la actividad enzimática promedio alcanzada en cada uno de ellos y la agrupación estadística resultante de la aplicación de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Tabla 7-32: Resultados del diseño unifactorial para la cuantificación enzimática. Buffer McIlvaine.

Tratamiento	pH	Actividad enzimática [U/g _{ss}]	Grupo
1	4.00	33.3 ± 1.2	a
2	5.00	19.3 ± 0.2	b
3	6.00	10.5 ± 0.2	c

Los resultados obtenidos para el buffer McIlvaine evidencian un comportamiento similar al observado con el buffer citrato de sodio. En este sentido, se destaca que, en tales sistemas, los tratamientos correspondientes a un pH de 4.00 se ubicaron en el grupo homogéneo *a*, los tratamientos correspondientes a un pH de 5.00 en el grupo *b* y los tratamientos correspondientes a un pH de 6.00 en el grupo *c*. En cuanto al buffer acetato de sodio, se observó un comportamiento similar en donde la actividad enzimática se ve favorecida a un pH de 4.00. Estos hallazgos demuestran que el pH es un factor sumamente influyente en la cuantificación de la actividad de la lacasa.

Ahora bien, para seleccionar las condiciones más favorables para la cuantificación enzimática, se realizó un ANOVA entre los tratamientos pertenecientes al grupo *a* de cada uno de los tres diseños de experimentos ejecutados y, dado que el efecto de los tratamientos resultó significativo (véase Tabla 7-33), se aplicó una prueba de comparaciones múltiples con el método de Tukey. Los resultados para esta última prueba se presentan en la Tabla 7-34.

Tabla 7-33: Resultados del ANOVA para el diseño factorial. Cuantificación enzimática, comparación entre buffers.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor-P
Tratamientos	3	55.97	18.66	21.5	0.000348
Error	8	6.94	0.87		

Tabla 7-34: Resultados prueba de comparaciones múltiples para los tratamientos pertenecientes al grupo a.

	pH	Concentración [mM]	Actividad enzimática [U/g _{ss}]	Grupo
Buffer acetato de sodio	4.00	50	39.4 ± 1.1	a
Buffer citrato de sodio	4.00	150	35.9 ± 0.5	b
	4.00	50	35.6 ± 0.8	b,c
Buffer McIlvaine	4.00	-	33.3 ± 1.2	c

Se estableció entonces el siguiente protocolo para realizar la cuantificación enzimática en las etapas siguientes de la investigación: Adicionar a la celda de reacción 500 µL de ABTS (0.4 mM), 1400 µL de buffer acetato de sodio 50 mM, pH = 4.00 y 100 µL de extracto enzimático; medir el cambio en la absorbancia durante 1 min en un espectrofotómetro a una longitud de onda de $\lambda = 420$ nm; finalmente, determinar la actividad de la enzima lacasa con las Ecuaciones 6.1 y/o 6.2. Es destacable que el valor de actividad alcanzado a las condiciones de cuantificación que se venían utilizando (33.3 U/g_{ss}), no presenta diferencia estadística significativa con el 33.2 U/g_{ss} que se registró en el ensayo previo, lo cual permite concluir en favor de la consistencia de los resultados a lo largo de la investigación. Adicionalmente, se observa, aunque pequeño (6.2 U/g_{ss}), un aumento en la actividad enzimática como resultado del estudio de la cuantificación enzimática.

Es valioso mencionar que los resultados resumidos en la Tabla 7-34 indican que la actividad de la lacasa se favorece al realizar la cuantificación de esta con el buffer acetato de sodio, en comparación con el buffer citrato de sodio y el buffer McIlvaine. Al respecto,

se plantea una hipótesis para explicar este comportamiento basada en la naturaleza misma de los ácidos carboxílicos participantes en cada sistema. El ácido cítrico cuenta en su estructura con la presencia de tres grupos carboxílicos (COOH), dando lugar a la formación de un mayor número de puentes de hidrógeno con la enzima, lo cual puede reducir la movilidad de la lacasa y provocar por tanto una disminución de su actividad. En contraste, el ácido acético es un compuesto monocarboxílico, por lo que generará puentes de hidrógeno limitados con la enzima, que afectan en menor proporción su movilidad y eficiencia.

Ahora bien, en relación al pH, su efecto en la cuantificación enzimática ha sido muy estudiado por diferentes autores. Así, Stoilova *et al.* (2010) reportó que en el caso de oxidación de compuestos fenólicos, la actividad enzimática de la mayoría de lacasas fúngicas se ve favorecida a valores de pH ligeramente ácidos, ya que a valores de pH muy elevados se propicia el enlace entre grupos hidroxilo y el sitio T2 y T3 de la lacasa, resultando en la interrupción de la transferencia interna de electrones y por tanto en la inhibición de la enzima [109]. Adicionalmente, Salony *et al.* (2006) reporta que a un pH alto, aminoácidos críticos como el ácido aspártico y el ácido glutámico pueden ionizarse, causando con esto la inactivación de la lacasa [110].

Por otro lado, los resultados de Palmieri *et al.* (1993) señalan que el pH óptimo para la actividad enzimática depende del compuesto seleccionado para la medición: para el caso de la oxidación de ABTS el rango óptimo de pH es de 3.0 a 3.5, mientras que para guaiacol y siringaldehído (compuestos también muy usados) es de 5.0 a 6.0 y 6.0 a 7.0, respectivamente [111]. Majcherczyk *et al.* (1999) sugiere que este comportamiento diferenciado puede ser atribuido al mecanismo por el que la enzima lleva a cabo la oxidación de cada sustrato, en este sentido, cuando el mecanismo implica la abstracción de un hidrógeno, el pH tiene un efecto directo sobre el potencial redox, y cuando el mecanismo implica la abstracción de un electrón, el pH afecta el estado de ionización del sustrato afectando por tanto su estabilidad para actuar como agente reductor [112].

Los resultados obtenidos en la presente investigación son respaldados por varios estudios en donde reportan que para lacasas fúngicas del género *Pleurotus*, valores de pH cercanos a 4.0 favorecen la actividad enzimática [113]–[115].

7.5 Construcción de curvas cinéticas para la determinación del día de máxima actividad

Para conocer el perfil de producción de lacasa y determinar el día en el que se obtiene la mayor actividad de esta, se realizó un monitoreo de la actividad enzimática y la actividad específica cada 24 horas durante 18 días, los resultados se presentan en las Figuras 7-7 y 7-8. Tanto la fermentación como la extracción y cuantificación de la enzima, se llevaron a cabo bajo las condiciones de proceso previamente establecidas.

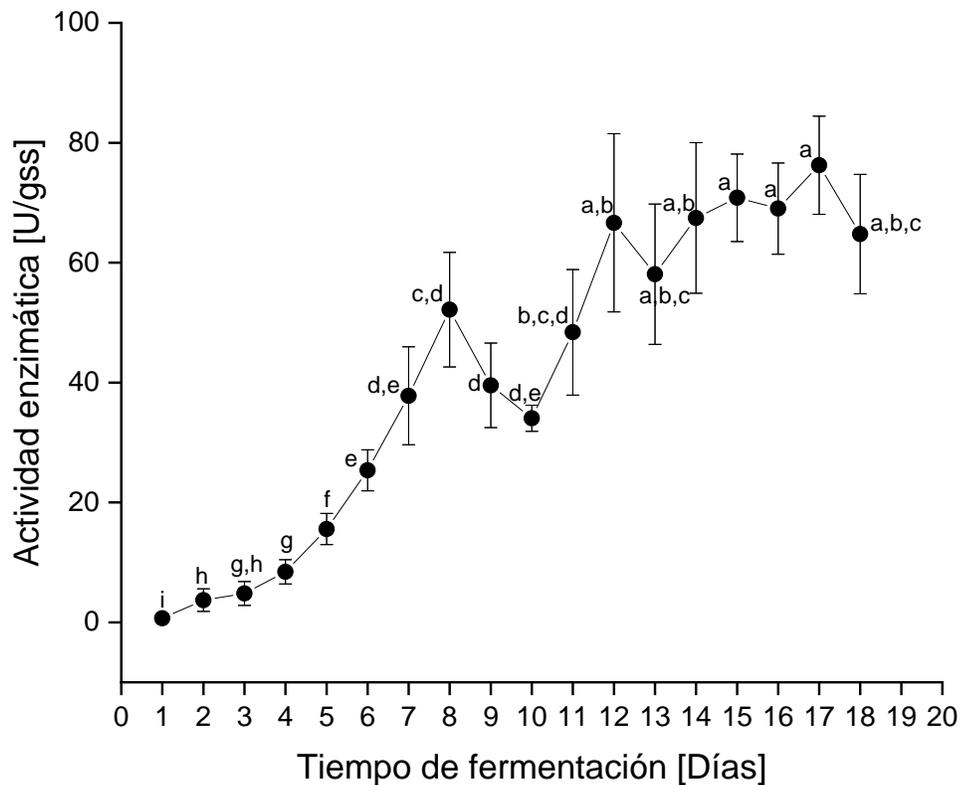
En el caso de la actividad enzimática (Figura 7-7), se observa una primera fase de baja actividad de la lacasa debido probablemente al proceso de adaptación del hongo al medio de fermentación. Luego, desde el cuarto hasta el octavo día, tiene lugar una etapa de producción acelerada en la que se prevé que el microorganismo toma los nutrientes y estos actúan como inductores de la síntesis de la enzima [97]. Acto seguido se observa un descenso en la actividad que inicia al octavo y finaliza al décimo día, tiempo en el que esta empieza a recuperarse alcanzando su posterior estabilización alrededor del doceavo día. El pico máximo, correspondiente a $76.2 \text{ U/g}_{\text{ss}} \pm 8.2 \text{ U/g}_{\text{ss}}$, se logró en el día 17 en donde, si bien hay un agotamiento de los nutrientes del medio, se espera alta actividad debido a la activación del metabolismo secundario del hongo.

Respecto al comportamiento observado de la actividad enzimática, en donde se presenta una disminución de esta seguida de un rápido aumento, se plantean dos hipótesis: La primera supone que al octavo día es posible que el microorganismo se encuentre ante una deficiencia de nutrientes en el medio, lo cual genera la reducción en la actividad; sin embargo, esta caída puede activar el metabolismo secundario de la especie y ocasionar así la recuperación de los niveles al décimo día [4], [5]. La segunda presume una posible producción simultánea de algunas proteasas por parte del microorganismo, las cuales pueden regular la actividad de la lacasa mediante la degradación y/o activación de diferentes isoenzimas [83].

En cuanto a la cinética de la actividad específica (Figura 7-8), se presenta un comportamiento similar al descrito para la actividad enzimática. Así, una primera fase de adaptación del microorganismo al medio (días 1 al 5), una segunda fase de producción de

proteína acelerada (días 5 al 9), una tercera fase de descenso de la actividad, seguido de una recuperación rápida (días 9 al 12), y una cuarta fase de estabilización (días 12 al 18); para este caso, el pico máximo, correspondiente a $5.7 \text{ U/mg} \pm 1.3 \text{ U/mg}$, se logró en el día 12. Es importante resaltar que la disminución observada en el contenido de proteína respalda lo discutido anteriormente con relación a la presencia de proteasas que pueden degradar la lacasa, a la vez que actúan en la regulación de isoenzimas más activas [83].

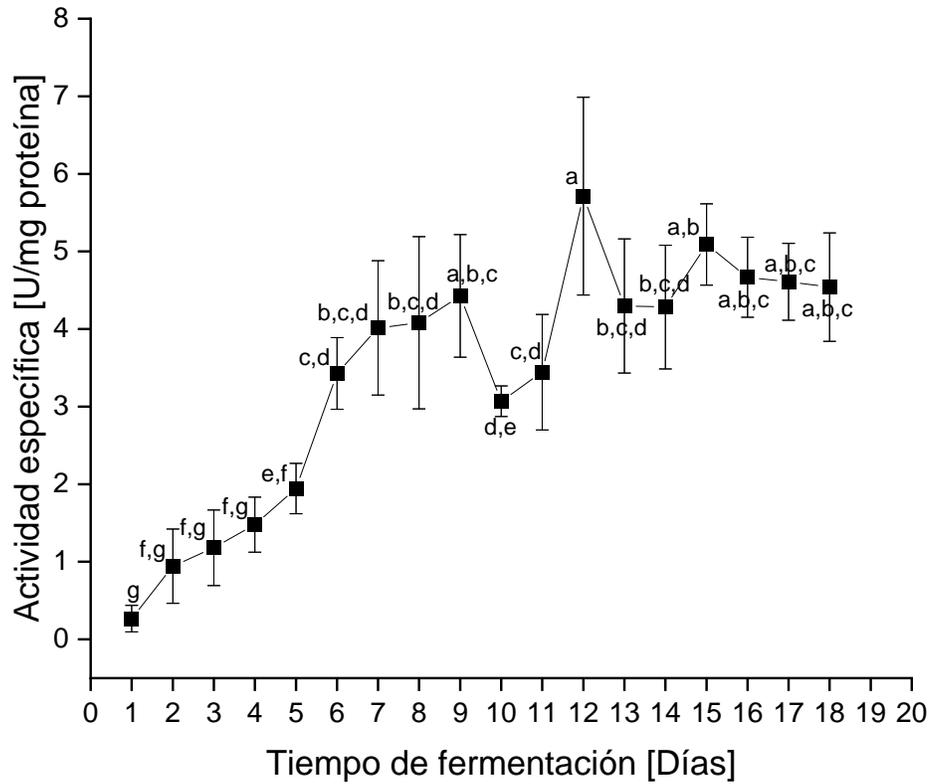
Figura 7-7: Cinética de actividad enzimática.



Los superíndices corresponden a los grupos estadísticos resultantes de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Figura 7-8: Cinética de actividad específica.

Los superíndices corresponden a los grupos estadísticos resultantes de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.



Los superíndices corresponden a los grupos estadísticos resultantes de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Al observar el comportamiento similar de ambas cinéticas, y en particular la segunda etapa de síntesis proteica/actividad enzimática acelerada, se presume que la nueva proteína que está siendo producida por el microorganismo corresponde en su mayoría a lacasa. Ahora bien, como el objetivo del presente estudio fue alcanzar los mayores niveles de actividad enzimática en el menor tiempo posible, para las etapas siguientes de la investigación, la fermentación se monitoreó durante 8 días, dado que, aunque no corresponde al tiempo en donde se alcanza el máximo global, se tiene una buena actividad de la lacasa ($52.2 \text{ U/g}_{\text{ss}} \pm 9.6 \text{ U/g}_{\text{ss}}$ - máximo local).

En definitiva, la construcción de las curvas cinéticas permitió apreciar el aumento en la actividad enzimática ocasionado por la activación del metabolismo secundario del hongo, aspecto no observado previamente debido a que la fermentación se estaba llevando a cabo en un periodo de tiempo fijo (7 días) y, por tanto, se desconocía el comportamiento previo y posterior de la actividad de la enzima. Por otro lado, es destacable que el valor alcanzado al séptimo día ($37.8 \text{ U/g}_{\text{ss}} \pm 8.2 \text{ U/g}_{\text{ss}}$) no presenta diferencia estadística significativa con el valor registrado en el ensayo previo ($39.4 \text{ U/g}_{\text{ss}} \pm 1.1 \text{ U/g}_{\text{ss}}$ - sección 6.10), también obtenido luego de 7 días del proceso, permitiendo concluir así en favor de la consistencia de los resultados a lo largo de la investigación.

Es muy valioso resaltar que, como resultado de este estudio cinético, se alcanzó un incremento en la actividad enzimática de 1.4 veces el valor obtenido luego de la evaluación de las condiciones para la cuantificación de la lacasa. Adicionalmente, al comparar el $52.2 \text{ U/g}_{\text{ss}}$ (correspondiente a la actividad enzimática alcanzada en el día 8 de la cinética – sección 6.11) con el $8.6 \text{ U/g}_{\text{ss}}$ (correspondiente a la actividad enzimática alcanzada en el primer ensayo de selección de la especie fúngica – sección 6.7), se observa un aumento total de aproximadamente un 500%, acentuando así la pertinencia de la presente investigación al realizar el estudio completo del proceso de producción, extracción, cuantificación y cinética enzimática de la lacasa producida bajo condiciones de FES, por medio de la especie fúngica *Pleurotus ostreatus*.

7.6 Purificación enzimática

7.6.1 *Salting out* - Precipitación con sulfato de amonio

Para determinar el rango de concentración del sulfato de amonio en el cual precipita la mayor cantidad de lacasa, se realizó una evaluación preliminar considerando porcentajes de saturación de esta sal entre el 10% y el 80%.

En la Tabla 7-35 se presenta el factor de purificación y el rendimiento de la precipitación tanto para el sobrenadante como para el precipitado re-disuelto.

Tabla 7-35: Resultados evaluación preliminar de la precipitación con sulfato de amonio.

Porcentaje de saturación	FP		%R	
	P	S	P	S
10%	-	0.95	-	100.00
20%	-	0.86	-	89.40
30%	-	0.78	-	86.29
40%	-	0.79	-	87.24
50%	0.46	0.76	14.50	64.18
60%	1.06	0.31	64.04	15.56
70%	1.04	0.28	64.68	10.81
80%	1.20	0.42	75.76	11.98

P: precipitado, S: sobrenadante

Como se observa en la Tabla 7-35, saturaciones entre 10% y 40% no formaron un precipitado; es a partir del 50% que se observa precipitación de la enzima, reflejada en un aumento del FP y el %R. Ahora bien, saturaciones del 60%, 70% y 80% son las que permitieron recuperar e incrementar la actividad específica de la lacasa.

Los resultados de este primer experimento señalan que el porcentaje de saturación de sulfato de amonio bajo el cual precipita la mayor cantidad de la enzima se encuentra en el intervalo de de 60 - 80%. Por esta razón, se llevó a cabo una segunda evaluación por triplicado bajo estas condiciones, cuyos resultados se presentan en la Tabla 7-36.

Tabla 7-36: Resultados evaluación de la precipitación con sulfato de amonio entre 60 y 80% de saturación de la sal.

Porcentaje de saturación	FP Promedio		%R Promedio	
	P	S	P	S
60%	1.33 ± 0.08	0.43 ± 0.02	61.80 ± 2.64 ^b	23.19 ± 1.05
70%	1.44 ± 0.21	0.31 ± 0.11	80.17 ± 5.26 ^a	12.10 ± 4.44
80%	1.37 ± 0.20	0.40 ± 0.17	74.55 ± 8.78 ^{a,b}	15.66 ± 6.91

P: precipitado, S: sobrenadante

La selección del porcentaje de saturación a utilizar en las siguientes etapas de la investigación se realizó por medio de un ANOVA, tanto para el factor de purificación promedio como para el rendimiento promedio, seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Para el primer factor, los datos señalan que no existe diferencia estadística al realizar la precipitación con 60%, 70% u 80% de saturación (datos no mostrados). En contraste, el análisis para el rendimiento indica que una concentración del 70% genera un resultado significativamente mayor (80.17%) que el observado al 60% y, similar al presentado al 80% (los grupos estadísticos se presentan como superíndices del %R promedio). Por otro lado, es importante discutir acerca de la diferencia presentada por ambos parámetros cuando se realizó la primera evaluación al 60%, 70% y 80% de saturación de la sal (Tabla 7-35), y sus equivalentes en la segunda evaluación (Tabla 7-36); así, se presumen variaciones leves en el contenido del extracto como resultado de la fermentación, que puede presentar cambios aun cuando se garantizan las mismas condiciones del proceso. Adicionalmente, es destacable que el primer ensayo, al ser un experimento preliminar para estimar el rango de porcentajes de saturación en el que precipitaba la enzima de manera preferencial, no se realizó por triplicado; por el contrario, el segundo ensayo tuvo sus respectivas réplicas y, por tanto, los resultados de este fueron los empleados para extraer las principales conclusiones del estudio.

Finalmente, se estableció el siguiente protocolo para obtener el extracto precipitado: tomar 10 mL del extracto crudo y adicionar 4.50 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para alcanzar un porcentaje de saturación de la sal del 70%, una vez la sal se haya disuelto completamente, dejar en reposo durante 2 horas a 4°C y posteriormente centrifugar a 3000 rcf durante 10 minutos a 4°C. Tomar el precipitado y re-suspenderlo en 5 mL de buffer acetato de sodio pH = 6.00, de concentración 50 mM.

Con relación a los resultados alcanzados, un rendimiento cercano al 80% indica que aproximadamente el 20% de la actividad enzimática, inicialmente cuantificada en el extracto crudo, se perdió como resultado de la precipitación. Por su parte, un factor de purificación de 1.4 está relacionado con la eliminación de cierta cantidad de proteína diferente a la lacasa, que es justamente lo deseado en esta etapa de la investigación.

Al comparar los resultados con otros estudios [94], [116], se observa que los valores obtenidos en la presente investigación son satisfactorios. Al respecto, Aslam *et al.* (2021)

reportaron un FP de 1.01 luego de someter el extracto obtenido de la especie *Pleurotus nebrodensis*, a una saturación de sulfato de amonio del 80%; es valioso mencionar que el extracto se produjo mediante un proceso de FES utilizando paja de trigo [116]. Por otro lado, Das *et al.* (2016) señalan un FP cercano a 1.7 después de utilizar dicha sal al 80% en un extracto generado por la especie *Pleurotus ostreatus*; en este caso, el sustrato de la FES fue una mezcla de paja de arroz y cáscara de maíz en iguales proporciones [94]. En lo que respecta este trabajo, el valor promedio alcanzado para el FP fue de 1.44, el cual está sin duda influenciado tanto por el sustrato utilizado para la FES, es decir, por el residuo agrícola tusa de maíz, como por las condiciones a las cuales se desarrolló el proceso fermentativo, entre las que se encuentra la especie fúngica seleccionada, *Pleurotus ostreatus*. Es destacable que estos resultados se lograron al 70% de saturación del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, lo cual está asociado a un menor consumo de dicha sal, en comparación con los estudios de Aslam *et al.* (2021) y Das *et al.* (2016).

En cuanto al %R, Das *et al.* (2016) y Aslam *et al.* (2021) reportan, a las condiciones arriba descritas, un rendimiento del 49.4% y 0.33% respectivamente. En contraste con estos resultados, en la presente investigación se alcanzó un %R del 80%, lo que indica una pérdida mucho menor de la actividad de la lacasa como resultado de someter el extracto a una concentración alta de sulfato de amonio. En ese sentido, es necesario señalar que lo deseable en una purificación enzimática es extraer la mayor cantidad de enzima de interés, evitando en lo posible que la actividad de esta se vea afectada y, por tanto, que el rendimiento del proceso disminuya.

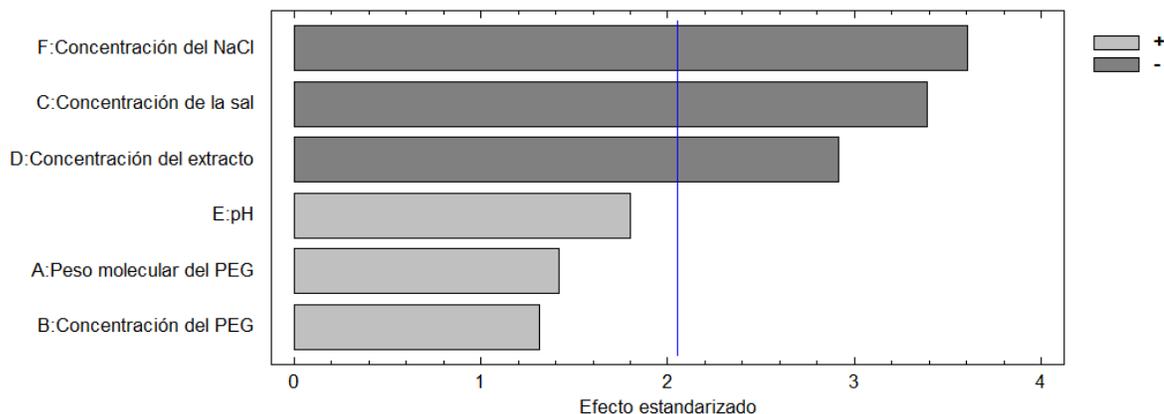
Por último, es importante precisar que para el proceso de precipitación con sal se seleccionó sulfato de amonio debido a que este es un compuesto de bajo costo, muy soluble en agua, presenta alta fuerza iónica y las especies resultantes de su disociación, NH_4^+ y SO_4^{2-} , han demostrado estabilizar la estructura de la proteína a separar [57], [117].

7.6.2 Separación por sistemas bifásicos acuosos – ATPS

Luego de obtener el extracto precipitado, este fue sometido a una siguiente etapa de purificación usando la técnica de separación por sistemas bifásicos acuosos (ATPS). En primer lugar, se realizó un diseño Plackett Burman de acuerdo con lo detallado en la

sección 6.12.3. En la Figura 7-9 se presenta el diagrama de Pareto con los efectos estandarizados de cada uno de los 6 parámetros contemplados en el experimento.

Figura 7-9: Diagrama de Pareto para el factor de purificación en la fase inferior.



Se registran tres efectos estadísticamente significativos correspondientes a la concentración del NaCl, la concentración del Na_2SO_4 y la concentración del extracto precipitado. Adicionalmente, se observa que los tres efectos son negativos, es decir que tienen una relación inversamente proporcional a la variable de respuesta.

Es valioso mencionar que la selección de los factores con sus respectivos valores se realizó basada en una extensa búsqueda bibliográfica. Asimismo, es destacable que, durante esta segunda metodología de purificación, se pretendía favorecer la migración de la enzima hacia la fase inferior (fase rica en Na_2SO_4), y así evitar la implementación de técnicas como la cromatografía, que son requeridas en aquellos casos donde la enzima se desplaza hacia la fase polimérica; hecho que aumenta los tiempos y costos del proceso y a la par disminuye el rendimiento de la enzima. A continuación se detallan los principales aspectos observados con relación a cada factor estudiado en el diseño de experimentos:

En primer lugar, la concentración de NaCl presenta un marcado efecto negativo sobre la variable de respuesta, lo cual concuerda con varios autores que aseveran que la adición de esta sal puede no favorecer la purificación enzimática [118], [119]. Al respecto, Ratanapongleka (2012) reporta que el NaCl a una concentración de 4 - 5% p/p, favorece la migración de la lacasa hacia la fase inferior; sin embargo, afirma que la migración puede ocurrir no solo para la proteína deseada, sino también para otras proteínas contaminantes,

generando así factores de purificación bajos [118]; este evento explica posiblemente los resultados alcanzados en el experimento. Por su parte, Mayolo-Deloisa (2017) afirma que añadir NaCl al sistema genera un aumento en la hidrofobicidad de la fase polimérica, debido a que se requieren más moléculas de agua para la solvatación de los iones Na^+ y Cl^- [63]. Así, se concluye que la lacasa obtenida en la presente investigación puede ser de naturaleza hidrofílica, por lo que un aumento en la hidrofobicidad de la fase polimérica no favorece significativamente la separación hacia la fase inferior.

En segundo lugar, se evaluó el efecto de la concentración del Na_2SO_4 en el sistema de purificación. Inicialmente, es valioso mencionar que las investigaciones de Agrawal & Verma (2020) y Silvério *et al.* (2013) reportan que sistemas ATPS con Na_2SO_4 facilitan la separación de lacasa hacia la fase inferior [120], [121], además destacan que es una sal muy cosmotrópica, lo que es favorable dado que estabiliza la enzima. Partiendo de lo anterior, se seleccionó y evaluó el Na_2SO_4 como la sal del sistema ATPS.

Los resultados indican que el aumento en la concentración del Na_2SO_4 disminuye de manera significativa el factor de purificación en la fase inferior. Tal evento puede ser explicado por el hecho de que un incremento de este compuesto, implica que se requieren más moléculas de agua para diluirlo, por tanto, se afectará el número de enlaces solvente-enzima que podría finalmente conducir a un proceso de *salting out*.

Cabe discutir que los hallazgos observados para el factor en cuestión, difieren con lo reportado por Ratanapongleka (2012), el cual señala que entre más alta es la concentración de la sal en el sistema, mayor es la migración de la lacasa hacia la fase inferior [118]. En tal sentido, dicho autor explica que la adición de altas cantidades de sal a una solución acuosa de PEG, induce un re-arreglo de las moléculas de agua alrededor de las moléculas del polímero, resultando en una estructura más compacta y reduciendo por tanto el volumen de la fase superior [122]; esta reducción del volumen está directamente asociada a una mayor proporción de la fase inferior hacia la cual migraría la enzima de manera preferencial [119], [123]. Podría suponerse entonces que el incremento en la concentración de Na_2SO_4 favoreció el fenómeno de *salting out* en mayor proporción, resultando finalmente en un efecto negativo de este factor sobre la variable de respuesta.

En cuanto al tercer factor, el peso molecular del PEG, se evaluó el PEG 3000 y el PEG 6000 de acuerdo con la disponibilidad de reactivos; la Figura 7-9 señala un efecto positivo de este parámetro, favoreciendo el uso del PEG 6000. Al respecto, la bibliografía señala que el peso molecular del polímero en el sistema influye en la separación de proteínas debido a que determina el número de interacciones hidrofóbicas entre dicho polímero y la enzima [124]; en particular, se tiene que un mayor peso molecular disminuye las interacciones, posiblemente por efectos de impedimento estérico, lo cual conduce a una disminución en la partición hacia la fase polimérica [118].

Por otra parte, los resultados del diagrama de Pareto con relación a la concentración del PEG señalan que, si bien el efecto de este factor no fue significativo, es positivo, indicando así que la alta concentración de polímero favoreció la migración de la lacasa hacia la fase inferior. En lo que concierne a este aspecto, algunos autores señalan que a cierta concentración del PEG, se mejora la interacción hidrofóbica entre este y la superficie de la proteína [118], [125]; sin embargo, cerca de una concentración límite, el exceso del polímero incrementa sustancialmente la viscosidad y la tensión interfacial del sistema, causando que la partición hacia la fase superior se dificulte y, por tanto, que la enzima migre hacia la fase rica en sal [118].

Para el quinto factor, es decir el pH, se observó que la separación hacia la fase inferior se vio favorecida a un pH cercano a la neutralidad, lo cual coincide con lo señalado por Goja *et al.* (2013), quienes afirman que un pH de 7.0 es adecuado en la separación de la mayoría de biomoléculas [126].

Ahora bien, con el fin de entender mejor el efecto del pH en la separación de proteínas mediante un sistema ATPS, varios estudios afirman que la partición preferencial hacia una determinada fase depende de la carga superficial de la enzima [118], [127], [128]; así, cuando la molécula posee una carga negativa, se inducirá un desplazamiento hacia la fase polimérica debido a que, si bien esta última no presenta ionización, tiene un momento dipolar que puede generar una interacción electrostática con la enzima [129]. En la presente investigación, el comportamiento observado sugiere que la lacasa presenta una carga positiva que la hace migrar de manera preferente hacia la fase salina.

Finalmente, el sexto factor evaluado, es decir, la concentración del extracto, presentó un efecto negativo significativo sobre la variable de respuesta. Estos hallazgos sirvieron como base para trabajar el siguiente diseño de experimentos con bajas concentraciones de dicho extracto.

En este punto de la discusión es importante destacar que, aunque se describió uno a uno el posible efecto de cada factor, la migración de la lacasa y de cualquier metabolito en general hacia una fase específica del sistema ATPS, dependerá del conjunto de interacciones entre todos los parámetros, por lo que es difícil predecir el comportamiento que se observará en un proceso bajo determinadas condiciones.

De acuerdo a lo señalado en la metodología, apartado 6.12.3, una vez concluido el diseño Plackett Burman, se procedió a realizar la próxima etapa de la purificación con ATPS, que consistió en la implementación de un diseño de superficie de respuesta central compuesto con 5 niveles por factor. Dado que el efecto negativo de la concentración de NaCl fue tan marcado, se decidió eliminar esta sal del sistema; por tal motivo, los factores contemplados en la optimización correspondieron a los tres parámetros con mayor efecto (de acuerdo con el diagrama de Pareto, Figura 7-9). Por su parte, el peso molecular del PEG y la concentración del mismo, se establecieron en valores constantes, PEG 6000 – 22.5% p/p, seleccionados con base a los resultados y discusión anteriores.

En la Tabla 7-37 se resumen las condiciones que, de acuerdo con el modelo, maximizan la variable de respuesta (factor de purificación en la fase inferior).

Tabla 7-37: Condiciones del sistema ATPS que maximizan el factor de purificación en la fase inferior. Resultados primera optimización.

Factores	Niveles	Axial	Bajo	Central	Alto	Axial	Óptimo
		Bajo				Alto	
Concentración del Na ₂ SO ₄ [%p/p]		7.32	8.00	9.00	10.00	10.68	7.32
Concentración del extracto [%p/p]		3.30	5.00	7.50	10.00	11.70	11.70
pH		4.32	5.00	6.00	7.00	7.68	7.39

Basados en la Tabla 7-37, el valor de pH que optimiza la purificación es 7.39, el cual se encuentra dentro del rango evaluado para este parámetro. En contraste, los resultados óptimos obtenidos para los dos factores restantes se ubican en el límite del rango considerado, lo que indica que en realidad la variable de respuesta no está siendo maximizada. Por esta razón, se realizó un segundo diseño de superficie de respuesta central compuesto en donde se modificó el rango de la concentración del Na_2SO_4 y del extracto precipitado. En la Tabla 7-38 se presentan los resultados obtenidos.

Es importante señalar que, para el primer diseño central compuesto, la concentración del extracto demostró tener un efecto positivo sobre la variable de respuesta; este comportamiento contrasta con el presentado por el diseño Plackett Burman, en donde se observó que el aumento en la cantidad de extracto precipitado generaba una disminución en el factor de purificación. Al respecto, es valioso señalar que en ambos experimentos los valores de actividad enzimática fueron bastante bajos, señalando probablemente que se está en el límite de cuantificación del método. Esta hipótesis, sumada a los resultados presentados en la Tabla 7-37, fueron los motivos por los cuales, para la siguiente optimización, se incrementó tan significativamente la concentración del extracto.

Tabla 7-38: Condiciones del sistema ATPS que maximizan el factor de purificación en la fase inferior. Resultados segunda optimización.

Factores	Niveles					
	Axial Bajo	Bajo	Central	Alto	Axial Alto	Óptimo
Concentración del Na_2SO_4 [%p/p]	5.38	6.00	7.50	9.00	9.62	8.83
Concentración del extracto [%p/p]	32.93	35.00	40.00	45.00	47.07	47.07

En la Tabla 7-38 se observa que la concentración óptima del Na_2SO_4 es de 8.83% p/p. Este valor se encuentra dentro del rango contemplado, por lo que se puede concluir que es un máximo en la región evaluada. En cuanto a la concentración óptima del extracto precipitado, si bien esta corresponde al nivel axial alto, se espera que siempre que se aumente el contenido de proteína, incremente el factor de purificación. El limitante estuvo entonces en la cantidad máxima de extracto que admitió el sistema (masa final 20 g), luego de adicionar los demás componentes.

Una vez conocidas las condiciones que maximizan la variable de respuesta, se procedió a realizar el montaje del respectivo sistema ATPS, con el fin de comparar el valor teórico con el valor real. En la Tabla 7-39 se resumen los resultados obtenidos. Es importante mencionar que, dado que la optimización se realizó en dos diseños consecutivos, no fue posible obtener un único modelo ajustado que relacione el factor de purificación en la fase inferior con los parámetros considerados en los experimentos (concentración de Na₂SO₄, concentración del extracto precipitado y pH).

Tabla 7-39: Factor de purificación promedio obtenido bajo el sistema ATPS optimizado.

Factores	Óptimo	FP Teórico Fase inferior	FP Experimental Fase inferior	FP Experimental Fase superior
Peso molecular del PEG	6000	1.73	1.51 ± 0.23	0.93 ± 0.10
Concentración del PEG [%p/p]	22.50			
Concentración del Na ₂ SO ₄ [%p/p]	8.83			
Concentración del extracto precipitado [%p/p]	47.07			
pH	7.39			
Concentración de NaCl [%p/p]	-			

De los resultados anteriores es importante señalar que el FP experimental en la fase inferior supera en un 60% el FP alcanzado en la fase superior, indicando que los diseños de experimentos implementados, en efecto, favorecieron la migración de la lacasa hacia la fase salina.

Ahora bien, es valioso comparar los hallazgos encontrados en este trabajo con los publicados por otros autores. Por ejemplo, Agrawal & Verma (2020) y Silvério *et al.* (2013) reportaron que sistemas ATPS con PEG y Na₂SO₄ favorecen la separación de lacasa hacia la fase inferior [120], [121]. En la Tabla 7-40 se comparan las condiciones empleadas en la presente investigación para generar el mayor FP en la fase inferior, con las

implementadas en cada uno de los respectivos estudios de acuerdo con el diseño de experimentos seleccionado.

Tabla 7-40: Separación de lacasa hacia la fase salina de un sistema ATPS – Resumen de estudios.

	Presente estudio	Agrawal & Verma (2020) [120]	Silvério et al. (2013) [121]
Fuente de origen de la lacasa	<i>Pleurotus ostreatus</i> , FES optimizada de tusa de maíz.	<i>Myrothecium verrucaria</i> ITCC-8447, fermentación optimizada en sumergido – medio definido.	<i>Trametes versicolor</i> , lacasa comercial purificada.
Peso molecular PEG	6000	8000	8000
Concentración del PEG [%p/p]	22.50	10	11.29
Concentración del Na₂SO₄ [%p/p]	8.83	30	6.94
Concentración del extracto [%p/p]	47.07	25	0 a 200 mg de una solución stock de la enzima (5 mg/mL). No reporta peso final del sistema.
pH	7.39	No reporta	No reporta
Concentración de NaCl [%p/p]	-	-	-
Temperatura	25 °C	28 °C	23 °C
FP fase inferior	1.51	2.5	No reporta ^a
FP fase superior	0.93	2.1	No reporta ^a

^a En lugar de los FP, los autores reportan el coeficiente de partición (K), correspondiente a 0.876, el cual cuantifica la distribución de la enzima entre las dos fases. Si K es > 1, la recuperación se favorece hacia la fase superior; si K < 1, la recuperación se favorece hacia la fase inferior.

Como se aprecia en los tres estudios, tanto las condiciones como los microorganismos a partir de los cuales se obtuvo la lacasa son muy diferentes, por lo que es probable que nos encontremos ante distintas isoenzimas de la lacasa. En este sentido, se espera que el comportamiento de la separación no sea exactamente igual. A pesar de lo anterior, es posible concluir algunos aspectos generales, tales como:

1. La migración selectiva de la enzima hacia la fase inferior se favorece cuando el peso molecular del PEG aumenta. Este comportamiento se observa en los tres estudios comparados.
2. La concentración del extracto en el sistema ATPS es un parámetro difícil de comparar dado que la actividad específica de la lacasa varía en función del microorganismo que la produce y de las condiciones fermentativas. No obstante, es destacable que en dos de los tres estudios se utilizan concentraciones altas del extracto.
3. Los autores no reportan el pH al cual se realizó el sistema ATPS; sin embargo, ambos estudios señalan que la lacasa evaluada es más estable a un pH básico o ligeramente básico (9 y 7.5, respectivamente). Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en la presente investigación, en donde se observa que un pH de 7.39 conduce a un aumento del FP en la fase inferior. Adicionalmente, es valioso señalar que, de acuerdo con lo discutido en la sección 7.3, la estabilidad de la lacasa producida en esta investigación, es mayor a medida que el pH del buffer de extracción aumenta, hallazgo que respalda lo observado por los anteriores autores.

En ninguno de los tres estudios se observó que la adición de una sal neutra como el NaCl favoreciera la separación de la enzima hacia la fase salina. Este hecho, sumado a la preferencia de la enzima por un pH ligeramente superior al neutro, sugiere que, al igual que lo reportado por Agrawal & Verma (2020), la isoenzima producida en esta investigación es una lacasa con mayor contenido de aminoácidos hidrofílicos.

En cuanto al contenido del PEG y de la sal Na₂SO₄, los resultados difieren bastante entre las tres investigaciones. En este sentido, es difícil concluir en favor de un rango de concentraciones adecuado para la separación de la lacasa hacia la fase inferior. Por lo

tanto, se sugiere que previo a la implementación de un sistema ATPS, se realice una evaluación rigurosa que contemple la interacción de los diferentes parámetros que afectan la eficiencia del método.

Ahora bien, al comparar el FP alcanzado luego de la precipitación con sulfato de amonio (1.44 ± 0.21), y el FP en la fase inferior del sistema ATPS (1.51 ± 0.23), se observa que la segunda etapa de purificación no permitió incrementar significativamente la purificación de la lacasa (valor P ANOVA > 0.05). Con base en estos resultados y por efectos de optimización de recursos y tiempo, para la siguiente etapa del estudio (la inmovilización enzimática), se decidió emplear el extracto precipitado sin someterlo a purificación mediante el sistema ATPS.

Bajo el contexto discutido, los resultados de esta sección podrían sugerir que la metodología evaluada no es aún lo suficientemente eficiente para emplearse y proyectarse a una escala industrial; sin embargo, estudios como los de Bertrand *et al.* (2016) reportan FP bastante altos (≥ 3.0) en la separación de la lacasa, sobre todo hacia la fase superior [118], [130]. Adicionalmente, es común encontrar la implementación de un sistema ATPS en varias etapas [131], o como paso previo a otras técnicas como la cromatografía de intercambio iónico o de exclusión que, aunque muy costosas, suelen proveer mejor nivel de purificación. En cuanto al uso a una mayor escala de operación, Vázquez-Villegas & Aguilar (2017) resaltan el altísimo potencial de esta metodología en la obtención de biomoléculas y presentan algunos casos de éxito a escala piloto [132]; los autores discuten en favor de la pertinencia del método debido a factores como su alta robustez (permite obtener resultados reproducibles en cada corrida) y bajo costo (solo requiere el uso de una sal y un polímero que, de hecho, puede ser de bajo costo como almidones o maltodextrinas) [63], [132].

Por último, cabe destacar que la técnica ATPS es actualmente el objeto de estudio en campos innovadores de la biotecnología en donde se usa, por ejemplo, para la recuperación de partículas virales que pueden servir como vehículos de administración de fármacos e inmunógenos para procedimientos de vacunación [131].

La sugerencia para futuras investigaciones en este tema sería extender el análisis hacia la evaluación de diferentes polímeros (PEG, UCON, dextrano), sales (K_2HPO_4 , $(NH_4)_2PO_4$,

($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, entre otras), composiciones del sistema (polímero/sal, polímero/polímero), aditivos (NaCl, iones metálicos) y/o diferentes condiciones de temperatura y pH; todo lo anterior con el objetivo de definir un sistema más apropiado para la purificación de lacasa obtenida de un extracto de FES.

7.7 Inmovilización enzimática sobre micropartículas de quitosano

Para esta etapa de la investigación se llevó a cabo una evaluación preliminar de la metodología mediante un protocolo estándar. El objetivo del ensayo consistió en inmovilizar la lacasa en micropartículas de quitosano funcionalizadas con glutaraldehído, para finalmente lograr una aproximación al estudio de la decoloración de un tinte sintético.

El quitosano es un biopolímero generado de la desacetilación de la quitina, la cual se encuentra de manera natural en el exoesqueleto de artrópodos y en la pared celular de algunos hongos y otros organismos [133]. Dadas las características estructurales del quitosano, este compuesto ha sido utilizado en la formación de soportes para inmovilización enzimática en diferentes procesos biotecnológicos, de los que destacan la liberación dirigida de fármacos, la biotecnología industrial y la agricultura sostenible [134].

Para el desarrollo del presente estudio, se implementó el quitosano como soporte para la inmovilización de la lacasa debido a que este es un polímero no tóxico, inerte y de bajo costo, que cuenta con una alta disponibilidad de grupos funcionales reactivos, los cuales pueden, ya sea reaccionar con la enzima que se busca inmovilizar, o reaccionar con alguna molécula adicional que posteriormente se enlazará con dicha enzima [135]. Respecto a este último aspecto, el glutaraldehído ha sido ampliamente utilizado como modificador del quitosano debido a tres factores: la presencia de dos grupos aldehído que pueden reaccionar con grupos amino de la enzima dando lugar a un mayor número de sitios de enlace [136], su utilización permite la formación de enlaces soporte – enzima más firmes [136] y, por último, su acción positiva en el fortalecimiento de las perlas de quitosano a través de la reticulación al interior de la matriz de inmovilización [137].

En la Tabla 7-41 se presentan los resultados obtenidos en el experimento. En el caso del extracto crudo y el extracto precipitado, la actividad total y la proteína total se determinaron de acuerdo con lo descrito en la sección 6.6. En cuanto a las micropartículas, la actividad se calculó reemplazando los 100 μL de extracto de la mezcla de reacción, por aproximadamente 0.05 g de perlas, y la proteína se cuantificó por diferencia entre el extracto precipitado y el extracto luego de las 24 h de inmovilización enzimática.

Tabla 7-41: Resultados inmovilización enzimática sobre micropartículas de quitosano.

Tratamiento	Actividad Total Promedio [U]	Proteína Total Promedio [mg]	Actividad Específica Promedio [U/mg]
Extracto crudo	4.70 \pm 0.26	3.45 \pm 0.13	1.36 \pm 0.07
Extracto precipitado – Fracción enzimática precipitada	3.38 \pm 0.18	2.21 \pm 0.06	1.53 \pm 0.08
Micropartículas	2.15 \pm 1.05	2.05 \pm 0.12	1.05 \pm 0.51

En primer lugar, los resultados presentados en la Tabla 7-41 señalan un aumento en la actividad específica del extracto precipitado con relación al extracto crudo. En ese sentido, es valioso señalar que el FP alcanzado (equivalente a 1.12) se encuentra dentro del rango de valores observado a lo largo de todos los experimentos de *salting out* y separación con ATPS; se destaca este aspecto debido a que, como es esperable, los sistemas biológicos presentan alta variabilidad y por tanto, alcanzar consistencia durante los ensayos resulta difícil en ocasiones.

Por otro lado, se observa una disminución en la actividad específica de las micropartículas, que viene determinada por una mayor caída en la actividad total. Al respecto, es necesario mencionar dos elementos importantes:

- El método de inmovilización empleado corresponde a una unión covalente de diferentes grupos funcionales de la lacasa (como el grupo amino, carboxilo y/o sulfhidrilo), con los respectivos grupos afines presentes en la superficie del soporte; con este precedente, es probable que dichos enlaces involucren el sitio activo de

la enzima, provocando una disminución significativa en la actividad enzimática [135].

- Las condiciones empleadas en la inmovilización no fueron optimizadas, lo cual también puede explicar la disminución en la actividad de la enzima.

En contraste con los resultados obtenidos en la presente investigación, se reporta que la inmovilización ofrece ventajas importantes en cuanto a la estabilización de la proteína en un rango más amplio de pH y temperatura, debido a que limita la movilidad de la enzima y, por tanto, la pérdida de su respectiva estructura secundaria y terciaria [135]. Bajo este contexto, se plantean dos sugerencias para futuras investigaciones: 1) realizar un diseño de experimentos que contemple los diferentes factores que influyen en el proceso, así como sus interacciones, a fin de encontrar las condiciones que provean los resultados esperados en cuanto a un incremento en la actividad enzimática y, 2) evaluar la estabilidad tanto de la lacasa libre como de la inmovilizada a diferentes valores de pH y temperatura; de donde se esperaría observar un aumento en la actividad luego de la inmovilización (especialmente al comparar las condiciones óptimas en cada uno de los dos escenarios).

Con base en el protocolo descrito, se identificaron las variables que presumiblemente afectan el rendimiento de la inmovilización, a continuación se discute el efecto de cada una de ellas y las consideraciones a tener en cuenta para futuros diseños de experimentos:

En primer lugar se debe considerar la el efecto de la concentración de quitosano, el cual, de acuerdo con Asgher *et al.* (2017), determina la dureza, rigidez y firmeza de las micropartículas [137]. En particular, se reporta que bajos contenidos de este compuesto pueden relacionarse con disminuciones en la actividad enzimática debido a que las perlas no se forman de la manera adecuada (pueden presentar poros de gran tamaño que disminuyen el área de contacto con la enzima); en contraposición, un alto contenido de quitosano está asociado a incrementos en la viscosidad que impiden la eficiencia de la encapsulación y, además, dificultan significativamente el goteo de la solución [138], [139]. Por tanto, en futuros experimentos se sugiere incrementar el contenido de quitosano para lograr una adecuada e íntegra estructura de las micropartículas.

En segundo lugar, la concentración de glutaraldehído ha sido un factor estudiado debido a su importancia en la funcionalización de la superficie de la micropartícula, la cual influye en la manera en que la enzima se une a esta. Así, se espera que bajas concentraciones de glutaraldehído generen perlas débiles, con baja estabilidad operativa y pobre adhesión de la enzima [140]. Por otro lado, altas concentraciones de este compuesto provocan bajas eficiencias en el proceso, debido probablemente a que la enzima se une en demasiados puntos, lo que la puede conllevar a un desempeño deficiente en la transformación del sustrato [139]. Se sugiere entonces aumentar la concentración de este compuesto para el próximo ensayo, cuidando que la inmovilización enzimática no impida la eficiencia de la lacasa en la oxidación del ABTS.

En tercer y cuarto lugar, el tiempo de incubación de las perlas con el glutaraldehído y el tiempo de incubación de las perlas ya funcionalizadas con la solución de enzima, son parámetros a tener en cuenta en el proceso de inmovilización. En cuanto al primero, se presume que este determina la cantidad de grupos funcionalizados de la superficie del soporte, lo que a su vez va a tener una implicación en la formación de los enlaces enzima – glutaraldehído; en tal sentido, mayores tiempos de contacto generarán una matriz estructuralmente más grande que posiblemente restringirá el acceso de la enzima a los sitios de unión [141]. Ahora bien, en cuanto al segundo, Halder *et al.* (2014) reporta que períodos muy breves de inmovilización implican que las moléculas de enzima no tengan el tiempo suficiente para penetrar la partícula, mientras que períodos muy largos conducen a que la enzima se enlace al soporte en muchos puntos, lo cual generará posiblemente un contacto pobre con el sustrato o una inactivación de la biomolécula por efectos en su sitio activo [142]. Así, se sugiere evaluar diferentes niveles de estos dos factores en miras a obtener una inmovilización enzimática de alta eficiencia.

Entendiendo el contexto anterior, es valioso señalar que en el caso particular de la inmovilización de lacasa, los rangos típicamente evaluados son, para la concentración de quitosano, 2.0 – 5.0 %p/v; para la concentración de glutaraldehído, 0 – 5% v/v; para el tiempo de incubación de las perlas con el glutaraldehído, 3 – 6 h; para el tiempo de incubación de las perlas con la solución de enzima, 6 – 24 h. No obstante, se resalta que estos valores funcionan únicamente como referencia, por lo que es necesario evaluarlos en cada sistema particular.

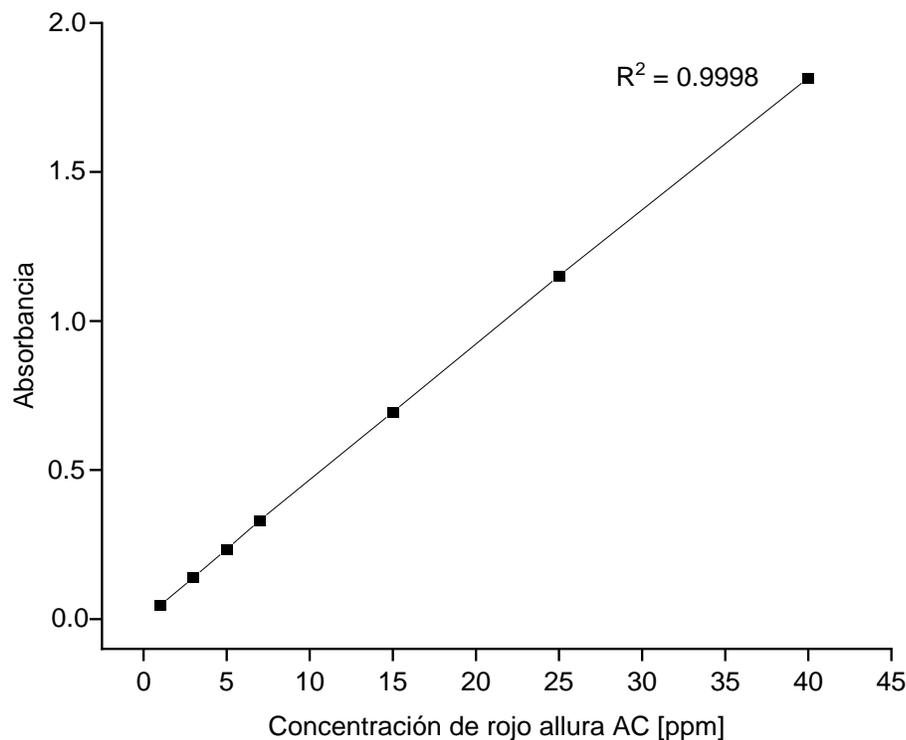
Como sugerencia final se plantea realizar un estudio de los ciclos de reutilización de las micropartículas obtenidas, a fin de caracterizar el proceso y obtener conocimientos útiles al momento de llevarlo a una mayor escala de operación; en este punto se destaca que dicho estudio puede realizarse utilizando como sustrato el ABTS, o directamente sobre una molécula de interés en aplicaciones industriales como lo son los colorantes sintéticos.

7.8 Evaluación de la decoloración del colorante sintético rojo allura AC

Como primer paso en el desarrollo de esta última etapa del estudio, se realizó la curva de calibración del rojo allura AC, la cual permitió correlacionar la concentración del colorante disuelto con su respectivo valor de absorbancia cuantificado mediante un espectrofotómetro. Para esto, se prepararon soluciones del soluto de interés a concentraciones conocidas en un rango entre 1 y 40 ppm, posteriormente se midió su absorbancia a la longitud de onda máxima del colorante (500 nm). Por último, se correlacionaron los datos mediante una regresión simple (Figura 7-10), definida mediante la siguiente ecuación de tipo lineal:

$$\text{Absorbancia} = 0.00777 + (0.0454 * \text{Concentración de rojo allura AC [ppm]}) \quad (7.7)$$

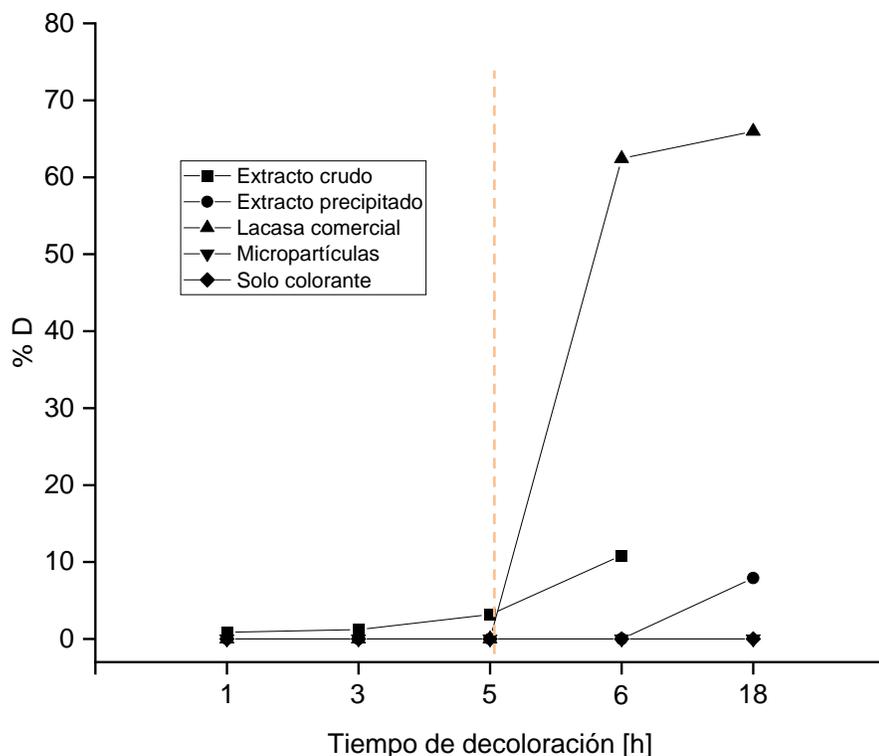
Figura 7-10: Curva de calibración del colorante sintético rojo allura AC.



Una vez construida la curva de calibración, se procedió al montaje de los tratamientos de acuerdo con lo descrito en la sección 6.14. Como primer aspecto de la evaluación, es importante mencionar que la concentración final del colorante se estableció en 35 ppm con el propósito de evitar tener diluciones en las mediciones a lo largo del ensayo, lo cual incorpora factores de error en el valor final de la concentración.

En la Figura 7-11 se presentan los resultados obtenidos para cada tratamiento, en donde se observa el porcentaje de decoloración en función del tiempo de monitoreo. En vista de que en las primeras cinco horas no se evidenció un aumento significativo en el %D por parte de ninguno de los sistemas, se adicionó ABTS a una concentración de 0.1 mM, para evaluar su efecto como inductor enzimático. La línea punteada vertical señala el momento en el que este reactivo fue adicionado.

Figura 7-11: Resultados evaluación de la decoloración del tinte sintético rojo allura AC.



Los resultados para el extracto crudo señalan una decoloración del 3.2% a las 5 h de proceso; una vez se adicionó el ABTS, el %D alcanzó un valor de 10.9%, lo que representa un aumento de 7.7 unidades porcentuales en tan solo una hora. A las 18 horas, se observó una turbidez en la muestra, debida a contaminación microbiana, que impidió realizar la lectura en este tiempo.

En contraste con el extracto crudo, la fracción enzimática precipitada no presentó un aumento inmediato al adicionar el ABTS, sin embargo, a las 18 h se observa una decoloración del 7.9% indicando que la enzima se encuentra activa. Cabe mencionar que, si bien la velocidad de decoloración de este sistema es significativamente menor que con el extracto crudo, el primero a diferencia del segundo no presentó contaminación ni mal olor, por lo que podría ser evaluado durante un período de tiempo más prolongado y de esta manera, alcanzar valores superiores de decoloración. Ahora bien, una posible explicación al comportamiento observado entre estos dos sistemas podría fundamentarse

en que el extracto crudo no solo contiene la enzima de interés, sino también una amplia variedad de compuestos resultantes del proceso fermentativo, que pueden tener un efecto positivo y favorecer la oxidación del grupo cromóforo del colorante. Este tipo de compuestos inductores puede verse reducido en cantidad o concentración como resultado de la etapa de *salting out*, ocasionando así una disminución en la velocidad de decoloración.

En cuanto a la lacasa comercial, se evidencia una tendencia similar a la observada en la evaluación con el extracto crudo: nula decoloración durante las primeras 5 h del proceso, seguida de un incremento marcado del %D en la siguiente hora (62.4%) debido a la adición del ABTS; luego de esto se presenta una reducción en la velocidad de decoloración, representada en un aumento de tan solo el 3.5% en las 12 horas posteriores. Se destaca que el sistema no exhibe contaminación microbiana.

Por su parte, la enzima inmovilizada mostró no tener la capacidad de oxidar el colorante bajo las condiciones implementadas en el estudio.

Es valioso señalar que en todos los tratamientos, exceptuando la solución que solo contenía colorante, luego de las 18 h se observó un color púrpura oscuro, debido probablemente a la mezcla del rojo del rojo allura AC con el azul-verdoso generado de la oxidación del ABTS por parte de la lacasa presente en el medio. Lo anterior sugiere que, en todos los casos, incluido el tratamiento con extracto crudo donde se observó contaminación microbiana, la enzima se encontraba activa (ver Anexo G).

De acuerdo con los resultados previos, la adición del ABTS demostró ser un factor determinante en la eficiencia de la lacasa para llevar a cabo la decoloración del rojo allura AC. Al respecto, se reporta que este actúa como un mediador redox que favorece la acción enzimática [143]. Si bien el mecanismo exacto de acción no está del todo dilucidado, se sabe que los mediadores redox son moléculas de bajo peso molecular, fácilmente oxidables por la lacasa, que generan intermediarios estables encargados de la oxidación del sustrato final, en este caso el rojo allura AC [2]. Para ser considerados como mediadores redox, estos compuestos deben tener potenciales redox lo suficientemente altos para llevar a cabo múltiples reacciones sin ser degradados [144]; y además, ser capaces de oxidar diferentes estructuras fenólicas y no fenólicas a concentraciones

relativamente bajas en la mezcla de reacción [2]. De acuerdo con Morozova *et al.* (2007), el ABTS es el compuesto orgánico que mejor encaja en la definición de “mediador rédox” de la lacasa [2].

Ahora bien, frente al interrogante del efecto más pronunciado del ABTS en el tratamiento con lacasa comercial respecto a los tratamientos con el extracto crudo y la fracción enzimática precipitada, puede en principio sugerirse que en los dos últimos sistemas, al ser justamente extractos cuya composición es variada y desconocida, podrían presentarse interacciones antagónicas entre el ABTS y algunos de los componentes restantes de la mezcla, conduciendo así a la disminución de la velocidad de decoloración. Adicionalmente, es posible también que la lacasa presente en los extractos sea más susceptible a desnaturalización y/o inactivación por causa de dichos compuestos. Queda entonces en evidencia la necesidad de obtener fracciones enzimáticas con un mayor grado de purificación.

Por otro lado, es claro que el efecto del ABTS no se observó en el caso de la enzima inmovilizada, ya que no se registró aumento en el %D luego de 18 h del proceso. Al respecto, es importante resaltar que, si bien la enzima inmovilizada se encontraba activa (dado que llevó a cabo la oxidación del ABTS, dando lugar a la formación de un color púrpura en la solución – ver Anexo C), esta fue incapaz de llevar a cabo la oxidación del rojo allura AC. Múltiples factores pueden estar influyendo en el desempeño de la enzima inmovilizada:

- En primer lugar, se tiene que la actividad enzimática final, asociada al número de micropartículas adicionadas, pudo no ser suficiente para evidenciar el efecto de la lacasa y el ABTS en las 18 h que tuvo lugar el experimento. En este sentido, es importante destacar que en la evaluación se buscó que los tratamientos fueran comparables entre sí, razón por la cual se garantizó en todos los casos una actividad de 0.15 U/mL en el volumen final de la solución de colorante.
- En segundo lugar, la concentración del ABTS (0.1 mM) pudo ser muy baja para este sistema. Sondhi *et al.* (2018) reporta resultados eficientes en la decoloración de diversos colorantes sintéticos al adicionar 1 mM de ABTS, lo que equivale a 10 veces el valor utilizado en el presente estudio [145].

- Las condiciones de pH y/o temperatura del proceso pueden no haber sido las óptimas para la enzima inmovilizada. Cabe mencionar que las implementadas en el experimento (pH de 4.00 y temperatura ambiente cercana a 27°C) fueron seleccionadas con base a criterios técnicos (ensayo de las condiciones más adecuadas para la cuantificación enzimática – sección 7.4), así como criterios prácticos (evitar el uso de altas temperaturas, asociadas a costos energéticos adicionales si se observa el proceso en una perspectiva futura de escalamiento). No obstante, como se mencionó en etapas previas de esta investigación, la inmovilización tiene un efecto importante en la estabilidad de la enzima ante diversos valores de pH y temperatura, razón por la cual surge la hipótesis de que al variar estos parámetros se pueda observar un mayor efecto de la enzima inmovilizada en la oxidación del colorante.

Resumiendo estos tres aspectos anteriores, es altamente probable que al realizar ensayos adicionales en donde se evalúe con más detalle el efecto de factores como la concentración del ABTS, la actividad enzimática final en la solución (asociada al número de perlas presentes), la duración del proceso, el pH y la temperatura del medio; así como las respectivas interacciones entre dichos factores, se observen resultados más promisorios en la decoloración tanto del rojo allura AC, como de otros colorantes sintéticos de diferente naturaleza química. Adicionalmente, la adición de inductores como el sulfato de cobre a concentraciones entre 0.3 y 0.5 mM puede tener también efectos positivos en el desempeño final de la enzima inmovilizada [145].

Si bien los resultados obtenidos en este estudio indican que la lacasa inmovilizada fue incapaz de llevar a cabo la decoloración del rojo allura AC, varios autores reportan que los sistemas de inmovilización, tanto en quitosano como en otros materiales, son eficientes no solo para esta aplicación específica de tratamiento de colorantes sintéticos, sino también para otro tipo de actividades, en donde se puede tomar ventaja del hecho de que el soporte en donde se fija la enzima puede protegerla de condiciones adversas del ambiente (como valores críticos de pH y temperatura) y, adicionalmente, permite su recuperación y reutilización en diferentes ciclos del proceso [116], [136], [137], [146]–[149].

8. Conclusiones y recomendaciones

8.1 Conclusiones

1. Bajo las condiciones evaluadas, *Pleurotus ostreatus* demostró ser la especie con mayor potencial para la producción de lacasa mediante la fermentación en estado sólido del residuo agrícola tusa de maíz. Cabe señalar que *Pleurotus pulmonarius* y *Trametes pubescens* también mostraron la capacidad de sintetizar esta enzima, aunque en menor proporción, mientras que *Phanerochaete chrysosporium* no presentó actividad enzimática cuantificable.
2. La producción máxima de lacasa en el rango de condiciones evaluado se alcanza utilizando extracto de malta como fuente de carbono a una concentración de 18.2 g/L; extracto de levadura como fuente de nitrógeno ajustando una proporción carbono-nitrógeno de 5.15:1; el inductor tween 80 a una concentración de 0.17% v/v; y el contenido de humedad en 85.0%. Es destacable que la implementación de dichas condiciones generó un incremento de aproximadamente 2.8 veces en la actividad enzimática respecto al valor inicial en ausencia de la optimización del medio fermentativo, señalando la importancia de la selección de las mejores condiciones de operación del proceso a través de un diseño de experimentos.
3. La presente investigación es pionera en el estudio de las condiciones que favorecen la extracción de la lacasa producida bajo fermentación en estado sólido. La enzima demostró ser una molécula muy versátil en cuanto al solvente requerido para su extracción, evidenciando que los buffers acetato de sodio, citrato de sodio y McIlvaine, a concentraciones entre 50 y 150 mM y valores de pH entre 4.00 y 6.00, proveen condiciones similares para la efectividad del proceso. Por otro lado, la cuantificación enzimática se favorece al emplear el buffer acetato de sodio a un pH de 4.00 como medio de la reacción. Al respecto se presume que el ácido acético,

al ser un ácido monocarboxílico, genera un número de puentes de hidrógeno limitado con la enzima, lo cual es positivo dado que afecta en menor proporción su movilidad y eficiencia. En cuanto al pH, este factor demostró ser aún más determinante al momento de cuantificar la actividad de la lacasa, en particular, se requieren valores ligeramente ácidos para favorecer el estado deseado de ionización de la enzima.

4. Las curvas cinéticas de actividad enzimática y actividad específica demostraron una tendencia similar y exhibieron dos picos, el primero alrededor del octavo día y el segundo cercano al doceavo día. En cuanto al primer pico, si bien no fue el máximo global, fue un máximo local que permitió obtener una actividad enzimática satisfactoria en un período de tiempo menor. Este último aspecto es de gran relevancia, especialmente cuando se considera el proceso desde una perspectiva de futuro escalado.
5. La implementación de diseños estadísticos de experimentos en los procesos de producción, extracción y cuantificación de la lacasa, en conjunto con la construcción de las curvas cinéticas, permitieron un aumento total de aproximadamente un 500% en la actividad enzimática, pasando de un valor de 8.6 U/g_{ss} (alcanzado en el primer ensayo de selección de la especie fúngica) a un valor de 52.2 U/g_{ss} (alcanzado al octavo día de la cinética). Así, se concluye en favor de la pertinencia de la presente investigación al realizar un estudio muy completo de la lacasa producida por la especie fúngica *Pleurotus ostreatus*, bajo condiciones de FES del residuo agrícola tusa de maíz.
6. La precipitación con sulfato de amonio, a una concentración de saturación de la sal de 70%, permitió obtener un factor de purificación promedio de 1.44 y un rendimiento promedio del 80.17%. La etapa siguiente de separación mediante un sistema bifásico acuoso, conformado por el polímero PEG 6000 y la sal Na₂SO₄, no generó un incremento estadísticamente significativo en el factor de purificación de la fase rica en sal. No obstante lo anterior, se logró evidenciar la migración preferencial de la enzima hacia la fase inferior, hecho deseado dado que evita la

implementación de técnicas adicionales de purificación, que son requeridas en aquellos casos donde la enzima se desplaza hacia la fase polimérica.

7. Con respecto a la inmovilización enzimática, se encontró que el protocolo estándar empleado para la producción de micropartículas de quitosano funcionalizadas con glutaraldehído, permitió inmovilizar satisfactoriamente la lacasa previamente producida, evidenciando una actividad específica promedio de 1.05 ± 0.51 U/mg.
8. El colorante sintético rojo allura AC alcanzó un porcentaje máximo de decoloración de 62.4% a las 6 horas de monitoreo con una lacasa comercial; de 10.9% al mismo tiempo con el extracto crudo producido de la FES; y de 7.9% a las 18 horas con la fracción precipitada del extracto crudo previamente obtenido. Las micropartículas por su parte no mostraron la capacidad de efectuar el proceso decolorativo en el tiempo y condiciones evaluadas. Se destaca que la adición del ABTS es un factor determinante en la eficiencia de la enzima para llevar a cabo la decoloración, lo cual es explicado por su acción como mediador rédox de la lacasa.

8.2 Recomendaciones

1. Como se observó en la construcción de las curvas cinéticas, tanto la actividad enzimática como la actividad específica presentaron una disminución alrededor del décimo día, seguida de una rápida recuperación de sus valores. De acuerdo con lo discutido, se plantean dos hipótesis para explicar este comportamiento, la primera relacionada con la carencia de nutrientes que puede activar el metabolismo secundario del microorganismo y la segunda relacionada con la producción simultánea de proteasas que regulan la síntesis de la lacasa. Al respecto, se recomienda validar cuál de los dos escenarios describe mejor el sistema con el fin de alcanzar mayores picos de actividad en menor tiempo. Para esta validación, se sugiere, por ejemplo, una caracterización, mediante electroforesis, de las enzimas producidas a lo largo del tiempo; adicionalmente, se podría utilizar un método de cuantificación de proteasas para verificar su presencia y sus picos de actividad durante la fermentación.

2. Para evidenciar el potencial reportado del método de purificación mediante ATPS, se sugiere en futuras investigaciones estudiar otros sistemas polímero/sal o polímero/polímero incluyendo la evaluación de diferentes polímeros, tales como el PEG, UCON y dextrano; diferentes sales como el K_2HPO_4 , $(NH_4)_2PO_4$ y $(NH_4)_2SO_4$; diferentes aditivos como el NaCl y iones metálicos; y/o diferentes condiciones de temperatura y pH.
3. En cuanto a la inmovilización enzimática, se resalta la necesidad de estudiar en mayor detalle el proceso para obtener así rendimientos significativamente superiores. Así, se sugieren tres enfoques: 1) realizar un diseño estadístico de experimentos, de preferencia una optimización, que evalúe el efecto de los diferentes factores influyentes como sus respectivas interacciones, de tal forma que permita obtener las condiciones que maximicen, por ejemplo, la actividad enzimática de las micropartículas; 2) realizar un estudio de los ciclos de reutilización de las micropartículas obtenidas en el primer numeral; y 3) evaluar la estabilidad tanto de la lacasa libre como de la inmovilizada a diferentes valores de pH y temperatura, con el objetivo de determinar el efecto del proceso en términos de un aumento en la estabilidad de la enzima a condiciones más extremas de operación.
4. Una vez sean tomadas en consideración las anteriores recomendaciones, sería valioso evaluar el sistema final en diversas aplicaciones como la deslignificación de sustratos y el tratamiento de efluentes contaminados con compuestos xenobióticos, entre otras. En particular, se sugiere la decoloración de colorantes sintéticos de diferente naturaleza química, incluyendo tanto la evaluación de diferentes mediadores que puedan optimizar el desempeño de la lacasa, así como el estudio de las rutas de degradación para verificar la no toxicidad de los productos secundarios generados.

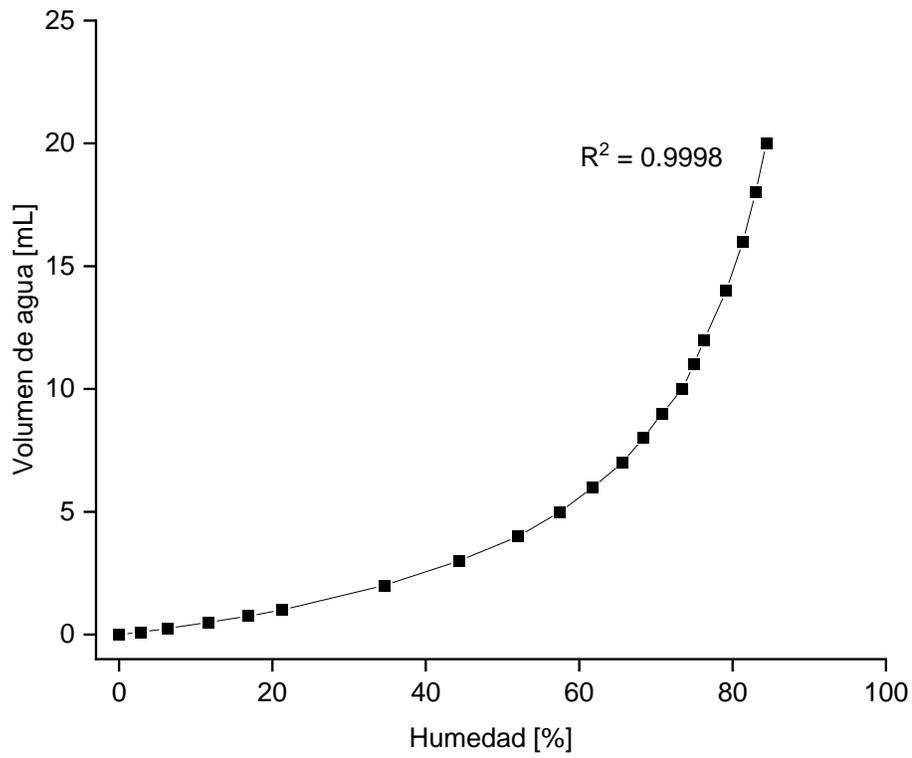
A. Anexo: Curva de humedad del sustrato sólido tusa de maíz

Para establecer el porcentaje de humedad en las diferentes fermentaciones realizadas, se construyó una curva de humedad adicionando de manera consecutiva y creciente volúmenes de agua conocidos y determinando el porcentaje de humedad equivalente.

La curva se construyó para 4.00 ± 0.01 g de tusa de maíz a la cual se le adicionaron volúmenes de agua en un rango de 0 a 20 mL. En la Figura A-12 se presenta el diagrama de dispersión de los datos experimentales y la regresión polinomial implementada en la investigación, la cual relaciona las variables humedad [%] y volumen de agua [mL] mediante un polinomio de quinto grado dado por la siguiente ecuación:

$$\text{Volumen de agua} = 3.786 * 10^{-8} \text{ Humedad}^5 - 6.301 * 10^{-6} \text{ Humedad}^4 + 3.854 * 10^{-4} \text{ Humedad}^3 - 9.006 * 10^{-3} \text{ Humedad}^2 + 0.1168 \text{ Humedad} - 0.1043 \quad (\text{A.8})$$

Figura A-12: Curva de humedad del sustrato sólido tusa de maíz.



B. Anexo: Diseño central compuesto para selección de condiciones que optimizan la producción de lacasa. Modelos ajustados

Las Ecuaciones A.9 – A.16 representan los modelos ajustados para los sistemas evaluados en el diseño de experimentos; estos relacionan la actividad enzimática [U/g_{ss}] con los parámetros concentración de la fuente de carbono, C [g/L]; concentración de inductor, I [%v/v]; porcentaje de humedad, %H y proporción carbono-nitrógeno, C:N.

1. Glucosa/Extracto de levadura/Sulfato de cobre

$$\begin{aligned} \text{Actividad lacasa} = & -55.0848 + 6.45338 * C + 105.434 * I + 0.942675 * \%H - 3.45454 * \\ & C: N + 0.0618963 * C^2 + 0.009975 * C * I - 0.106573 * C * \%H - 0.0084066 * C * C: N + \\ & 11.3759 * I^2 - 1.69908 * I * \%H + 0.319607 * I * C: N + 0.00250577 * \%H^2 + 0.0455247 * \\ & \%H * C: N - 0.004838 * C: N^2 \end{aligned} \quad (\text{A.9})$$

$$R^2 \quad 0.6340$$

$$R^2 \text{ ajustado} \quad 0.3679$$

2. Glucosa/Peptona/Sulfato de cobre

$$\begin{aligned} \text{Actividad lacasa} = & -111.634 - 0.00551825 * C + 6.4448 * I + 3.18022 * \%H - 0.516971 * \\ & C: N - 0.0126706 * C^2 + 0.180745 * C * I + 0.00610053 * C * \%H - 0.000881931 * C * \\ & C: N - 5.4969 * I^2 - 0.0549328 * I * \%H + 0.106378 * I * C: N - 0.0232556 * \%H^2 + \\ & 0.0119561 * \%H * C: N - 0.00657348 * C: N^2 \end{aligned} \quad (\text{A.10})$$

$$\begin{aligned} R^2 & 0.7059 \\ R^2 \text{ ajustado} & 0.4920 \end{aligned}$$

3. Extracto de malta/Extracto de levadura/Sulfato de cobre

$$\begin{aligned} \text{Actividad lacasa} = & -117.507 - 3.79814 * C + 29.3263 * I + 2.32157 * \%H + 3.46313 * \\ & C: N + 0.00269775 * C^2 - 0.243748 * C * I + 0.0712169 * C * \%H - 0.0528154 * C * C: N - \\ & 2.96268 * I^2 - 0.185526 * I * \%H - 0.260643 * I * C: N - 0.0135345 * \%H^2 - 0.033712 * \\ & \%H * C: N - 0.000582923 * C: N^2 \end{aligned} \quad (A.11)$$

$$\begin{aligned} R^2 & 0.7043 \\ R^2 \text{ ajustado} & 0.4893 \end{aligned}$$

4. Extracto de malta/Peptona/Sulfato de cobre

$$\begin{aligned} \text{Actividad lacasa} = & 126.548 - 1.20464 * C - 43.4273 * I - 2.39786 * \%H - 1.23672 * C: N + \\ & 0.0102809 * C^2 - 0.460057 * C * I + 0.00829221 * C * \%H + 0.0155538 * C * C: N - \\ & 1.00386 * I^2 + 0.691507 * I * \%H + 0.0137631 * I * C: N + 0.0121742 * \%H^2 + 0.0101882 * \\ & \%H * C: N + 0.00366384 * C: N^2 \end{aligned} \quad (A.12)$$

$$\begin{aligned} R^2 & 0.4694 \\ R^2 \text{ ajustado} & 0.0834 \end{aligned}$$

5. Glucosa/Extracto de levadura/Tween 80

$$\begin{aligned} \text{Actividad lacasa} = & -89.8953 + 1.80636 * C + 576.464 * I + 1.2892 * \%H - 1.27478 * \\ & C: N + 0.026594 * C^2 + 2.49756 * C * I - 0.0524032 * C * \%H + 0.0308016 * C * C: N + \\ & 23.1895 * I^2 - 7.3754 * I * \%H - 2.02458 * I * C: N + 0.00303673 * \%H^2 + 0.0142231 * \\ & \%H * C: N + 0.00076321 * C: N^2 \end{aligned} \quad (A.13)$$

$$\begin{aligned} R^2 & 0.7237 \\ R^2 \text{ ajustado} & 0.5228 \end{aligned}$$

6. Glucosa/Peptona/Tween 80

$$\begin{aligned} \text{Actividad lacasa} = & 9.20111 + 1.16155 * C + 77.1942 * I - 0.324594 * \%H - 0.825415 * \\ & C: N - 0.019783 * C^2 + 0.847917 * C * I - 0.0101247 * C * \%H + 0.00635792 * C * C: N - \\ & 236.814 * I^2 - 0.392583 * I * \%H + 0.176514 * I * C: N + 0.00240365 * \%H^2 + 0.0112032 * \\ & \%H * C: N + 0.00132702 * C: N^2 \end{aligned} \quad (\text{A.14})$$

$$\begin{aligned} R^2 & 0.4513 \\ R^2 \text{ ajustado} & 0.0522 \end{aligned}$$

7. Extracto de malta/Extracto de levadura/Tween 80

$$\begin{aligned} \text{Actividad lacasa} = & -55.8593 + 2.47429 * C - 196.077 * I + 1.26752 * \%H + 0.712019 * \\ & C: N - 0.02271 * C^2 + 1.77064 * C * I - 0.0226709 * C * \%H - 0.00560211 * C * C: N - \\ & 222.456 * I^2 + 2.75003 * I * \%H + 1.17174 * I * C: N - 0.00657835 * \%H^2 - 0.0116024 * \\ & \%H * C: N + 0.00117069 * C: N^2 \end{aligned} \quad (\text{A.15})$$

$$\begin{aligned} R^2 & 0.5028 \\ R^2 \text{ ajustado} & 0.1411 \end{aligned}$$

8. Extracto de malta/Peptona/Tween 80

$$\begin{aligned} \text{Actividad lacasa} = & -100.661 - 0.897924 * C + 123.692 * I + 2.89422 * \%H - 0.671474 * \\ & C: N - 0.00853263 * C^2 + 0.649907 * C * I + 0.0163781 * C * \%H - 0.00290648 * C * C: N - \\ & 71.9035 * I^2 - 1.45557 * I * \%H - 0.412731 * I * C: N - 0.0204665 * \%H^2 + 0.00808759 * \\ & \%H * C: N + 0.00469172 * C: N^2 \end{aligned} \quad (\text{A.16})$$

$$\begin{aligned} R^2 & 0.7022 \\ R^2 \text{ ajustado} & 0.4855 \end{aligned}$$

C. Anexo: Resultados actividad enzimática – Optimización de las condiciones fermentativas para la producción enzimática. Sistema seleccionado

En la Tabla A-42 se presentan las condiciones detalladas y los resultados obtenidos para cada tratamiento evaluado en el diseño de optimización del sistema seleccionado.

Tabla A-42: Resultados actividad enzimática para el diseño central compuesto del sistema seleccionado: Fuente de carbono – Extracto de malta; Fuente de nitrógeno – Extracto de levadura; Inductor – Tween 80.

Bloque	Tratamiento	C [g/L]	I [%v/v]	%H	C:N	Actividad Enzimática [U/g _{ss}]
1	1	15	0.15	75	25	7.7
	2	15	0.15	75	25	8.0
	3	20	0.1	80	35	5.4
	4	20	0.2	80	15	9.1
	5	10	0.1	70	35	6.6
	6	15	0.15	75	25	9.5
	7	10	0.2	70	15	2.4
	8	15	0.15	75	25	8.6
	9	15	0.15	75	25	9.5
	10	10	0.2	80	35	4.4
	11	10	0.1	80	15	8.1
	12	20	0.2	70	35	8.4

	13	20	0.1	70	15	11.8
2	1	15	0.15	75	25	9.5
	2	20	0.2	70	15	7.4
	3	15	0.15	75	25	9.9
	4	15	0.15	75	25	10.9
	5	15	0.15	75	25	14.4
	6	20	0.2	80	35	12.5
	7	10	0.1	80	35	7.1
	8	15	0.15	75	25	6.8
	9	20	0.1	80	15	6.2
	10	10	0.1	70	15	3.7
	11	10	0.2	80	15	6.7
	12	10	0.2	70	35	9.0
	13	20	0.1	70	35	10.0
3	1	15	0.15	75	25	6.5
	2	15	0.15	75	25	5.6
	3	25	0.15	75	25	6.2
	4	15	0.15	75	45	5.7
	5	5	0.15	75	25	4.5
	6	15	0.15	65	25	5.1
	7	15	0.15	75	25	5.2
	8	15	0.15	75	25	5.6
	9	15	0.15	75	5	10.6
	10	15	0.05	75	25	5.9
	11	15	0.15	85	25	8.9
	12	15	0.25	75	25	4.9
	13	15	0.15	75	25	6.4

C: fuente de carbono, [g/L]. I: inductor - Tween 80, [%v/v] Sulfato de cobre, [mM]. %H: porcentaje de humedad. C:N: proporción carbono-nitrógeno

D. Anexo: Resultados cinética de actividad enzimática y actividad específica

En las Tablas A-43 y A-44 se presentan los resultados obtenidos para la actividad enzimática y la actividad específica durante los 18 días de monitoreo del proceso.

Tabla A-43: Resultados cinética de actividad enzimática

Tiempo [Días]	Actividad Enzimática [U/g _{ss}]
1	0.7 ± 0.4
2	3.7 ± 1.9
3	4.8 ± 2.0
4	8.4 ± 2.0
5	15.6 ± 2.6
6	25.4 ± 3.4
7	37.8 ± 8.2
8	52.2 ± 9.6
9	39.5 ± 7.1
10	34.1 ± 2.2
11	48.4 ± 10.5
12	66.6 ± 14.9
13	58.1 ± 11.7
14	67.5 ± 12.6
15	70.8 ± 7.3

16	69.0 ± 7.6
17	76.2 ± 8.2
18	64.8 ± 10.0

Tabla A-44: Resultados cinética de actividad específica

Tiempo [Días]	Actividad Específica [U/mg]
1	0.3 ± 0.2
2	0.9 ± 0.5
3	1.2 ± 0.5
4	1.5 ± 0.4
5	1.9 ± 0.3
6	3.4 ± 0.5
7	4.0 ± 0.9
8	4.1 ± 1.1
9	4.4 ± 0.8
10	3.1 ± 0.2
11	3.4 ± 0.8
12	5.7 ± 1.3
13	4.3 ± 0.9
14	4.3 ± 0.8
15	5.1 ± 0.5
16	4.7 ± 0.5
17	4.6 ± 0.5
18	4.5 ± 0.7

E. Anexo: Resultados purificación mediante el sistema ATPS

En las Tablas A-45 - A-47 se presentan las condiciones detalladas y los resultados obtenidos para cada tratamiento evaluado en el diseño Plackett Burman y en los dos diseños de optimización de la purificación mediante el sistema ATPS, respectivamente.

Tabla A-45: Resultados factor de purificación en la fase inferior – Diseño Plackett Burman.

Tratamiento	Peso molecular PEG	pH	NaCl [%p/p]	PEG [%p/p]	Na ₂ SO ₄ [%p/p]	Extracto [%p/p]	FP fase inferior
1	3000	7.00	5.00	25.00	8.00	10.00	0.04 ± 0.07
2	6000	4.00	5.00	20.00	8.00	5.00	0
3	3000	4.00	0.00	25.00	11.00	10.00	0.03 ± 0.05
4	6000	4.00	5.00	25.00	8.00	10.00	0
5	3000	4.00	5.00	25.00	11.00	5.00	0
6	6000	7.00	0.00	25.00	8.00	5.00	7.11 ± 1.03
7	6000	7.00	0.00	25.00	11.00	5.00	0.08 ± 0.03
8	3000	4.00	0.00	20.00	8.00	5.00	2.43 ± 0.26
9	3000	7.00	0.00	20.00	8.00	10.00	0.75 ± 0.10
10	3000	7.00	5.00	20.00	11.00	5.00	0
11	6000	4.00	0.00	20.00	11.00	10.00	0.23 ± 0.03
12	6000	7.00	5.00	20.00	11.00	10.00	0

Tabla A-46: Resultados factor de purificación en la fase inferior – Primer diseño de optimización central compuesto.

Tratamiento	pH	Extracto [%p/p]	Na ₂ SO ₄ [%p/p]	FP fase inferior
1	5	5	10	0.36
2	5	10	10	0.59
3	6	11.7045	9	0.45
4	7	10	10	1.47
5	5	5	8	-3.58
6	6	7.5	9	0.40
7	6	7.5	7.31821	1.66
8	4.31821	7.5	9	-0.29
9	6	3.29552	9	0.35
10	6	7.5	9	0.42
11	7.68179	7.5	9	0.40
12	7	5	10	0.03
13	6	7.5	9	0.27
14	6	7.5	9	0.41
15	7	5	8	0.48
16	5	10	8	0.76
17	6	7.5	9	0.36
18	6	7.5	9	0.53
19	6	7.5	10.6818	0.06
20	7	10	8	0.57

Tabla A-47: Resultados factor de purificación en la fase inferior – Segundo diseño de optimización central compuesto.

Tratamiento	Extracto [%p/p]	Na ₂ SO ₄ [%p/p]	FP fase inferior
1	40	7.5	1.32
2	45	6	1.20
3	40	5.37868	1.40
4	40	7.5	1.17
5	32.9289	7.5	1.14
6	40	7.5	1.23

7	40	7.5	1.27
8	40	9.62132	0.57
9	40	7.5	1.43
10	47.0711	7.5	1.43
11	35	9	1.44
12	40	7.5	1.59
13	45	9	2.07
14	35	6	1.04

F. Anexo: Resultados evaluación de la decoloración del colorante rojo allura AC

En la Tabla A-48 se presentan los porcentajes de decoloración alcanzados para cada sistema evaluado en la decoloración del colorante sintético rojo allura AC..

Tabla A-48: Porcentaje de decoloración del rojo allura AC.

Tiempo [h]	Porcentaje de decoloración [%]				
	Extracto crudo	Fracción enzimática precipitada	Lacasa comercial	Micropartículas	Solución de colorante
0	0	0	0	0	0
1	0.9 ± 0.4	0	0	0	0
3	1.2 ± 0.3	0	0	0	0
5	3.2 ± 1.5	0	0	0	0
6	10.9 ± 0.9	0	62.4 ± 0.1	0	0
18	-	7.9 ± 0.7	66.0 ± 0.4	0	0

G. Anexo: Registro fotográfico

Se adjuntan las siguientes ilustraciones como registro fotográfico de las diferentes etapas consideradas en la investigación.

Ilustración A-1: Diseño central compuesto para selección de condiciones que optimizan la producción de lacasa. Resultados al séptimo día.



1. Glucosa/Extracto de levadura/Sulfato de cobre
2. Glucosa/Peptona/Sulfato de cobre
3. Extracto de malta/Extracto de levadura/Sulfato de cobre
4. Extracto de malta/Peptona/Sulfato de cobre
5. Glucosa/Extracto de levadura/Tween 80

6. Glucosa/Peptona/Tween 80
7. Extracto de malta/Extracto de levadura/Tween 80
8. Extracto de malta/Peptona/Tween 80

Ilustración A-2: Resumen obtención de extracto crudo y extracto precipitado.

a) Fermentación en estado sólido a las condiciones óptimas seleccionadas (Sección 6.8).



b) Extracto crudo (Sección 6.9).



c) Sobrenadante y precipitado obtenido luego de realizar precipitación con sulfato de amonio al 70% (Sección 6.12.2).



d) Extracto precipitado (re-suspensión del precipitado en 5 mL de buffer acetato de sodio pH=6.00, Sección 6.12.2).



Ilustración A-3: Resumen obtención de micropartículas e inmovilización enzimática (Sección 6.13).

a) Micropartículas de quitosano

b) Micropartículas funcionalizadas con glutaraldehído

c) Inmovilización enzimática sobre micropartículas de quitosano funcionalizadas con glutaraldehído.

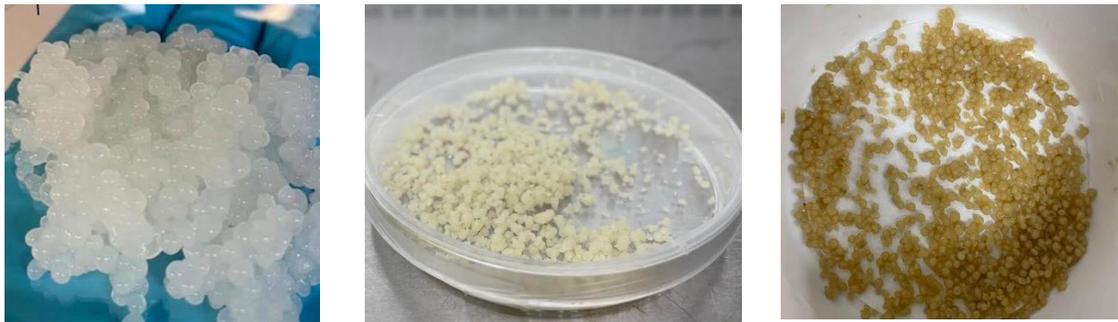


Ilustración A-4: Decoloración del tinte sintético rojo allura AC luego de 18 h de iniciado el proceso.

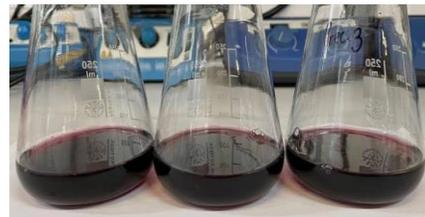
a) Solución de colorante a 35 ppm con 0.1 mM de ABTS.



a) Decoloración con extracto crudo

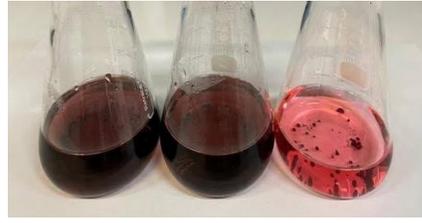


b) Decoloración con extracto precipitado



c) Decoloración con lacasa comercial

d) Decoloración con micropartículas. La imagen de la derecha corresponde a la enzima desnaturalizada.



Bibliografía

- [1] D. Zhu, Q. Wu, and N. Wang, "Industrial Enzymes," in *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, vol. 3, M. Moo-Young, Ed. Elsevier B.V., 2011, pp. 3–13.
- [2] O. V. Morozova, G. P. Shumakovich, S. V. Shleev, and Y. I. Yaropolov, "Laccase-mediator systems and their applications: A review," *Appl. Biochem. Microbiol.*, vol. 43, no. 5, pp. 523–535, 2007, doi: 10.1134/S0003683807050055.
- [3] S. Rodríguez Couto and J. L. Toca Herrera, "Industrial and biotechnological applications of laccases: A review," *Biotechnol. Adv.*, vol. 24, no. 5, pp. 500–513, 2006, doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.04.003.
- [4] D. P. Barr and S. D. Aust, "Pollutant Degradation by White Rot Fungi," *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 138, pp. 49–72, 1994, doi: 10.1007/978-1-4612-2672-1_3.
- [5] C. A. Reddy and Z. Mathew, "Bioremediation potential of white rot fungi," in *Fungi in Bioremediation*, G. M. Gadd, Ed. Cambridge University Press, 2009, pp. 52–78.
- [6] C. M. Rivera-Hoyos, E. D. Morales-Álvarez, R. A. Poutou-Piñales, A. M. Pedroza-Rodríguez, R. Rodríguez-Vázquez, and J. M. Delgado-Boada, "Fungal laccases," *Fungal Biol. Rev.*, vol. 27, no. 3–4, pp. 67–82, 2013, doi: 10.1016/j.fbr.2013.07.001.
- [7] J. A. Majeau, S. K. Brar, and R. D. Tyagi, "Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 7, pp. 2331–2350, 2010, doi: 10.1016/j.biortech.2009.10.087.
- [8] S. Rodríguez-Couto, "Solid-State Fermentation for Laccases Production and Their Applications," *Curr. Dev. Biotechnol. Bioeng.*, pp. 211–234, 2017, doi:

- 10.1016/b978-0-444-63990-5.00011-6.
- [9] M. Bilal, T. Rasheed, F. Nabeel, H. M. N. Iqbal, and Y. Zhao, "Hazardous contaminants in the environment and their laccase-assisted degradation – A review," *J. Environ. Manage.*, vol. 234, no. December 2018, pp. 253–264, 2019, doi: 10.1016/j.jenvman.2019.01.001.
- [10] T. Rasheed, M. Bilal, F. Nabeel, M. Adeel, and H. M. N. Iqbal, "Environmentally-related contaminants of high concern: Potential sources and analytical modalities for detection, quantification, and treatment," *Environ. Int.*, vol. 122, no. September, pp. 52–66, 2019, doi: 10.1016/j.envint.2018.11.038.
- [11] K. Turhan, I. Durukan, S. A. Ozturkcan, and Z. Turgut, "Decolorization of textile basic dye in aqueous solution by ozone," *Dye. Pigment.*, vol. 92, no. 3, pp. 897–901, 2012, doi: 10.1016/j.dyepig.2011.07.012.
- [12] I. Arslan-Alaton and I. Alaton, "Degradation of xenobiotics originating from the textile preparation, dyeing, and finishing industry using ozonation and advanced oxidation," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 68, no. 1, pp. 98–107, 2007, doi: 10.1016/j.ecoenv.2006.03.009.
- [13] G. M. Scott, M. Akhtar, R. E. Swaney, and C. J. Houtman, "Recent Developments in Biopulping Technology at Madison, WI," *Prog. Biotechnol.*, vol. 21, pp. 61–72, 2002, doi: 10.1016/S0921-0423(02)80008-9.
- [14] G. Singh and S. K. Arya, "Utility of laccase in pulp and paper industry: A progressive step towards the green technology," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 134, pp. 1070–1084, 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.05.168.
- [15] N. P. Cheremisinoff and P. E. Rosenfeld, "Sources of air emissions from pulp and paper mills," in *Handbook of Pollution Prevention and Cleaner Production*, vol. 2, 2010, pp. 179–259.
- [16] A. Rekuć, J. Bryjak, K. Szymańska, and A. B. Jarzebski, "Laccase immobilization on mesostructured cellular foams affords preparations with ultra high activity," *Process Biochem.*, vol. 44, no. 2, pp. 191–198, 2009, doi: 10.1016/j.procbio.2008.10.007.

- [17] A. Kandelbauer, O. Maute, R. W. Kessler, A. Erlacher, and G. M. Gübitz, "Study of dye decolorization in an immobilized laccase enzyme-reactor using online spectroscopy," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 87, no. 4, pp. 552–563, 2004, doi: 10.1002/bit.20162.
- [18] S. Rodríguez Couto, J. F. Osma, V. Saravia, G. M. Gübitz, and J. L. Toca Herrera, "Coating of immobilised laccase for stability enhancement: A novel approach," *Appl. Catal. A Gen.*, vol. 329, no. March 2019, pp. 156–160, 2007, doi: 10.1016/j.apcata.2007.07.001.
- [19] Y. G. Makas, N. A. Kalkan, S. Aksoy, H. Altinok, and N. Hasirci Nesrin, "Immobilization of laccase in κ -carrageenan based semi-interpenetrating polymer networks," *J. Biotechnol.*, vol. 148, no. 4, pp. 216–220, 2010, doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.05.011.
- [20] S. García-Lara and S. O. Serna-Saldivar, "Corn History and Culture," in *Corn. Chemistry and Technology*, Third Edit., S. O. Serna-Saldivar, Ed. Elsevier Inc., 2019, pp. 1–18.
- [21] G. M. H. Gómez and J. E. Ocampo, "Producción y consumo del maíz en Colombia, descripción de la cadena y propuesta de estrategias para un mejor desempeño de la misma," in *Algunos componentes generales, particulares y singulares del maíz en Colombia y México*, First Edit., G. M. H. Gómez, Ed. Medellín, Colombia: Biogénesis Fondo Editorial. Universidad de Antioquia, 2018, pp. 95–112.
- [22] Agroinsumos SAS, "Situación del Cultivo de Maíz en Colombia," 2018.
- [23] L. V. P. Gonzalez, S. P. M. Gómez, and P. A. G. Abad, "Aprovechamiento de residuos agroindustriales en Colombia," *Rev. Investig. Agrar. y Ambient.*, vol. 8, no. 2, pp. 141–150, 2017.
- [24] J. S. Knapp and K. C. A. Bromley-Challoner, "Recalcitrant organic compounds," in *Handbook of Water and Wastewater Microbiology*, D. Mara and N. Horan, Eds. Elsevier, 2003, pp. 559–595.
- [25] P. Goyal and R. K. Basniwal, "Environmental Bioremediation : Biodegradation of

- Xenobiotic Compounds,” in *Xenobiotics in the Soil Environment: Monitoring, Toxicity and Management*, M. Z. Hashmi, V. Kumar, and A. Varma, Eds. 2017, pp. 347–371.
- [26] W. Przystas, E. Zabłocka-Godlewska, and E. Grabinska-Sota, “Efficiency of decolorization of different dyes using fungal biomass immobilized on different solid supports,” *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 9, pp. 285–295, 2017, doi: 10.1016/j.bjm.2017.06.010.
- [27] D. P. de Lima *et al.*, “Fungal bioremediation of pollutant aromatic amines,” *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, vol. 11, pp. 34–44, 2018, doi: 10.1016/j.cogsc.2018.03.012.
- [28] J. A. Mir-Tutusaus *et al.*, “Pharmaceuticals removal and microbial community assessment in a continuous fungal treatment of non-sterile real hospital wastewater after a coagulation-flocculation pretreatment,” *Water Res.*, vol. 116, pp. 65–75, 2017, doi: 10.1016/j.watres.2017.03.005.
- [29] A. T. N. Dao, J. Vonck, T. K. S. Janssens, H. T. C. Dang, A. Brouwer, and T. E. de Boer, “Screening white-rot fungi for bioremediation potential of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin,” *Ind. Crop. Prod.*, vol. 128, pp. 153–161, 2019, doi: 10.1016/j.indcrop.2018.10.059.
- [30] P. J. Harvey and C. F. Thurston, “The biochemistry of ligninolytic fungi,” in *Fungi in Bioremediation*, G. M. Gadd, Ed. Cambridge University Press, 2009, pp. 27–51.
- [31] A. Hatakka and K. E. Hammel, “Fungal Biodegradation of Lignocelluloses,” in *Hofrichter M. (eds) Industrial Applications. The Mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research)*, Second edi., Springer, Berlin, Heidelberg, 2010, pp. 319–340.
- [32] L. Gianfreda, M. A. Rao, R. Scelza, and M. D. L. Mora, “Role of Enzymes in Environment Cleanup / Remediation,” in *Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production*, First Edit., G. Dhillon and S. Kaur, Eds. Elsevier Inc., 2016, pp. 133–155.
- [33] C. F. Thurston, “The structure and function of fungal laccases,” *Microbiology*, vol.

- 140, no. 1, pp. 19–26, 1994, doi: 10.5771/9783845276564-901.
- [34] P. J. Strong and H. Claus, “Laccase : A Review of Its Past and Its Future in Bioremediation,” *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, vol. 41, no. 4, pp. 373–434, 2011, doi: 10.1080/10643380902945706.
- [35] A. T. N. Dao, J. Vonck, T. K. S. Janssens, H. T. C. Dang, A. Brouwer, and T. E. de Boer, “Screening white-rot fungi for bioremediation potential of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 128, pp. 153–161, 2019, doi: 10.1016/j.indcrop.2018.10.059.
- [36] H. Forootanfar *et al.*, “Removal of chlorophenolic derivatives by soil isolated ascomycete of *Paraconiothyrium variabile* and studying the role of its extracellular laccase,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 209–210, pp. 199–203, 2012, doi: 10.1016/j.jhazmat.2012.01.012.
- [37] S. Shanmugam, P. Ulaganathan, K. Swaminathan, S. Sadhasivam, and Y. R. Wu, “Enhanced biodegradation and detoxification of malachite green by *Trichoderma asperellum* laccase: Degradation pathway and product analysis,” *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 125, pp. 258–268, 2017, doi: 10.1016/j.ibiod.2017.08.001.
- [38] C. Krishna, “Solid-State Fermentation Systems—An Overview,” *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 25, no. 1–2, pp. 1–30, 2005, doi: 10.1080/07388550590925383.
- [39] A. Pandey, C. R. Soccol, J. A. Rodríguez-Leon, and P. Nigam, *Solid-State Fermentation in Biotechnology. Fundamentals and Applications*, First Edit. New Delhi, 2001.
- [40] C. R. Soccol *et al.*, “Recent developments and innovations in solid state fermentation,” *Biotechnol. Res. Innov.*, vol. 1, pp. 52–71, 2017, doi: 10.1016/j.biori.2017.01.002.
- [41] N. Srivastava, M. Srivastava, W. Ramteke, and K. Mishra, “Solid-State Fermentation Strategy for Microbial Metabolites Production : An Overview,” in *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier B.V., 2019, pp. 345–354.

-
- [42] X. Ge, J. Vasco-Correa, and Y. Li, "Solid-State Fermentation Bioreactors and Fundamentals," in *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Bioprocesses, Bioreactors and Controls*, C. Larroche, M. Á. Sanromán, G. Du, and A. Pandey, Eds. 2017, pp. 381–402.
- [43] D. A. Mitchell, *Solid Substrate Cultivation*. London: Elsevier Applied Science, 1992.
- [44] M. K. Gowthaman, C. Krishna, and M. Moo-Young, "Fungal solid state fermentation — an overview," in *Applied Mycology and Biotechnology. Vol 1. Agriculture and Food Production*, G. G. Khachatourians and D. K. Arora, Eds. Elsevier Science B.V., 2001, pp. 305–352.
- [45] B. K. Lonsane, N. P. Ghildyal, S. Budiartman, and S. V. Ramakrishna, "Engineering Aspects of Solid-State Fermentation," *Enzym. Microb. Technol.*, vol. 7, pp. 258–265, 1985, doi: 10.1016/S0065-2164(08)70215-6.
- [46] M. Raimbault, "General and microbiological aspects of solid substrate fermentation," *Electron. J. Biotechnol.*, vol. 1, no. 3, pp. 114–140, 1998.
- [47] B. K. Lonsane *et al.*, "Scale-Up Strategies for Solid State Fermentation Systems," *Process Biochem.*, vol. 27, pp. 259–273, 1992.
- [48] B. Bertrand, F. Martínez-Morales, and M. R. Trejo-Hernández, "Fungal Laccases: Induction and production," *Rev. Mex. Ing. Química*, vol. 12, no. 3, pp. 23–43, 2013.
- [49] D. Iark *et al.*, "Enzymatic degradation and detoxification of azo dye Congo red by a new laccase from *Oudemansiella canarii*," *Bioresour. Technol.*, vol. 289, 2019, doi: 10.1016/j.biortech.2019.121655.
- [50] S. Zeng, X. Qin, and L. Xia, "Degradation of the herbicide isoproturon by laccase-mediator systems," *Biochem. Eng. J.*, vol. 119, pp. 92–100, 2017, doi: 10.1016/j.bej.2016.12.016.
- [51] C. Barrios-Estrada *et al.*, "Potentialities of active membranes with immobilized laccase for Bisphenol A degradation," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 108, pp. 837–844, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.177.
- [52] X. Li, S. Li, X. Liang, D. J. McClements, X. Liu, and F. Liu, "Applications of

- oxidases in modification of food molecules and colloidal systems: Laccase, peroxidase and tyrosinase,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 103, no. June, pp. 78–93, 2020, doi: 10.1016/j.tifs.2020.06.014.
- [53] M. Christwardana, “Combination of physico-chemical entrapment and crosslinking of low activity laccase-based biocathode on carboxylated carbon nanotube for increasing biofuel cell performance,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 106, no. June, pp. 1–10, 2017, doi: 10.1016/j.enzmictec.2017.06.012.
- [54] A. Guadix, F. Camacho, and E. M. Guadix, “Production of whey protein hydrolysates with reduced allergenicity in a stable membrane reactor,” *J. Food Eng.*, vol. 72, pp. 398–405, 2006, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2004.12.022.
- [55] E. Dako, A.-M. Bernier, A. Thomas, and C. K., “The Problems Associated with Enzyme Purification,” in *Chemical Biology*, P. D. Ekinici, Ed. InTech, 2012, pp. 19–40.
- [56] A. H. Westphal and W. J. H. van Berkel, “Techniques for Enzyme Purification,” in *Biocatalysis for Practitioners*, G. De-Gonzalo and I. Lavandera, Eds. 2021.
- [57] S. Mukherjee, “Isolation and Purification of Industrial Enzymes: Advances in Enzyme Technology,” in *Advances in Enzyme Technology*, R. S. Singh, R. R. Singhanian, A. Pandey, and C. Larroche, Eds. Kolkata, India: Elsevier B.V., 2019, pp. 41–70.
- [58] E. V. Schmalhausen, M. S. Shumkov, V. I. Muronetz, and V. K. Švedas, “Expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *M. tuberculosis* in *E. coli*. Purification and characteristics of the untagged recombinant enzyme,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 157, pp. 28–35, 2019, doi: 10.1016/j.pep.2019.01.010.
- [59] A. C. Lemes, S. C. Silvério, S. Rodrigues, and L. R. Rodrigues, “Integrated strategy for purification of esterase from *Aureobasidium pullulans*,” *Sep. Purif. Technol.*, vol. 209, pp. 409–418, 2019, doi: 10.1016/j.seppur.2018.07.062.
- [60] A. M. Othman, M. A. Elsayed, A. M. Elshafei, and M. M. Hassan, “Purification and biochemical characterization of two isolated laccase isoforms from *Agaricus*

- bisporus CU13 and their potency in dye decolorization," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 113, pp. 1142–1148, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.043.
- [61] S. Sadeghian-Abadi, S. Rezaei, M. Yousefi-Mokri, and M. A. Faramarzi, "Enhanced production, one-step affinity purification, and characterization of laccase from solid-state culture of *Lentinus tigrinus* and delignification of pistachio shell by free and immobilized enzyme," *J. Environ. Manage.*, vol. 244, pp. 235–246, 2019, doi: 10.1016/j.jenvman.2019.05.058.
- [62] R. Hatti-kaul, "Aqueous Two-Phase Systems: A General Overview," in *Aqueous Two-Phase Systems. Methods and Protocols*, 2000, pp. 1–10.
- [63] K. Mayolo-Deloisa, J. Benavides, and M. Rito-Palomares, "General Concepts and Definitions of Aqueous Two-Phase Systems," in *Aqueous Two-Phase Systems for Bioprocess Development for the Recovery of Biological Products*, 2017, pp. 1–18.
- [64] M. L. Cacicedo *et al.*, "Immobilized Enzymes and Their Applications," in *Advances in Enzyme Technology*, R. S. Singh, R. R. Singhanian, A. Pandey, and C. Larroche, Eds. Buenos Aires, Argentina: Elsevier B.V., 2019, pp. 169–200.
- [65] M. Bilal, Y. Zhao, T. Rasheed, and H. M. N. Iqbal, "Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization: A review," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 120, pp. 2530–2544, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.025.
- [66] A. Gürses, M. Açıkyıldız, K. Güneş, and M. S. Gürses, "Dyes and Pigments: Their Structure and Properties," in *Dyes and Pigments*, Springer, Cham, 2016, pp. 13–29.
- [67] O. Glenz, "APPLICATION OF DYES BY DYEING," in *The Chemistry of SYNTHETIC DYES*, vol. IV, K. Venkataraman, Ed. ACADEMIC PRESS, INC., 1970, pp. 1–74.
- [68] N. Ashfaq and T. Masud, "Surveillance on Artificial Colours in Different Ready to Eat Foods," *Pakistan J. Nutr.*, vol. 1, no. 5, pp. 223–225, 2002.
- [69] R. Christie, *Environmental Aspects of Textile Dyeing*. Elsevier, 2007.
- [70] K. Hunger, "Industrial dyes: chemistry, properties, applications," vol. 125, no. 33,

2003.

- [71] LP Information Inc., "Global Dyes Market Growth 2019-2024," 2019. [Online]. Available: <https://www.lpinformationdata.com/reports/153723/global-dyes-market>.
- [72] H. Zollinger, *Color chemistry: synthesis, properties, and applications of organic dyes and pigments*. New York: VCH Publishers, 1987.
- [73] P. Nigam, G. Armour, I. M. Banat, D. Singh, and R. Marchant, "Physical removal of textile dyes from effluents and solid-state fermentation of dye-adsorbed agricultural residues," *Bioresour. Technol.*, vol. 72, no. 3, pp. 219–226, 2000, doi: 10.1016/S0960-8524(99)00123-6.
- [74] V. K. Gupta and Suhas, "Application of low-cost adsorbents for dye removal - A review," *J. Environ. Manage.*, vol. 90, no. 8, pp. 2313–2342, 2009, doi: 10.1016/j.jenvman.2008.11.017.
- [75] A. Gürses, M. Açıkyıldız, K. Güneş, and M. S. Gürses, "Classification of Dye and Pigments," in *Dyes and Pigments*, Springer, Cham, 2016, pp. 31–45.
- [76] R. W. Sabnis, "A," in *Handbook of Biological Dyes and Stains: Synthesis and Industrial Applications*, John Wiley & Sons, Inc., 2010, pp. 1–35.
- [77] K. Bevziuk, A. Chebotarev, D. Snigur, Y. Bazel, M. Fizer, and V. Sidey, "Spectrophotometric and theoretical studies of the protonation of Allura Red AC and Ponceau 4R," *J. Mol. Struct.*, vol. 1144, pp. 216–224, 2017, doi: 10.1016/j.molstruc.2017.05.001.
- [78] H. C. Ha, Y. Honda, T. Watanabe, and M. Kuwahara, "Production of manganese peroxidase by pellet culture of the lignin-degrading basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 55, no. 6, pp. 704–711, 2001, doi: 10.1007/s002530100653.
- [79] A. Jaramillo, S. Jimenez, A. Merino, and A. Hormaza, "Obtención de un inóculo fúngico para la degradación de un colorante azo por fermentación en estado sólido," *U.D.C.A Actual. Divulg. Científica*, vol. 17, no. 2, pp. 577–585, 2014.

- [80] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Anal. Biochem.*, vol. 72, pp. 248–254, 1976, doi: 10.1016/j.cj.2017.04.003.
- [81] P. Ander and K. Messner, "Oxidation of 1-hydroxybenzotriazole by laccase and lignin peroxidase," *Biotechnol. Tech.*, vol. 12, no. 3, pp. 191–195, 1998, doi: 10.1023/A:1008813206178.
- [82] R. E. Childs and W. G. Bardsley, "The Steady-State Kinetics of Peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as Chromogen," *Biochem. J.*, vol. 145, no. 1, pp. 93–103, 1975, doi: 10.1042/bj1450093.
- [83] G. Palmieri *et al.*, "Purification, Characterization, and Functional Role of a Novel Extracellular Protease from *Pleurotus ostreatus*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, no. 6, pp. 2754–2759, 2001, doi: 10.1128/AEM.67.6.2754-2759.2001.
- [84] H. Risdianto, E. Sofianti, S. H. Suhardi, and T. Setiadi, "Optimisation of Laccase Production using White Rot Fungi and Agriculture Wastes in Solid State Fermentation," *Int. J. Eng. Sci.*, vol. 44, no. 2, pp. 92–105, 2012, doi: 10.5614/itbj.eng.sci.2012.44.2.1.
- [85] S. Rodríguez-Couto, M. A. Longo, C. Cameselle, and A. Sanromán, "Ligninolytic enzymes from Corncob Cultures of *Phanerochaete chrysosporium* under Semi-Solid-State Conditions," *Acta Biotechnol.*, vol. 19, no. 1, pp. 17–25, 1999, doi: 10.1002/abio.370190104.
- [86] J. C. Gonzalez, S. C. Medina, A. Rodriguez, J. F. Osma, C. J. Alméciga-Díaz, and O. F. Sánchez, "Production of *Trametes pubescens* Laccase under Submerged and Semi-Solid Culture Conditions on Agro-Industrial Wastes," *PLoS One*, vol. 8, no. 9, pp. 1–14, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0073721.
- [87] V. Elisashvili, E. Kachlishvili, and M. Penninckx, "Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 35, no. 11, pp. 1531–1538, 2008, doi: 10.1007/s10295-008-0454-2.
- [88] G. C. dos Santos Bazanella, D. F. de Souza, R. Castoldi, R. F. Oliveira, A. Bracht,

- and R. M. Peralta, "Production of laccase and manganese peroxidase by *Pleurotus pulmonarius* in solid-state cultures and application in dye decolorization," *Folia Microbiol. (Praha)*, vol. 58, no. 6, pp. 641–647, 2013, doi: 10.1007/s12223-013-0253-7.
- [89] Q. An *et al.*, "Sequential Solid-State and Submerged Cultivation of the White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus* on Biomass and the Activity of Lignocellulolytic Enzymes," *BioResources*, vol. 11, no. 4, pp. 8791–8805, 2016, doi: 10.15376/biores.11.4.8791-8805.
- [90] I. Membrillo, C. Sánchez, M. Meneses, E. Favela, and O. Loera, "Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains," *Bioresour. Technol.*, vol. 99, no. 16, pp. 7842–7847, 2008, doi: 10.1016/j.biortech.2008.01.083.
- [91] A. I. El-Batal, N. M. Elkenawy, A. S. Yassin, and M. A. Amin, "Laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its application in synthesis of gold nanoparticles," *Biotechnol. Reports*, vol. 5, no. 1, pp. 31–39, 2015, doi: 10.1016/j.btre.2014.11.001.
- [92] A. Mishra and S. Kumar, "Cyanobacterial biomass as N-supplement to agro-waste for hyper-production of laccase from *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation," *Process Biochem.*, vol. 42, no. 4, pp. 681–685, 2007, doi: 10.1016/j.procbio.2006.09.022.
- [93] C. Zhu, G. Bao, and S. Huang, "Optimization of laccase production in the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* (ATCC 52857) induced through yeast extract and copper," *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, vol. 30, no. 2, pp. 270–276, 2016, doi: 10.1080/13102818.2015.1135081.
- [94] A. Das, S. Bhattacharya, G. Panchanan, B. S. Navya, and P. Nambiar, "Production, characterization and Congo red dye decolourizing efficiency of a laccase from *Pleurotus ostreatus* MTCC 142 cultivated on co-substrates of paddy straw and corn husk," *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, vol. 14, no. 2, pp. 281–288, 2016, doi: 10.1016/j.jgeb.2016.09.007.

- [95] J. M. Bollag and A. Leonowicz, "Comparative studies of extracellular fungal laccases," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 48, no. 4, pp. 849–854, 1984, doi: 10.1128/aem.48.4.849-854.1984.
- [96] M. A. Elsayed, M. M. Hassan, A. M. Elshafei, B. M. Haroun, and A. M. Othman, "Optimization of Cultural and Nutritional Parameters for the Production of Laccase by *Pleurotus ostreatus* ARC280," *Br. Biotechnol. J.*, vol. 2, no. 3, pp. 115–132, 2012, doi: 10.9734/bbj/2012/1305.
- [97] É. C. D'Agostini, T. R. D'Agostini Mantovani, J. S. do Valle, L. D. Paccola-Meirelles, N. Barros Colauto, and G. A. Linde, "Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation," *Sci. Agric.*, vol. 68, no. 3, pp. 295–300, 2011, doi: 10.1590/s0103-90162011000300004.
- [98] M. Stajić *et al.*, "Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 38, no. 1–2, pp. 65–73, 2006, doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.03.026.
- [99] G. Palmieri, P. Giardina, C. Bianco, B. Fontanella, and G. Sannia, "Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 66, no. 3, pp. 920–924, 2000, doi: 10.1128/AEM.66.3.920-924.2000.
- [100] M. I. Fonseca, E. Shimizu, P. D. Zapata, and L. L. Villalba, "Copper inducing effect on laccase production of white rot fungi native from Misiones (Argentina)," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 46, no. 6, pp. 534–539, 2010, doi: 10.1016/j.enzmictec.2009.12.017.
- [101] P. Baldrian and J. Gabriel, "Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 206, no. 1, pp. 69–74, 2002, doi: 10.1016/S0378-1097(01)00519-5.
- [102] S. G. Karp *et al.*, "Statistical Optimization of Laccase Production and Delignification of Sugarcane Bagasse by *Pleurotus ostreatus* in Solid-State Fermentation," *Biomed Res. Int.*, 2015, doi: 10.1155/2015/181204.
- [103] M. Akpınar and R. Öztürk Urek, "Induction of fungal laccase production under solid

- state bioprocessing of new agroindustrial waste and its application on dye decolorization," *3 Biotech*, vol. 7, no. 2, pp. 1–10, 2017, doi: 10.1007/s13205-017-0742-5.
- [104] S. G. Karp *et al.*, "Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse," *Bioresour. Technol.*, vol. 114, pp. 735–739, 2012, doi: 10.1016/j.biortech.2012.03.058.
- [105] D. Lestan, M. Lestan, and A. Perdih, "Physiological aspects of biosynthesis of lignin peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 60, no. 2, pp. 606–612, 1994, doi: 10.1128/aem.60.2.606-612.1994.
- [106] Z. Zheng and J. P. Obbard, "Effect of non-ionic surfactants on elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil-slurry by *Phanerochaete chrysosporium*," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 76, no. 4, pp. 423–429, 2001, doi: 10.1002/jctb.396.
- [107] P. Dwivedi, V. Vivekanand, N. Pareek, A. Sharma, and R. P. Singh, "Co-cultivation of mutant *Penicillium oxalicum* SAU E-3.510 and *Pleurotus ostreatus* for simultaneous biosynthesis of xylanase and laccase under solid-state fermentation," *N. Biotechnol.*, vol. 28, no. 6, pp. 616–626, 2011, doi: 10.1016/j.nbt.2011.05.006.
- [108] D. Kumar, V. K. Jain, G. Shanker, and A. Srivastava, "Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse," *Process Biochem.*, vol. 38, no. 12, pp. 1731–1738, 2003, doi: 10.1016/S0032-9592(02)00252-2.
- [109] I. Stoilova, A. Krastanov, and V. Stanchev, "Properties of crude laccase from *Trametes versicolor* produced by solid-substrate fermentation," *Adv. Biosci. Biotechnol.*, vol. 01, no. 03, pp. 208–215, 2010, doi: 10.4236/abb.2010.13029.
- [110] S. Salony, V. Mishra, and V. S. Bisaria, "Production and characterization of laccase from *Cyathus bulleri* and its use in decolourization of recalcitrant textile dyes," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 71, no. 5, pp. 646–653, 2006, doi: 10.1007/s00253-005-0206-4.
- [111] G. Palmieri *et al.*, "Stability and activity of a phenol oxidase from the ligninolytic

- fungus *Pleurotus ostreatus*,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 39, no. 4–5, pp. 632–636, 1993, doi: 10.1007/BF00205066.
- [112] A. Majcherczyk, C. Johannes, and A. Hüttermann, “Oxidation of aromatic alcohols by laccase from *Trametes versicolor* mediated by the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) cation radical and dication,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 51, no. 2, pp. 267–276, 1999, doi: 10.1007/s002530051392.
- [113] R. Zhuo *et al.*, “Heterologous expression and characterization of three laccases obtained from *Pleurotus ostreatus* HAUCC 162 for removal of environmental pollutants,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 344, pp. 499–510, 2018, doi: 10.1016/j.jhazmat.2017.10.055.
- [114] Z. Ding *et al.*, “Production and characterization of laccase from *Pleurotus ferulae* in submerged fermentation,” *Ann. Microbiol.*, vol. 64, no. 1, pp. 121–129, 2014, doi: 10.1007/s13213-013-0640-y.
- [115] L. Liu *et al.*, “Fermentation optimization and characterization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* strain 10969,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 44, no. 6–7, pp. 426–433, 2009, doi: 10.1016/j.enzmictec.2009.02.008.
- [116] S. Aslam, M. Asgher, N. A. Khan, and M. Bilal, “Immobilization of *Pleurotus nebrodensis* WC 850 laccase on glutaraldehyde cross-linked chitosan beads for enhanced biocatalytic degradation of textile dyes,” *J. Water Process Eng.*, vol. 40, 2021, doi: 10.1016/j.jwpe.2021.101971.
- [117] V. A. Parsegian, “Hopes for Hofmeister,” *Nature*, vol. 378, no. 6555, pp. 335–336, 1995, doi: <https://doi.org/10.1038/378335a0>.
- [118] K. Ratanapongleka, “Partitioning behavior of laccase from *Lentinus polychrous* lev in aqueous two phase systems,” *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, vol. 34, no. 1, pp. 69–76, 2012.
- [119] S. Ketnawa, S. Rawdkuen, and P. Chaiwut, “Two phase partitioning and collagen hydrolysis of bromelain from pineapple peel Nang Lae cultivar,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 52, no. 2–3, pp. 205–211, 2010, doi: 10.1016/j.bej.2010.08.012.
- [120] K. Agrawal and P. Verma, “Potential removal of hazardous wastes using white

- laccase purified by ATPS–PEG–salt system: An operational study,” *Environ. Technol. Innov.*, vol. 17, p. 100556, 2020, doi: 10.1016/j.eti.2019.100556.
- [121] S. C. Silvério, O. Rodríguez, A. P. M. Tavares, J. A. Teixeira, and E. A. MacEdo, “Laccase recovery with aqueous two-phase systems: Enzyme partitioning and stability,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 87, pp. 37–43, 2013, doi: 10.1016/j.molcatb.2012.10.010.
- [122] B. Farruggia, R. Rigatuso, L. Capezio, V. Diez, and G. Picó, “Influence of high concentration monovalent cations on the protein partitioning in polyethyleneglycol 1500-phosphate aqueous two-phase systems,” *J. Chromatogr. B*, vol. 809, no. 2, pp. 301–306, 2004, doi: 10.1016/j.jchromb.2004.06.040.
- [123] S. Nalinanon, S. Benjakul, W. Visessanguan, and H. Kishimura, “Partitioning of protease from stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*) by aqueous two-phase systems,” *Process Biochem.*, vol. 44, no. 4, pp. 471–476, 2009, doi: 10.1016/j.procbio.2008.12.018.
- [124] H. Shahbaz-Mohamadi, E. Omidinia, and R. Dinarvand, “Evaluation of recombinant phenylalanine dehydrogenase behavior in aqueous two-phase partitioning,” *Process Biochem.*, vol. 42, no. 9, pp. 1296–1301, 2007, doi: 10.1016/j.procbio.2007.06.005.
- [125] G. Bassani, B. Farruggia, B. Nerli, D. Romanini, and G. Picó, “Porcine pancreatic lipase partition in potassium phosphate-polyethylene glycol aqueous two-phase systems,” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 859, no. 2, pp. 222–228, 2007, doi: 10.1016/j.jchromb.2007.09.038.
- [126] A. M. Goja, H. Yang, M. Cui, and C. Li, “Aqueous Two-Phase Extraction Advances for Bioseparation,” *J. Bioprocess. Biotech.*, vol. 04, no. 01, pp. 1–8, 2013, doi: 10.4172/2155-9821.1000140.
- [127] K. Naganagouda and V. H. Mulimani, “Aqueous two-phase extraction (ATPE): An attractive and economically viable technology for downstream processing of *Aspergillus oryzae* α -galactosidase,” *Process Biochem.*, vol. 43, no. 11, pp. 1293–1299, 2008, doi: 10.1016/j.procbio.2008.07.016.

- [128] S. Yang, Z. Huang, Z. Jiang, and L. Li, "Partition and purification of a thermostable xylanase produced by *Paecilomyces thermophila* in solid-state fermentation using aqueous two-phase systems," *Process Biochem.*, vol. 43, no. 1, pp. 56–61, 2008, doi: 10.1016/j.procbio.2007.10.013.
- [129] A. S. Schmidt, A. M. Ventom, and J. A. Asenjo, "Partitioning and purification of α -amylase in aqueous two-phase systems," *Enzym. Microb. Technol.*, vol. 16, no. 2, pp. 131–142, 1994.
- [130] B. Bertrand *et al.*, "Pleurotus ostreatus laccase recovery from residual compost using aqueous two-phase systems," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 91, no. 8, pp. 2235–2242, 2016, doi: 10.1002/jctb.4995.
- [131] M. González-González and F. Ruiz-Ruiz, "Aqueous Two-Phase Systems for the Recovery of Bioparticles," in *Aqueous Two-Phase Systems for Bioprocess Development for the Recovery of Biological Products*, 2017, pp. 54–78.
- [132] P. Vázquez-Villegas and O. Aguilar, "Continuous Aqueous Two-Phase System Processes," in *Aqueous Two-Phase Systems for Bioprocess Development for the Recovery of Biological Products*, 2017, pp. 141–159.
- [133] E. I. Díaz-Rojas, W. M. Argüelles-Monal, I. Higuera-Ciapara, J. Hernández, J. Lizardi-Mendoza, and F. M. Goycoolea, "Determination of chitin and protein contents during the isolation of chitin from shrimp waste," *Macromol. Biosci.*, vol. 6, no. 5, pp. 340–347, 2006, doi: 10.1002/mabi.200500233.
- [134] M. L. Verma, S. Kumar, A. Das, J. S. Randhawa, and M. Chamundeeswari, "Enzyme Immobilization on Chitin and Chitosan-Based Supports for Biotechnological Applications," in *Sustainable Agriculture Reviews 35*, vol. 35, Springer, Cham, 2019, pp. 147–173.
- [135] J. A. Salazar-Leyva *et al.*, "Utilización de materiales a base de quitina y quitosano en la inmovilización de proteasas: Efectos en su estabilización y aplicaciones," *Rev. Mex. Ing. Química*, vol. 13, no. 1, pp. 129–150, 2014, [Online]. Available: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62029966013>.
- [136] F. Zheng, B. K. Cui, X. J. Wu, G. Meng, H. X. Liu, and J. Si, "Immobilization of

- laccase onto chitosan beads to enhance its capability to degrade synthetic dyes,” *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 110, no. 4, pp. 69–78, 2016, doi: 10.1016/j.ibiod.2016.03.004.
- [137] M. Asgher, S. Noreen, and M. Bilal, “Enhancing catalytic functionality of *Trametes versicolor* IBL-04 laccase by immobilization on chitosan microspheres,” *Chem. Eng. Res. Des.*, vol. 119, pp. 1–11, 2017, doi: 10.1016/j.cherd.2016.12.011.
- [138] M. Bilal and M. Asgher, “Sandal reactive dyes decolorization and cytotoxicity reduction using manganese peroxidase immobilized onto polyvinyl alcohol-alginate beads,” *Chem. Cent. J.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–14, 2015, doi: 10.1186/s13065-015-0125-0.
- [139] A. Kumari and A. M. Kayastha, “Immobilization of soybean (*Glycine max*) α -amylase onto Chitosan and Amberlite MB-150 beads: Optimization and characterization,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 69, no. 1–2, pp. 8–14, 2011, doi: 10.1016/j.molcatb.2010.12.003.
- [140] Ş. A. Çetinus, E. Şahin, and D. Saraydin, “Preparation of Cu(II) adsorbed chitosan beads for catalase immobilization,” *Food Chem.*, vol. 114, no. 3, pp. 962–969, 2009, doi: 10.1016/j.foodchem.2008.10.049.
- [141] O. Kašpar, V. Tokárová, G. S. Nyanhongo, G. Gübitz, and F. Štěpánek, “Effect of cross-linking method on the activity of spray-dried chitosan microparticles with immobilized laccase,” *Food Bioprod. Process.*, vol. 91, no. 4, pp. 525–533, 2013, doi: 10.1016/j.fbp.2013.06.001.
- [142] S. K. Halder *et al.*, “Chitinases biosynthesis by immobilized *Aeromonas hydrophila* SBK1 by prawn shells valorization and application of enzyme cocktail for fungal protoplast preparation,” *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 117, no. 2, pp. 170–177, 2014, doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.07.011.
- [143] R. Bourbonnais and M. G. Paice, “Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation,” *FEBS Lett.*, vol. 267, no. 1, pp. 99–102, 1990, doi: 10.1016/0014-5793(90)80298-w.

- [144] M. Fabbrini, C. Galli, and P. Gentili, "Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase," *J. Mol. Catal. - B Enzym.*, vol. 16, no. 5–6, pp. 231–240, 2002, doi: 10.1016/S1381-1177(01)00067-4.
- [145] S. Sondhi, R. Kaur, S. Kaur, and P. S. Kaur, "Immobilization of laccase-ABTS system for the development of a continuous flow packed bed bioreactor for decolorization of textile effluent," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 117, pp. 1093–1100, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.06.007.
- [146] L. Aricov, A. R. Leonties, I. C. Gîfu, D. Preda, A. Raducan, and D. F. Anghel, "Enhancement of laccase immobilization onto wet chitosan microspheres using an iterative protocol and its potential to remove micropollutants," *J. Environ. Manage.*, vol. 276, 2020, doi: 10.1016/j.jenvman.2020.111326.
- [147] P. P. Champagne and J. A. Ramsay, "Dye decolorization and detoxification by laccase immobilized on porous glass beads," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 7, pp. 2230–2235, 2010, doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.066.
- [148] M. Vera, G. S. Nyanhongo, A. Pellis, B. L. Rivas, and G. M. Guebitz, "Immobilization of *Myceliophthora thermophila* laccase on poly(glycidyl methacrylate) microspheres enhances the degradation of azinphos-methyl," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 136, no. 16, pp. 1–10, 2019, doi: 10.1002/app.47417.
- [149] C. C. S. Fortes, A. L. Daniel-da-Silva, A. M. R. B. Xavier, and A. P. M. Tavares, "Optimization of enzyme immobilization on functionalized magnetic nanoparticles for laccase biocatalytic reactions," *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, vol. 117, no. August 2016, pp. 1–8, 2017, doi: 10.1016/j.cep.2017.03.009.