

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“CARACTERIZACIÓN INICIAL DE LACASAS Y PEROXIDASAS
PRODUCIDAS POR BIOPELÍCULAS DE HONGOS
DECOLORADORES DE TINTES AZOICOS”**

Presentado por:

David Romero Suárez

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO

Lima - Perú

2015

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Enzimas Modificadoras de Lignina.....	4
2.1.1. Lignina Peroxidasas.....	4
2.1.2. Manganeso Peroxidasas.....	6
2.1.3. Lacasas.....	6
2.2. Tintes Sintéticos y Efluentes Coloreados.....	8
2.3. Tratamiento de Efluentes Textiles.....	9
2.4. Biopelículas de Hongos Filamentosos.....	9
2.5. Purificación de Proteínas.....	10
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.1. Materiales.....	11
Equipos.....	12
Material Biológico.....	13
Medios de Cultivo.....	13
3.2. Métodos.....	13
3.2.1. Inóculo.....	13

3.2.2. Formación de Biopelícula.....	14
3.2.3. Producción de Enzimas y Decoloración de Azul Brillante	14
3.2.4. Cinética de Decoloración de Azul Brillante	14
3.2.5. Cinética de Producción de Enzimas en Medio de Producción Suplementado con Azul Brillante.....	15
3.2.6. Cinética de Producción de Enzimas en Medio de Producción Suplementado con CuSO_4 0.02 mM (Medio Basal).....	15
3.2.7. Determinación de la Concentración Óptima de CuSO_4 para la Producción de Lacasas	15
3.2.8. Cinética de Producción de Enzimas en Medio Suplementado con CuSO_4 1.00 mM	16
3.2.9. Cinética de Biomasa Durante la Decoloración y Producción de Enzimas	16
3.2.10. Ensayo de Actividad Enzimática de Lacasas.....	16
3.2.11. Ensayo de Actividad Enzimática de Lignina Peroxidasas.....	17
3.2.12. Prueba de Actividad Enzimática de Manganeso Peroxidasas	17
3.2.13. Determinación de Proteínas Solubles.....	17
3.2.14. Cuantificación de Decoloración de Azul Brillante Mediante Espectrofotometría.....	18
3.2.15. Cuantificación de Decoloración de Azul Brillante mediante HPLC	18
3.2.16. Purificación de Lacasas, Lignina Peroxidasas y Manganeso Peroxidasas	19
3.2.17. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato Sódico (SDS-PAGE)	20
3.2.18. Zimograma en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato Sódico	20
3.2.19. Determinación del Peso Molecular de Proteínas	21

3.2.20. Análisis Estadístico	21
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1. Producción de Enzimas Durante Proceso de Decoloración	22
4.2. Inducción de la Producción de Lacasas en Medio de Cultivo Suplementado con CuSO ₄	25
4.3. Cinética de Producción de Enzimas en Medio de Cultivo Suplementado con CuSO ₄ 1.0 mM.....	29
4.4. Purificación de Proteínas	32
4.5. Determinación de Peso Molecular de la Lacasa Purificada	36
4.6. Decoloración de Azul Brillante con Cultivos de LMBTM5	39
4.7. Degradación de Azul Brillante con Lacasa Purificada	50
V. CONCLUSIONES	54
VI. RECOMENDACIONES	54
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros de Productividad de Lacasas Producidas por <i>Trametes polyzona</i> (LMBTM5).....	32
Tabla 2. Etapas de Purificación de Lacasas Producidas por Biopelículas de <i>Trametes polyzona</i>	33
Tabla 3. Cinética de Degradación (HPLC) de Azul Brillante por Biopelículas de <i>Trametes polyzona</i> (LMBTM5).....	42
Tabla 4. Cinética de Degradación (HPLC) de Azul Brillante por Biopelículas de <i>Trametes polyzona</i> (LMBTM5).....	43
Tabla 5. Decoloración de Azul Brillante (espectrofotometría) con Lacasa Purificada Producida por Biopelículas de <i>Trametes polyzona</i> (LMBTM5)	51
Tabla 6. Decoloración de Azul Brillante (HPLC) con Lacasa Purificada Producida por Biopelículas de <i>Trametes polyzona</i> (LMBTM5).....	51

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo Catalítico de Lignina Peroxidasas.....	6
Figura 2. Mecanismo Catalítico de Lacasas	8
Figura 3. Cinética de Producción de Lacasas de Biopelículas de Trametes polyzona (LMBTM5) en Medio Suplementado con Azul Brillante.....	23
Figura 4. Cinética de Producción de Lignina Peroxidasas de Biopelículas de Trametes polyzona (LMBTM5) en Medio Suplementado con Azul Brillante	24
Figura 5. Cinética de Producción de Manganeso Peroxidasas de Biopelículas de Trametes polyzona (LMBTM5) en Medio Suplementado con Azul Brillante	24
Figura 6. Cinética de Biomasa de Biopelículas de Trametes polyzona (LMBTM5) en Medio Suplementado con Azul Brillante	25
Figura 7. Cinética de Producción de Lacasas de Biopelículas de Trametes polyzona (LMBTM5) en Medio Basal (suplementado con CuSO ₄ 0.02 mM).....	26
Figura 8. Cinética de Biomasa de Biopelículas de Trametes polyzona (LMBTM5) en Medio Basal (suplementado con CuSO ₄ 0.02 mM).....	26
Figura 9. Cinética de Producción de Lacasas de Biopelículas de Trametes polyzona (LMBTM5) en Medio de Suplementado con 0.50, 1.00, 1.50 y 2.00 mM de CuSO ₄	29
Figura 10. Cinética de Producción de Lacasas de Biopelículas de Trametes polyzona (LMBTM5) en Medio Suplementado 1.00 mM de CuSO ₄	31
Figura 11. Cinética de Biomasa de Biopelículas de Trametes polyzona (LMBTM5) en Medio Suplementado 1.00 mM de CuSO ₄	31

Figura 12. Cromatografía de Intercambio Aniónico (Columna IEC DEAE3N-4T) de Cultivos de Biopelículas de Trametes polyzona (LMBTM5) a 280 nm. Gradiente de NaCl 0-1 M en 12 min. Actividad Lacasa de las fracciones 1-19	34
Figura 13. Cromatografía de Intercambio Aniónico (Columna IEC DEAE3N-4T) de Cultivos de Biopelículas de Trametes polyzona (LMBTM5) a 600 nm. Gradiente de NaCl 0-1 M en 12 min. Actividad Lacasa de las Fracciones 1-19	34
Figura 14. Cromatografía de Exclusión por Tamaño (Columna K-803 5 μ m, 8 x 300 mm) de Cultivos de Biopelículas de Trametes polyzona (LMBTM5) a 280 nm. Actividad Lacasa de las Fracciones 1-15	35
Figura 15. Cromatografía de Exclusión por Tamaño (Columna K-803 5 μ m, 8 x 300 mm) de Cultivos de Biopelículas de Trametes polyzona (LMBTM5) a 600 nm. Actividad Lacasa de las Fracciones 1-15	35
Figura 16. SDS-PAGE de lacasa producida por biopelículas de Trametes polyzona (LMBTM5).....	37
Figura 17. Zimograma con ABTS y SDS-PAGE de lacasa producida por biopelículas de Trametes polyzona (LMBTM5)	38
Figura 18. Cinética de Degradación (Espectrofotometría) de Azul Brillante por Biopelículas de Trametes polyzona (LMBTM5).....	42
Figura 19. Cinética de Degradación (Espectrofotometría) de Azul Brillante por Biopelículas de Trametes polyzona (LMBTM5).....	43
Figura 20. Cromatografía de Fase Reversa (Columna ZORBAX SB-C18 5 μ m 4.6 x 150 mm) de Proceso de Decoloración de Azul Brillante durante 0 h con Biopelículas de Trametes polyzona (LMBTM5) a 590 nm.....	44
Figura 21. Cromatografía de Fase Reversa (Columna ZORBAX SB-C18 5 μ m 4.6 x 150 mm) de Proceso de Decoloración de Azul Brillante durante 6 h con Biopelículas de Trametes polyzona (LMBTM5) a 590 nm.....	44

Figura 22. Cromatografía de Fase Reversa (Columna ZORBAX SB-C18 5 µm 4.6 x 150 mm) de Proceso de Decoloración de Azul Brillante durante 12 h con Biopelículas de Trametes polyzona (LMBTM5) a 590 nm	45
Figura 23. Cromatografía de Fase Reversa (Columna ZORBAX SB-C18 5 µm 4.6 x 150 mm) de Proceso de Decoloración de Azul Brillante durante 18 h con Biopelículas de Trametes polyzona (LMBTM5) a 590 nm	45
Figura 24. Cromatografía de Fase Reversa (Columna ZORBAX SB-C18 5 µm 4.6 x 150 mm) de Proceso de Decoloración de Azul Brillante durante 24 h con Biopelículas de Trametes polyzona (LMBTM5) a 590 nm	46
Figura 25. Cromatografía de Fase Reversa (Columna ZORBAX SB-C18 5 µm 4.6 x 150 mm) de Proceso de Decoloración de Azul Brillante durante 48 h con Biopelículas de Trametes polyzona (LMBTM5) a 590 nm	46
Figura 26. Cromatografía de Fase Reversa (Columna ZORBAX SB-C18 5 µm 4.6 x 150 mm) de Proceso de Decoloración de Azul Brillante durante 0 h con Biopelículas de Trametes polyzona (LMBTM5) a 254 nm.....	47
Figura 27. Cromatografía de Fase Reversa (Columna ZORBAX SB-C18 5 µm 4.6 x 150 mm) de Proceso de Decoloración de Azul Brillante durante 6 h con Biopelículas de Trametes polyzona (LMBTM5) a 254 nm.....	47
Figura 28. Cromatografía de Fase Reversa (Columna ZORBAX SB-C18 5 µm 4.6 x 150 mm) de Proceso de Decoloración de Azul Brillante durante 12 h con Biopelículas de Trametes polyzona (LMBTM5) a 254 nm	48
Figura 29. Cromatografía de Fase Reversa (Columna ZORBAX SB-C18 5 µm 4.6 x 150 mm) de Proceso de Decoloración de Azul Brillante durante 18 h con Biopelículas de Trametes polyzona (LMBTM5) a 254 nm	48
Figura 30. Cromatografía de Fase Reversa (Columna ZORBAX SB-C18 5 µm 4.6 x 150 mm) de Proceso de Decoloración de Azul Brillante durante 24 h con Biopelículas de Trametes polyzona (LMBTM5) a 254 nm	49

Figura 31. Cromatografía de Fase Reversa (Columna ZORBAX SB-C18 5 μ m 4.6 x 150 mm) de Proceso de Decoloración de Azul Brillante durante 48 h con Biopelículas de Trametes polyzona (LMBTM5) a 254 nm	49
Figura 32. Cromatografía de Fase Reversa (Columna ZORBAX SB-C18 5 μ m 4.6 x 150 mm) de Proceso de Decoloración de Azul Brillante durante 1 h con Lacasa Purificada de Trametes polyzona (LMBTM5) a 590 nm.....	52
Figura 33. Cromatografía de Fase Reversa (Columna ZORBAX SB-C18 5 μ m 4.6 x 150 mm) de Proceso de Decoloración de Azul Brillante durante 1 h con Lacasa Purificada de Trametes polyzona (LMBTM5) a 254 nm.....	52
Figura 34. Cromatografía de Fase Reversa (Columna ZORBAX SB-C18 5 μ m 4.6 x 150 mm) de Proceso de Decoloración de Azul Brillante Durante 12 h con Lacasa Purificada de Trametes polyzona (LMBTM5) a 590 nm.....	53
Figura 35. Cromatografía de Fase Reversa (Columna ZORBAX SB-C18 5 μ m 4.6 x 150 mm) de Proceso de Decoloración Azul Brillante durante 12 h con Lacasa Purificada de Trametes polyzona (LMBTM5) a 254 nm.....	53

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Comparación de Biomasa en Cultivos de Biopelícula (g/L) durante la Producción de Lacasas en Medio con Azul Brillante a las 0, 24, 48, 72 y 96 h de Cultivo.....	65
Anexo 2. Comparación de Producción de Lacasas en Medio Basal (Suplementado con $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) y Medio con Azul Brillante.....	66
Anexo 3. Comparación de Biomasa en Cultivos de Biopelícula (g/L) durante la Producción de Lacasas en Medio Basal (Suplementado con $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas de cultivo.....	68
Anexo 4. Comparación de Producción de Lacasas Inducidas por Diferentes Dosis de Cobre.....	69
Anexo 5. Comparación de Lacasas en Medio con $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0 mM a las 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 y 216 h de cultivo	75
Anexo 6. Comparación de Biomasa en Cultivos de Biopelícula (g/L) durante la Producción de Lacasas en Medio con $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0 mM a las 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 y 216 h de cultivo.....	77
Anexo 7. Comparación de Biomasa en Cultivos de Biopelícula (g/L) durante la Producción de Lacasas en Medio Basal (suplementado con $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0 mM 0.02 mM), Medio con $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0 mM y Medio con Azul Brillante	79
Anexo 8. Curva Estándar- Cinética de Degradación 0-96 h (HPLC) de Azul Brillante por Biopelículas de <i>Trametes polyzona</i> (LMBTM5)	82
Anexo 9. Curva Estándar. Cinética de Degradación 0-48 h (HPLC) de Azul Brillante por Biopelículas de <i>Trametes polyzona</i> (LMBTM5).....	83

Anexo 10. Curva Estándar- Decoloración de Azul Brillante (HPLC) con Lacasa Purificada Producida por Biopelículas de Trametes polyzona (LMBTM5)	84
--	----

RESUMEN

En el presente estudio se purificó una lacasa de cultivos de biopelícula de la cepa LMBTM5 del hongo basidiomiceto *Trametes polyzona* y se determinó su capacidad de decoloración del tinte azul brillante. Los cultivos de este hongo fueron capaces de decolorar el tinte azul brillante en un porcentaje mayor a 97.5% a las 24 horas del proceso de decoloración.

Para la producción de enzimas involucradas en el proceso de decoloración se ensayaron diferentes concentraciones de CuSO_4 en el medio de cultivo, siendo 1.0 mM la concentración con la que se observó la mayor producción de lacasas. En cultivos con 1.0 mM de CuSO_4 de 216 horas se observó la mayor actividad enzimática a las 120 horas, 2704.69 U/L. En este punto también se observó la mayor actividad específica, 4971.16 U/mg y el mayor valor de productividad volumétrica (Γ), $14.09 \text{ U l}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Además se observó una productividad específica (qp) de $12.57 \text{ U g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Las actividades enzimáticas de lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa fueron mínimas.

Para la purificación de la enzima se utilizó ultrafiltración, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de exclusión por tamaño. Se empleó SDS-PAGE para determinar el peso molecular de la proteína purificada, este fue 59.4 kDa. Además, se observó que la enzima purificada fue capaz de decolorar más de 75% de azul brillante en una hora.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la industria textil desecha grandes cantidades de tintes en sus efluentes (Zengin et al. 2012, Zollinger 2003). Algunos de estos tintes tienen efectos negativos en el medio ambiente (Banat et al. 1996, Rodríguez 2009) y la salud humana (Bhaskar et al. 2003, Øllgaard et al. 1998, Siemiatycki et al. 2004).

Existen diferentes alternativas para el tratamiento de efluentes con tintes sintéticos, incluyendo tratamientos físicos, químicos y biológicos, pero los dos primeros son de alto costo (Robinson et al. 2001). Los tratamientos biológicos de efluentes textiles son atractivos porque son de bajo costo, amigables con el medio ambiente y aceptados públicamente (McMullan et al. 2001).

Los hongos degradadores de lignina son los microorganismos más eficientes en la degradación de tintes sintéticos (Wesenberg et al. 2003), por lo cual su uso en el tratamiento de efluentes textiles es una alternativa interesante. Estos hongos producen enzimas que degradan lignina, que además son capaces de degradar otros contaminantes ambientales (Aust 1995, Pointing 2001, Scheibner et al. 1997) incluyendo tintes sintéticos (Wesenberg et al. 2003). Entre estas enzimas se encuentran las lacasas, lignina peroxidasas y manganeso peroxidasas (Wesenberg et al. 2003).

Se ha demostrado que las biopelículas de hongos filamentosos tienen alta producción de enzimas (Gutiérrez-Correa et al. 2012). Asimismo, se ha reportado la eficiencia de biopelículas de una cepa (Kapdan y Kargi 2002) o de consorcios de varias cepas (Yang et al. 2009) para degradar tintes sintéticos. Para mejorar la eficiencia de los procesos de tratamiento de efluentes de la industria textil, es necesario entender los mecanismos involucrados en la decoloración de tintes, entre ellos la cinética de producción de las enzimas relacionadas a la degradación de compuestos xenobióticos.

En esta investigación se evaluó la degradación del tinte antraquinónico azul brillante (*Remazol Brilliant Blue R*) con cultivos de biopelícula de la cepa LMBTM5 del hongo *Trametes polizona*. Además, se observó la producción de lignina peroxidasas, manganeso

peroxidasas y lacasas durante el proceso de decoloración. Se purificó una lacasa de los cultivos de este hongo y se comprobó que la enzima purificada fue capaz de degradar el tinte azul brillante.

Hipótesis

Las enzimas lacasas y peroxidasas de biopelículas de hongos decoloradores están involucradas en la decoloración y/o degradación de tintes sintéticos y estas enzimas pueden ser separadas y caracterizadas.

Objetivo General

Caracterizar las lacasas, lignina peroxidasas y manganeso peroxidasas producidas por biopelículas de hongos decoloradores de tintes sintéticos.

Objetivos Específicos

-Purificar lacasas, lignina peroxidasas y manganeso peroxidasas extracelulares de biopelículas de hongos decoloradores de tintes sintéticos mediante técnicas cromatográficas.

-Determinar la actividad enzimática específica de las enzimas purificadas.

-Estimar el peso molecular de las lacasas y peroxidasas purificadas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Enzimas Modificadoras de Lignina

Los hongos de la pudrición blanca (del inglés *white rot fungi*, WRF) son el grupo microbiano más eficiente en degradar la lignina (Kerem et al. 1992), un polímero complejo aromático que se encuentra en paredes celulares de plantas vasculares (Hofrichter 2002). Este grupo de hongos está formado principalmente por basidiomicetos pero también incluye algunos ascomicetos (Kirk 1987). Los basidiomicetos de la pudrición blanca son capaces de resistir condiciones adversas durante la degradación de la madera, entre las que se incluyen: baja concentración de nitrógeno y presencia de compuestos tóxicos y antibióticos (Martínez et al. 2005).

Debido a la estructura de la lignina las enzimas que la degradan deben ser extracelulares, no específicas y no hidrolíticas (Kirk 1987). Las enzimas responsables de la degradación de la lignina son llamadas enzimas modificadoras de lignina (del inglés *lignin-modifying enzymes*, LME).

Las enzimas LME incluyen cuatro oxidoreductasas: lacasa (Lac, E.C. 1.10.3.2), lignina peroxidasa (LiP, E.C. 1.11.1.14), manganeso peroxidasa (MnP, E.C. 1.11.1.13) y peroxidasa versátil VP (VP; EC 1.11.1.16) (Wong 2009) que están involucradas en la degradación de diferentes contaminantes ambientales orgánicos (Aust 1995, Scheibner et al. 1997, Pointing 2001, Reddy 1995) incluyendo tintes sintéticos (Wesenberg et al. 2003). No todos los hongos producen todas las enzimas LME, existen reportes de hongos que producen una, dos o tres enzimas (Hatakka 1994).

2.1.1. Lignina Peroxidasas

Las lignina peroxidasas (LiP) catalizan la despolimerización oxidativa de la lignina (Wong 2009). Inicialmente se reportaron en *Phanerochaete chrysosporium* como enzimas dependientes de H₂O₂ cuyos productos de reacción eran equivalentes a los productos metabólicos aislados de cultivos lignolíticos (Kirk y Tien 1983, Glenn et al. 1983). Estas

enzimas fueron luego purificadas y caracterizadas. Los pesos moleculares fueron de 41-42 kDa y sus espectros de absorción mostraron picos cercanos a 410 nm y 500 nm debido a que contienen un grupo protohemo IX por molécula (Gold et al. 1984, Kuwahara et al. 1984, Tien y Kirk 1984).

En general las LiP son de peso molecular de entre 38-47 kDa, de puntos isoeléctricos de 3.2-4.0, con un pH óptimo cercano a 3 y están glucosiladas (Wesenberg et al. 2003, Wong 2009). Las LiP reaccionan con compuestos aromáticos tomando electrones de sus anillos lo que resulta en reacciones de escisión (Zheng y Obbard 2002).

El ciclo catalítico de las lignina peroxidadas es similar al de otras peroxidadas (Figura 1). El grupo hemo de la enzima nativa, que contiene Fe(III), es oxidado con dos electrones de H₂O₂ siendo el producto el compuesto I, que contiene un catión de hierro porfirina [Fe(IV)=O.+]. Durante esta reacción el sustrato H₂O₂ es reducido a agua mediante la escisión del enlace O-O. En el siguiente paso del ciclo catalítico se produce una reducción con un electrón proveniente de un sustrato donador de electrones como el *veratryl alcohol*, el producto de esta reacción es el compuesto II que contiene Fe(IV)=O. Una segunda reducción con otro electrón de un donador, regresa el hierro de la enzima a su estado de oxidación inicial Fe(III), completándose el ciclo catalítico (Renganathan y Gold 1986, Zhao 2004, Wong 2009).

A pH 3 en exceso de H₂O₂ y en ausencia de sustrato reductor, el compuesto II reacciona con H₂O₂ para formar el compuesto III, una forma inactiva de la enzima, en la que el hierro existe como complejo oxidado de hierro (*ferric-superoxo complex*) [Fe(III) O₂⁻]. El compuesto III puede ser convertido a la enzima nativa mediante autooxidación espontánea o por oxidación con un radical de *veratryl alcohol* (Wariishi y Gold 1989, Cai y Tieng 1992).

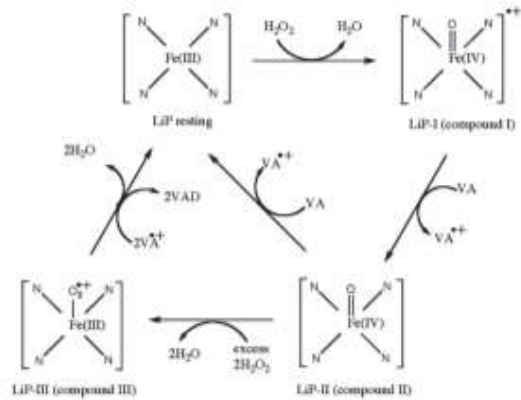


Figura 1. Mecanismo Catalítico de Lignina Peroxidasas (Wong 2009).

2.1.2. Manganese Peroxidasas

Las manganeso peroxidasas (MnP) contienen el grupo prostético hemo (Glenn et al. 1985), son glucosiladas y de pesos moleculares entre 32 y 99 kDa (Hofrichter 2002). Estas enzimas son capaces de oxidar Mn(II) a Mn(III) (Glenn et al. 1985) que luego es estabilizado por queladores como malonato y oxalato (Wariishi y Gold 1999). El Mn (III) actúa como un mediador redox difusible y permite a las MnP oxidar lignina, compuestos orgánicos y compuestos recalcitrantes (Kirk 1987, Wesenberg et al. 2003).

Las MnP se descubrieron en cultivos lignolíticos de *Phanerochaete chrysosporium*. Se purificó una enzima de 46 kDa y fue caracterizada como dependiente de H₂O₂ y además dependiente de Mn(II) y lactato. Esta enzima fue capaz de degradar los colorantes rojo fenol, *o*-dianisidine y Poly R (Kuwahara et al. 1984). Debido a que contienen una molécula del grupo hemo por cada proteína, las MnP tienen su máximo de absorción a 406 nm (Glenn et al. 1985).

El ciclo catalítico de las MnP es similar al de las LiP. El primer paso es la oxidación de la MnP nativa al compuesto I (MnP-I). El MnP I cataliza la oxidación de Mn(II) a Mn(III) reduciéndose a MnP-II. Finalmente el MnP-II cataliza la oxidación de Mn(II) a Mn(III). El Mn(III) es capaz de oxidar sustratos orgánicos (Wong 2009).

2.1.3. Lacasas

Esta enzima se conoce desde finales de siglo XIX cuando fue descubierta en el árbol *Rhus vernicifera* (Witayakran y Ragauskas 2009). Además de encontrarse en plantas, esta

enzima se puede encontrar en hongos y bacterias (Morozova et al. 2007) siendo más frecuente en hongos (Mayer y Staples 2002).

Las lacasas son glucoproteínas, de punto isoelectrico (pI) de entre 2.6 y 7.5 pero generalmente en el rango 3.0-5.0 (Morozova et al. 2007). Las lacasas monoméricas tienen pesos moleculares de entre 50 y 110 kDa. Además, se han reportado lacasas diméricas y tetraméricas (Wesenberg et al. 2003). Estas enzimas pertenecen a un grupo de enzimas llamadas oxidasas de cobre azules (*blue copper oxidases*) que tienen átomos de cobre en el centro activo (Baldrian 2006) y son capaces de oxidar fenoles, aminas aromáticas y otros compuestos, pero no tirosina, reduciendo el oxígeno a agua (Hou et al. 2004, Baldrian 2006). Se ha reportado que catorce especies de hongos basidiomicetos producen lacasas intracelulares y extracelulares (Blaich y Esser 1975). Sin embargo, la mayor parte de la enzima (95%) es extracelular (Morozova et al. 2007).

Las lacasas catalizan la oxidación de un sustrato, reduciendo dos moléculas de oxígeno molecular a agua con dos electrones por cada molécula de oxígeno (Figura 2). El primer paso del ciclo catalítico de las lacasas es la oxidación del sustrato. La enzima es reducida por cuatro electrones procedentes del sustrato, los cuatro átomos de cobre de la proteína cambian su estado de oxidación de Cu^{2+} a Cu^{+} . Así la enzima pasa de su estado *resting* (oxidada) a un estado reducido. Se necesita cuatro moléculas de sustrato donadoras de un electrón cada una para reducir la enzima. La oxidación del dióxigeno se lleva a cabo en dos pasos vía formación de intermediarios unidos a oxígeno (Figura 2) (Morozova et al. 2007, Wong 2009).



Figura 2. Mecanismo Catalítico de Lacasas (Wong 2009).

Se han propuesto diferentes aplicaciones para las lacasas entre ellas *biopulping* y *biobleaching* en la industria forestal (Widsten y Kandelbauer 2008), procesamiento de bebidas en la industria de alimentos (Minussi et al. 2002), síntesis química (Witayakran y Ragauskas 2009) y biorremediación (Mougin et al. 2003) incluyendo tratamiento de efluentes industriales coloreados (Wesenberg et al. 2003).

2.2. Tintes Sintéticos y Efluentes Coloreados

Anualmente se producen aproximadamente 0.9 millones de toneladas de colorantes orgánicos y la industria textil utiliza la mitad (Zollinger 2003). En 1978, se estimó que 50000 toneladas de la producción de colorantes fue desechada en los efluentes de la industria (Zengin et al. 2012). Los tintes sintéticos usados en la industria textil están diseñados para resistir la decoloración producida por diferentes factores entre ellos exposición a la luz, agua, sudor, productos químicos y ataque de microorganismos (Wesenberg et al. 2003).

Incluso en concentraciones muy pequeñas (menos de 1 ppm para algunos colorantes) la presencia de colorantes es altamente visible (Banat et al. 1996); su presencia disminuye la penetración de luz solar en los cuerpos de agua, retarda la fotosíntesis, inhibe el crecimiento de la biota acuática e interfiere con la solubilidad de gases (Rodríguez 2009).

Como ejemplo de la toxicidad de los tintes sintéticos se puede citar la toxicidad de los tintes azoicos, el grupo más grande de colorantes, en términos de número y volumen de producción (Zollinger 2003). La toxicidad aguda de los estos tintes, definida por criterios de la Unión Europea para la clasificación de sustancias peligrosas es baja. La mayoría de tintes azoicos tienen una dosis letal media (LD_{50}) de 250-2,000 mg/kg de peso corporal, sólo unos pocos tintes tienen LD_{50} menores a 250 mg/kg. Se ha relacionado algunos de estos tintes con irritaciones de la piel y alergia, pero la gran variedad de tintes y nombres comerciales de cada uno de ellos hace difícil un seguimiento (Øllgaard et al. 1998). Además, se consideran posibles carcinógenos (Siemiatycki et al. 2004). Los tintes azoicos pueden ser metabolizados a aminas aromáticas por la acción de microorganismos intestinales o enzimas del hígado (Chung et al. 1992). Varias aminas aromáticas han sido clasificadas como cancerígenas para humanos por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (Bhaskar et al. 2003).

2.3. Tratamiento de Efluentes Textiles

Generalmente los tintes de los efluentes son tratados por métodos fisicoquímicos, sin embargo, estos tratamientos son efectivos en volúmenes pequeños de efluentes y tienen un costo elevado (Robinson et al. 2001). Los microorganismos son capaces de decolorar y metabolizar tintes, y su uso en tecnologías de biorremediación para el tratamiento de efluentes textiles ha atraído interés (McMullan et al. 2001). Los hongos degradadores de lignina son los microorganismos más eficientes en degradar tintes sintéticos. Esto se debe a su capacidad de producir enzimas extracelulares modificadoras de lignina, las que carecen de especificidad de sustrato y gracias a ellos pueden degradar diferentes compuestos xenobióticos (Wesenberg et al. 2003). A pesar que existen estudios en sobre la degradación y decoloración de tintes textiles por hongos degradadores de lignina, el desarrollo de tecnologías de tratamiento de efluentes utilizando estos microorganismos ha sido limitada (McMullan et al. 2001).

Diferentes grupos de investigación han estudiado la capacidad de bacterias para metabolizar tintes sintéticos. Se ha reportado que en condiciones aeróbicas las bacterias pueden degradar algunos tintes azoicos pero estos no son completamente mineralizados, mientras que en condiciones anaeróbicas la degradación de estos tintes puede resultar en la producción de aminas aromáticas (Robinson et al. 2001).

2.4. Biopelículas de Hongos Filamentosos

Las biopelículas son comunidades complejas, interdependientes de microorganismos asociados a superficies (Jabra-Rizk et al. 2004). Las biopelículas están conformadas por los microorganismos y productos extracelulares, por lo general polisacáridos. Estas estructuras sirven para proteger a los microorganismos de ambientes hostiles (Sandholm y Wirtanen 2009). La adhesión de los hongos entre sí o a superficies y la capacidad de estar organizados dentro de sustancias poliméricas les permite formar biopelículas (Ramage et al. 2011). Las fermentaciones por biopelículas de hongos filamentosos (FFB) tienen características de los procesos de fermentación en estado sólido (SSF) incluyendo su productividad y se llevan a cabo en un medio líquido, siendo la producción de enzimas mayor que en la fermentación sumergida (Gutiérrez-Correa et al. 2012).

2.5. Purificación de Proteínas

La purificación de proteínas consiste de una serie de procesos cuyo objetivo es aislar un tipo de proteína de una mezcla compleja (Shanmugam 2009). Para la purificación de proteínas deberán tomarse en cuenta diferentes consideraciones, entre ellas la cantidad requerida, necesidad de retener la actividad biológica, grado de pureza, entre otras (Cutler 2004). El proceso de purificación de proteínas involucra los siguientes pasos: (1) precipitación, (2) diálisis o ultrafiltración, (3) técnicas cromatográficas y (4) verificación de la pureza mediante electroforesis, cromatografía o espectrofotometría (Shanmugam 2009). A partir de una proteína purificada se pueden determinar: parámetros bioquímicos como la constante de Michaelis-Menten (K_m), efectos de activadores o inhibidores, peso molecular, modificaciones post-traduccionales, secuencia de aminoácidos (Bonner 2007).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de Ejecución

Laboratorio de Micología y Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.1. Materiales

Material de Plástico

- Microtubos de 1.5 mL y 2.0 mL
- Puntas de micropipeta de 10-200 μ L, 100-1000 μ L
- Placas Petri
- Cubetas de espectrofómetro
- Tubos cónicos de 50 y 15 mL
- Tubos cónicos para filtración por centrifugación (10 kDa)

Material de Vidrio

- Matraces de 250 mL
- Perlas de 3 y 12 mm de diámetro
- Pipetas de 10 mL
- Probetas de 50, 100, 500 y 1000 mL
- Tubos de ensayo 25 x 250 mm
- Vasos de precipitado de 50, 100, 250 y 500 mL
- Botellas de vidrio para laboratorio de 250 y 1000 mL
- Embudo *Bushner*
- Matraces Kitasato de 500 y 1000 mL

Otros Materiales

- Asa de siembra

- Sacabocados de 5 y 10 mm de diámetro
- Tela de poliéster
- Papel Filtro
- Micropipetas
- Jeringas de 20 y 50 μ L para equipo de HPLC
- Filtros de jeringa con membrana de 0.22 μ m
- Jeringas de 10 y 20 mL
- Membrana de 0.22 μ m
- Cassette para ultrafiltración con *cut off* de 10kDa
- Columna para cromatografía fase reversa ZORBAX SB-C18 5 μ m 4.6 x 150 mm (Agilent)
- Columna para cromatografía de intercambio iónico IEC DEAE3N-4T 4.6 x 35 mm (Shodex)
- Columna para cromatografía de exclusión por tamaño Shodex K-803 Column, 5 μ m, 8 x 300 mm (Shodex)

Equipos

- Autoclave
- Balanza analítica
- Agitadores orbitales
- Cámara de flujo laminar
- Vórtex
- Potenciómetro
- Microscopio binocular
- Cámara Fotográfica
- Horno de secado
- Horno microondas
- Incubadora de 28 °C
- Refrigeradora de 4 °C
- Congeladora de -20 °C
- Microcentrífuga
- Centrífuga
- *Thermoblock*

- Equipo de Ultrafiltración (Sistema TFF)
- Espectrofotómetro
- Equipo de HPLC (Agilent Technologies, Serie 1200)
- Cámara de electroforesis y fuente de poder

Material Biológico

- Cepa LMBTM5, *Trametes polyzona* (Cerrón Alván 2014)

Medios de Cultivo

1. Medio malta (inóculo/biopelícula)
2. Medio de producción/decoloración
3. Medio de producción suplementado con 0.02 mM de CuSO₄ (medio basal)
4. Agar extracto de Malta

3.2. Métodos

3.2.1. Inóculo

1. Se sembró la cepa LMBTM5 en placas Petri con agar extracto de malta y se incubó a 28 °C durante 72 a 96 horas.
2. Con ayuda de un sacabocado se tomaron tres discos de 1cm de diámetro y se introdujeron en matraces de 250 mL con 50 mL de medio malta y 6 esferas de vidrio de 12 mm de diámetro. La composición por litro del medio utilizado, medio malta, fue la siguiente: glucosa 7 g, peptona 3 g, extracto de levadura 2 g, extracto malta 2 g. Se ajustó el medio a pH 6.
3. Los matraces con discos de agar fueron incubados a 28 °C y con agitación a 175 rpm durante 72 horas.
4. Se colectó el contenido de cada matraz en un tubo cónico de 50 mL, se centrifugó por 10 minutos a 4000 rpm y se descartó el sobrenadante y se conservó la biomasa.
5. Se añadieron perlas de vidrio de 3 mm de diámetro y NaCl 0.85% en los tubos con biomasa en una proporción de volumen de 2:4:1 de biomasa, NaCl 0.85% y perlas de vidrio.
6. Se agitaron los tubos en Vortex durante 1 minuto a 2000 rpm

3.2.2. Formación de Biopelícula

1. Se añadieron 2.5 mL del inóculo en matraces de 250 mL con 50 mL de agua destilada y un cuadrado de tela de poliéster de 2.6 x 2.6 cm.
2. Se agitaron los matraces con inóculo y soporte de tela durante 30 minutos a 175 rpm. A este periodo se le denomina tiempo de adhesión.
3. Se retiró el agua de los matraces con los restos de inóculo que no se adhirieron a la tela de poliéster
4. Se añadió 50 mL de agua destilada y se agitaron los matraces durante 15 minutos. Este proceso se llevó a cabo dos veces
5. Se colocó la tela con inóculo adherido en matraces con medio malta.
6. Se incubaron los matraces a 28 °C y con agitación a 175 rpm durante 72 horas.

3.2.3. Producción de Enzimas y Decoloración de Azul Brillante

1. Luego de la formación de biopelículas se hicieron dos lavados con NaCl 0.85% de 15 minutos cada uno.
2. Se transfirieron las biopelículas a matraces de 250 mL con 50 mL de medio de producción de enzimas (en adelante medio de producción) cuya composición por litro de medio es la siguiente: 0.1 g de glucosa, 0.1 g de extracto de levadura, 0.2 g de KH_2PO_4 , 0.05 g de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 0.016 g de $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ y 0.013 g de $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$. Para el medio de producción basal se añadió CuSO_4 hasta una concentración de 0.02 mM en el medio de cultivo antes de autoclavar. Para los demás ensayos se añadió CuSO_4 para obtener concentraciones finales de 0.5 mM, 1.00 mM, 1.50 mM y 2.00 mM o azul brillante para una concentración final de 0.4 g/L (400 ppm) al medio. Las soluciones de CuSO_4 y azul brillante se agregaron luego de autoclavar el medio de cultivo. Se incubaron los matraces a 28 °C y con agitación a 175 rpm de acuerdo a los requerimientos de los experimentos.

3.2.4. Cinética de Decoloración de Azul Brillante

Para evaluar la decoloración del tinte sintético azul brillante con biopelículas de la cepa LMBTM5 se usaron matraces de 250 mL con 50 mL medio de producción de enzimas suplementado con 0.4 g/L de azul brillante. Se incubaron los matraces con las biopelículas a 28 °C y 175 rpm. Los experimentos se realizaron por duplicado, se colectaron dos matraces cada 24 horas como muestra. Las muestras fueron tomadas a las 0, 24, 48, 72 y

96 horas de cultivo. Para evaluar en detalle la cinética de decoloración se tomaron muestras a las 0, 6, 12, 18, 24 y 48 horas de cultivo.

La muestra se filtró con papel filtro y se separó en alícuotas para evaluar la decoloración del tinte azul brillante. Se almacenaron las muestras a -20 °C hasta el momento de las mediciones. La decoloración se evaluó por espectrofotometría y cromatografía de fase reversa.

3.2.5. Cinética de Producción de Enzimas en Medio de Producción Suplementado con Azul Brillante

Para la cuantificación de la producción de enzimas de la cepa LMBTM5 durante la decoloración del tinte azul brillante se usaron biopelículas en matraces de 250 mL con 50 mL de medio de producción con 0.4 g/L del tinte. Se incubaron los matraces con biopelículas a 28 °C y con agitación a 175 rpm. Los experimentos se realizaron por duplicado, se colectaron dos matraces cada 24 horas como muestra. Las muestras fueron tomadas a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas de cultivo. Se filtró el medio de cultivo con papel filtro y se separó en alícuotas. Se almacenaron las muestras a -20 °C hasta el momento de las mediciones de actividad enzimática de lacasas, lignina peroxidasas y manganeso peroxidasas.

3.2.6. Cinética de Producción de Enzimas en Medio de Producción Suplementado con CuSO₄ 0.02 mM (Medio Basal)

Para cuantificar la producción de enzimas durante la fermentación en medio de producción basal se usaron biopelículas en matraces de 250 mL con 50 mL medio de producción basal. Los experimentos se realizaron por duplicado, se colectaron matraces cada 24 horas como muestra. Las muestras fueron tomadas a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas de cultivo. Se filtró el medio de cultivo con papel filtro y se separó en alícuotas. Se almacenaron las muestras a -20 °C hasta el momento de las mediciones de actividad enzimática de lacasas, lignina peroxidasas y manganeso peroxidasas.

3.2.7. Determinación de la Concentración Óptima de CuSO₄ para la Producción de Lacasas

Para determinar de concentración óptima de CuSO₄ en el medio para la producción de lacasas se usaron biopelículas en matraces de 250 mL con 50 mL de medio de producción suplementado con CuSO₄ a 0.50 mM, 1.00 mM, 1.50 mM y 2.00 mM, incubados a 28 °C y con agitación a 175 rpm. Se tomaron alícuotas de 2 mL a las 24, 48, 72 y 96 horas de

cultivo y alícuotas de 1 mL a las 120, 168, 216 y 264 horas de cultivo. Se almacenaron las muestras a -20 °C hasta el momento de las mediciones de la actividad enzimática de lacasas. Los experimentos se realizaron por duplicado.

3.2.8. Cinética de Producción de Enzimas en Medio Suplementado con CuSO₄ 1.00 mM

Para cuantificar la producción de enzimas durante la fermentación en medio suplementado con CuSO₄ 1.00 mM se usaron biopelículas en matraces de 250 mL con 50 mL de medio de producción. Se incubaron los matraces con las biopelículas a 28 °C y con agitación a 175 rpm. Los experimentos se realizaron por duplicado, se colectaron dos matraces cada 24 horas para evaluar la producción de enzimas. Las muestras fueron tomadas a las 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 y 216 horas de cultivo. Se filtró el medio de cultivo con papel filtro y se separó en alícuotas. Se almacenaron las muestras a -20 °C hasta el momento de las mediciones de actividad enzimática de lacasas, lignina peroxidasas y manganeso peroxidasas.

3.2.9. Cinética de Biomasa Durante la Decoloración y Producción de Enzimas

Luego de filtrar los medios de cultivo de las fermentaciones, se secaron las biopelículas a 105 °C hasta que el peso de la biomasa fue constante. El peso en gramos corresponde al peso seco para 50 mL de medio de cultivo. Los valores reportados tienen como unidades gramos de biomasa seca por litro de medio de cultivo (g/L).

3.2.10. Ensayo de Actividad Enzimática de Lacasas

El ensayo de determinación de actividad de lacasa está basada en lo reportado por Niku-Paavola et al. (1990), Shin y Lee (2000) y Souza et al. (2011). El sustrato de la reacción fue *2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)* (ABTS). La mezcla de reacción contenía: 600 µL de buffer acetato 40 mM pH 4.0, 200 µL de agua destilada, 200 µL de muestra adecuadamente diluida y 200 µL de ABTS 1mM. Para iniciar la reacción se añadió 200 µL de la solución de ABTS 1 mM. La reacción se llevó a cabo por 2 minutos a 25 °C. Para detener la reacción se añadieron 300 µL de H₂SO₄ 1 M. El producto coloreado de la reacción se detectó mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 420 nm. El coeficiente de extinción molar (ϵ_{420}) usado fue 36000 cm⁻¹ M⁻¹. Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que es necesaria para oxidar 1 µmol de ABTS por minuto.

3.2.11. Ensayo de Actividad Enzimática de Lignina Peroxidasas

Se utilizó el ensayo para determinación de la actividad enzimática de LiP reportado por Linko y Haapala (1993). En este ensayo el sustrato de la reacción es *veratryl alcohol*. La mezcla de reacción contenía: 300 μL de buffer tartrato 0.393M pH 3.0, 400 μL de agua destilada, 200 μL de muestra adecuadamente diluida, 100 μL de *veratryl alcohol* 4 mM y 6 μL de H_2O_2 54 mM. Para iniciar la reacción se añadió 6 μL de la solución de H_2O_2 54 mM. La reacción enzimática se llevó a cabo por 5 minutos a 23 °C. Para detener la reacción se añadieron 500 μL de H_2SO_4 1 M. El producto de la reacción, veratraldehído, se detectó mediante espectrofotometría a 310 nm. El coeficiente de extinción molar (ϵ_{420}) usado fue 9300 $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$. Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que es necesaria para oxidar 1 μmol de *veratryl alcohol* por minuto.

3.2.12. Prueba de Actividad Enzimática de Manganese Peroxidasas

El ensayo de determinación de actividad de MnP está basado en lo reportado por Castillo et al. (1994). En la reacción de este ensayo hay dos sustratos: *3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone* (MBTH) y *3-(dimethylamino) benzoic acid* (DMAB). La mezcla de reacción contiene: 250 μL de buffer succinato-lactato 400 mM pH 4.5, 50 μL de MnSO_4 3 mM, 250 μL de DMAB 3.96 mM, 250 μL de MBTH 0.28 mM, 100 μL de H_2O_2 0.1 mM y 150 μL de muestra adecuadamente diluida. Para iniciar la reacción se añadió la muestra adecuadamente diluida. La reacción se llevó a cabo a 37 °C durante 2 minutos. Para detener la reacción se añadieron 500 μL H_2SO_4 1 M. El producto coloreado de la reacción se detectó mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 590 nm ($\epsilon_{590} = 53000 \text{ cm}^{-1} \text{M}^{-1}$). Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que es necesaria para producir 1 μmol de producto por minuto.

3.2.13. Determinación de Proteínas Solubles

Para la determinación de la proteína total se usó el ensayo de Lowry (Waterborg 2009). Para ello se prepararon tres soluciones A (Na_2CO_3 al 2% en 1 M de NaOH), B1 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5%) y B2 (tartrato de sodio al 1%) y se las combinó en una proporción de 100:1:1 para obtener la solución C. Para la mezcla de reacción se utilizó 800 μL de muestra, 1000 μL de solución C, se agitó y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se añadió 400 μL de reactivo de Folin (1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sodio) 1 N, se agitó y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Después se leyeron las absorbancias de las muestras a 550 nm.

3.2.14. Cuantificación de Decoloración de Azul Brillante Mediante Espectrofotometría

Previo al análisis por espectrofotometría y HPLC se filtraron las muestras utilizando papel filtro de paso medio. Para la medición de la decoloración de azul brillante por espectrofotometría se midieron las absorbancias de las muestras a 590 nm, en diluciones adecuadas.

La decoloración se calculó según la fórmula:

$$\text{Porcentaje de decoloración (\%)} = \frac{(A_0 - A_t)}{(A_0)}$$

Donde:

A_t : Absorbancia de la muestra a las t horas de cultivo

A_0 : Absorbancia de la muestra a las 0 horas de cultivo

3.2.15. Cuantificación de Decoloración de Azul Brillante mediante HPLC

Previo al análisis, se filtraron las muestras con membranas de ésteres de celulosa con un tamaño de poro de 0.22 μm (PVC Millex-GS, Millipore) y se almacenaron a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta el análisis.

Para el análisis se usó el cromatógrafo 1200 Infinity Series (Agilent Technologies). Se utilizó la técnica de HPLC de fase reversa con la columna ZORBAX SB-C18 5 μm , 4.6 x 150mm. Para las corridas de cromatografía de fase reversa se emplearon como fase móvil: (A) NaH_2PO_4 20mM pH 4.6 y (B) metanol/acetonitrilo 50/50 (v/v). La gradiente utilizada fue: 1-12 minutos 5-80% de B. Para el lavado de la columna se usó la siguiente gradiente: 12-12.1 minutos, 80-98% de B, 12.1-14 minutos 98% de B y 14-15.5 min con 5% de B. El flujo utilizado fue de 1.6 mL/minuto y la temperatura fue de $36\text{ }^\circ\text{C}$. Para el análisis se inyectó manualmente 20 μL de muestra.

Para la detección de la muestra se utilizó el detector de arreglo de diodos 1260 DAD VL (Agilent Technologies). La longitud de onda empleada para la cuantificación del tinte azul brillante fue 590 nm. La detección de productos de degradación no coloreados se hizo a 254 nm.

3.2.16. Purificación de Lacasas, Lignina Peroxidasas y Manganeso Peroxidasas

3.2.16.1. Concentración de Proteínas del Medio de cultivo Mediante Ultrafiltración

Previo al proceso de ultrafiltración, se filtraron las muestras con membranas de esteres de celulosa de 47 mm de diámetro y 0.22 μm de tamaño de poro (PVC Millex-GS, Millipore). Luego de filtrar las muestras se las almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta realizar el proceso de ultrafiltración.

Se utilizó el instrumento Labscale TFF system (MILLIPORE) con un cassette con *cut off* de 10 kDa y 50 cm^2 de área de filtración para concentrar las proteínas del medio de cultivo. En este proceso el volumen se concentra hasta aproximadamente 50 mL. Luego se realizó un segundo proceso de ultrafiltración por centrifugación con filtros Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit con Ultracel-10 membrane de 10 kDa. En este proceso el volumen se redujo hasta 2200 μL . Se midió la actividad de LiP, MnP y Lacasas de la muestra luego del proceso de ultrafiltración.

3.2.16.2. Cromatografía de Intercambio Aniónico

Para realizar la cromatografía de intercambio aniónico se utilizó la columna IEC DEAE3N-4T 4.6 x 35 mm (Shodex). Se utilizaron como fases móviles: (A) buffer fosfato 20 mM pH 6.5 y (B) buffer fosfato 20 mM pH 6.5 con NaCl 1.0 M. La gradiente utilizada fue: 0-1 minutos 100% de A; 1.1-11 minutos un gradiente de 0-100% de B. El flujo utilizado fue de 1.0 mL/minuto y la temperatura fue de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para el análisis se inyectó manualmente 20 μL de muestra.

Para la detección de proteínas se utilizó un detector de arreglo de diodos 1260 DAD VL (Agilent Technologies). La longitud de onda empleada para la cuantificación de proteínas fue 280 nm. Adicionalmente se usó la longitud de onda 600 nm, en la que se puede detectar el cobre que forma parte de la estructura de las lacasas (Madhavi y Lele 2009).

Se colectaron las fracciones en el colector de fracciones 1260 Bio FC-AS (Agilent Technologies) y se determinó la actividad enzimática de lacasas. Se concentraron las fracciones con mayor actividad mediante ultrafiltración. Para la concentración de fracciones se utilizó filtros Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit con Ultracel-10 membrane de 10 kDa. En este proceso el volumen se redujo hasta 1200 μL .

3.2.16.3. Cromatografía de Exclusión por Tamaño

Para realizar la cromatografía de exclusión por tamaño se utilizó la columna PROTEIN KW-803 8.0 x 300 mm (Shodex). La fase móvil fue buffer fosfato 20 mM pH 6.5. La corrida fue de 15 minutos con un flujo de 1.0 mL/minuto a una temperatura de 25 °C. Para el análisis se inyectaron manualmente 50 µL de muestra.

La detección de proteínas, colección de fracciones se hicieron de la misma forma que en las muestras provenientes de la purificación cromatografía de intercambio aniónico. Se concentraron las fracciones con mayor actividad enzimática mediante ultrafiltración. El volumen de las fracciones colectadas se redujo hasta 580 µL.

3.2.17. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato Sódico (SDS-PAGE)

Para la determinación del peso molecular de las proteínas purificadas se utilizó electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) (Sambrook et al. 1989). El gel de acrilamida al 12% utilizado tenía la siguiente composición (por 10 mL de gel): 3.3 mL de H₂O, 4.0 mL de solución de 29% acrilamida y 1% N,N'-metilenobis(acrilamida), 2.5 mL de Tris 1.5 M (pH 8.8), 0.1 mL de SDS al 10%, 0.1 mL de persulfato de amonio al 10% y 0.004 mL de TEMED. El gel de apilamiento (*stacking*) al 5% de la siguiente (por 10 mL de gel): 6.8 mL de H₂O, 1.7 mL de solución de 29% acrilamida y 1% N,N'-metilenobis(acrilamida), 1.25 mL de Tris 1.0 M (pH 6.8), 0.1 mL de SDS al 10%, 0.1 mL de persulfato de amonio al 10% y 0.01 mL de TEMED. El buffer de corrida consta de 25 mM Tris, 250 mM de glicina y SDS al 0.1% a pH 8.3. El volumen de la cámara de electroforesis usado fue de 4 L y las dimensiones del gel 20 x 20 cm. Las muestras se incubaron a 100 °C con buffer de carga por 5 minutos. El buffer de carga usado tenía la siguiente composición (por 10 mL de buffer): 3.55 mL de agua desionizada, 1.25 mL de Tris-HCl pH 6.8, 2.5 mL de glicerol, 2.0 mL de SDS al 10%, 0.2 mL de azul de bromofenol al 0.5% y 0.5 mL de β-mercaptoetanol. La corrida se hizo a 25 Amperios por 10 horas. Para la tinción del gel se usó el protocolo de tinción de nitrato de plata reportado por Blum et al. (1987).

3.2.18. Zimograma en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato Sódico

Para hacer zimograma de la proteína purificada se usó el mismo procedimiento que para el SDS-PAGE excepto que las muestras no se incubaron a 100 °C y el buffer de carga usado no contenía β-mercaptoetanol. El gel para zimograma se tiñó con ABTS 0.5 mM en 0.2 M

buffer citrato pH 4.0 y se incubó a temperatura ambiente (Zhao et al. 2012). Además se hizo un gel SDS-PAGE y se tiñó utilizando el protocolo de tinción con nitrato plata por Blum et al. (1987).

3.2.19. Determinación del Peso Molecular de Proteínas

Para la determinación del peso molecular de las proteínas se determinó el Rf (distancia migrada/longitud del gel) de la proteína purificada y de los estándares de peso molecular. La movilidad de las proteínas (Rf) y el logaritmo del peso molecular (en daltons) tienen una relación lineal. Al hacer una curva con estándares de peso molecular conocido se puede estimar el peso molecular de la proteína purificada a partir de la ecuación de la curva.

3.2.20. Análisis Estadístico

Todos los análisis fueron llevados a cabo con el programa Prism (GraphPad Software).

Para los análisis estadísticos se consideró lo siguiente:

- Se empleó un nivel de confianza de 95% ($\alpha=0.05$).
- Se rechazó las hipótesis nula o planteada considerando si el p-valor obtenido es menor a 0.05.
- Para analizar dos muestras independientes se empleó la prueba de T de Student.
- En caso de comparar más de tres tratamientos se empleó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar la presencia o no de diferencias significativas entre los mismos. De existir diferencias significativas se procedió a usar la prueba de diferencias múltiples de Duncan.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Producción de Enzimas Durante Proceso de Decoloración

Los cultivos de biopelícula de la cepa LMBTM5 de *Trametes polyzona* son capaces de decolorar soluciones de tintes sintéticos, incluyendo tintes azoicos (Cerrón Alván 2014). Se determinó la producción de lacasas, lignina peroxidasas y manganeso peroxidasas durante la decoloración del tinte azul brillante.

La actividad de lacasas en el medio de cultivo durante la decoloración de azul brillante fue de 179.93 U/L a las 24 horas de cultivo, 114.27 U/L a las 48 horas, 248.88 U/L a las 72 horas y 170.89 a las 96 horas (Figura 3). En el caso de la actividad de lignina peroxidasas la actividad enzimática durante todo el proceso fue menor a 5 U/L (Figura 4). De forma similar a las lignina peroxidasas la actividad enzimática de manganeso peroxidasas durante la decoloración de azul brillante fue reducida, siendo sus valores los siguientes: 8.45 U/L a las 24 horas, 5.40 U/L a las 48 horas, 2.85 U/L a las 72 horas y 45.20 U/L a las 96 horas (Figura 5).

En concordancia a lo observado en este estudio para *Trametes polyzona*, cultivos en medio líquido de la cepa En3 de *Ganoderma sp.* produjeron bajos títulos de lacasas (en base a oxidación de ABTS), de entre 120 y 135 U/L en presencia de cuatro tintes (verde de malaquita, naranja de metilo, azul de bromofenol y cristal violeta). No se detectó actividad de LiP ni MnP. La decoloración de los cuatro tintes fue entre 92.4 a 98.9% (Zhuo et al. 2011). En otro estudio se midió la actividad de enzimas lignolíticas de cultivos de 12 cepas de 10 especies entre ellas tres cepas de *Trametes villosa*, reportándose bajas actividades de lacasas (<168 U/L), de MnP (<0.93 U/L), y de LiP (<0.36 U/L). A estos cultivos en medio líquido se les añadió efluente y se produjo decoloración de entre 25 y 78% en 24 horas (Moreira-Neto et al. 2013).

La presencia de actividad enzimática de lacasas y la actividad reducida de LiP y MnP en los cultivos de la cepa LMBTM5 que degradan el tinte azul brillante sugiere que la

degradación de este tinte (Figura 18) se debe principalmente a la actividad enzimática de lacasas.

Respecto a la cinética de biomasa, se observó que la biomasa disminuyó durante el proceso de decoloración del tinte azul brillante (Figura 6), desde 1.92 g/L al inicio del cultivo hasta 1.14 g/L a las 96 horas de cultivo. Galhaup et al. (2002) observaron en cultivos de *Trametes pubescens* en biorreactor de tanque agitado que la biomasa disminuyó luego del agotamiento de glucosa, lo que se explicó como la posible utilización de compuestos de reserva y autólisis. En este estudio las cepas se cambian de un medio rico en glucosa (medio de formación de biopelícula) a un medio con baja concentración de glucosa (medio de producción o decoloración). La disminución de la biomasa podría explicarse por la baja concentración de glucosa en el medio de cultivo durante la producción de enzimas y decoloración de azul brillante.

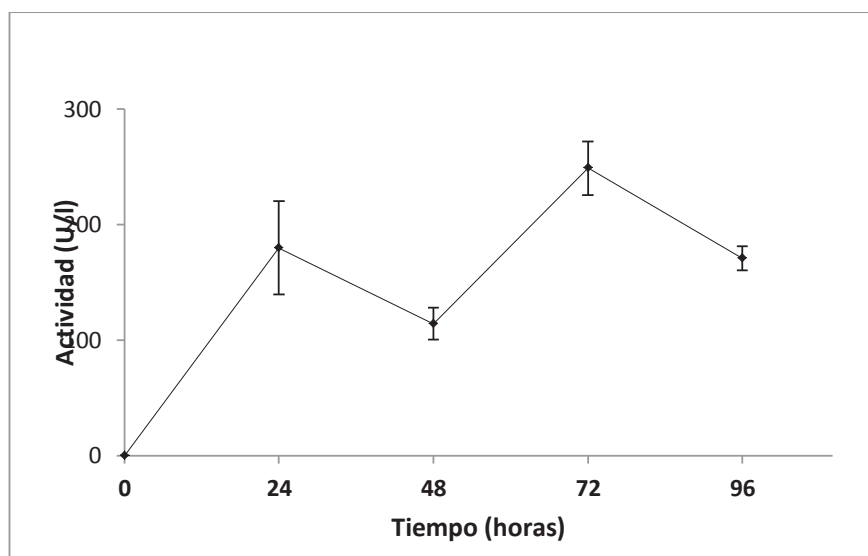


Figura 3. Cinética de Producción de Lacasas de Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5) en Medio Suplementado con Azul Brillante.

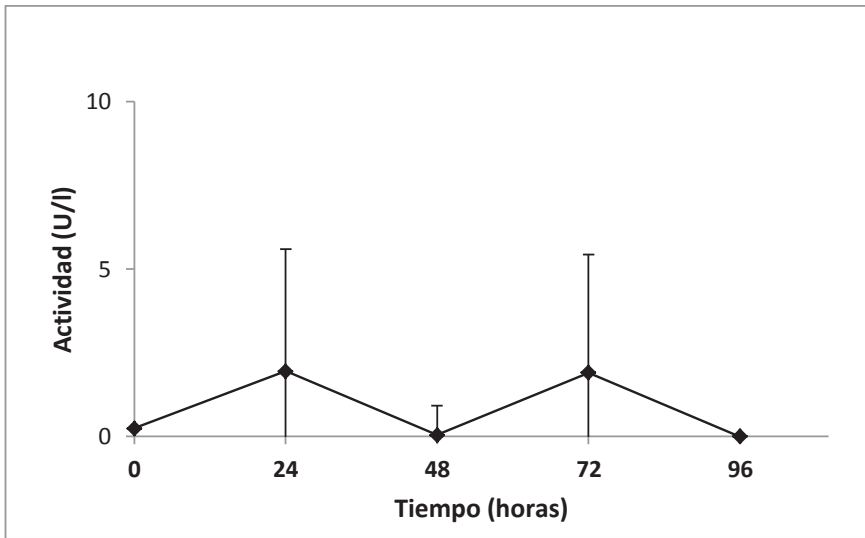


Figura 4. Cinética de Producción de Lignina Peroxidasas de Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5) en Medio Suplementado con Azul Brillante.

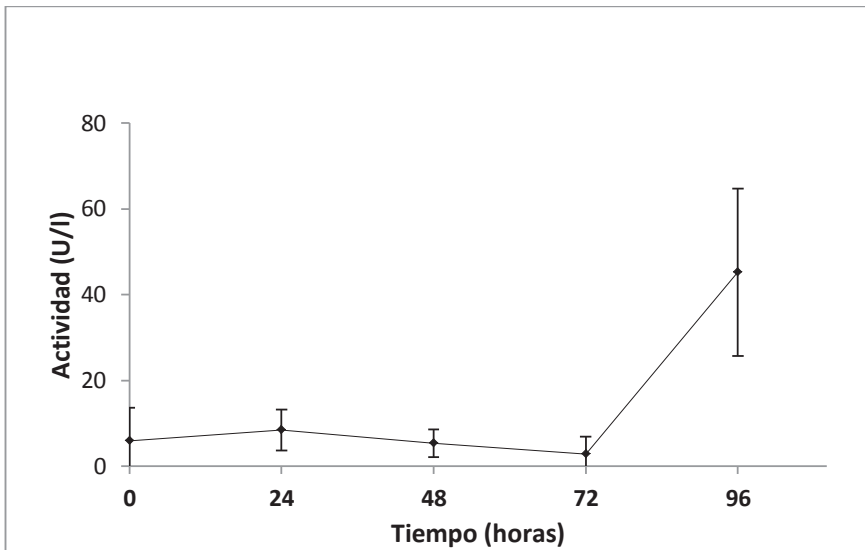


Figura 5. Cinética de Producción de Manganeso Peroxidasas de Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5) en Medio Suplementado con Azul Brillante.

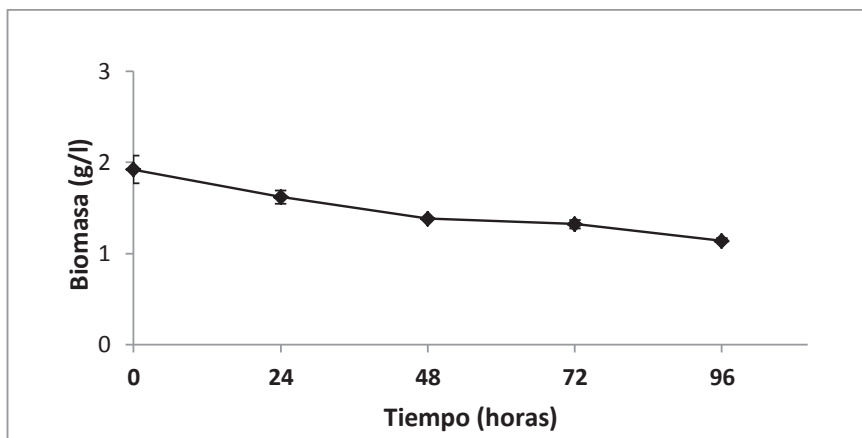


Figura 6. Cinética de Biomasa de Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5) en Medio Suplementado con Azul Brillante.

4.2. Inducción de la Producción de Lacasas en Medio de Cultivo Suplementado con CuSO_4

La producción de lacasas en medio de cultivo basal (medio de producción suplementado con CuSO_4 0.02 mM) fue de 73.0 U/L, 54.6 U/L, 73.4 U/L y 35.7 U/L a las 24, 48, 72 y 96 horas respectivamente (Figura 7), siendo más baja que la producción en medio de cultivo suplementado con azul brillante. Se encontraron diferencias significativas entre la producción en medio basal y medio con azul brillante a las 72 y 96 horas de cultivo (Anexo 2) por lo que el azul brillante estaría induciendo la producción de lacasas.

Existen reportes de producción de lacasas en medios sin inductores y a bajas concentraciones de CuSO_4 que resultaron en títulos bajos de lacasas. Por ejemplo, se reportó 0.11 U/mL de actividad lacasa a los siete días de cultivo para una cepa de *Trametes versicolor* en medio líquido con 0.001 g/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Lee et al. 1999). En pruebas con cultivos sumergidos de 10 días de *Trametes versicolor* en medio sin CuSO_4 se encontró que la producción de lacasas fue menor a 0.2 U/mL (Collins y Dobson 1997). En otro reporte se observó una producción menor a 0.1 U/mL de actividad lacasa en base a oxidación de 2,6-Dimethoxyphenol (DMP) en cultivos de 10 días de una cepa de *Trametes sp.* en medio de cultivo sin CuSO_4 (Daâssi et al. 2013).

Al igual que en los cultivos en medio suplementado con azul brillante, la biomasa disminuyó durante el proceso de producción de lacasas en medio basal de 2.00 g/L hasta 1.04 g/L (Figura 8).

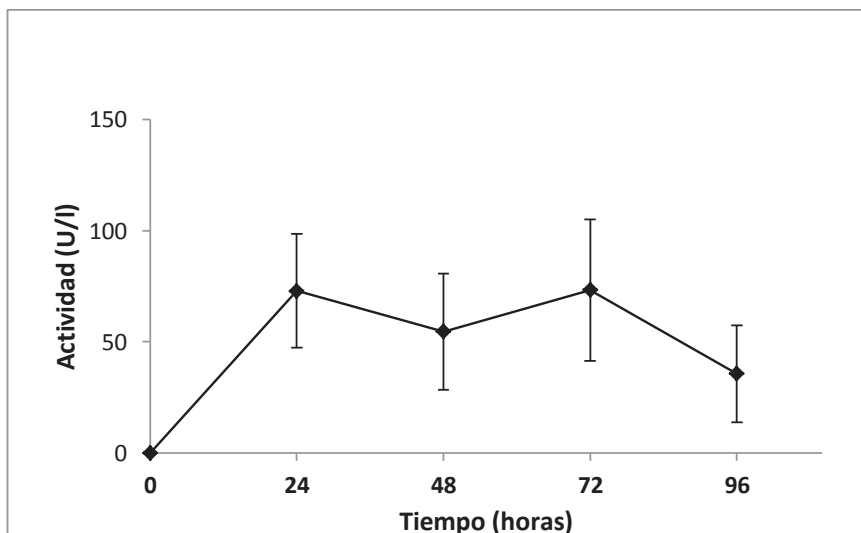


Figura 7. Cinética de Producción de Lacasas de Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5) en Medio Basal (suplementado con CuSO_4 0.02 mM).

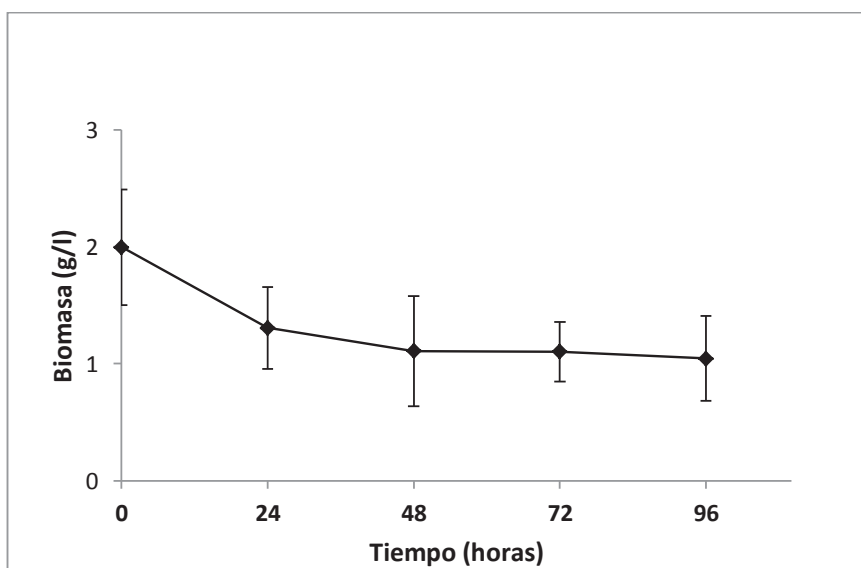


Figura 8. Cinética de Biomasa de Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5) en Medio Basal (suplementado con CuSO_4 0.02 mM).

El sulfato de cobre (CuSO_4) ha sido utilizado en varios estudios para inducir la producción de lacasas. Collins y Dobson (1997) usaron concentraciones de CuSO_4 de entre 0 y 400 μM para inducir la producción de lacasas en *Trametes versicolor* en cultivo sumergido. La actividad máxima de lacasas fue observada en medio suplementado con 400 μM de CuSO_4 , aproximadamente 2.3 U/mL, fue 20 veces mayor que en el medio sin CuSO_4 . En otro trabajo en cultivos sumergidos de *Trametes sp.*, se usaron diferentes dosis de CuSO_4 para

inducir la producción de lacasas. Se observaron actividades de lacasa para oxidación de DMP de 1.0, 3.77 y 4.54 U/mL para concentraciones de CuSO₄ de 75, 200 y 300 μM, siendo estas actividades 10, 38 y 45 veces más altas que la de los cultivos sin CuSO₄ (Daâssi et al. 2013). En estos reportes el suplemento de cobre en el medio permitió que la actividad de lacasas aumente de concentraciones cercanas a 0.1 U/mL hasta concentraciones mayores a 2.0 U/mL. Se ha comprobado que el cobre no sólo aumenta la actividad de lacasas en cultivos de hongos basidiomicetos sino que también aumenta la transcripción de los genes de estas enzimas en *Pleurotus ostreatus* (Palmieri et al. 2000), este aumento de la transcripción es dependiente de la dosis en *Trametes versicolor* (Collins y Dobson 1997). Cordi et al. (2007) reportaron actividad lacasa de oxidación de siringaldazina menor a 70 U/L en cultivos de *Trametes versicolor* en medio líquido durante 20 días medio de cultivo basal sin suplemento de cobre, mientras que en presencia de CuSO₄ a 0.005-0.1 mM la actividad aumentó hasta 40000 U/L a los 12 días de cultivo.

En el presente estudio se añadió CuSO₄ al medio de cultivo en concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mM para estimular la producción de lacasas. Se midió la actividad enzimática a las 24, 48, 72, 96, 120, 168, 216 y 264 horas de cultivo (Figura 9). La concentración de 1.0 mM de CuSO₄ en el medio de cultivo resultó en la actividad promedio de lacasas más alta, 2036.46 U/L, siendo el tiempo de producción máxima 120 horas. Esta actividad fue 20 veces mayor a la del medio basal, que fue menor a 100 U/L durante las 96 horas de cultivo (Figura 7)

Existen estudios donde se reporta actividad de lacasas cercanas o mayores a 2 U/mL en cultivos de hongos degradadores de lignina en medio con bajas concentraciones de CuSO₄ y aumentos de la actividad al agregar CuSO₄ al medio de cultivo. Palmieri et al. (2000) reportaron una producción menor a 2 U/mL de lacasas en cultivos en sumergidos de *Pleurotus ostreatus* en medio basal sin cobre durante siete días, mientras que en presencia de 150 μM de CuSO₄ la actividad fue superior a 9 U/mL desde el tercer día de cultivo. En otro estudio, se reportó que una cepa de *Trametes trogii* en cultivos sumergidos mostró actividad de lacasas cercana a 5 U/mL en cultivos de 27 días en medio basal con 1.6 μM de CuSO₄. Al suplementar el medio con CuSO₄ la actividad aumentó hasta aproximadamente 65 U/mL (CuSO₄ 500 μM) y 95 U/mL (CuSO₄ 1000 μM). La actividad de MnP también aumentó en presencia de CuSO₄, de aproximadamente 0.1 U/mL en medio con 1.6 μM de CuSO₄ a 0.8 U/mL en medio con 500 μM de CuSO₄ y 1.2 U/mL en medio con 1000 μM de CuSO₄ (Levin et al. 2002). En otro reporte, se observó que cultivos sumergidos de

Trametes pubescens producen aproximadamente 2.0 U/L de lacasas en medio basal con 5 μ M de CuSO_4 en cultivos de 13 días. Al suplementar los cultivos con 0.5-2.0 mM de CuSO_4 la actividad de lacasas aumentó hasta un máximo de 65 U/L (Galhaup y Haltrich 2001).

También se ha reportado cultivos con actividad de lacasas superiores a 50 U/mL en medio basal en los que el suplemento de CuSO_4 aumentó la actividad de los cultivos. Para cultivos en medio líquido de *Pleurotus ostreatus* la actividad de lacasas aumentó aproximadamente 8 veces en presencia de CuSO_4 1 mM en comparación al control sin CuSO_4 hasta aproximadamente 400 U/mL (Baldrian y Gabriel 2002). En otro reporte la actividad de lacasas de cultivos sumergidos de *Pleurotus ostreatus* aumentó aproximadamente de 80 U/mL a 360 U/mL en presencia de 1.0 mM CuSO_4 en cultivos de 18 días (Hou et al. 2004).

Rodríguez Couto et al. (2004) hicieron cultivos de biopelículas en reactores de lecho fluidizado de 180 mL usando diferentes soportes, entre ellos espuma de poliuretano, esponja de nylon y esponja de acero inoxidable. En el cultivo con soporte de esponja de acero inoxidable se observó la mayor producción de lacasas (800 U/L), seguido de cultivo con esponja de nylon como soporte (500 U/L) y espuma de poliuretano (<200 U/L). En un reactor de 1 L con medio suplementado con 1.0 mM de sulfato de cobre se observó una producción de 2200 U/L de lacasas.

Las diferencias entre las altas actividades de lacasas, hasta 400 U/mL, reportadas en algunos estudios y lo encontrado para la cepa LMBTM5, cercano a 2000 U/L, se podrían deber a varios factores entre ellos la cepa, los componentes del medio de cultivo, y las condiciones de cultivo.

Se han optimizado medios de cultivo en base a criterios de fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, limitación de nitrógeno, agitación o cultivos estáticos y uso de varios inductores (Hou et al. 2004), concentración y tiempo de suplementación de inductores a los cultivos (Galhaup y Haltrich 2001). Galhaup et al. (2002) optimizaron un medio para la producción de lacasas con *Trametes pubescens* y reportaron una producción en matraz de aproximadamente 170 U/mL en 15 días de cultivo. En bioreactor se reportó 330 U/mL y un máximo de 740 U/mL cuando se añadió glucosa a una tasa de 0.06 g por litro de medio por hora, para mantener una concentración menor a 0.25 g/L. En este trabajo se usó 2 mM de CuSO_4 para inducir la producción de lacasas, el cobre fue agregado durante el crecimiento

de los cultivos cuando la concentración de glucosa fue de aproximadamente 15 g/L. Estos estudios sugieren que es posible aumentar la producción de lacasas en cultivos de la cepa LMBTM5 modificando el medio cultivo, parámetros de incubación y usando inductores.

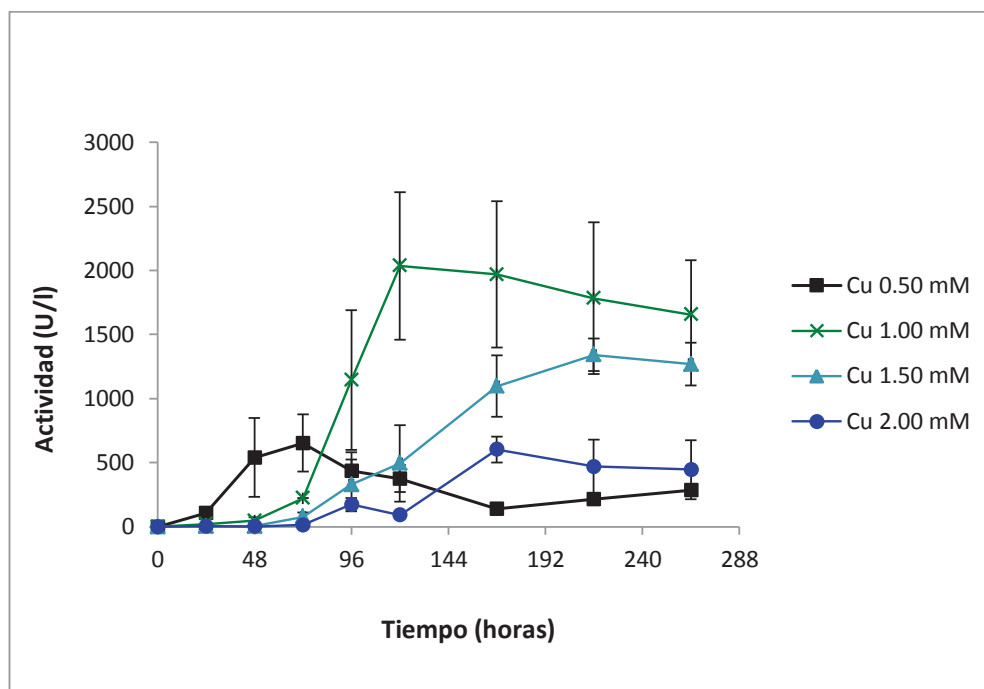


Figura 9. Cinética de Producción de Lacasas de Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5) en Medio de Suplementado con 0.50, 1.00, 1.50 y 2.00 mM de CuSO_4 .

4.3. Cinética de Producción de Enzimas en Medio de Cultivo Suplementado con CuSO_4 1.0 mM

Se cultivaron biopelículas de la cepa LMBTM5 de *Trametes polyzona* en medio de cultivo con 1.0 mM de sulfato de cobre y se midió la actividad de lacasas, lignina peroxidasas y manganeso peroxidasas cada 24 horas hasta 216 horas de cultivo. Respecto a la actividad de lacasas la actividad promedio fue menor a 130 U/L hasta las 72 horas de cultivo. A las 96 horas la actividad fue de 1006.77 U/L. La actividad máxima, 2704.69 U/L fue observada a las 120 horas de cultivo, en la siguiente medición la actividad cayó a 2118.75 U/L. En los tres días restantes la actividad de lacasas fue menor a 1300 U/L (Figura 10). La actividad máxima observada a las 120 horas de cultivo fue significativamente diferente a

las observadas en otros días (Anexo 5). A las 120 horas de cultivo también se observó valores de $14.09 \text{ U L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $12.57 \text{ U g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y 4971.16 U/mg de productividad volumétrica (Γ), productividad específica (qp) y actividad específica respectivamente (Tabla 1).

De forma similar a lo encontrado en el medio de cultivo suplementado con azul brillante (Figura 4) la actividad de lignina peroxidasas fue despreciable en los cultivos en medio suplementado con 1.0 mM de CuSO_4 .

La actividad enzimática de manganeso peroxidasas fue menor a 60 U/L durante todo el tiempo de cultivo en niveles similares a lo observado en los cultivos durante la decoloración de azul brillante. El cobre no indujo la producción de LiP ni de MnP. Es posible que la actividad de manganeso peroxidasa observada se deba a la presencia de lacasas en el medio las cuales pueden catalizar el acoplamiento oxidativo (*oxidative coupling*) de DMAB y MBTH, los sustratos de la reacción enzimática de las MnP (Jordaan y Leukes 2003).

Durante el proceso de producción de enzimas la biomasa disminuyó. Al inicio del cultivo la biomasa fue de 1.83 g/L y llegó hasta 0.88 g/L a las 216 horas de cultivo. Además se comprobó que la biomasa durante la producción de enzimas en medio con 1.0 mM de cobre (Figura 11), no muestra diferencias significativas con la biomasa durante la producción de enzimas en medio basal (Figura 8) ni durante la decoloración del tinte azul brillante (Figura 6) a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas de cultivo (Anexo 7).

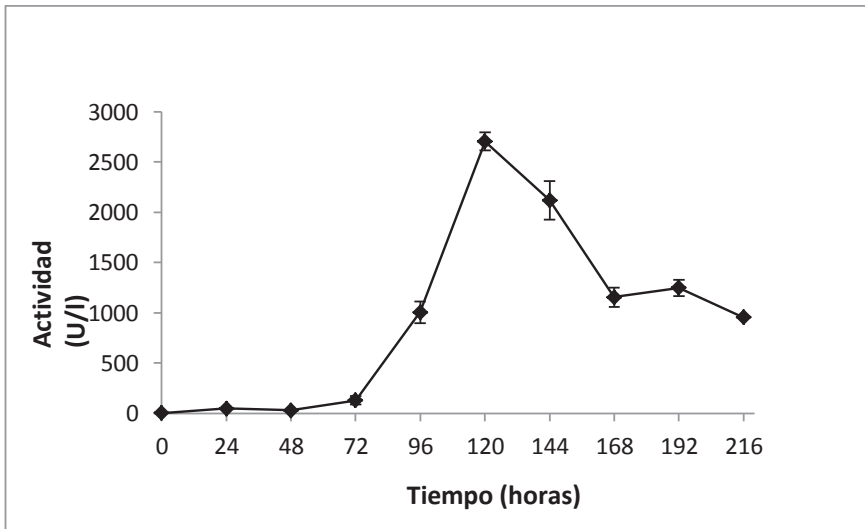


Figura 10. Cinética de Producción de Lacasas de Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5) en Medio Suplementado con 1.00 mM de CuSO_4 .

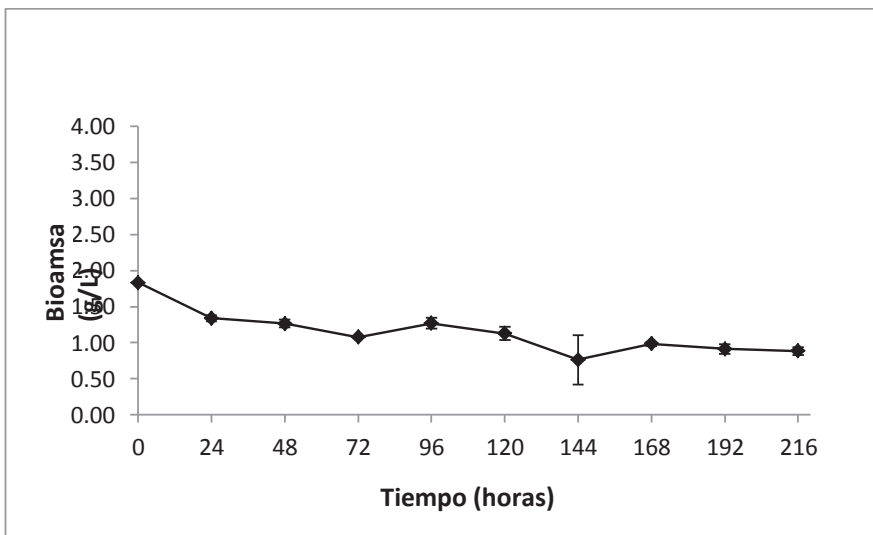


Figura 11. Cinética de Biomasa de Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5) en Medio Suplementado con 1.00 mM de CuSO_4 .

Tabla 1. Parámetros de Productividad de Lacasas Producidas por *Trametes polyzona* (LMBTM5).

t (h)	U L⁻¹	x (g L⁻¹)	Γ (U l⁻¹ h⁻¹)	q_p (U g⁻¹ h⁻¹)	AE (U g⁻¹)
0	1.38	1.83	0.02	0.01	9.15
24	48.595	1.34	0.51	0.38	118.41
48	30.47	1.22	0.25	0.21	46.81
72	128.515	1.08	0.89	0.83	267.13
96	1006.77	1.27	5.99	4.75	2647.95
120	2704.69	1.13	14.09	12.57	4971.16
144	2118.75	0.76	9.81	14.04	4208.57
168	1154.69	0.99	4.81	4.84	2366.43
192	1247.92	0.92	4.73	5.15	2651.49
216	955.21	0.88	3.32	3.76	2048.38

t: tiempo de producción.(h). x: concentración de biomasa (g L⁻¹). Γ: productividad volumétrica. q_p: Productividad Específica (U g⁻¹ h⁻¹) . Actividad Específica (U g⁻¹).

4.4. Purificación de Proteínas

Para la purificación de las proteínas producidas por biopelículas de la cepa LMBTM5, se usaron cultivos de 144 horas y se realizaron tres etapas (Tabla 2): ultrafiltración con un cassette con *cut off* de 10 kDa, cromatografía de intercambio aniónico (columna IEC DEAE3N-4T 4.6 x 35mm) y cromatografía de exclusión por tamaño (columna K-803 5 μm, 8 x 300 mm). Luego de coleccionar el medio de cultivo, este se filtró en papel filtro y se midió la actividad enzimática de lacasas, LiP y MnP. En el medio de cultivo la actividad de

lacasas fue 2200 U/L, no se detectó actividad de LiP y la actividad de MnP fue menor a 80 U/L. Luego de la ultrafiltración la actividad de lacasas aumentó considerablemente a 305208 U/L y se obtuvo un factor de purificación de 4.07. Luego de este proceso no se detectó actividad de LiP ni MnP por lo que en las siguientes etapas de purificación solo se midió la actividad de lacasas.

En el cromatograma correspondiente a la cromatografía de intercambio aniónico se observó dos picos definidos en las longitudes de onda 280 (Figura 12) y 600 nm (Figura 13) en las fracciones 1 y 4-5. Al medir la actividad de lacasas la actividad en la fracción 1 fue despreciable pero fue elevada en las fracciones 4-5 por lo que se colectó estas fracciones y se las concentró por ultrafiltración. Luego de la cromatografía de intercambio aniónico y de la ultrafiltración de las fracciones seleccionadas la actividad de lacasas fue de 74739 U/L con un factor de purificación de 31.00.

La última etapa de purificación, cromatografía de exclusión por tamaño, se observó un solo pico definido en los cromatogramas a 280 (Figura 14) y 600 nm (Figura 15) que corresponde a pico máximo de actividad de lacasas en la fracción 10. Luego concentrar la fracción por ultrafiltración la actividad de lacasas fue de 56406.25 U/L. Se obtuvo un factor de purificación de 21.52. Esta muestra se usó para análisis posteriores.

Tabla 2. Etapas de Purificación de Lacasas Producidas por Biopelículas de *Trametes polizona*.

	Volumen (mL)	Actividad U/L	Actividad Total (U)	Proteínas (mg/mL)	Actividad Específica U/mg proteínas	Rendimiento	Factor de Purificación
Medio de cultivo	575	2200.52	1265.30	0.40	5.48	100.00	1.00
Ultrafiltración(10kD)	2.2	305208.33	671.46	13.67	22.33	53.07	4.07
DEAE+Ultrafiltración(10kD)	1.2	74739.58	89.69	0.44	169.95	7.09	31.00
K-803+Ultrafiltración(10kD)	0.58	56406.25	32.72	0.48	117.96	2.59	21.52

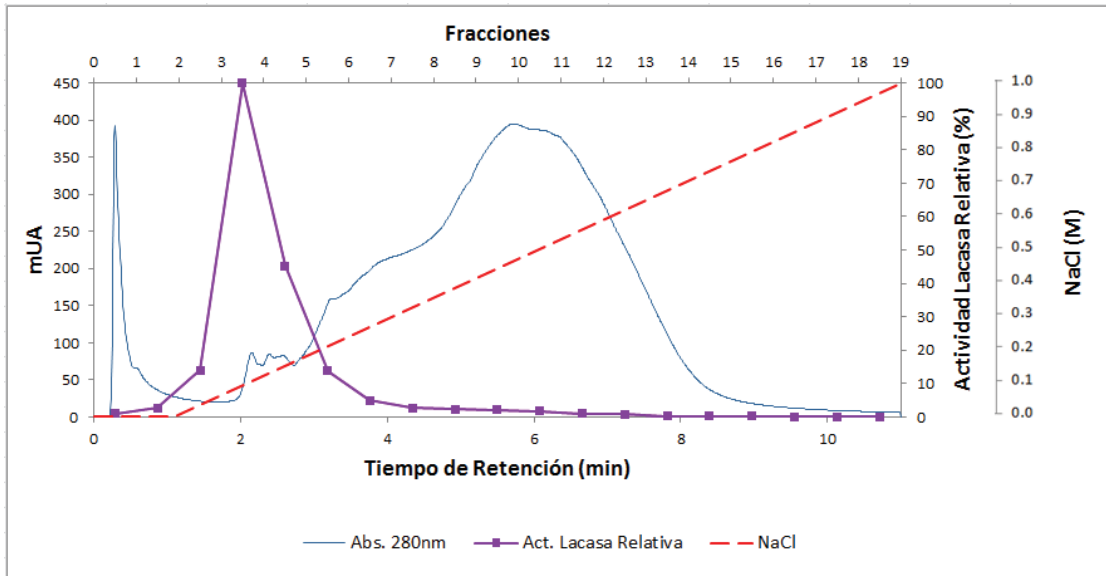


Figura 12. Cromatografía de Intercambio Aniónico (Columna IEC DEAE3N-4T) de Cultivos de Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5) a 280 nm. Gradiente de NaCl 0-1 M en 12 min. Actividad Lacasa de las fracciones 1-19.

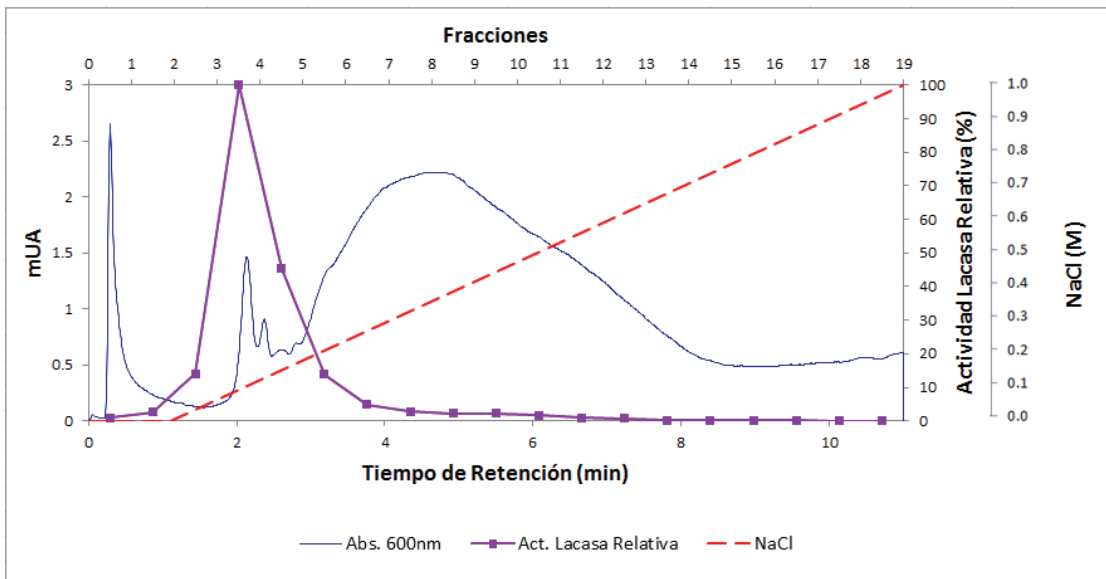


Figura 13. Cromatografía de Intercambio Aniónico (Columna IEC DEAE3N-4T) de Cultivos de Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5) a 600 nm. Gradiente de NaCl 0-1 M en 12 min. Actividad Lacasa de las Fracciones 1-19.

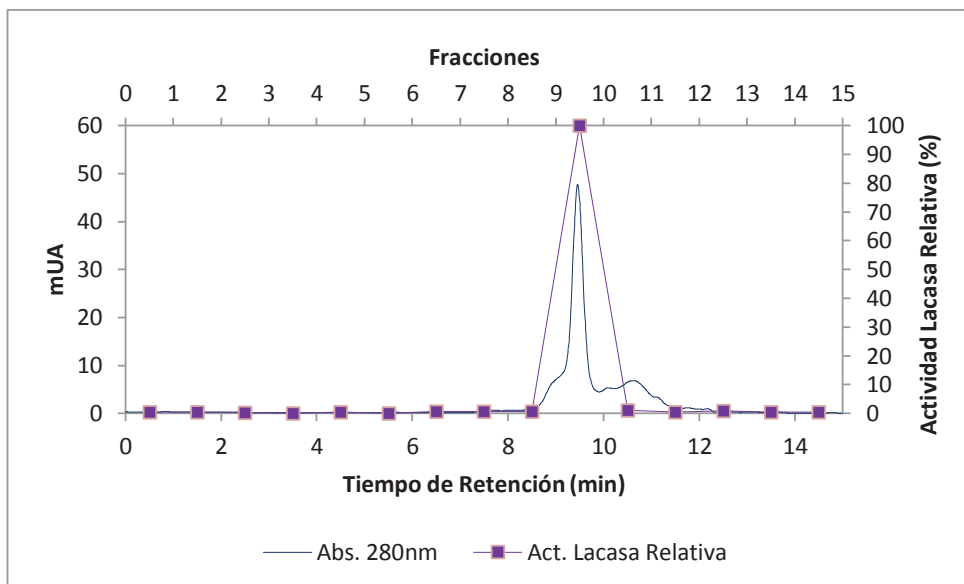


Figura 14. Cromatografía de Exclusión por Tamaño (Columna K-803 5 μ m, 8 x 300 mm) de Cultivos de Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5) a 280 nm. Actividad Lacasa de las Fracciones 1-15.

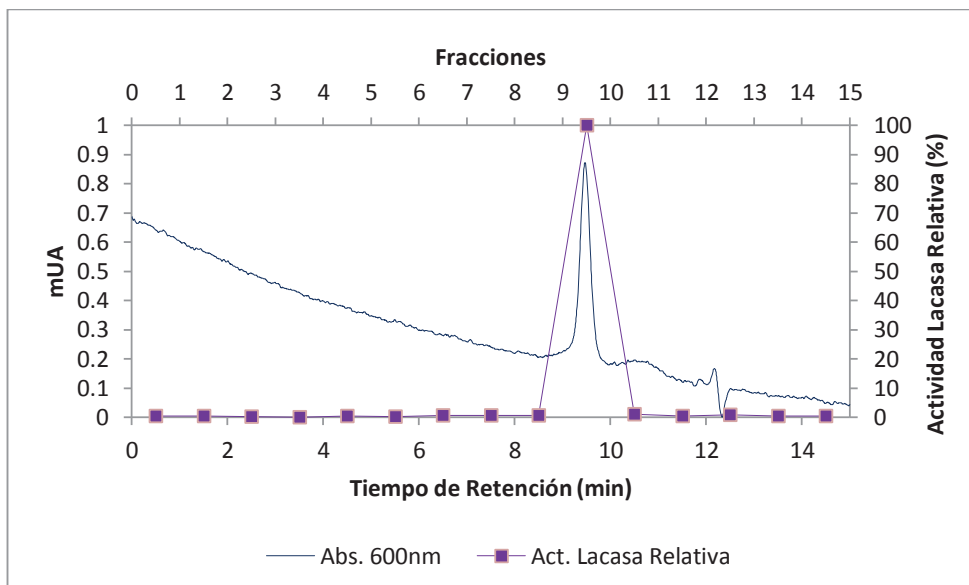


Figura 15. Cromatografía de Exclusión por Tamaño (Columna K-803 5 μ m, 8 x 300 mm) de Cultivos de Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5) a 600 nm. Actividad Lacasa de las Fracciones 1-15.

4.5. Determinación de Peso Molecular de la Lacasa Purificada

Se empleó SDS-PAGE para determinar el peso molecular de la proteína purificada. El peso molecular de la proteína fue de 59.4 kDa (Figura 16). En el gel no denaturante la banda correspondiente a la proteína purificada muestra actividad enzimática de oxidación de ABTS (Figura 17) confirmando así que esta enzima es una lacasa.

El tamaño de esta enzima es similar comparado al de otras lacasas monoméricas de cepas del género *Trametes* reportadas, en la mayoría de casos el tamaño se determinó mediante SDS-PAGE. Para la especie *Trametes polyzona* sólo existe un reporte de purificación de una lacasa con un peso molecular de 70 kDa determinado por SDS-PAGE y 68 kDa por cromatografía por filtración en gel (Chairin et al. 2014). Para *Trametes hirsuta* se han reportado dos lacasas de 65 kDa (Zapata-Castillo et al. 2012) y 90 kDa (Haibo et al. 2009). Una lacasa purificada a partir de cultivos de *Trametes pubescens* tuvo un peso molecular de 68 kDa (Si et al. 2013). Zouari-Mechichi et al. (2006) aislaron dos isoenzimas de lacasas de *Trametes trogii* de 62 kDa (58 kDa por cromatografía de exclusión por tamaño) mientras que Yan et al., (2014) purificaron una lacasa de 56 kDa. Para la especie *Trametes versicolor* se han reportado lacasas de 97 kDa (Han et al. 2005), 66 kDa (Han et al. 2005) (Minussi et al. 2007) y 60 kDa (Zhu et al. 2011). En *Trametes villosa* se purificó una lacasa dimérica de 130 kDa (cromatografía por filtración en gel) con monómeros de 63 kDa (SDS-PAGE) (Yaver et al. 1996).

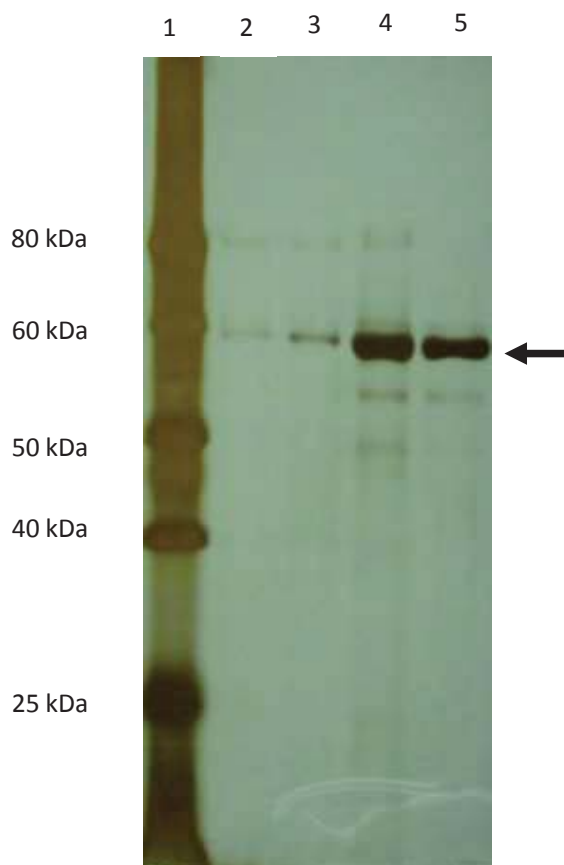


Figura 16. SDS-PAGE de Lacasa Producida por Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5). (1) Estándares de proteínas de 80, 60, 50, 40 25 kDa. (2) Medio de cultivo de producción con proteínas producidas por *Trametes polyzona* (LMBTM5). (3) Muestra concentrada por ultrafiltración (10 kDa). (4) Muestra purificada por cromatografía de intercambio aniónico. (5) Muestra purificada por cromatografía de exclusión por tamaño.

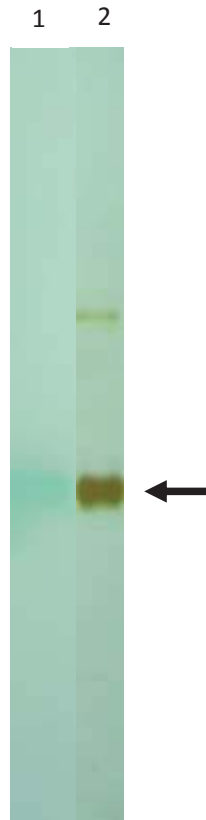


Figura 17. (1) Zimograma con ABTS y (2) SDS-PAGE de Lacasa Purificada Producida por Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5).

4.6. Decoloración de Azul Brillante con Cultivos de LMBTM5

Se evaluó la decoloración de azul brillante en cultivos de biopelículas de la cepa LMBTM5. El porcentaje de decoloración determinado por espectrofotometría fue de 96.76%, 96.11%, 96.27% y 96.67% a las 24, 48, 72 y 96 horas de cultivo respectivamente (Figura 18). Las mediciones realizadas por HPLC a las 24, 48, 72 y 96 horas de la decoloración fueron mayores al límite de detección 97.5% (Tabla 3). A las 0 horas de cultivo la decoloración medida por HPLC fue de 8.86% lo que representaría el porcentaje de tinte adsorbido inicialmente por la biomasa, que luego es degradado por actividad enzimática de las lacasas del medio de cultivo.

Debido a que la decoloración del tinte azul brillante fue máxima a las 24 horas de cultivo, esto significaría que el tinte fue degradado antes de ese momento. Se hizo un nuevo experimento para evaluar la decoloración, esta vez tomando muestras a las 6, 12, 18, 24 y 48 horas del proceso. La decoloración fue de 35.35%, 96.13%, 95.33%, 94.92% y 95.18% a las 6, 12, 18 y 24 y 48 horas de cultivo en las mediciones por espectrofotometría (Figura 19). En el análisis por HPLC la decoloración fue de 15.16%, 86.85%, 91.22% a las 6, 12 y 18 horas de cultivo y mayor a 98.75% a las 24 y 48 horas (Tabla 4). Al inicio del cultivo la decoloración fue de 0.06% lo que difiere con el 8.86% medido en el experimento anterior. La explicación de esta observación sería que el las muestras del segundo experimento se procesaron más rápido, lo que impidió la adsorción del tinte a la biomasa.

Al inicio del proceso de degradación se puede observar que hay solamente un pico en los cromatogramas a longitudes de onda 590 nm, a esta longitud de onda se detectó el tinte azul brillante. Los productos de degradación no coloreados del tinte se detectaron a 254 nm (Zhao y Hardin 2007). A las 6 horas del proceso no existe cambio en el patrón de los cromatogramas (Figura 21 y Figura 27) por lo que se presume que la disminución de concentración de tinte en el medio de cultivo se debe a la biosorción, la adsorción de tintes a la biomasa (Khan et al. 2012) debida a la interacción entre los tintes y los lípidos y polisacáridos de la pared celular de los microorganismos involucrados en este proceso (Solís et al. 2012). A las 12 horas se puede observar el pico correspondiente al tinte azul brillante en el cromatograma de 590 nm (Figura 22) y 254 nm (Figura 28). Adicionalmente se puede observar que se han formado productos no coloreados, por lo que se observan ocho picos adicionales al pico de azul brillante en el cromatograma de 254 nm (Figura 28). A las 18 y 24 horas de cultivo se observó que el pico del cromatograma correspondiente a azul brillante continuó disminuyendo su tamaño (Figura 23, Figura 24) mientras que a las

48 horas no se observó este pico (Figura 25). Adicionalmente, se formaron más picos correspondientes a productos no coloreados a las 18, 24 y 48 horas (Figura 29, Figura 30 y Figura 31).

Se han utilizado cultivos de varias especies de hongos para decolorar tintes sintéticos. Grassi et al. (2011) reportaron que filtrados de cultivos en medio sumergido sin mediadores redox de *Trametes trogii* pudieron decolorar nueve tintes. Estas cepas presentaron porcentajes de decoloración de 85, 82, 75, 35, 29, 13, 11, 11 y 8% para Carmín de índigo, RBBR (*Remazol Brilliant Blue R*), azul de bromofenol, verde de malaquita, violeta de genciana, *Xylidine*, Azur B, azul de metileno y *Fast Blue RR*, respectivamente. En otro estudio se usaron cultivos sumergidos de la cepa *Ganoderma* sp. En3 para decolorar cuatro colorantes. Los tintes verde de malaquita, naranja de metilo y cristal violeta fueron decolorados hasta 98.9%, 96.7% y 75.8% respectivamente a las 72 horas de cultivo. El tinte azul de bromofenol fue decolorado hasta 98.3% a las 12 horas de cultivo. Se observó actividad lacasa < 120 U/L pero no se detectó actividad enzimática de LiP ni de MnP en los cultivos (Zhuo et al. 2011). Swamy y Ramsay (1999) evaluaron la decoloración de cinco tintes usando una cepa de *Trametes versicolor* en medio líquido. Esta cepa fue capaz de decolorar el 100% de seis colorantes *Amaranth*, *Tropaeolin O*, *Remazol Black B*, *Remazol Orange Reactive Blue*, *Remazol Brilliant Blue*. Chagas y Durrant (2001) evaluaron la decoloración de cuatro tintes con cultivos de *Phanerochaete chrysosporium* y *Pleurotus sajorcaju* en cultivos sumergidos. Los cultivos de *P. chrysosporium* decoloraron 98.5, 95.0, 96.8 y 60% de *Amaranth*, *New Coccine*, *Orange G* y *Tartrazine* respectivamente a los 8 días de cultivo. *Pleurotus sajorcaju* también mostró una alta degradación de tintes al degradar 97.0, 96.5, 47.5 y 20.0% de los mismos tintes. En otro reporte, cultivos sumergidos de *Pleurotus ostreatus* degradaron el tinte azoico Disperse Orange 3 llegando hasta 60% de decoloración en 10 días de cultivo. Producto de la degradación se formaron los metabolitos *4-nitroaniline*, *4-nitrobenzene*, *4-nitrophenol*, y *4-nitroanisole* (Zhao et al. 2006).

Se ha estudiado también la capacidad de hongos de la pudrición blanca para decolorar efluentes con tintes sintéticos. Moreira-Neto et al. (2013) usaron cultivos de 12 cepas de hongos entre ellas tres de *Trametes villosa* en medio líquido para decolorar un efluente con los tintes Cibacron Brilliant Blue H-GR y dye Cibacron Red FN-2BL y reportaron una eficiencia de decoloración de 25-78%, todas las cepas presentaron baja actividad de lacasas (<168 U/L), de MnP (<0.93 U/L), y de LiP (<0.36 U/L).

En otros estudios se han usado filtrados del medio de cultivo para decolorar tintes lo que permite evaluar el porcentaje de decoloración debido a la actividad enzimática sin la interferencia de la biosorción. El medio de cultivo sumergido de una cepa de *Trametes modesta*, productora de lacasas y MnP, fue usado para decolorar cinco tintes. Los porcentajes de decoloración fueron 51, 26, 61, 52 y 14% para los tintes *Acid Blue 225*, *Acid Violet 17*, *Basic Red 9 base*, *Direct Blue 71* y *Reactive Black 5* y con el uso de diferentes mediadores redox se llegó a porcentajes de decoloración superiores a 84% (Nyanhongo et al. 2002). En otro reporte se utilizó lacasa cruda de cultivos sumergidos (medio de cultivo filtrado por 10 kDa) de *Pleurotus ostreatus* para decolorar SN4R hasta un 66% (Hou et al. 2004).

En otros estudios se han usado cultivos de biopelículas en bioreactores de disco rotatorio y de lecho fluidizado para la decoloración de tintes sintéticos. Kapdan y Kargi (2002) observaron decoloración de hasta 80% del tinte textil *Everzol Turquoise Blue G* en cultivos de *Coriolus versicolor* en un biorreactor de disco rotatorio. En otro estudio, se observó decoloración de 99% para los tintes *Reactive Red 2* y *Reactive Blue 4* en cultivos de la cepa *Bjerkandera sp.* BOL 13 en un bioreactor de disco rotatorio (Axelsson et al. 2006). Ramsay, Shin, Wong, & Goode, (2006) reportaron la decoloración del tinte azoico *Amaranth* de hasta 95% utilizando cultivos de *Trametes versicolor* en biorreactor de disco rotatorio.

Rodríguez Couto et al. (2004) reportaron la decoloración del colorante *Lanaset Marine* en cultivos de biopelículas de *Trametes hirsuta* en reactor de lecho fluidizado de 96% a las 24 horas de cultivo, y atribuyeron la decoloración a la actividad de lacasas y adsorción. Svobodová et al. (2007) reportaron la decoloración del tinte *Reactive Orange 16* en cultivos de biopelículas de *Irpex lacteus* en reactor de lecho fluidizado, observaron 80% de decoloración a las 24 horas de cultivo.

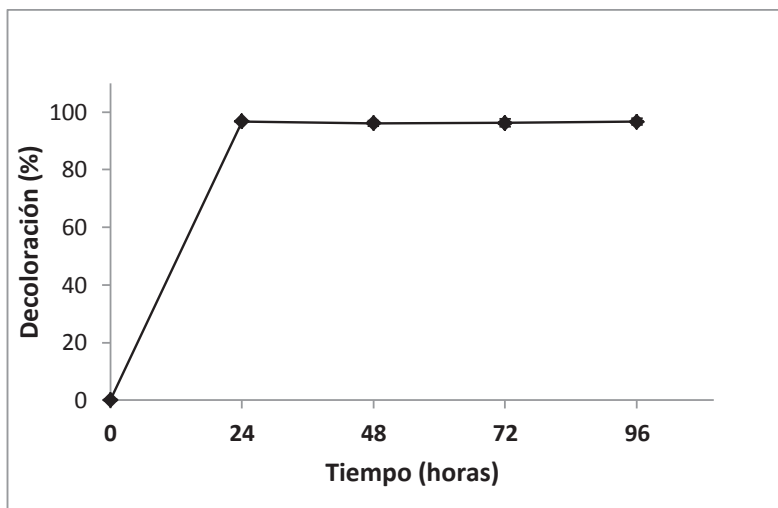


Figura 18. Cinética de Degradación (Espectrofotometría) de Azul Brillante por Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5).

Tabla 3. Cinética de Degradación (HPLC) de Azul Brillante por Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5).

Tiempo (h)	Decoloración (%)
0	8.86
24	>97.50
48	>97.50
72	>97.50
96	>97.50

n=2

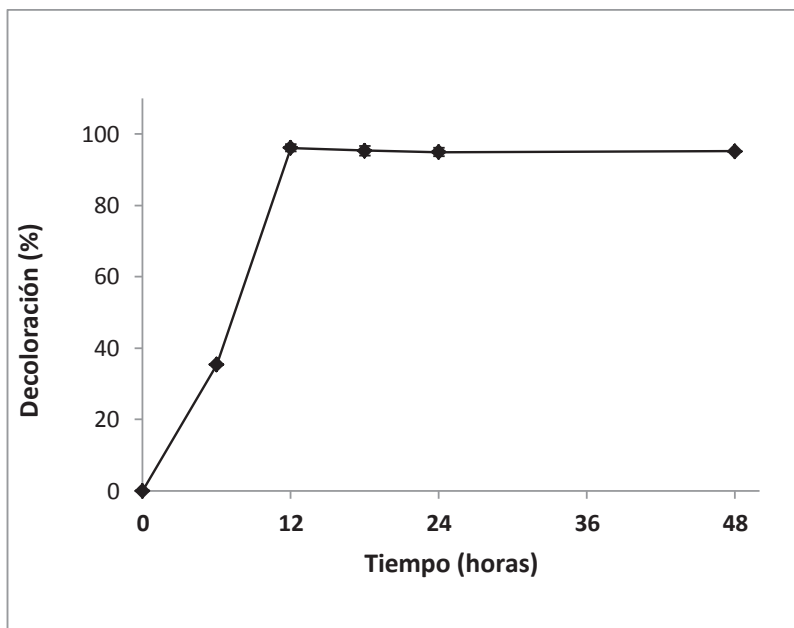


Figura 19. Cinética de Degradación (Espectrofotometría) de Azul Brillante por Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5).

Tabla 4. Cinética de Degradación (HPLC) de Azul Brillante por Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5).

Tiempo (h)	Decoloración (%)
0	0.06
6	15.16
12	86.85
18	91.22
24	>98.75
48	>98.75

n=2

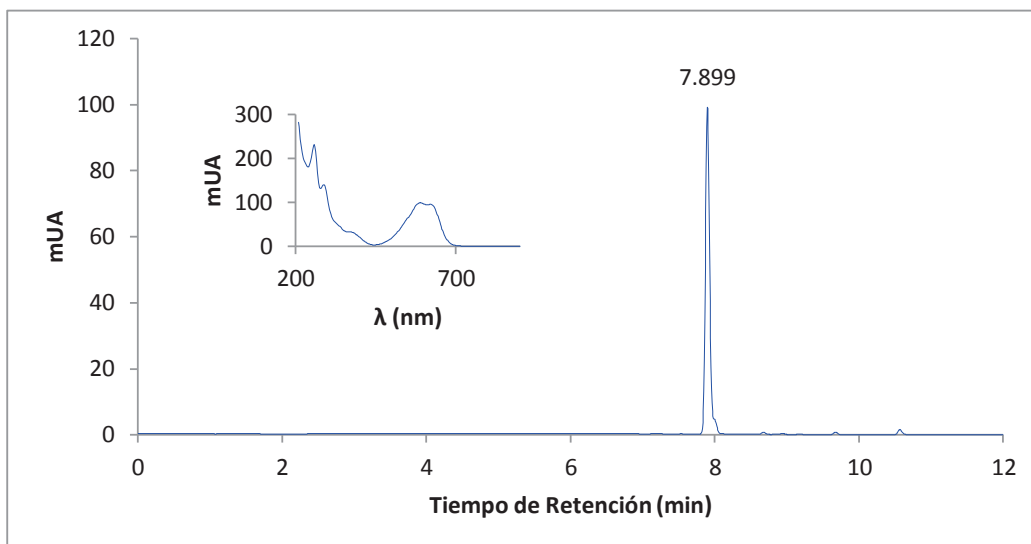


Figura 20. Cromatografía de Fase Reversa (Columna ZORBAX SB-C18 5 μ m 4.6 x 150 mm) de Proceso de Decoloración de Azul Brillante durante 0 h con Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5) a 590 nm. El pico señalado corresponde a Azul Brillante. En el recuadro pequeño se muestra el espectro del pico señalado. Dilución de la muestra: 1 en 10.

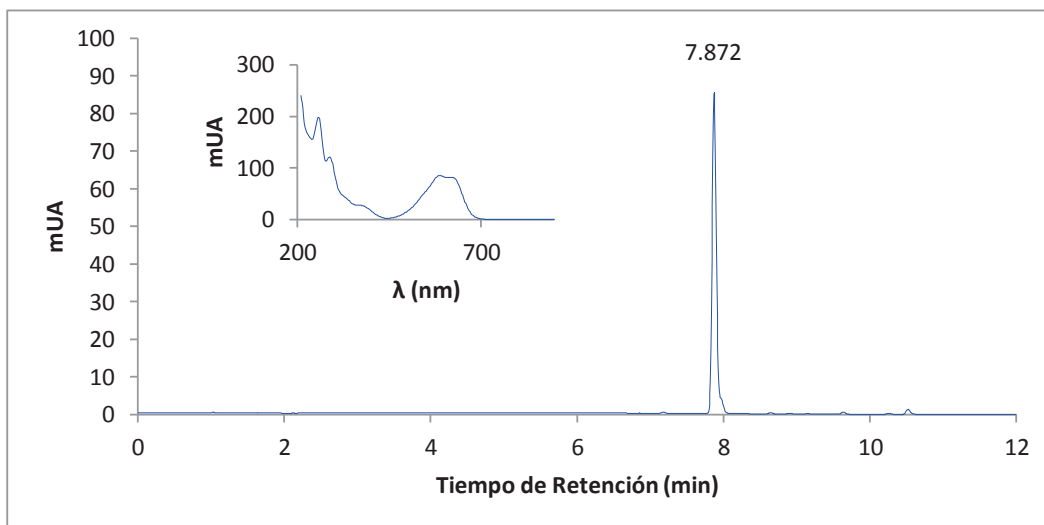


Figura 21. Cromatografía de Fase Reversa (Columna ZORBAX SB-C18 5 μ m 4.6 x 150 mm) de Proceso de Decoloración de Azul Brillante durante 6 h con Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5) a 590 nm. El pico señalado corresponde a Azul Brillante. En el recuadro pequeño se muestra el espectro del pico señalado. Dilución de la muestra: 1 en 10.

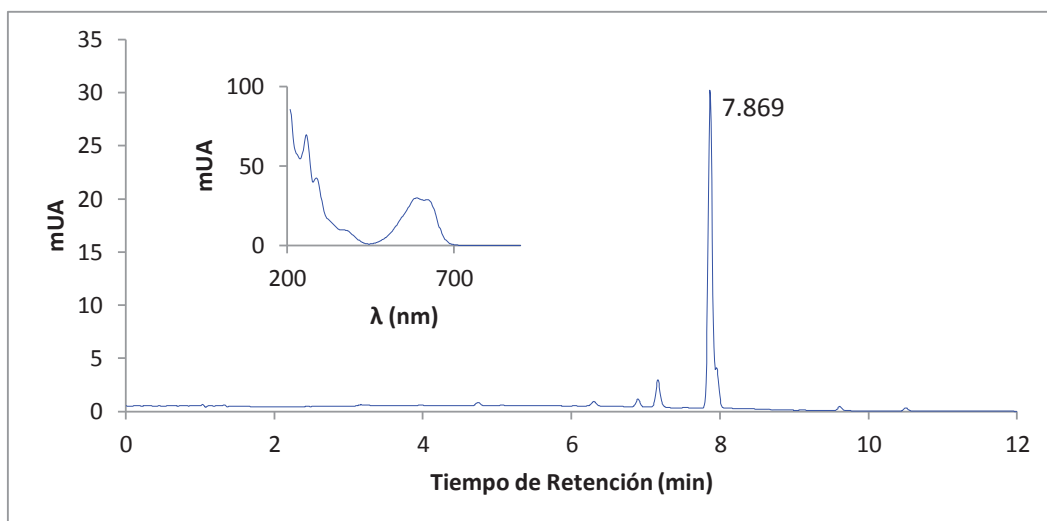


Figura 22. Cromatografía de Fase Reversa (Columna ZORBAX SB-C18 5 μm 4.6 x 150 mm) de Proceso de Decoloración de Azul Brillante durante 12 h con Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5) a 590 nm. El pico señalado corresponde a Azul Brillante. En el recuadro pequeño se muestra el espectro del pico señalado. Dilución de la muestra: 1 en 5.

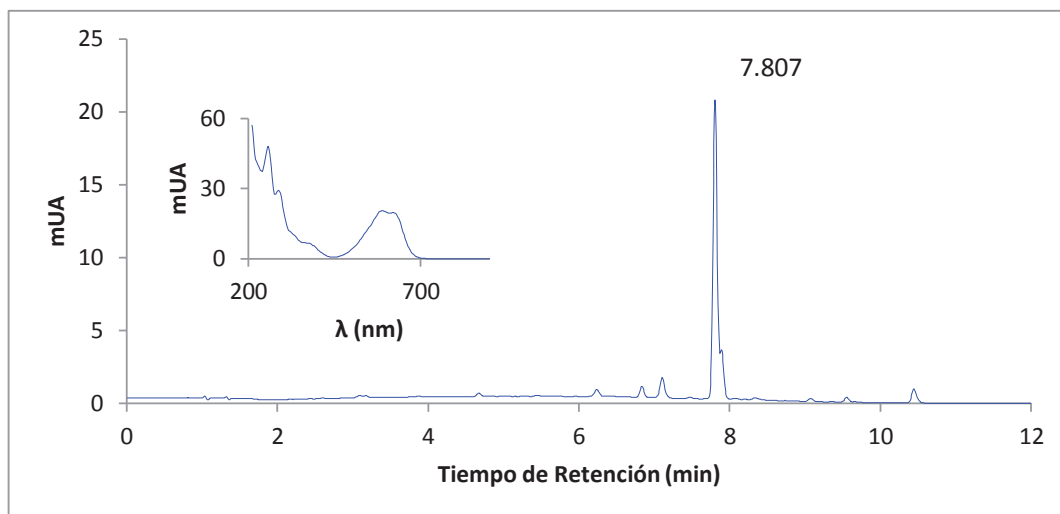


Figura 23. Cromatografía de Fase Reversa (Columna ZORBAX SB-C18 5 μm 4.6 x 150 mm) de Proceso de Decoloración de Azul Brillante durante 18 h con Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5) a 590 nm. El pico señalado corresponde a Azul Brillante. En el recuadro pequeño se muestra el espectro del pico señalado. Dilución de la muestra: 1 en 5.

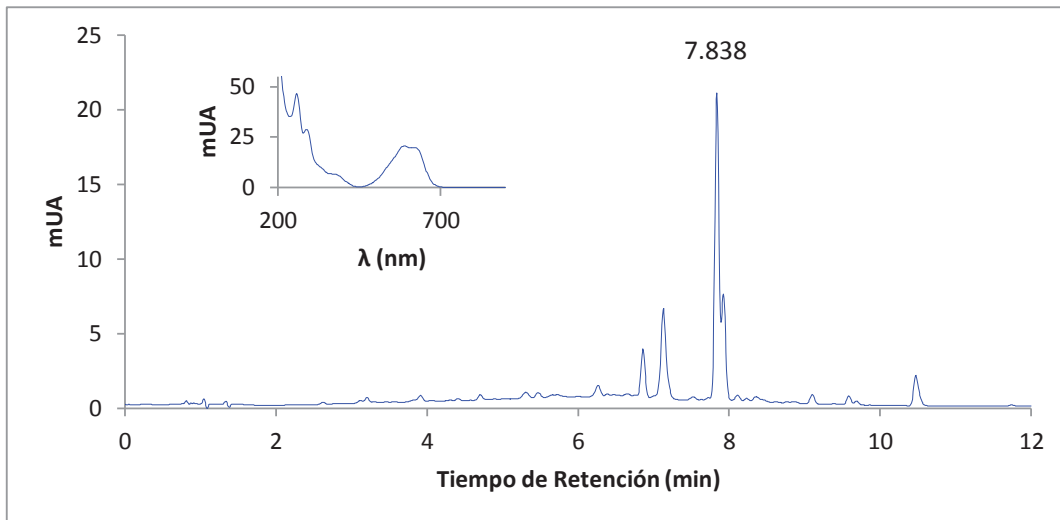


Figura 24. Cromatografía de Fase Reversa (Columna ZORBAX SB-C18 5 μm 4.6 x 150 mm) de Proceso de Decoloración de Azul Brillante durante 24 h con Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5) a 590 nm. El pico señalado corresponde a Azul Brillante. En el recuadro pequeño se muestra el espectro del pico señalado.

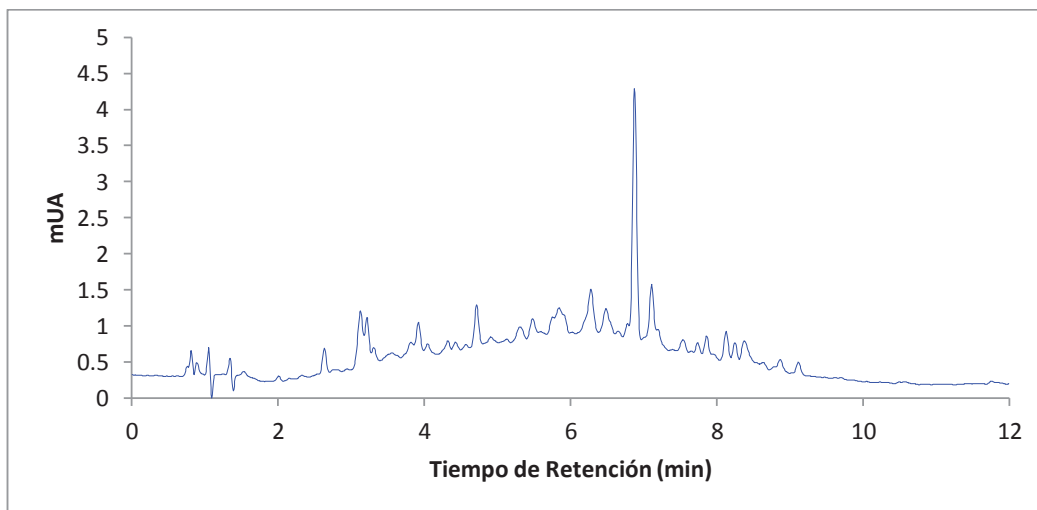


Figura 25. Cromatografía de Fase Reversa (Columna ZORBAX SB-C18 5 μm 4.6 x 150 mm) de Proceso de Decoloración de Azul Brillante durante 48 h con Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5) a 590 nm.

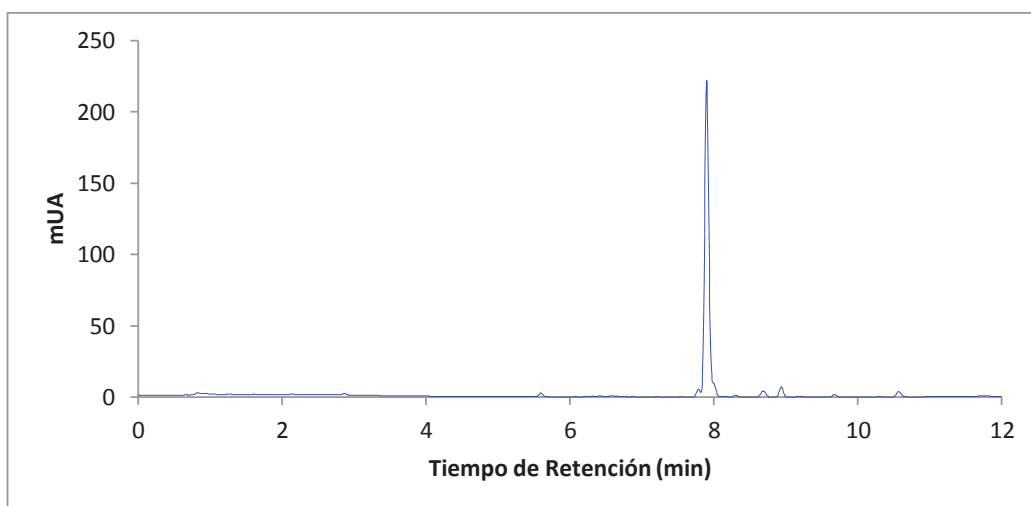


Figura 26. Cromatografía de Fase Reversa (Columna ZORBAX SB-C18 5 μm 4.6 x 150 mm) de Proceso de Decoloración de Azul Brillante durante 0 h con Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5) a 254 nm. Dilución de la muestra: 1 en 10.

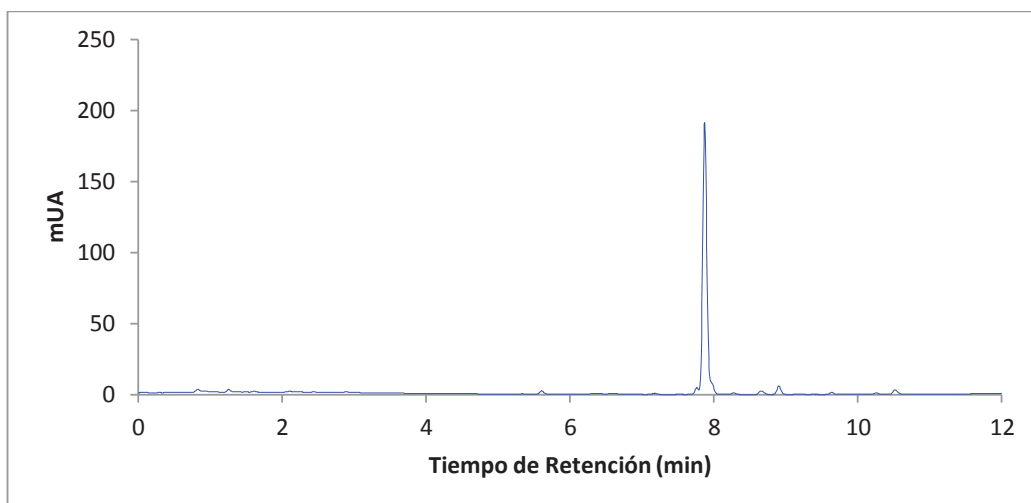


Figura 27. Cromatografía de Fase Reversa (Columna ZORBAX SB-C18 5 μm 4.6 x 150 mm) de Proceso de Decoloración de Azul Brillante durante 6 h con Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5) a 254 nm. Dilución de la muestra: 1 en 10.

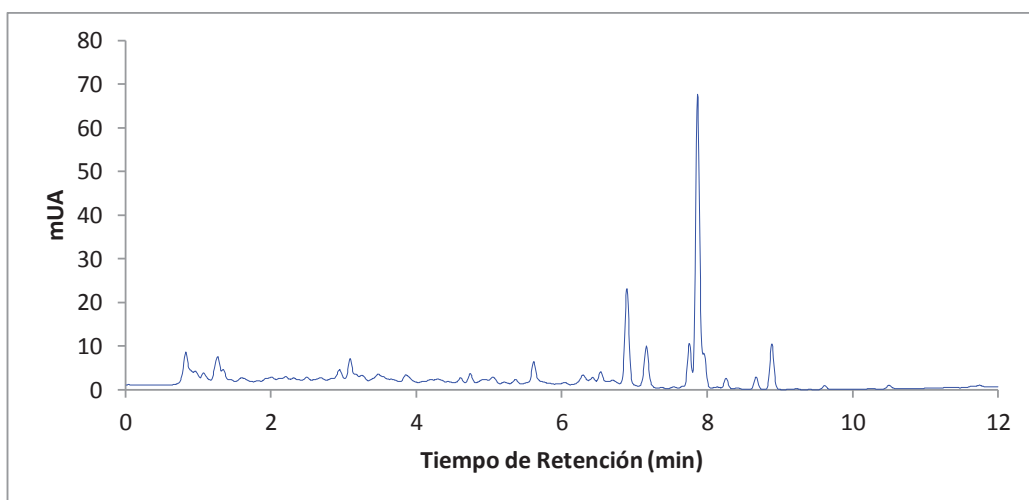


Figura 28. Cromatografía de Fase Reversa (Columna ZORBAX SB-C18 5 μ m 4.6 x 150 mm) de Proceso de Decoloración de Azul Brillante durante 12 h con Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5) a 254 nm. Dilución de la muestra: 1 en 5.

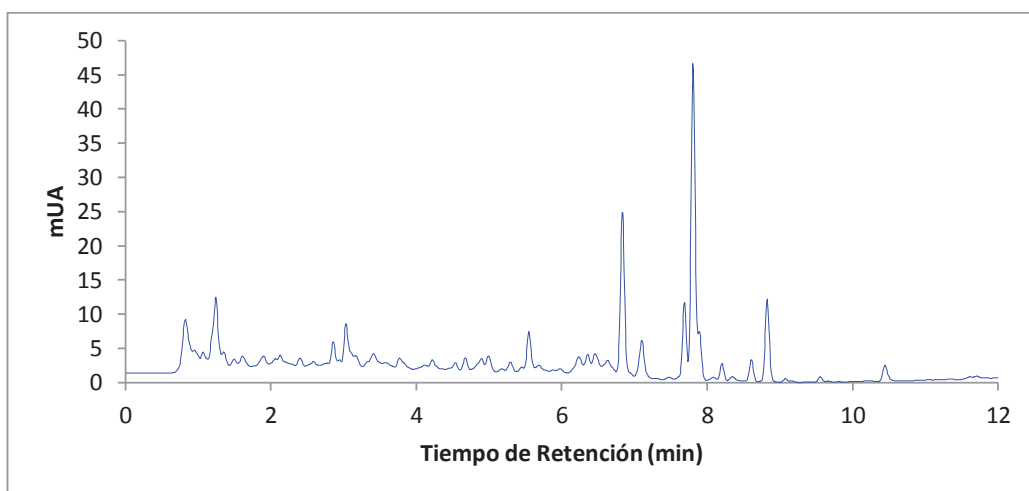


Figura 29. Cromatografía de Fase Reversa (Columna ZORBAX SB-C18 5 μ m 4.6 x 150 mm) de Proceso de Decoloración de Azul Brillante durante 18 h con Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5) a 254 nm. Dilución de la muestra: 1 en 5.

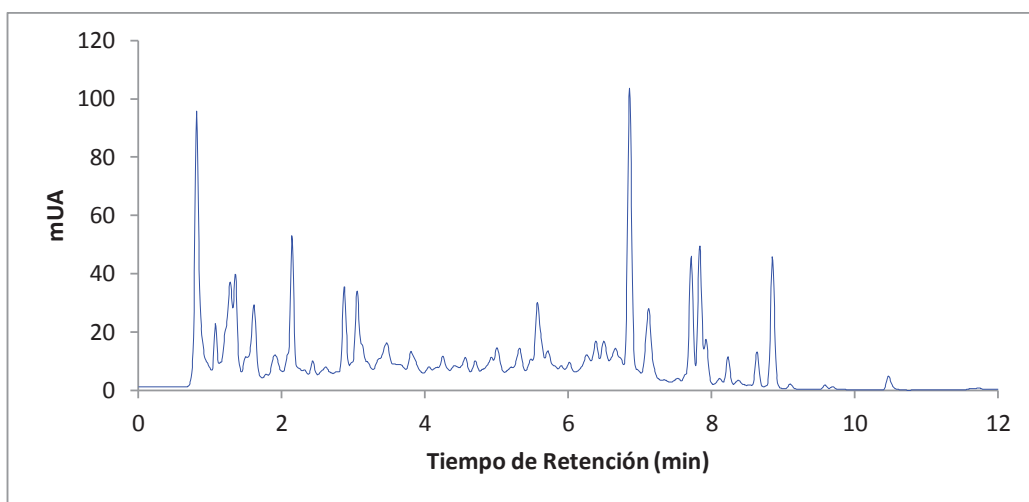


Figura 30. Cromatografía de Fase Reversa (Columna ZORBAX SB-C18 5 μ m 4.6 x 150 mm) de Proceso de Decoloración de Azul Brillante durante 24 h con Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5) a 254 nm.

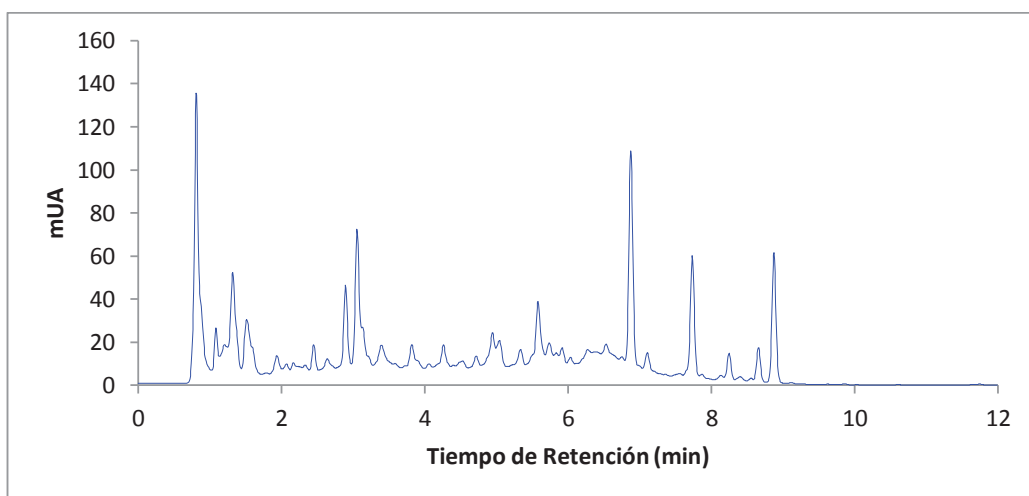


Figura 31. Cromatografía de Fase Reversa (Columna ZORBAX SB-C18 5 μ m 4.6 x 150 mm) de Proceso de Decoloración de Azul Brillante durante 48 h con Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5) a 254 nm.

4.7. Degradación de azul brillante con lacasa purificada

Se evaluó la decoloración de azul brillante con la lacasa purificada de los cultivos de biopelícula de la cepa LMBTM5. La decoloración luego de una hora fue 59.85% por espectrofotometría y > 75% por HPLC (Tabla 5 y Tabla 6). A las 12 horas la decoloración fue de 80.96% y > 75% por espectrofotometría y HPLC respectivamente (Tabla 5 y Tabla 6). En los cromatogramas a 254 nm se puede observar la presencia de productos de degradación de azul brillante luego de 1 y 12 horas de decoloración (Figura 33 y Figura 35).

Se ha reportado la capacidad de lacasas de decolorar diferentes tintes. Zhu et al. (2011) usaron una lacasa purificada de *Trametes versicolor* para decolorar 5 tintes: azul de bromofenol, verde brillante, rojo de cresol, cristal violeta y rojo de metilo y observaron porcentajes de decoloración mayores a 75.6% en una hora. Una lacasa aislada de cultivos de *Trametes trogii* fue usada para degradar los tintes verde de malaquita, cristal violeta, rojo ácido y azul de bromofenol obteniéndose porcentajes de decoloración de 83.6, 95.7, 81.0 y 96.4% (Yan et al. 2014). Otra enzima purificada de *Trametes versicolor* fue capaz de decolorar 90% de RBBR (Guo et al. 2008). Zouari-Mechichi et al. (2006) purificaron una lacasa de *Trametes trogii* y evaluaron la decoloración tintes textiles tratados con la enzima purificada. Se observaron porcentajes de decoloración de 40.5, 0.0, 86.4, 0.0, 91.5 y 68.5% para *Neolane yellow*, *Maxillon blue*, *Neolane pink*, *Basacryl yellow*, *Neolane blue* y *Bezaktiv yellow* respectivamente.

En otros estudios se ha evaluado la capacidad de lacasas para decolorar efluentes textiles. Zapata-Castillo et al. (2012) reportó el uso de una lacasa purificada de *Trametes hirsuta* para decolorar el tinte *acid blue* y un efluente textil. El tinte fue decolorado en su totalidad mientras que el efluente fue decolorado 36%.

Una forma de aumentar la decoloración de compuestos orgánicos por lacasas es el uso de mediadores redox. Los mediadores redox son moléculas de bajo peso molecular que funcionan como lanzaderas de electrones (*electron shuttles*) que permiten la oxidación de sustratos complejos que no pueden entrar al sitio activo de la enzima. Luego de ser oxidados por la enzima, los mediadores permiten la oxidación de compuestos que no son sustratos de las lacasas por su tamaño o por su alto potencial redox (Cañas y Camarero 2010). Una lacasa purificada de *Trametes trogii* fue capaz de decolorar más de 85% de seis tintes: RBBR, carmín de índigo, *xylidine*, verde de malaquita, violeta de genciana y azul de

bromofenol luego de 24 horas. Al añadir el mediador redox HBT la decoloración de algunos de los tintes aumentó (Grassi et al. 2011). En otro estudio se reportó el uso de una lacasa de *Pleurotus ostreatus* para decolorar el tinte antraquinonico SN4R. No se observó decoloración en el tratamiento sólo con la enzima pero al agregarle el mediador redox ABTS la decoloración fue de 85% (Hou et al. 2004).

Tabla 5. Decoloración de Azul Brillante (espectrofotometría) con Lacasa Purificada Producida por Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5).

Tiempo (h)	Decoloración (%)
1	59.85
12	80.96

n=2

Tabla 6. Decoloración de Azul Brillante (HPLC) con Lacasa Purificada Producida por Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5).

Tiempo (h)	Decoloración (%)
1	>75%
12	>75%

n=2

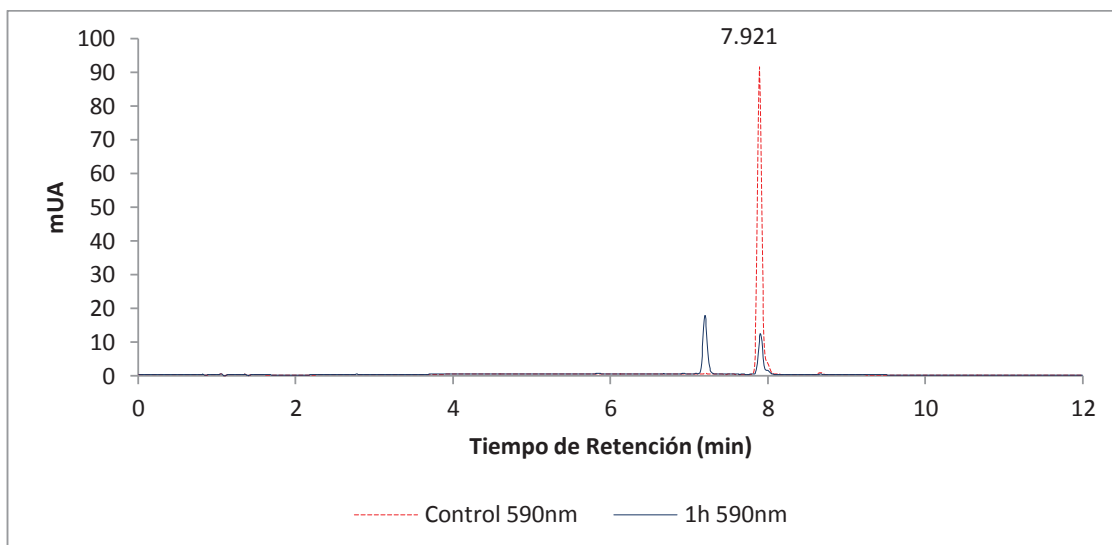


Figura 32. Cromatografía de Fase Reversa (Columna ZORBAX SB-C18 5 μ m 4.6 x 150 mm) de Proceso de Decoloración de Azul Brillante Durante 1 h con Lacasa Purificada de *Trametes polyzona* (LMBTM5) a 590 nm. El pico señalado corresponde a Azul Brillante.

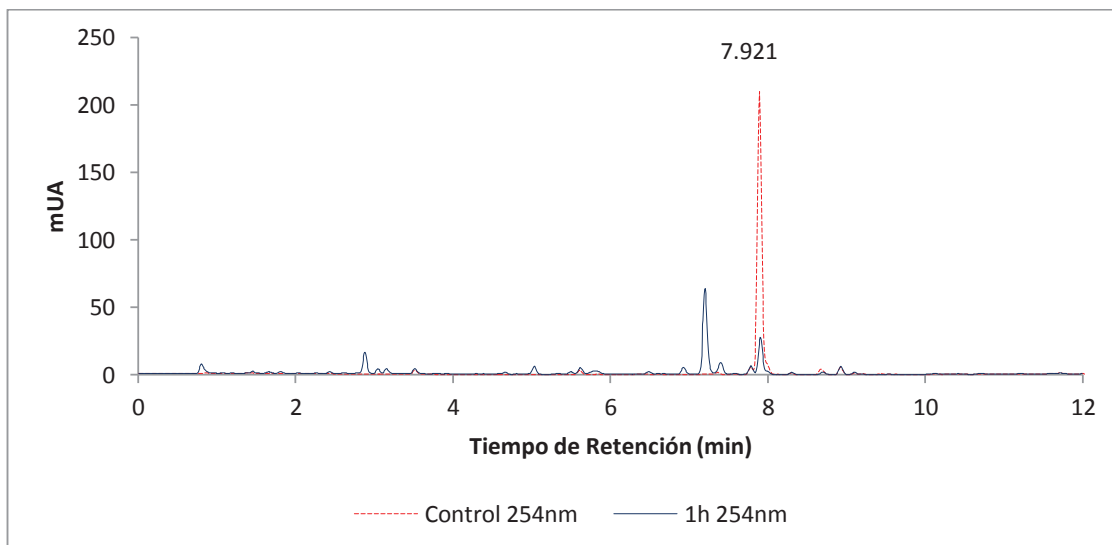


Figura 33. Cromatografía de Fase Reversa (Columna ZORBAX SB-C18 5 μ m 4.6 x 150 mm) de Proceso de Decoloración de Azul Brillante durante 1 h con Lacasa Purificada de *Trametes polyzona* (LMBTM5) a 254 nm. El pico señalado corresponde a Azul Brillante.

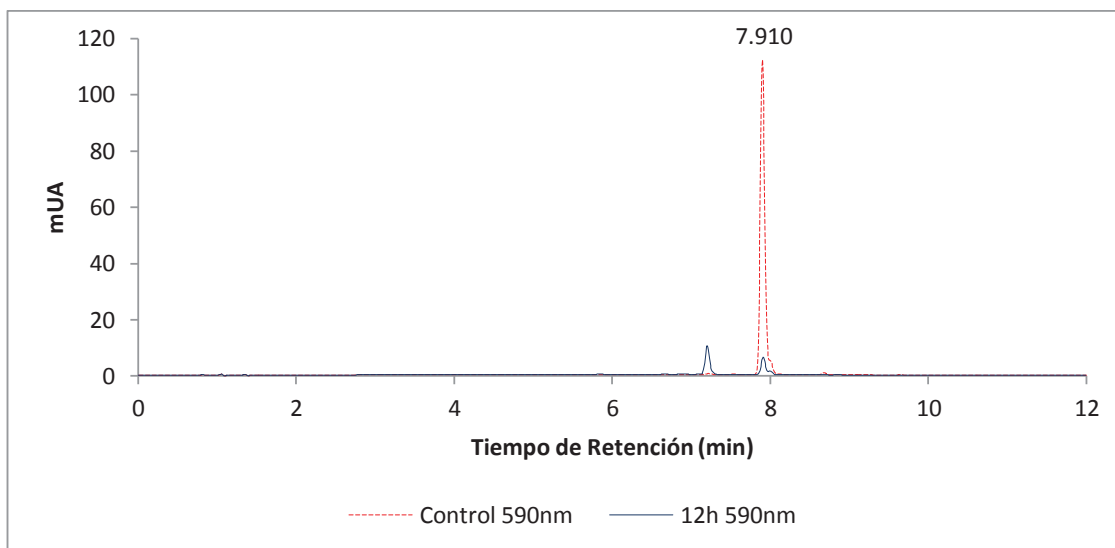


Figura 34. Cromatografía de Fase Reversa (Columna ZORBAX SB-C18 5 μ m 4.6 x 150 mm) de Proceso de Decoloración de Azul Brillante Durante 12 h con Lacasa Purificada de *Trametes polyzona* (LMBTM5) a 590 nm. El pico señalado corresponde a Azul Brillante.

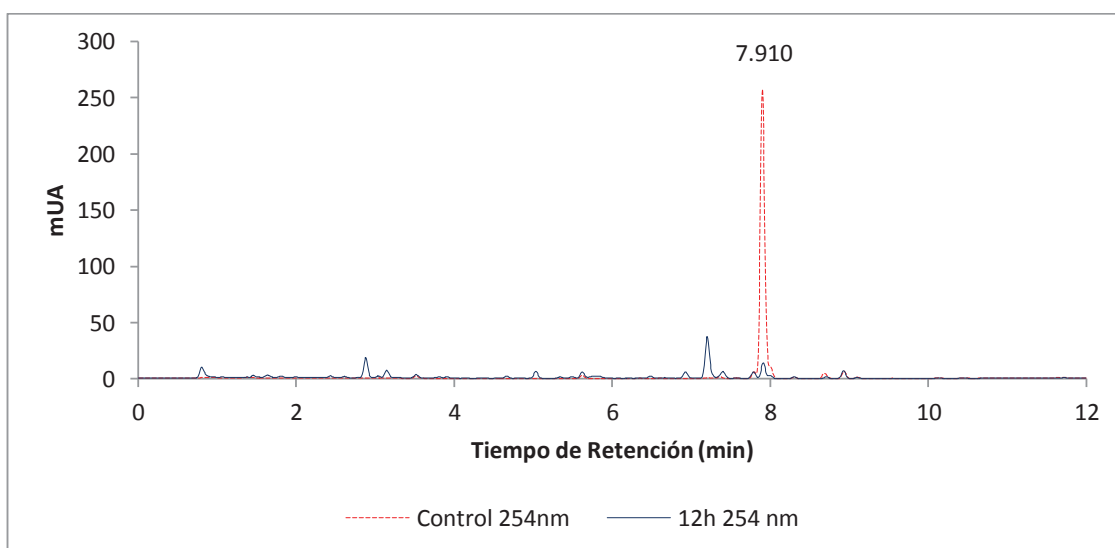


Figura 35. Cromatografía de Fase reversa (Columna ZORBAX SB-C18 5 μ m 4.6 x 150 mm) de Proceso de Decoloración Azul Brillante durante 12 h con Lacasa Purificada de *Trametes polyzona* (LMBTM5) a 254 nm. El pico señalado corresponde a Azul Brillante.

V. CONCLUSIONES

-La cepa de *Trametes polyzona* LMBTM5 produce al menos una lacasa, pero no lignina peroxidasa ni manganeso peroxidasa en cultivos en biopelículas bajo las condiciones ensayadas.

- La cepa de *Trametes polyzona* LMBTM5 produce una lacasa de peso molecular 59.4 kDa.

-La lacasa purificada es responsable de la decoloración de azul brillante observada en los cultivos de biopelícula de la cepa LMBTM5.

VI. RECOMENDACIONES

- Secuenciar la proteína purificada para comprobar su identidad como lacasa.
- Evaluar la decoloración de otros tintes producida por la lacasa aislada.
- Evaluar el uso de mediadores redox en la decoloración de tintes por la lacasa aislada.
- Optimizar el medio de cultivo para aumentar la actividad enzimática de lacasas, LiP y MnP.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aust, SD. 1995. Mechanisms of degradation by white rot fungi. *Environmental Health Perspectives* 103 Suppl: 59-61.
2. Axelsson, J; Nilsson, U; Terrazas, E; Alvarez Aliaga, T; Welander, U. 2006. Decolorization of the textile dyes Reactive Red 2 and Reactive Blue 4 using *Bjerkandera* sp. Strain BOL 13 in a continuous rotating biological contactor reactor. *Enzyme and Microbial Technology* 39(1): 32-37.
3. Baldrian, P. 2002. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiology Letters* 206(1): 69-74.
4. Baldrian, P. 2006. Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* 30(2): 215-42.
5. Banat, IM; Nigam, P; Singh, D; Marchant, R. 1996. Microbial Decolorization Of Textile-Dye- Containing Effluents: A Review. *Bioresource Technology* 58(3): 217-227.
6. Bhaskar, M; Gnanamani, A; Ganeshjeevan, RJ; Chandrasekar, R; Sadulla, S; Radhakrishnan, G. 2003. Analyses of carcinogenic aromatic amines released from harmful azo colorants by *Streptomyces* SP. SS07. *Journal of Chromatography A* 1018(1): 117-123.
7. Blauch, R; Esser, K. 1975. Function of enzymes in wood destroying fungi - II. Multiple forms of laccase in white rot fungi. *Archives of Microbiology* 103: 271-277.
8. Blum, H; Beier, H; Gross, HJ. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8(2): 93-99.
9. Bonner, PLR. 2007. *Protein Purification*. 230 p.
10. Cai, D; Tieng, M. 1992. Kinetic Studies on the Formation and Decomposition of Compounds II and III. *The Journal of Biological Chemistry* 267(16): 11149-11155.
11. Cañas, AI; Camarero, S. 2010. Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology advances* 28(6): 694-705.

12. Castillo, MP; Stenström, J; Ander, P. 1994. Determination of manganese peroxidase activity with 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone and 3-(dimethylamino)benzoic acid. *Analytical Biochemistry* 218(2): 399-404.
13. Cerrón Alván, L. 2014. Aislamiento y selección de basidiomicetos con capacidad de decoloración de tintes azoicos. Tesis para obtener el título de Biólogo. Universidad Nacional Agraria La Molina. 181 p.
14. Chagas, EP; Durrant, LR. 2001. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. *Enzyme and Microbial Technology* 29(8-9): 473-477.
15. Chairin, T; Nitheranont, T; Watanabe, A; Asada, Y; Khanongnuch, C; Lumyong, S. 2014. Purification and characterization of the extracellular laccase produced by *Trametes polyzona* WR710-1 under solid-state fermentation. *Journal of Basic Microbiology* 54(1): 35-43.
16. Chung, KT; Stevens, SE; Cerniglia, CE. 1992. The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. *Critical Reviews in Microbiology* 18(3): 175-190.
17. Collins, PJ; Dobson, ADW. 1997. Regulation of Laccase Gene Transcription in Regulation of Laccase Gene Transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* 63(9): 3444-3450.
18. Cordi, L; Minussi, RC; Freire, RS; Duran, N. 2007. Fungal laccase: copper induction, semi-purification , immobilization , phenolic effluent treatment and electrochemical measurement. *African Journal of Biotechnology* 6(10): 1255-1259.
19. Cutler, P. 2004. *Protein Purification Protocols*. 484 p.
20. Daâssi, D; Zouari-Mechichi, H; Prieto, A; Martínez, MJ; Nasri, M; Mechichi, T. 2013. Purification and biochemical characterization of a new alkali-stable laccase from *Trametes* sp. isolated in Tunisia: role of the enzyme in olive mill waste water treatment. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 29(11): 2145-55.
21. Galhaup, C; Wagner, H; Hinterstoisser, B; Haltrich, D. 2002. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology* 30(4): 529-536.
22. Galhaup, D; Haltrich, C. 2001. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56(1-2): 225-232.
23. Glenn, JK; Morgan, MA; Mayfield, MB. 1983. An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete

- Phanerochaete chrysosporium. *Biochemistry and Biophysical Research Communications* 114(3): 1077-1083.
24. Glenn, K; Gold, H; Agarose, B. 1985. Purification and Characterization of an Extracellular Mn(II)-Dependent Peroxidase from the Lignin-Degrading Basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 242(2): 329-341.
25. Gold, H; Glenn, K; Chiu, A; Both, IX. 1984. Purification and Characterization of an Extracellular H₂O₂-Requiring Diarylpropane Oxygenase from the White Rot Basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 234(2): 353-362.
26. Grassi, E; Scodeller, P; Filiel, N; Carballo, R; Levin, L. 2011. Potential of *Trametes trogii* culture fluids and its purified laccase for the decolorization of different types of recalcitrant dyes without the addition of redox mediators. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65(4): 635-643.
27. Guo, M; Lu, F; Liu, M; Li, T; Pu, J; Wang, N; Liang, P; Zhang, C. 2008. Purification of recombinant laccase from *Trametes versicolor* in *Pichia methanolica* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Biotechnology Letters* 30(12): 2091-6.
28. Gutiérrez-Correa, M; Ludeña, Y; Ramage, G; Villena, GK. 2012. Recent Advances on Filamentous Fungal Biofilms for Industrial Uses. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167(5): 1235-1253.
29. Haibo, Z; Yinglong, Z; Feng, H; Peiji, G; Jiachuan, C. 2009. Purification and characterization of a thermostable laccase with unique oxidative characteristics from *Trametes hirsuta*. *Biotechnology Letters* 31(6): 837-43.
30. Han, M-J; Choi, H-T; Song, H-G. 2005. Purification and Characterization of Laccase from the White Rot Fungus *Trametes versicolor*. *The Journal of Microbiology* 43(6): 555-560.
31. Hatakka, A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews* 13(2-3): 125-135.
32. Hofrichter, M. 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology* 30(4): 454-466.
33. Hou, H; Zhou, J; Wang, J; Du, C; Yan, B. 2004. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochemistry* 39(11): 1415-1419.

34. Jabra-Rizk, MA; Falkler, WA; Meiller, TF. 2004. Fungal biofilms and drug resistance. *Emerging Infectious Diseases* 10(1): 14-9.
35. Jordaan, J; Leukes, WD. 2003. Isolation of a thermostable laccase with DMAB and MBTH oxidative coupling activity from a mesophilic white rot fungus. *Enzyme and Microbial Technology* 33(1): 212-219.
36. Kapdan, KI; Kargi, F. 2002. Biological decolorization of textile dyestuff containing wastewater by *Coriolus versicolor* in a rotating biological contactor. *Enzyme and Microbial Technology* 30(2): 195-199.
37. Kent Kirk, T. 1987. Enzymatic «Combustion»: The Microbial Degradation of Lignin. *Annual Review of Microbiology* 41: 465-505.
38. Kerem, Z; Friesem, D; Hadar, Y. 1992. Lignocellulose Degradation during Solid-State Fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 58(4): 1121-1127.
39. Khan, R; Bhawana, P; Fulekar, MH. 2012. Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 12(1): 75-97.
40. Kirk, TK; Tien, M. 1983. Biochemistry of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*: Investigations with non-phenolic model compounds. *Recent Advances in Lignin Biodegradation Research*: 233-45.
41. Kuwahara, M; Glenn, JK; Morgan, MA; Gold, MH. 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS* 169(2): 247-250.
42. Lee, I; Jung, K; Lee, C; Park, Y. 1999. Enhanced production of laccase in *Trametes versicolor* by the addition of ethanol. *Biotechnology Letters* 21: 965-968.
43. Levin, L; Forchiassin, F; Ramos, AM. 2002. Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Mycologia* 94(3): 377-83.
44. Linko, S; Haapala, R. 1993. A Critical Study of Lignin Peroxidase Activity by Veratryl Alcohol Oxidation. *Biotechnology Techniques* 7(1): 75-80.
45. Madhavi, V; Lele, SS. 2009. Laccase: properties and applications. *Bioresources* 4(4):1694-1717.
46. Martínez, AT; Speranza, M; Ruiz-Dueñas, FJ; Ferreira, P; Camarero, S; Guillén, F; Martínez, MJ; Gutiérrez, A; del Río, JC. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology* 8(3): 195-204.

47. Mayer, AM; Staples, RC. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60(6): 551-65.
48. McMullan, G; Meehan, C; Conneely, A; Kirby, N; Robinson, T; Nigam, P; Banat, IM; Marchant, R; Smyth, WF. 2001. Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56(1-2): 81-87.
49. Minussi, RC; Miranda, MA; Silva, JA; Ferreira, C V; Aoyama, H; Rotilio, D; Pastore, GM; Durán, N. 2007. Purification , characterization and application of laccase from *Trametes versicolor* for colour and phenolic removal of olive mill wastewater in the presence of 1- hydroxybenzotriazole. *African Journal of Biochemistry* 6(10): 1248-1254.
50. Minussi, RC; Pastore, M; Dura, N. 2002. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology* 13: 205-216.
51. Moreira-Neto, SL; Mussatto, SI; Machado, KMG; Milagres, AMF. 2013. Decolorization of salt-alkaline effluent with industrial reactive dyes by laccase-producing Basidiomycetes strains. *Letters in applied microbiology* 56(4): 283-90.
52. Morozova, O V; Shumakovich, GP; Gorbacheva, MA; Shleev, S V; Yaropolov, A I. 2007. «Blue» laccases. *Biokhimiya* 72(10): 1136-50.
53. Mougin, C; Jolival, C; Briozzo, P; Madzak, C. 2003. Fungal laccases: from structure-activity studies to environmental applications. *Environmental Chemistry Letters* 1(2): 145-148.
54. Niku-Paavola, MLL; Raaska, L; Itävaara, M. 1990. Detection of white-rot fungi by a non-toxic stain. *Mycological Research* 94(1): 27-31.
55. Nyanhongo, GS; Gomes, J; Gübitz, GM; Zvauya, R; Read, J; Steiner, W. 2002. Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Water Research* 36(6): 1449-56.
56. Øllgaard, H; Frost, L; Galster, J; Hansen, OC. 1998. Survey of azo-colorants in Denmark?: Consumption , use , health and environmental aspects. Ministry of Environment and Energy, Denmark and Danish Environmental Protection Agency, p.147-290.
57. Palmieri, G; Giardina, P; Bianco, C; Sannia, G; Fontanella, B. 2000. Copper Induction of Laccase Isoenzymes in the Ligninolytic Fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 66(3): 920-924.
58. Pointing, S. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57(1-2): 20-33.

59. Ramage, G; Rajendran, R; Gutierrez-Correa, M; Jones, B; Williams, C. 2011. *Aspergillus* biofilms clinical and industrial significance. *FEMS Microbiology Letters* 324: 89-97.
60. Ramsay, J; Shin, M; Wong, S; Goode, C. 2006. Amaranth decoloration by *Trametes versicolor* in a rotating biological contacting reactor. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 33(9): 791-795.
61. Reddy, A. 1995. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Current Opinion in Biotechnology* 6: 320-328.
62. Renganathan, V; Gold, MH. 1986. Spectral Characterization of the Oxidized States of Lignin Peroxidase, an Extracellular Heme Enzyme from the White Rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry* 25: 1626-1631.
63. Robinson, T; McMullan, G; Marchant, R; Nigam, P. 2001. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource technology* 77(3): 247-55.
64. Rodríguez Couto, S; Sanromán, M a.; Hofer, D; Gübitz, GM. 2004. Stainless steel sponge: A novel carrier for the immobilisation of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* for decolourization of textile dyes. *Bioresource Technology* 95(1): 67-72.
65. Rodríguez Couto, S. 2009. Dye removal by immobilized fungi. *Biotechnology advances* 27(3): 227-35.
66. Sambrook, J; Fritsch, EF; Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2° ed. 1626 p.
67. Sandholm, TM; Wirtanen, G. 2009. Biofilm formation in the industry: A review. *Food Reviews International* 8(4): 573-603.
68. Scheibner, K; Hofrichter, M; Fritsche, W. 1997. Mineralization of 2-amino-4, 6-dinitrotoluene by manganese peroxidase of the white-rot fungus *Nematoloma frowardii*. *Biotechnology Letters* 19(9): 835-839.
69. Shanmugam, S. 2009. *Enzyme Technology*. 232 p.
70. Shin, KS; Lee, YJ. 2000. Purification and characterization of a new member of the laccase family from the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 384(1): 109-15.
71. Si, J; Peng, F; Cui, B. 2013. Purification, biochemical characterization and dye decolorization capacity of an alkali-resistant and metal-tolerant laccase from *Trametes pubescens*. *Bioresource Technology* 128(1): 49-57.

72. Siemiatycki, J; Richardson, L; Straif, K; Latreille, B; Lakhani, R; Campbell, S; Rousseau, M-C; Boffetta, P. 2004. Listing occupational carcinogens. *Environmental health perspectives* 112(15): 1447-59.
73. Solís, M; Solís, A; Pérez, HI; Manjarrez, N; Flores, M. 2012. Microbial decolouration of azo dyes: A review. *Process Biochemistry* 47(12): 1723-1748.
74. Souza, ÉS De; Sampaio, IDL; Freire, AKDL; Khell, B; Silva, S; Sobrinho, AS; Lima, AM; Souza, JVB. 2011. Production of *Trametes versicolor* laccase by solid state fermentation using a fixed-bed bioreactor. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 9(2): 55-58.
75. Svobodová, K; Senholdt, M; Novotný, C; Rehorek, A. 2007. Mechanism of Reactive Orange 16 degradation with the white rot fungus *Irpex lacteus*. *Process Biochemistry* 42(9): 1279-1284.
76. Swamy, J; Ramsay, JA. 1999. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. 24(983-4): 130-137.
77. Tien, M; Kirk, TK. 1984. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81(8): 2280-2284.
78. Wariishi, H; Gold, MH. 1989. Lignin peroxidase compound III Formation, inactivation, and conversion to the native enzyme. *FEBS Letters* 243(2): 165-168.
79. Wariishi, H. 1999. Manganese (II) Oxidation by Manganese Peroxidase from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *The Journal of Biological Chemistry* 267(33): 23688-23695.
80. Waterborg, J. 2009. The Lowry method for protein quantitation. *The Protein Protocols Handbook*. Humana Press. p.7-10.
81. Wesenberg, D; Kyriakides, I; Agathos, SN. 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances* 22(1-2): 161-187.
82. Widsten, P; Kandelbauer, A. 2008. Laccase applications in the forest products industry: A review. *Enzyme and Microbial Technology* 42(4): 293-307.
83. Witayakran, S; Ragauskas, AJ. 2009. Synthetic Applications of Laccase in Green Chemistry. *Advanced Synthesis & Catalysis* 351(9): 1187-1209.
84. Wong, DWS. 2009. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 157(2):174-209.

85. Yan, J; Chen, D; Yang, E; Niu, J; Chen, Y; Chagan, I. 2014. Purification and characterization of a thermotolerant laccase isoform in *Trametes trogii* strain and its potential in dye decolorization. *International Biodeterioration & Biodegradation* 93(1): 186-194.
86. Yang, Q; Li, C; Li, H; Li, Y; Yu, N. 2009. Degradation of synthetic reactive azo dyes and treatment of textile wastewater by a fungi consortium reactor. *Biochemical Engineering Journal* 43(3): 225-230.
87. Yaver, DS; Xu, F; Golightly, EJ; Brown, KM; Brown, SH; Rey, MW; Schneider, P; Halkier, T; Mondorf, K; Dalboge, H; Yaver, DS; Xu, F; Golightly, EJ; Brown, KIMM; Brown, SH; Rey, MW; Schneider, P; Halkier, T; Mondorf, K. 1996. Purification, Characterization, Molecular Cloning, and Expression of Two Laccase Genes from the White Rot Basidiomycete *Trametes villosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 62(3): 834-841.
88. Zapata-Castillo, P; Villalonga-Santana, MDL; Tamayo-Cortés, J; Rivera-Muñoz, G; Solís-Pereira, S. 2012. Purification and characterization of laccase from *Trametes hirsuta* Bm-2 and its contribution to dye and effluent decolorization. *African Journal of Biotechnology* 11(15): 3603-3611.
89. Zengin, G; Ozgunay, H; Ayan, EM; Mutlu, MM. 2012. Determination of Dyestuffs Remaining in Dyeing Processes of Vegetable-Tanned Leathers and Their Removal Using Shavings. *Polish Journal of Environmental Studies* 21(2): 499-508.
90. Zhao, D; Zhang, X; Cui, D; Zhao, M. 2012. Characterisation of a novel white laccase from the deuteromycete fungus *Myrothecium verrucaria* NF-05 and its decolourisation of dyes. *PloS one* 7(6): e38817.
91. Zhao, X; Hardin, IR; Hwang, H-M. 2006. Biodegradation of a model azo disperse dye by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 57(1): 1-6.
92. Zhao, X; Hardin, IR. 2007. HPLC and spectrophotometric analysis of biodegradation of azo dyes by *Pleurotus ostreatus*. *Dyes and Pigments* 73(3): 322-325.
93. Zhao, X. 2004. Analysis of Fungal Degradation Products of Azo Dyes. Tesis Doctoral. The University of Georgia. 116 p.
94. Zheng, Z; Obbard, JP. 2002. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme and Microbial Technology* 31(1-2): 3-9.

95. Zhu, Y; Zhang, H; Cao, M; Wei, Z; Huang, F; Gao, P. 2011. Production of a thermostable metal-tolerant laccase from *Trametes versicolor* and its application in dye decolorization. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 16(5): 1027-1035.
96. Zhuo, R; Ma, L; Fan, F; Gong, Y; Wan, X; Jiang, M; Zhang, X; Yang, Y. 2011. Decolorization of different dyes by a newly isolated white-rot fungi strain *Ganoderma* sp. En3 and cloning and functional analysis of its laccase gene. *Journal of hazardous materials* 192(2): 855-73.
97. Zollinger, H. 2003. *Color Chemistry: Syntheses, Properties, and Applications of Organic Dyes and Pigments*. 637 p.
98. Zouari-Mechichi, H; Mechichi, T; Dhouib, A; Sayadi, S; Martínez, AT; Martínez, MJ; Mart, AT; Mart, MJ. 2006. Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. *Enzyme and Microbial Technology* 39(1): 141-148.

ANEXOS

Anexo 1. Comparación de Biomasa en Cultivos de Biopelícula (g/L) durante la Producción de Lacasas en Medio con Azul Brillante a las 0, 24, 48, 72 y 96 h de Cultivo.

Análisis de Varianza

ANOVA Summary	
F	30.89
P value	0.0010
P value summary	**
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	Yes
R square	0.9611

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?
0 vs. 24	0.3050	-0.004952 to 0.6150	No
0 vs. 48	0.5450	0.2350 to 0.8550	Yes
0 vs. 72	0.6050	0.2950 to 0.9150	Yes
0 vs. 96	0.7850	0.4750 to 1.095	Yes
24 vs. 48	0.2400	-0.06995 to 0.5500	No
24 vs. 72	0.3000	-0.009952 to 0.6100	No
24 vs. 96	0.4800	0.1700 to 0.7900	Yes
48 vs. 72	0.0600	-0.2500 to 0.3700	No
48 vs. 96	0.2400	-0.06995 to 0.5500	No
72 vs. 96	0.1800	-0.1300 to 0.4900	No

Anexo 2. Comparación de Producción de Lacasas en Medio Basal (Suplementado con $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) y Medio con Azul Brillante.

2.1. Comparación de Producción de Lacasas en Medio Basal (Suplementado con $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) y Medio con Azul Brillante a las 24 h de Cultivo.

Prueba t student

Table Analyzed	24h basal vs AB
Column A	Medio Basal
vs.	vs.
Column B	Azul Brillante
Unpaired t test with Welch's correction	
P value	0.1072
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed

2.2. Comparación de Producción de Lacasas en Medio Basal (Suplementado con $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) y Medio con Azul Brillante a las 48 h de Cultivo.

Table Analyzed	48h basal vs AB
Column A	Medio Basal
vs.	vs.
Column B	Azul Brillante
Unpaired t test with Welch's correction	
P value	0.1411
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed

2.3. Comparación de Producción de Lacasas en Medio Basal (Suplementado con $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) y Medio con Azul Brillante a las 72 h de Cultivo.

Table Analyzed	72h basal vs AB
Column A	Medio Basal
vs.	vs.
Column B	Azul Brillante
Unpaired t test with Welch's correction	
P value	0.0301
P value summary	*
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed

2.4. Comparación de Producción de Lacasas en Medio Basal (Suplementado con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y Medio con Azul Brillante a las 96 h de Cultivo.

Table Analyzed	96h basal vs AB
Column A	Medio Basal
vs.	vs.
Column B	Azul Brillante
Unpaired t test with Welch's correction	
P value	0.0371
P value summary	*
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed

Anexo 3. Comparación de Biomasa en Cultivos de Biopelícula (g/L) durante la Producción de Lacasas en Medio Basal (Suplementado con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a las 0, 24, 48, 72 y 96 h de cultivo.

Análisis de Varianza

ANOVA summary	
F	2.027
P value	0.2289
P value summary	ns
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	No
R square	0.6185

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?
0 vs. 24	0.6950	-0.8871 to 2.277	No
0 vs. 48	0.8900	-0.6921 to 2.472	No
0 vs. 72	0.9000	-0.6821 to 2.482	No
0 vs. 96	0.9550	-0.6271 to 2.537	No
24 vs. 48	0.1950	-1.387 to 1.777	No
24 vs. 72	0.2050	-1.377 to 1.787	No
24 vs. 96	0.2600	-1.322 to 1.842	No
48 vs. 72	0.01000	-1.572 to 1.592	No
48 vs. 96	0.06500	-1.517 to 1.647	No
72 vs. 96	0.05500	-1.527 to 1.637	No

Anexo 4. Comparación de Producción de Lacasas Inducidas por Diferentes Dosis de Cobre.

4.1. Comparación de Producción de Lacasas Inducidas por Diferentes Dosis de $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ a 24 h de Cultivo

Análisis de Varianza

Table Analyzed	24h Cu 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0mM
ANOVA summary	
F	21.78
P value	0.0061
P value summary	**
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	Yes
R square	0.9423

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?
0.5mM vs. 1.0mM	84.48	23.99 to 145.0	Yes
0.5mM vs. 1.5mM	102.8	42.32 to 163.3	Yes
0.5mM vs. 2.0mM	102.5	41.96 to 162.9	Yes
1.0mM vs. 1.5mM	18.34	-42.16 to 78.83	No
1.0mM vs. 2.0mM	17.97	-42.52 to 78.46	No
1.5mM vs. 2.0mM	-0.3650	-60.86 to 60.13	No

4.2. Comparación de Producción de Lacasas Inducidas por Diferentes Dosis de $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ a 48 h de Cultivo.

Análisis de Varianza

Table Analyzed	48h Cu 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0mM
ANOVA summary	
F	5.730
P value	0.0624
P value summary	ns
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	No
R square	0.8112

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?
0.5mM vs. 1.0mM	491.7	-137.5 to 1121	No
0.5mM vs. 1.5mM	535.6	-93.65 to 1165	No
0.5mM vs. 2.0mM	537.4	-91.86 to 1167	No
1.0mM vs. 1.5mM	43.84	-585.4 to 673.0	No
1.0mM vs. 2.0mM	45.63	-583.6 to 674.8	No
1.5mM vs. 2.0mM	1.795	-627.4 to 631.0	No

4.3. Comparación de Producción de Lacasas Inducidas por Diferentes Dosis de $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ a 72 h de Cultivo.

Análisis de Varianza

Table Analyzed	72h Cu 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0mM
ANOVA summary	
F	12.84
P value	0.0161
P value summary	*
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	Yes
R square	0.9059

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?
0.5mM vs. 1.0mM	430.9	-32.41 to 894.1	No
0.5mM vs. 1.5mM	577.7	114.4 to 1041	Yes
0.5mM vs. 2.0mM	639.7	176.4 to 1103	Yes
1.0mM vs. 1.5mM	146.8	-316.4 to 610.1	No
1.0mM vs. 2.0mM	208.8	-254.4 to 672.1	No
1.5mM vs. 2.0mM	62.00	-401.3 to 525.3	No

4.4. Comparación de Producción de Lacasas Inducidas por Diferentes Dosis de CuSO₄x5H₂O a 96 h de Cultivo.

Análisis de Varianza

Table Analyzed	96h Cu 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0mM
ANOVA summary	
F	4.103
P value	0.1031
P value summary	ns
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	No
R square	0.7547

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?
0.5mM vs. 1.0mM	-709.4	-1931 to 511.8	No
0.5mM vs. 1.5mM	106.9	-1114 to 1328	No
0.5mM vs. 2.0mM	261.3	-959.8 to 1482	No
1.0mM vs. 1.5mM	816.3	-404.9 to 2037	No
1.0mM vs. 2.0mM	970.7	-250.4 to 2192	No
1.5mM vs. 2.0mM	154.4	-1067 to 1376	No

4.5. Comparación de Producción de Lacasas Inducidas por Diferentes Dosis de CuSO₄x5H₂O a 120 h de Cultivo.

Análisis de Varianza

Table Analyzed	120h Cu 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0mM
ANOVA summary	
F	14.12
P value	0.0135
P value summary	*
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	Yes
R square	0.9137

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?
0.5mM vs. 1.0mM	-1661	-3001 to -320.5	Yes
0.5mM vs. 1.5mM	-117.8	-1458 to 1222	No
0.5mM vs. 2.0mM	285.4	-1055 to 1625	No
1.0mM vs. 1.5mM	1543	202.6 to 2883	Yes
1.0mM vs. 2.0mM	1946	605.8 to 3286	Yes
1.5mM vs. 2.0mM	403.2	-936.9 to 1743	No

4.6. Comparación de Producción de Lacasas Inducidas por Diferentes Dosis de $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ a 144 h de Cultivo.

Análisis de Varianza

Table Analyzed	168h Cu 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0mM
ANOVA summary	
F	12.51
P value	0.0168
P value summary	*
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	Yes
R square	0.9037

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?
0.5mM vs. 1.0mM	-1833	-3108 to -557.1	Yes
0.5mM vs. 1.5mM	-959.8	-2235 to 315.8	No
0.5mM vs. 2.0mM	-466.0	-1742 to 809.6	No
1.0mM vs. 1.5mM	872.9	-402.7 to 2149	No
1.0mM vs. 2.0mM	1367	91.07 to 2642	Yes
1.5mM vs. 2.0mM	493.8	-781.8 to 1769	No

4.7. Comparación de Producción de Lacasas Inducidas por Diferentes Dosis de CuSO₄x5H₂O a 216 h de Cultivo.

Análisis de Varianza

Table Analyzed	216h Cu 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0mM
ANOVA summary	
F	10.50
P value	0.0229
P value summary	*
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	Yes
R square	0.8873

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?
0.5mM vs. 1.0mM	-1571	-2878 to -263.9	Yes
0.5mM vs. 1.5mM	-1129	-2435 to 178.3	No
0.5mM vs. 2.0mM	-255.6	-1562 to 1051	No
1.0mM vs. 1.5mM	442.2	-864.7 to 1749	No
1.0mM vs. 2.0mM	1315	8.265 to 2622	Yes
1.5mM vs. 2.0mM	872.9	-433.9 to 2180	No

4.8. Comparación de Producción de Lacasas Inducidas por Diferentes Dosis de CuSO₄x5H₂O a 264 h de Cultivo.

Análisis de Varianza

Table Analyzed	264h Cu 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0mM
ANOVA summary	
F	13.02
P value	0.0157
P value summary	*
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	Yes
R square	0.9071

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?
0.5mM vs. 1.0mM	-1369	-2414 to -323.8	Yes
0.5mM vs. 1.5mM	-981.6	-2027 to 63.67	No
0.5mM vs. 2.0mM	-159.8	-1205 to 885.6	No
1.0mM vs. 1.5mM	387.5	-657.8 to 1433	No
1.0mM vs. 2.0mM	1209	164.1 to 2255	Yes
1.5mM vs. 2.0mM	821.9	-223.4 to 1867	No

Anexo 5. Comparación de Lacasas en Medio con CuSO₄x5H₂O 1.0 mM a las 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 y 216 h de Cultivo.

Análisis de Varianza

Table Analyzed	Lacasas Cu1.0mM 0- 216h
ANOVA summary	
F	235.1
P value	< 0.0001
P value summary	****
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	Yes
R square	0.9953

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?
0 vs. 24	-47.22	-387.4 to 292.9	No
0 vs. 48	-29.09	-369.2 to 311.1	No
0 vs. 72	-127.1	-467.3 to 213.0	No
0 vs. 96	-1005	-1346 to -665.2	Yes
0 vs. 120	-2703	-3043 to -2363	Yes
0 vs. 144	-2117	-2458 to -1777	Yes
0 vs. 168	-1153	-1493 to -813.2	Yes
0 vs. 192	-1246	-1586 to -905.9	Yes
0 vs. 216	-953.8	-1294 to -613.7	Yes
24 vs. 48	18.13	-322.0 to 358.3	No
24 vs. 72	-79.92	-420.1 to 260.2	No
24 vs. 96	-958.2	-1298 to -618.0	Yes
24 vs. 120	-2656	-2996 to -2316	Yes
24 vs. 144	-2070	-2410 to -1730	Yes
24 vs. 168	-1106	-1446 to -765.9	Yes
24 vs. 192	-1199	-1539 to -858.7	Yes
24 vs. 216	-906.6	-1247 to -566.5	Yes
48 vs. 72	-98.05	-438.2 to 242.1	No
48 vs. 96	-976.3	-1316 to -636.1	Yes
48 vs. 120	-2674	-3014 to -2334	Yes
48 vs. 144	-2088	-2428 to -1748	Yes
48 vs. 168	-1124	-1464 to -784.1	Yes
48 vs. 192	-1217	-1557 to -876.8	Yes
48 vs. 216	-924.7	-1265 to -584.6	Yes
72 vs. 96	-878.3	-1218 to -538.1	Yes
72 vs. 120	-2576	-2916 to -2236	Yes
72 vs. 144	-1990	-2330 to -1650	Yes
72 vs. 168	-1026	-1366 to -686.0	Yes
72 vs. 192	-1119	-1459 to -778.7	Yes
72 vs. 216	-826.7	-1167 to -486.5	Yes

96 vs. 120	-1698	-2038 to -1358	Yes
96 vs. 144	-1112	-1452 to -771.8	Yes
96 vs. 168	-147.9	-488.1 to 192.2	No
96 vs. 192	-240.7	-580.8 to 99.51	No
96 vs. 216	51.56	-288.6 to 391.7	No
120 vs. 144	585.9	245.8 to 926.1	Yes
120 vs. 168	1550	1210 to 1890	Yes
120 vs. 192	1457	1117 to 1797	Yes
120 vs. 216	1749	1409 to 2090	Yes
144 vs. 168	964.1	623.9 to 1304	Yes
144 vs. 192	871.3	531.2 to 1211	Yes
144 vs. 216	1164	823.4 to 1504	Yes
168 vs. 192	-92.73	-432.9 to 247.4	No
168 vs. 216	199.5	-140.7 to 539.6	No
192 vs. 216	292.2	-47.95 to 632.4	No

Anexo 6. Comparación de Biomasa en Cultivos de Biopelícula (g/L) durante la Producción de Lacasas en Medio con CuSO₄x5H₂O 1.0 mM a las 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 y 216 h de Cultivo.

.Análisis de Varianza

ANOVA summary	
F	12.69
P value	0.0002
P value summary	***
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	Yes
R square	0.9195

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?
0 vs. 24	0.4950	0.01536 to 0.9746	Yes
0 vs. 48	0.5700	0.09036 to 1.050	Yes
0 vs. 72	0.7550	0.2754 to 1.235	Yes
0 vs. 96	0.5700	0.09036 to 1.050	Yes
0 vs. 120	0.7100	0.2304 to 1.190	Yes
0 vs. 144	1.070	0.5904 to 1.550	Yes
0 vs. 168	0.8500	0.3704 to 1.330	Yes
0 vs. 192	0.9200	0.4404 to 1.400	Yes
0 vs. 216	0.9500	0.4704 to 1.430	Yes
24 vs. 48	0.07500	-0.4046 to 0.5546	No
24 vs. 72	0.2600	-0.2196 to 0.7396	No
24 vs. 96	0.07500	-0.4046 to 0.5546	No
24 vs. 120	0.2150	-0.2646 to 0.6946	No
24 vs. 144	0.5750	0.09536 to 1.055	Yes
24 vs. 168	0.3550	-0.1246 to 0.8346	No
24 vs. 192	0.4250	-0.05464 to 0.9046	No
24 vs. 216	0.4550	-0.02464 to 0.9346	No
48 vs. 72	0.1850	-0.2946 to 0.6646	No
48 vs. 96	-5.960e-008	-0.4796 to 0.4796	No
48 vs. 120	0.1400	-0.3396 to 0.6196	No
48 vs. 144	0.5000	0.02036 to 0.9796	Yes
48 vs. 168	0.2800	-0.1996 to 0.7596	No
48 vs. 192	0.3500	-0.1296 to 0.8296	No
48 vs. 216	0.3800	-0.09964 to 0.8596	No
72 vs. 96	-0.1850	-0.6646 to 0.2946	No
72 vs. 120	-0.04500	-0.5246 to 0.4346	No
72 vs. 144	0.3150	-0.1646 to 0.7946	No
72 vs. 168	0.09500	-0.3846 to 0.5746	No
72 vs. 192	0.1650	-0.3146 to 0.6446	No
72 vs. 216	0.1950	-0.2846 to 0.6746	No
96 vs. 120	0.1400	-0.3396 to 0.6196	No
96 vs. 144	0.5000	0.02036 to 0.9796	Yes

96 vs. 168	0.2800	-0.1996 to 0.7596	No
96 vs. 192	0.3500	-0.1296 to 0.8296	No
96 vs. 216	0.3800	-0.09964 to 0.8596	No
120 vs. 144	0.3600	-0.1196 to 0.8396	No
120 vs. 168	0.1400	-0.3396 to 0.6196	No
120 vs. 192	0.2100	-0.2696 to 0.6896	No
120 vs. 216	0.2400	-0.2396 to 0.7196	No
144 vs. 168	-0.2200	-0.6996 to 0.2596	No
144 vs. 192	-0.1500	-0.6296 to 0.3296	No
144 vs. 216	-0.1200	-0.5996 to 0.3596	No
168 vs. 192	0.07000	-0.4096 to 0.5496	No
168 vs. 216	0.1000	-0.3796 to 0.5796	No
192 vs. 216	0.03000	-0.4496 to 0.5096	No

Anexo 7. Comparación de Biomasa en Cultivos de Biopelícula (g/L) durante la Producción de Lacasas en Medio Basal (suplementado con $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0 mM 0.02 mM), Medio con $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0 mM y Medio con Azul Brillante.

7.1. Comparación de Biomasa en Cultivos de Biopelícula (g/L) durante la Producción de Lacasas en Medio Basal (suplementado con $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0 mM 0.02 mM), Medio con $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0 mM y Medio con Azul Brillante a las 0 h de Cultivo.

Análisis de Varianza

ANOVA summary	
F	0.1533
P value	0.8642
P value summary	ns
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	No
R square	0.09273

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?
Basal vs. Cu 1.0mM	0.1650	-1.082 to 1.412	No
Basal vs. AB	0.07500	-1.172 to 1.322	No
Cu 1.0mM vs. AB	-0.09000	-1.337 to 1.157	No

7.2. Comparación de Biomasa en Cultivos de Biopelícula (g/L) durante la Producción de Lacasas en Medio Basal (suplementado con $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0 mM 0.02 mM), Medio con $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0 mM y Medio con Azul Brillante a las 24 horas de Cultivo.

Análisis de Varianza

ANOVA summary	
F	1.410
P value	0.3701
P value summary	ns
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	No
R square	0.4845

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?
Basal vs. Cu 1.0mM	-0.03500	-0.8943 to 0.8243	No
Basal vs. AB	-0.3150	-1.174 to 0.5443	No
Cu 1.0mM vs. AB	-0.2800	-1.139 to 0.5793	No

7.3. Comparación de Biomasa en Cultivos de Biopelícula (g/L) durante la Producción de Lacasas en Medio Basal (suplementado con $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0 mM 0.02 mM), Medio con $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0 mM y Medio con Azul Brillante a las 48 h de Cultivo.

Análisis de Varianza

ANOVA summary	
F	0.4997
P value	0.6497
P value summary	ns
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	No
R square	0.2499

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?
Basal vs. Cu 1.0mM	-0.1550	-1.288 to 0.9778	No
Basal vs. AB	-0.2700	-1.403 to 0.8628	No
Cu 1.0mM vs. AB	-0.1150	-1.248 to 1.018	No

7.4. Comparación de Biomasa en Cultivos de Biopelícula (g/L) durante la Producción de Lacasas en Medio Basal (suplementado con $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0 mM 0.02 mM), Medio con $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0 mM y Medio con Azul Brillante a las 72 h de Cultivo.

Análisis de Varianza

ANOVA summary	
F	1.593
P value	0.3378
P value summary	ns
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	No
R square	0.5150

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?
Basal vs. Cu 1.0mM	0.02000	-0.6036 to 0.6436	No
Basal vs. AB	-0.2200	-0.8436 to 0.4036	No
Cu 1.0mM vs. AB	-0.2400	-0.8636 to 0.3836	No

7.5. Comparación de Biomasa en Cultivos de Biopelícula (g/L) durante la Producción de Lacasas en Medio Basal (suplementado con $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0 mM 0.02 mM), Medio con $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0 mM y Medio con Azul Brillante a las 96 h de Cultivo.

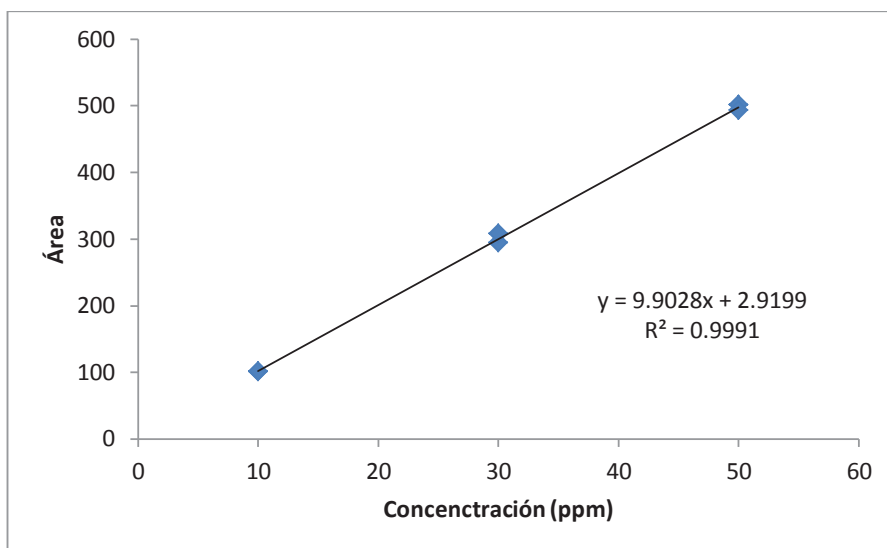
Análisis de Varianza

ANOVA summary	
F	0.5336
P value	0.6335
P value summary	ns
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	No
R square	0.2624

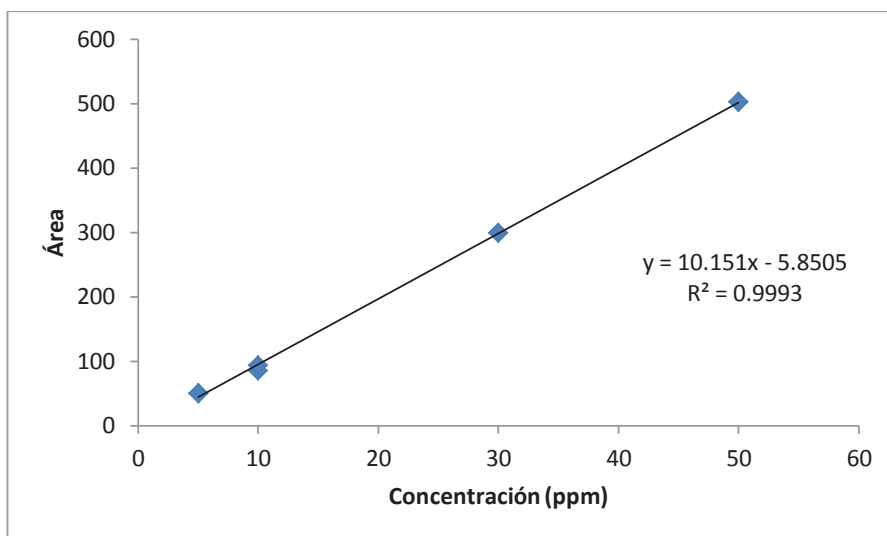
Prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?
Basal vs. Cu 1.0mM	-0.2200	-1.113 to 0.6727	No
Basal vs. AB	-0.0950	-0.9877 to 0.7977	No
Cu 1.0mM vs. AB	0.1250	-0.7677 to 1.018	No

Anexo 8. Curva Estándar- Cinética de Degradación 0-96 h (HPLC) de Azul Brillante por Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5).



Anexo 9. Curva Estándar. Cinética de degradación 0-48 h (HPLC) de Azul Brillante por Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5).



Anexo 10. Curva Estándar- Decoloración de Azul Brillante (HPLC) con Lacasa Purificada
Producida por Biopelículas de *Trametes polyzona* (LMBTM5)

