

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA E
INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS EXTRAÍDAS DE ORGANISMOS
DE BAJA CALIFORNIA**

TESIS

**PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIOINGENIERO**

PRESENTA

MELISSA MONSERRAT QUEZADA LUNA

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO, NOVIEMBRE DE 2017.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA E INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS
EXTRAÍDAS DE ORGANISMOS DE BAJA CALIFORNIA**

TESIS

**PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIOINGENIERO**

PRESENTA:

MELISSA MONSERRAT QUEZADA LUNA

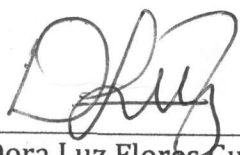
Aprobada por:



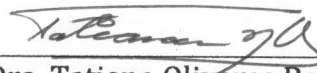
Dr. David Cervantes Vásquez
Director
(Presidente)



Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez
Codirector
(Secretario)



Dra. Dora Luz Flores Gutiérrez
Sinodal
(Vocal)



Dra. Tatiana Olivares Bañuelos
Sinodal
(Vocal)



Dr. Oscar López Bonilla
Sinodal
(Vocal)

RESUMEN

De la tesis de **Melissa Monserrat Quezada Luna**, presentada como requisito parcial para la obtención del título de **BIOINGENIERO**. Ensenada, Baja California. Noviembre de 2017.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA E INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS EXTRAÍDAS DE ORGANISMOS DE BAJA CALIFORNIA

Resumen aprobado por:



Dr. David Cervantes Vásquez
Director



Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez
Codirectora

Las peroxidasas son enzimas que se encuentran en una gran variedad de organismos y tienen la capacidad de catalizar la oxidación de sustratos orgánicos e inorgánicos en presencia de peróxido de hidrógeno. En este estudio se evaluó la actividad enzimática e inmovilización de la peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés) y de dos muestras de enzimas aisladas a partir de los hongos *Lactarius* sp. y *Russula* sp. colectados en la localidad de El Salto en el municipio de Ensenada, Baja California.

A partir de la colecta de los macromicetos se procede al asilamiento y caracterización de las enzimas por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS PAGE), para su posterior inmovilización en esferas de alginato y quitosán. La actividad enzimática se prueba con los sustratos Guayacol y ABTS para la peroxidasa de rábano puesto que son ampliamente utilizados en este tipo de ensayos. Sin embargo, para las muestras aisladas se utiliza Guayacol como sustrato debido a que se difunde con mayor facilidad al sitio activo con respecto al ABTS. De acuerdo con las actividades enzimáticas obtenidas se determina que hubo mayor actividad para la enzima HRP inmovilizada en esferas de alginato y la implementación de quitosán favorece a la actividad enzimática de las enzimas extraídas de *Lactarius* sp., y de *Russula* sp. En la enzima semipurificada de *Russula* sp. no se detectó actividad, pero en las muestras inmovilizadas en quitosán y alginato se observaron actividades similares a las obtenidas con *Lactarius* sp., y HRP.

Palabras Clave: *Russula* sp., *Lactarius* sp., peroxidasas, alginato, quitosán, inmovilización, biorremediación

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Baja California por darme la oportunidad de formar parte de su alumnado, poder cursar la carrera de Bioingeniería y el apoyo brindado por desarrollar este trabajo.

Se agradece al proyecto PRODEP con número 11156 por el apoyo económico brindado para la realización de este trabajo.

Al Dr. David Cervantes Vásquez, director de tesis, por la confianza, apoyo y paciencia otorgados desde el inicio de este trabajo. Así como también por el apoyo y enseñanzas recibidas a lo largo de mi carrera universitaria.

A la Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez, codirector de tesis, por el apoyo, tiempo y dedicación en la realización de este trabajo y por las enseñanzas recibidas durante mi formación universitaria.

A mi comité de tesis: A la Dra. Dora Luz Flores Gutiérrez, por la confianza para la realización de este proyecto y por el apoyo recibido como maestra y tutora durante estos años. A la Dra. Tatiana Olivares, por el apoyo, motivación y enseñanzas brindadas durante mi carrera y al Dr. Oscar Roberto López Bonilla por el apoyo para formar parte del comité.

A Balam Benítez, becario de laboratorio y alumno de la carrera de Bioingeniería, por el apoyo en la realización de experimentos para llevar a cabo este proyecto.

A mi familia: Mi papá, José Aarón Quezada Rodríguez, por ser para mí un ejemplo de dedicación y perseverancia. A mi mamá, Norma Patricia Luna Garza, por apoyarme siempre en cada momento. A mis hermanos, Aarón e Hiram Quezada Luna, por preocuparse por mí y estar a mi lado.

A P. Gustavo Luis Benson Sotomayor, por el apoyo brindado para poder llevar a cabo la culminación de mis estudios universitarios.

RESUMEN.....	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
2.1. Enzimas con aplicaciones en biorremediación: Peroxidasas	4
2.2. Inmovilización de enzimas.....	8
2.3. Sustratos utilizados en ensayos enzimáticos	14
2.4. Bioprospección de especies de macromicetos de Baja California con potencial para la obtención de peroxidasas.....	18
 3. Hipótesis y Objetivos	 21
3.1. Hipótesis:	21
3.2. Objetivo General:.....	21
3.3. Objetivos específicos:	21
4. Desarrollo experimental	22
4. 1. Colecta de organismos	22
4. 2. Aislamiento y purificación.....	23
4.2.1 Preparación de muestras.....	23
4.2.2 Homogenado.....	23
4.2.3 Aislamiento y purificación.....	23
4.2.4 Determinación de proteínas.....	24
4.2.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS PAGE).....	25
4.3 Determinación de actividad enzimática.....	25
4.4 Síntesis de matrices para inmovilización	27
5. Resultados y discusión	29
5.1. Aislamiento y purificación de peroxidasas de origen natural	29
5.2. Actividad enzimática.....	30
6. Conclusiones	33
7. Referencias.....	34

Lista de Figuras

Figura 1. Mecanismo de reacción para sustratos fenólicos.....	5
Figura 2. Oxidación de ABTS mediante peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) catalizado por la enzima HRP encapsulada en matriz sol-gel de sílice	16
Figura 3. Efecto de la concentración de Guayacol en la tasa de formación de TetraGuayacol.....	17
Figura 4. Escena típica en El Salto de Santa Rosa	22
Figura 5. Microesferas de quitosán.....	28
Figura 6. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) con las muestras obtenidas de los hongos <i>Russula</i> sp. y <i>Lactarius</i> sp.....	29
Figura 7. Curva de calibración para la determinación del peso molecular de las muestras correspondientes a cada grupo de experimentación.....	30

Lista de Tablas

Tabla I. Concentración de metales absorbidos en <i>Lactarius deliciosus</i>	19
Tabla II. Concentración de metales absorbidos por especies de <i>Russula</i>	20
Tabla III. Componentes utilizados en el ensayo enzimático de HRP libre con ABTS.....	23
Tabla IV. Formulación química del Buffer de fosfatos.....	25
Tabla V. Componentes utilizados en el ensayo enzimático de HRP inmovilizada en esferas de alginato de sodio con ABTS.	26
Tabla VI. Componentes utilizados en el ensayo enzimático de HRP libre.	26
Tabla VII. Componentes utilizados en el ensayo enzimático de HRP, PHB, PHR inmovilizadas en microesferas de alginato de sodio.	26
Tabla VIII. Componentes utilizados en el ensayo enzimático PHB y PHR inmovilizadas en microesferas de quitosán.	27
Tabla IX. Actividad enzimática de peroxidasa comercial (HRP) y dos muestras semipurificadas de macromicetos de Baja California.	32

1. Introducción

En la actualidad existen una gran cantidad de problemas de contaminación ambiental, los cuales se derivan de la síntesis y producción de compuestos químicos utilizados por el hombre. Debido a esto, se buscan alternativas para la restauración de ambientes contaminados, de tal forma que las consecuencias provocadas por la contaminación se vean eliminadas o reducidas (Bioremediation, 2014).

Como solución a los problemas ambientales de suelos contaminados se emplea la biorremediación, la cual consiste en utilizar organismos o sus componentes para degradar o transformar desechos, convirtiéndolos en compuestos inofensivos y disminuyendo su concentración por debajo de los límites permitidos (Vidali, 2001).

La biorremediación puede dividirse en dos tipos: *In situ* y *Ex situ*. Cuando se habla de tratamiento *In situ*, se refiere a remediar sitios contaminados en el lugar, como pueden ser: bioventeo, fitorremediación y barrera permeable reactiva. Mientras que el tratamiento *Ex situ*, requiere el transporte de los contaminantes para ser llevados a un sitio de tratamiento, tal como la utilización de biorreactores o tratamiento superficial en suelos (Juwarkar *et al.*, 2010).

Con el fin de una correcta remediación del lugar, es necesario entender las características y propiedades del medio a tratar. Es decir, las propiedades físicas, químicas y microbiológicas del contaminante. Entre los contaminantes a tratar, se destacan los metales pesados, pesticidas, aguas residuales e hidrocarburos ya que estos pueden estar presentes en altas o bajas concentraciones, sin embargo, el que se encuentren en bajas concentraciones sigue siendo preocupante debido a que puede resultar altamente tóxico para los seres vivos o el mismo suelo que los contiene (Zubuike *et al.*, 2016).

Una de las tecnologías utilizadas para la biorremediación de sitios contaminados por compuestos nocivos son los biocatalizadores. Éstos son enzimas de naturaleza proteica que facilitan la conversión de sustratos a productos, promoviendo condiciones favorables que reducen o aceleran la energía de activación en una reacción. La utilización de enzimas en biorremediación tiene múltiples ventajas con respecto al uso de organismos completos, por ejemplo: no se generan subproductos tóxicos, pueden permanecer en ambientes extremos, no pierden su actividad a causa de inhibidores generados por el metabolismo celular, tienen actividad catalítica incluso a bajas concentraciones del contaminante y facilidad en el control del proceso (Durán, 2000; Rao *et al.*, 2010).

Si bien sus características son idóneas para ser utilizadas en un proceso de biorremediación, es necesario proteger o propiciar mayor resistencia a las enzimas para mejorar los resultados de su actividad en aplicaciones de biorremediación. Para esto, las enzimas pueden ser inmovilizadas en distintos soportes o matrices que brinden protección a las enzimas y, además, permitan los procesos de actividad enzimática propios de las enzimas.

La inmovilización es un proceso muy importante para la utilización de enzimas en biorremediación. Debido a que se requiere una matriz que envuelva la enzima y ésta pueda entrar en contacto directo con el medio sin afectar su actividad catalítica. En el caso de tratamiento de aguas residuales es muy importante considerar que el medio en el que va a encontrarse la enzima presenta condiciones adversas. Para que la enzima pueda trabajar de manera correcta y sin perder su actividad catalítica se utiliza una matriz resistente a estas condiciones, como por ejemplo microesferas de alginato de calcio, las cuales se han utilizado para inmovilizar la enzima HRP en el tratamiento de colorantes presentes en aguas residuales. Una de las principales aplicaciones de

las enzimas inmovilizadas es en el tratamiento de aguas residuales ya que el sector industrial crece cada vez más conforme pasa el tiempo, así como también los efluentes en el medio ambiente. La industria textil es una industria que se caracteriza por el uso de colorantes para la elaboración de sus productos, por lo que los efluentes producidos por esta industria contendrán en su mayoría este tipo de compuestos. Los colorantes son carcinogénicos aun en concentraciones relativamente bajas. Por lo que la biorremediación para reducir o eliminar este tipo de compuestos de los efluentes es una alternativa que se considera prometedora. El uso de peroxidasas como herramienta para la remoción de colorantes es prácticamente nueva comparada con los métodos tradicionales (Chiou y Wu, 2014).

2. Antecedentes

2.1. Enzimas con aplicaciones en biorremediación: Peroxidasas

Las peroxidasas son enzimas con un grupo hemo que catalizan la oxidación de diferentes sustratos (en presencia de peróxido de hidrógeno) altamente utilizados en la industria. Por lo tanto, poseen la capacidad para oxidar diferentes compuestos químicos y son producidas por plantas, animales y microorganismos (Hamid y Rehman, 2009).

El uso de peroxidasas ha sido demostrado para remover compuestos fenólicos y sus derivados. Estos compuestos son comúnmente utilizados para la fabricación de productos de interés industrial y son altamente tóxicos. La remoción de fenoles por medio de estas enzimas se da a través de reacciones de óxido-reducción en presencia de peróxido de hidrógeno y produce oligómeros, los cuales pueden ser eliminados fácilmente (Regalado *et al.*, 2004). Un ejemplo de esto es la peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés) que degrada al fenol. La HRP es una peroxidasa que puede ser encontrada en abundancia en las raíces del rábano picante. Es una enzima que posee dos centros metálicos y dos átomos de calcio, éste acomodo estructural le confiere a la enzima una correcta funcionalidad. En los últimos años la enzima ha sido ampliamente estudiada debido a sus múltiples aplicaciones y las diferentes propiedades que la caracterizan (Veitch, 2004).

El mecanismo de acción de la HRP es el siguiente: la enzima en su conformación nativa es oxidada por H_2O_2 para formar un compuesto conocido como compuesto I. Este compuesto oxida una molécula de fenol ($PhOH$) para formar un radical libre ($PhO\cdot$) el cual es convertido en el

compuesto II. A su vez el compuesto II oxida una segunda molécula de fenol para producir otro radical y completar el ciclo regresando a su conformación nativa. Los radicales libres formados se difunden desde la enzima a la solución donde reaccionan para formar productos poliaromáticos. Los cuales son insolubles en agua y pueden ser removidos por operaciones de sólido-líquido (Chiong *et al.*, 2014).

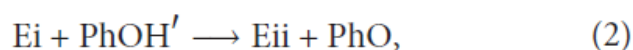
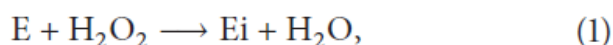


Figura 1. Mecanismo de reacción para sustratos fenólicos. Tomado de Bansal y Kanwar (2013).

La actividad de las peroxidasas para su utilización en la biorremediación está definida por la estructura de su sitio activo, debido a que la catálisis inicia por el acoplamiento fisicoquímico del sustrato a sus sitios activos. Para una óptima actividad enzimática hay diferentes variables que deben tomarse en cuenta, por ejemplo, un cambio en el pH puede conllevar la restructuración del sitio activo y perder actividad enzimática. Además, la temperatura tiene un efecto importante, ya que al incremento de ésta el sitio activo toma su conformación más favorable y hay una mayor interacción entre las moléculas del sustrato y las del sitio activo (Bansal y Kanwar, 2013).

Entre las aplicaciones más destacadas se encuentran:

- **Ensayos inmunológicos**

Esta enzima es altamente utilizada en el inmunoensayo ELISA (Hamid y Rehman, 2009) en éste un antígeno es inmovilizado en un sustrato; el antígeno se une a un anticuerpo específico que a su vez es detectado por otro anticuerpo que está enlazado a la enzima

HRP. Para la detección se utiliza un sustrato cromogénico, el cual en presencia de la enzima provoca una coloración que es proporcional a la concentración de antígeno presente (Gan y Patel, 2013).

- **Biosensores**

Son dispositivos utilizados para la detección de un analito biológico específico. Empleando tres componentes distintos: uno que reconoce al analito emitiendo una señal, un transductor y un dispositivo lector. Xu *et al.* (2010) desarrollaron un biosensor capaz de detectar peróxido de hidrógeno, el cual es un compuesto cuya determinación es de suma importancia en diferentes sectores, como pueden ser: industrial, alimenticio e incluso en la salud, debido a que es considerado un mediador bioquímico de la patología celular que puede estar involucrado en enfermedades neurodegenerativas. El sensor está constituido por un electrodo modificado con una pared de múltiples nanotubos de carbono (MWNTs), utilizando glutaraldehído y albúmina para crear el enlace HRP-MWNTs. Puede detectar peróxido de hidrógeno a concentraciones relativamente bajas debido a que utiliza una peroxidasa como biocatalizador y demostró alta estabilidad en los ensayos realizados (Veitch, 2004).

- **Terapia contra el cáncer**

Una de las técnicas que se emplean para el tratamiento del cáncer es la terapia con profármacos enzimáticos dirigidos por anticuerpos. Éste consta de un complejo enzima-anticuerpo que es altamente selectivo debido a que el anticuerpo se enlaza a un antígeno

específico expresado en la superficie de las células tumorales (Niculescu-Duvaz y Springer, 1996).

La combinación entre ácido indolacético y la enzima HRP ofrece una aplicación potencial para su uso en terapia dirigida. En un estudio realizado por Bonifert *et al.* (2016), se caracterizaron dos peroxidasas HRP recombinantes en el organismo *Pichia pastoris* y se utilizaron en células cancerígenas. Independientemente de las incompatibilidades entre las glicosilaciones que presentan las células de plantas y las de los seres humanos, en una de las enzimas recombinantes se obtuvo actividad catalítica resultando altamente activa con el ácido indolacético en ausencia de H₂O.

- **Biorremediación**

La mayoría de las aplicaciones en esta área se han centrado en el tratamiento de compuestos fenólicos. Cheng y Zuo (2005) inmovilizaron la enzima HRP en una matriz de arcilla intercalada con aluminio para la oxidación de compuestos fenólicos en aguas residuales. Demostraron, de manera satisfactoria, la remoción de fenoles por precipitación o transformación de estos en otros productos.

Sin embargo, la enzima HRP también es utilizada para el tratamiento de aguas residuales contaminadas por compuestos aromáticos y colorantes. En un estudio elaborado por Maddhinni, *et al.* (2006) se evaluó la capacidad de la enzima HRP y peróxido de hidrógeno para oxidar un colorante elaborado a base de compuestos azoicos, dando resultados satisfactorios al degradar a este contaminante. La oxidación del colorante se

evaluó en función de la enzima HRP a una concentración fija de H_2O_2 y a una actividad HRP constante.

2.2. Inmovilización de enzimas

La inmovilización es un proceso que se lleva a cabo para aumentar la viabilidad de una enzima. De forma física, la enzima se envuelve en un material al que se le conoce como soporte o matriz, dicho material permite que la enzima perdure por una mayor cantidad de tiempo en un medio y condiciones determinadas. Tales características pueden ser: resistencia de compresión, hidrofilidad, biocompatibilidad y resistencia a ataques microbianos (González y Batista, 2013).

Existen diferentes técnicas de inmovilización y dependiendo de las características del bioproceso es la técnica de inmovilización a utilizar, ya que la actividad enzimática puede estar influenciada por el entorno al que estará expuesta la enzima (Datta *et al.*, 2013).

- **Adsorción**

Esta técnica involucra interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. La enzima se inmoviliza en la matriz a partir de este tipo de enlaces; es un proceso que se vuelve reversible al cambiar las condiciones físicas del sistema. Es el tipo de inmovilización más sencilla y generalmente se mantiene la actividad catalítica (Niculescu-Duvaz y Springer, 1996).

Dey *et al.* (2002) utilizaron fibras de coco para la inmovilización de alfa-amilasa de *Bacillus circulans*. Dando como resultado un soporte capaz de absorber gran cantidad de

agua y poseer un alto intercambio iónico. El estudio fue realizado con el fin de evaluar a la fibra de coco como matriz de inmovilización para la enzima alfa-amilasa.

Cabrera-Padilla *et al.* (2012) lograron la inmovilización de la lipasa obtenida a partir de *Candida rugosa* en un polímero biodegradable (3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) obteniendo una eficiencia del 30% con respecto a la enzima libre. La estabilidad de la enzima fue evaluada dando como resultado una reutilización de hasta 12 ciclos con una actividad catalítica del 50%. Los ensayos de las actividades hidrolíticas de la lipasa libre e inmovilizada se realizaron mediante el método de emulsión de aceite de oliva-agua. El estudio fue realizado para evaluar la capacidad de poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) como matriz de inmovilización para la lipasa de *Candida rugosa*. Así como también, las propiedades bioquímicas, morfológicas y fisicoquímicas del polímero.

- **Enlaces covalentes**

La inmovilización a partir de enlaces covalentes es posible gracias a la cadena lateral que poseen los aminoácidos, tales como la histidina y arginina. La superficie de la matriz posee péptidos modificados que al realizar el enlace con la enzima éste suele ser muy efectivo para la biocatálisis y la estabilidad de la enzima (Dey *et al.*, 2002).

En 2000 el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Taiwán llevó a cabo la inmovilización de una invertasa en quitosán para mejorar su estabilidad térmica. Se utilizaron restos de carbohidratos para realizar el acoplamiento covalente de la invertasa, lo cual permite proteger el sitio activo y preservar la actividad de la enzima

ya inmovilizada. Se obtuvo una actividad del 91% y su vida media a altas temperaturas se vio incrementada. La invertasa se inmovilizó en soporte de quitosán utilizando cinco métodos diferentes para evaluar la matriz de inmovilización, el procedimiento de acoplamiento y evaluar glutaraldehído y / o etilendiamina como espaciador sobre la actividad relativa, la estabilidad térmica y las características catalíticas de la invertasa inmovilizada (Hsieh *et al.*, 2000).

- **Inmovilización por afinidad**

Este tipo de inmovilización se realiza en diferentes condiciones fisiológicas. Puede ser a través de ligandos específicos para una enzima, los cuales se acoplan a la matriz o la enzima se acopla a una estructura que posee afinidad por la matriz. La estratificación por bioafinidad es un ejemplo de este tipo de inmovilización y consta de alternar capas del ligando de afinidad y la proteína, siendo depositadas en la matriz de inmovilización (Dey *et al.*, 2002).

En el Departamento de Química del Instituto de Tecnología en India, los investigadores Sardar y Gupta, inmovilizaron la pectinasa del tomate en una matriz de agarosa-Concavalina A, utilizando capas de Concavalina A y pectinasa en un soporte de agarosa. Este experimento demostró que la inmovilización por afinidad le confirió al sistema una mayor estabilidad térmica. La actividad de la concavalina A se estimó utilizando glicógeno como sustrato y analizando la turbidez a 450 nm. La actividad de la pectinasa se determinó usando ácido poligalacturónico como sustrato. Una unidad enzimática libera

1 mol de azúcar reductor cada minuto a 37 °C. La cantidad de azúcar reductor formado se estimó mediante el método del ácido dinitrosalicílico (Sardar y Gupta, 2005).

- **Encapsulamiento**

El encapsulamiento de las enzimas en los materiales se da a través de enlaces covalentes o no covalentes y suelen estar dentro de matrices como geles o fibras. El enlace enzima-matriz es posible gracias a métodos como la inclusión de la enzima dentro de una matriz polimérica, disolución de la enzima en una fase no acuosa y separando la enzima a través de microporos (Chiou y Wu, 2004).

Shen *et al.* (2011), utilizaron una matriz híbrida de alginato-gelatina-fosfato de calcio para la inmovilización de β -galactosidasa. Se utilizaron dos matrices. Una matriz consistió en una cápsula de alginato de calcio y otra de alginato de sodio, ambas cubiertas con una película de gelatina y una coraza de calcio. Esta encapsulación le confirió propiedades características al sistema gracias a los materiales con las que fue elaborada. Por ejemplo, la coraza de calcio permitió una mayor estabilidad mecánica, incrementó la eficiencia de la inmovilización y evitó fugas de la enzima. La encapsulación resultó ser muy eficiente en cuanto a la durabilidad y la actividad enzimática.

Las características de la matriz son importantes para la correcta funcionalidad del sistema de inmovilización. Existen diferentes materiales para la inmovilización de enzimas y éstos deben presentar propiedades de resistencia a la compresión, resistencia a ataques microbianos, biocompatibilidad, etc. Los materiales pueden clasificarse en inorgánicos y

orgánicos. Como parte de los materiales orgánicos se encuentran los polímeros naturales. (Dey *et al.*, 2002).

Polímeros naturales

Los polímeros naturales han sido ampliamente estudiados en los últimos años debido a que presentan propiedades como la fácil degradación, biocompatibilidad, facilidad de escalamiento a nivel industrial, etc. A continuación se describen algunos de los polímeros naturales comúnmente utilizados como matriz de inmovilización:

- **Alginato**

Es un polímero que se obtiene a partir de las algas pardas como *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata* y *Ascophyllum nodosum*. De forma natural, los alginatos se encuentran como sales de calcio, magnesio y sodio, las cuales forman parte del ácido algínico y han sido ampliamente utilizadas como matrices para inmovilización de enzimas. Un ejemplo de esto son las microesferas de alginato de calcio (Yong y Mooney, 2012; Dey *et al.*, 2002).

Un grupo de investigadores especializados en reactores biológicos y enzimáticos del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Cádiz, inmovilizaron glucosa oxidasa en cápsulas de alginato de calcio. La investigación se centró en estudiar las condiciones y características ideales para una eficiente encapsulación de glucosa oxidasa.

Se demostró que el alginato es una matriz de inmovilización que posee la ventaja de cambiar el espesor de la cápsula y el porcentaje de difusión de la enzima, variando el tiempo de gelificación, las concentraciones de alginato de sodio y del cloruro de calcio (Blandino y Macías, 2001).

- **Quitósán**

Es un polisacárido que posee características que son esenciales para que una material pueda usarse como matriz de inmovilización. Entre ellas destacan: la estabilidad mecánica, la afinidad para enlazar proteínas y los grupos que pueden interactuar directamente con la enzima (Sirisha *et al.*, 2016).

En 2004, los investigadores Wu y Chiou, del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Nacional Tsing Hua en Taiwan, desarrollaron un método de inmovilización en quitósán para la enzima lipasa obtenida a partir de *Candida rugosa*. La enzima se inmovilizó en dos diferentes tipos de esferas mediante la activación de grupos hidroxilo, utilizando carbodiimida como agente enlazante. Los resultados mostraron un incremento en la estabilidad de la enzima, por lo que este tipo de matriz es ideal para su utilización en biocatálisis de procesos industriales debido a su bajo costo y estabilidad operacional (Chiou y Wu, 2004).

- **Pectina**

Es un polisacárido presente en la pared celular primaria de las plantas. Se utiliza junto con el alginato de calcio como matriz para encapsular la enzima, ésta combinación

incrementa su resistencia a desnaturalización, temperatura y actividad catalítica (Chiou y Wu, 2004).

Se desarrollaron esferas de alginato-pectina para la encapsulación del complejo concanavalina A-peroxidasa TP para su posible utilización en la remoción de compuestos aromáticos presentes en aguas residuales y efluentes industriales. La conformación de la matriz dio como resultado un incremento en la estabilidad de la enzima debido a que la encapsulación con alginato-pectina posee una mejor estabilidad frente a los agentes desnaturalizantes físicos y químicos en comparación a la encapsulación con la enzima soluble (Matto y Husain, 2006).

- **Colágeno**

Este polímero natural es también utilizado como matriz de inmovilización. Las fibras de colágeno con iones de Fe^{3+} brindan un excelente soporte y la actividad catalítica se mantiene incluso después de ser utilizada 26 veces (Dey *et al.*, 2002).

Hanachi, P. *et al.* (2015) comprobaron que puede emplearse colágeno tipo I como matriz de inmovilización para la enzima fosfatasa alcalina. Encontraron que la actividad enzimática permanecía un 48.6% después de 9 veces de aplicación. Hubo aumento en su estabilidad térmica y una resistencia a la desnaturalización de la enzima.

2.3. Sustratos utilizados en ensayos enzimáticos

Para que se lleven a cabo los ensayos enzimáticos es necesario el uso de un sustrato debido que la actividad enzimática expresa la cantidad de sustrato consumido en la reacción durante un tiempo determinado. A continuación se describen dos diferentes sustratos utilizados para la realización de ensayos enzimáticos:

- **ABTS**

El ABTS es un compuesto químico que se utiliza para observar la cinética de reacción de enzimas específicas. Es comúnmente utilizado como sustrato en conjunto con H_2O_2 para enzimas peroxidasas. Ha sido ampliamente utilizado como mediador de la lacasa obtenida de *Myceliophthora thermophila* debido a su alta estabilidad y su conocida reacción de óxido-reducción. Solis-Oba *et al.*, (2007) realizaron un estudio para demostrar que el ABTS es un agente oxidante y además interactúa con la lacasa, de tal forma que se recicla múltiples veces entre la enzima y el sustrato.

Un estudio elaborado en el Departamento de Química de la Universidad de Iowa en Estados Unidos, evalúa la oxidación de ABTS por H_2O_2 catalizado a partir de la peroxidasa HRP encapsulada en un soporte sol-gel de vidrio hecho con sílice. Se utilizó vidrio sílice SiO_2 y $RSiO_2$ (Donde R puede ser grupo metil o propil) como matriz de inmovilización. El estudio tuvo como fin comparar la actividad catalítica de la peroxidasa encapsulada en las diferentes matrices sol-gel. Se observó que conforme se eleva la concentración de sustrato ABTS, el rendimiento disminuye ligeramente, porque se requieren más volúmenes de la enzima para oxidar el sustrato. Además, el complejo HRP- $MeSiO_2$ tuvo un 70-85% de rendimiento en la oxidación de ABTS,

mientras que el complejo HRP -SiO₂ y HRP-PrSiO₂ lograron entre 30-40% (Kadnikova y Kostic, 2002).

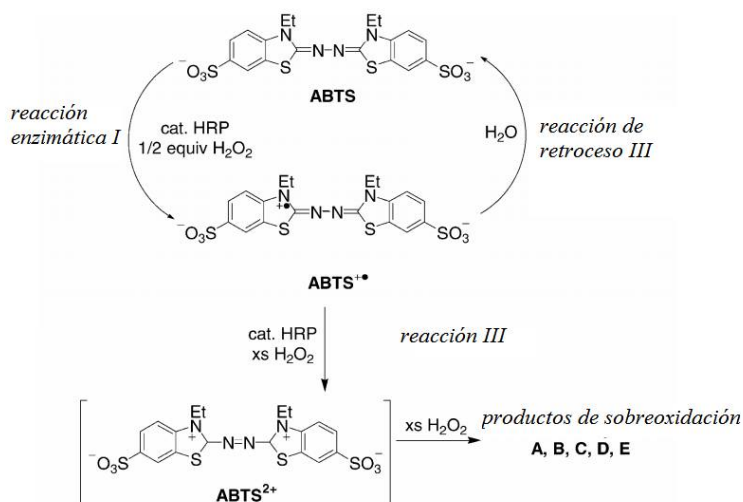


Figura 2. Oxidación de ABTS mediante peróxido de hidrógeno (H₂O₂) catalizado por la peroxidasa HRP encapsulada en matriz sol-gel de sílice. Tomado de Kadnikova y Kostic (2002).

- **Guayacol**

Es un compuesto fenólico natural obtenido a partir del guayacán y puede ser sintetizado a partir de la metilación del catecol utilizando potasa y sulfato de dimetilo. Es utilizado para la síntesis de vainilla, induce la proliferación celular, como sedante en el ámbito odontológico y como antiséptico, expectorante y como anestesia local en medicina (Guayacol, 2017).

El Guayacol es un sustrato comúnmente utilizado para evaluar la presencia de una enzima. En el caso de peroxidasas, cuando se utiliza en presencia de H₂O₂ y la enzima se encuentra presente, ésta se convertirá rápidamente en agua y oxígeno, el oxígeno reacciona con el Guayacol de tal forma que éste es oxidado y el producto final puede ser analizado por espectrofotometría (Bynum, 1996).

Un experimento, llevado a cabo en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad del Estado de Pensilvania, evaluó la oxidación de Guayacol por la peroxidasa lignina. La investigación tuvo como fin estudiar la capacidad del alcohol veratrílico para mediar la oxidación de Guayacol catalizado por la peroxidasa. Los resultados mostraron que la oxidación de Guayacol por lignina tiene como producto tetraGuayacol y la cantidad de tetraGuayacol formado fue linealmente dependiente a la concentración de la enzima. El mecanismo de oxidación de Guayacol siguió el comportamiento clásico de la cinética de Michaelis-Menten (Tien y Koduri, 1995).

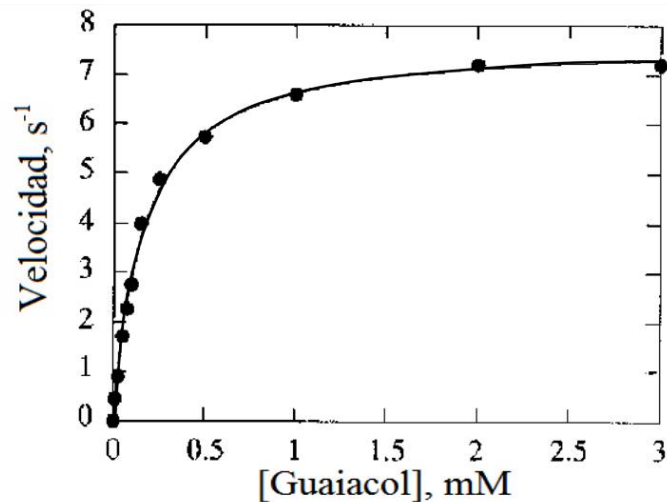


Figura 3. Efecto de la concentración de Guayacol en la tasa de formación de TetraGuayacol.

Tomado de Koduri y Tien (1995).

- **Alcohol veratrílico**

Es un metabolito secundario obtenido a partir del hongo *Phanerochaete chrysosporium*. Es ampliamente utilizado como sustrato en la catálisis de la peroxidasa lignina, puesto que actúa como mediador redox para la degradación de la misma. Es un compuesto armónico que presenta

alta reactividad cuando se encuentra como catión radical y es capaz de proteger a la enzima cuando el peróxido de hidrógeno se encuentra en concentraciones elevadas (Zapanta y Tien, 1997; Pascual *et al.*, 2012).

2.4. Bioprospección de especies de macromicetos de Baja California con potencial para la obtención de peroxidasas.

Debido al potencial que tienen las peroxidasas como biocatalizadores de compuestos tóxicos al medio ambiente, es necesario que se realicen estudios de bioprospección para identificar especies que sirvan como fuentes de extracción de estas enzimas. Así mismo es necesario establecer el potencial biotecnológico de Baja California como fuente de biocatalizadores por lo que en este trabajo se decidió estudiar dos macromicetos, *Lactarius* sp. y *Russula* sp., para evaluar su potencial.

***Lactarius* sp.**

Es un hongo perteneciente a la familia *Russulaceae*. Este tipo de hongos se caracterizan por su capacidad para secretar látex por medio del cuerpo fructífero recién cortado, y posee una coloración que varía entre diferentes tipos de azul. En cuanto a su morfología, su píleo puede medir entre 2-5.5 cm de diámetro, variando su forma según su etapa de crecimiento, plana-convexa cuando están en las primeras etapas y cóncavos al llegar a la madurez. *Lactarius* sp., ha sido objeto de estudio para evaluar su capacidad de absorción de metales pesados, para su posible utilización en biorremediación (Nuytinck, 2015).

Akin *et al.* (2009), evaluaron la capacidad de *Lactarius deliciosus*, *Russula delica* y *Hizopogon roseolus* para acumular los metales Cd, Cr, Cu, Pb y Zn. Dando como resultado una mayor acumulación de cromo en *Lactarius deliciosus* (Dilna *et al.*, 2011).

Demirbas (2001) realizó un estudio en el que evaluó la concentración de 21 metales en 18 especies de hongos. Entre los cuales destacan: *Lactarius piperatus*, *Lactarius* sp. y *Lactarius volemus*. Obteniendo como resultado la absorción de 44.4 mg/kg de Mn en *Lactarius* sp, 145 mg/kg de Ni en *Lactarius piperatus* y 0.37 mg/kg de Sb en *Lactarius* sp. La determinación de la concentración absorbida por las diferentes especies se realizó mediante espectrofotometría de absorción atómica.

Kosanovic *et al.*, (2016) determinaron la concentración de metales y antioxidantes, además del potencial antimicrobiano y anticancerígeno de *Lactarius deliciosus*. Los metales evaluados se muestran en la Tabla I.

Tabla I. Concentración de metales absorbidos en *Lactarius deliciosus* (mg/kg).

Fe	Zn	Cu	Mn	Ni	Cd	Pb	Cr	Co
216.83±1.38	123.57±0.30	15.49±0.12	5.98±0.04	1.58±0.01	0.54±0.00	0.44±0.30	1.11±0.01	0.12±0.00

***Russula* sp.**

Es una especie perteneciente a la familia *Russulaceae*, morfológicamente se caracteriza por presentar una esperada amarillenta o blanca, sus láminas se encuentran libres y poseen un color claro, carecen de velo parcial y a diferencia de *Lactarius* sp. no exudan látex al ser cortados. A

pesar de que la mayoría de las especies pertenecientes a este género prefieren un clima húmedo, es común encontrar *Russula* sp. en ambientes secos y sin otros hongos alrededor. En el ámbito de la biorremediación *Russula* sp. también ha sido evaluado como organismo bioacumulador de metales pesados (Volk, 2004).

Pastircakova (2004) evaluó la concentración de Hg, Pb, Cd, Mn Zn, Cu, Ni, Co y Cr presente en 51 especies de hongos, de entre los cuales se estudiaron las especies *Russula delica*, *Russula emética*, *Russula flava*, *Russula foetens*, *Russula* sp. y *Russula virescens*. Los resultados del estudio mostraron que *Russula* sp. acumuló 17.14 mg/kg de Zn.

Demirbas (2001) estudió 18 especies de hongos silvestres provenientes de la región este del mar negro para evaluar la acumulación de: Pb, Cd, Hg, Cu, Mn, Zn, Fe, Co, As, Ca, Na, K, Mg, Ba, Ni, Ti, Cr, Al, Bi, Sb, and Ag. Los resultados del género *Russula* se observan en la Tabla II

Tabla II. Concentración de metales absorbidos por especies de *Russula* (mg/kg)

Hongo	Metal	Concentración (mg/kg)
<i>Russula foetens</i>	Pb	4.91
<i>Russula delica</i>	Sb	0.26
<i>Russula</i> sp.	Al	24.1

3. Hipótesis y Objetivos

3.1. Hipótesis:

La actividad enzimática de los hongos *Lactarius* sp. y *Russula* sp. colectados en Baja California se mantiene cuando las enzimas son inmovilizadas en matrices de alginatos y quitosán, lo que permite su utilización para procesos de biorremediación.

3.2. Objetivo General:

Evaluar la actividad enzimática de las enzimas extraídas de a partir de los hongos *Lactarius* sp. y *Russula* sp., al ser inmovilizadas en matrices de alginato y quitosán.

3.3. Objetivos específicos:

- Bioprospección de especies para la obtención de biocatalizadores con actividad enzimática.
- Aislamiento y purificación enzimas de los hongos *Lactarius* sp. y *Russula* sp colectados en Baja California.
- Medir la actividad enzimática de enzimas extraídas a partir de los hongos *Lactarius* sp. y *Russula* sp.
- Evaluación de la actividad enzimática de las enzimas extraídas a partir de los hongos *Lactarius* sp. y *Russula* sp.
- Evaluación de la actividad enzimática de las enzimas inmovilizadas.

4. Desarrollo experimental

4. 1. Colecta de organismos

Los hongos fueron colectados en el parque de El Salto de Santa Rosa ubicado en el municipio de Ensenada del Estado de Baja California, México y se encuentra en las coordenadas GPS: longitud (dec): -116.775278, latitud (dec): 32.036111. La localidad se encuentra a una mediana altura de 220 metros sobre el nivel del mar (<http://www.nuestro-mexico.com/>). El lugar presenta humedad y desechos orgánicos en el suelo, lo que favorece el crecimiento de los mismos (Figura 4). Una vez colectados fueron enjuagados con agua destilada y almacenados a -80°C hasta su uso.



Figura 4. Escena típica en El Salto de Santa Rosa, donde se puede observar la extensa vegetación. En este lugar se colectaron los hongos utilizados en este trabajo para la extracción de peroxidasas.

4.2. Aislamiento y purificación

4.2.1. Preparación de muestras

Las muestras recolectadas se lavaron superficialmente con buffer de acetatos 20 mM a pH 7.0., se pesaron y cubrieron con papel aluminio para ser almacenadas en bolsas de plástico las cuales se depositaron en un congelador a -80°C.

4.2.2. Homogenado

Los homogenados se llevaron a cabo utilizando un homogeneizador, a las muestras se les agregó buffer de fosfatos en una concentración de 1:1.2. El buffer utilizado se elaboró en el laboratorio en base a la formulación química que se muestra a continuación:

Tabla III. Formulación química del Buffer de fosfatos, 10X (1 L)

Reactivo	Cantidad (g)
NaCl	80
KCl	2
Na ₂ HPO ₄	14.4
KH ₂ PO ₄	2.4

4.2.3. Aislamiento y purificación

Para la preparación de polvos de acetona cada homogenado se centrifugó a 10,000xg durante 60 minutos a 5 °C. Al sobrenadante se le adicionaron 1.5 volúmenes de acetona a -20°C. La

mezcla se dejó reposando un periodo de 15 a 18 h a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 10,000xg por 30 min a 5°C, el precipitado que se obtuvo se colocó en 1.5 volúmenes de acetona. Esta muestra se dejó reposar un periodo de 10 a 15 minutos a 4°C y se centrifugó de nuevo bajo los mismos criterios de velocidad, tiempo y temperatura antes mencionados.

En la última centrifugación, el precipitado se recolectó y se pesó en una balanza digital. Una vez calculado el peso final del precipitado se colocó en una membrana de diálisis de 12 kDa. Posteriormente, la muestra se filtró.

La concentración proteica se cuantificó por método de Lowry mientras que la calidad de la peroxidasa purificada se evaluó mediante los ensayos de actividad enzimática.

4.2.4. Determinación de proteínas

La cuantificación de proteínas se determinó con el método de Lowry. El cual es un método colorimétrico que se basa en la unión de los iones Cu^{2+} (en medio alcalino) con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos de la proteína. La formación de este complejo provoca una coloración azul claro y un desdoblamiento en la estructura de la proteína, propiciando que los residuos fenólicos de la tirosina queden expuestos para así participar en la reducción del reactivo Folin-Ciocalteu mediado por el cobre. El ácido fosfomolibdotúngstico presenta una coloración amarilla y es el componente principal del reactivo Folin-Ciocalteu, que al ser reducido por los grupos fenólicos produce una coloración azul intenso (Lowry *et al.*, 1951)

4.2.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS PAGE)

Se utilizaron geles de poliacrilamida en medio discontinuo de 80 x 73 x 0.75 mm y con una concentración de 4.0 % (Laemmli, 1970). Los amortiguadores utilizados fueron para el gel Tris-HCl pH 8.8 y Tris-glicina pH 8.3 para el sistema. La electroforesis se corrió a un voltaje constante de 200 V. Para los geles se utilizó un marcador molecular BIORAD de 250,000 Da a 10,000 Da.

4.3 Determinación de actividad enzimática

Se llevó a cabo la determinación de la actividad enzimática de la Peroxidasa de Rábano Picante (HRP), Peroxidasa de Hongo Blanco (PHB) y Peroxidasa de Hongo Rojo (PHR) inmovilizadas en microesferas de alginato y quitosán mediante la preparación de un sistema de reacción el cual fue monitoreado con el cambio de absorbancia en función del tiempo.

Se utilizaron los siguientes métodos:

- ABTS

Este método se basa en la oxidación de ABTS producida por la catálisis de la peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno.

El ensayo se realizó a temperatura ambiente con la peroxidasa comercial de rábano picante, utilizando Buffer de PO_4 a una concentración de 100 mM y un pH de 6.81 como solución amortiguadora. Se midió la absorbancia a 405 nm utilizando como línea base ABTS.

Tabla IV. Componentes utilizados en el ensayo enzimático de HRP libre con ABTS.

Peroxidasa	ABTS (ml)	Buffer de fosfatos (ml)	H₂O₂ (ml)	Enzima (ml)
HRP	1	0.95	0.1	0.005

Tabla V. Componentes utilizados en el ensayo enzimático de HRP inmovilizada en esferas de alginato de sodio con ABTS.

Peroxidasa	ABTS (ml)	Buffer de fosfatos (ml)	H₂O₂ (ml)	Unidades
HRP	1	0.95	0.1	10

- Guayacol

El método se basa en la oxidación de Guayacol a tetraGuayacol en presencia de H₂O₂ y la reacción es catalizada por la peroxidasa.

El ensayo se realizó a temperatura ambiente con la peroxidasa comercial de rábano picante, utilizando Buffer Tris-HCl a una concentración de 50mM y un pH 7.00 como solución amortiguadora. Se midió la absorbancia a 470 nm utilizando como línea base Buffer Tris HCl y Guayacol.

Tabla VI. Componentes utilizados en el ensayo enzimático de HRP libre.

Peroxidasa	Guayacol (ml)	Buffer Tri-HCl (ml)	H₂O₂ (ml)	Enzima (ml)
HRP	0.75	1	0.02	0.01

Tabla III. Componentes utilizados en el ensayo enzimático de HRP, PHB, PHR inmovilizadas en microesferas de alginato de sodio.

Peroxidasa	Guayacol (ml)	Buffer Tri-HCl (ml)	H₂O₂ (ml)	Unidades
HRP	0.75	1	0.02	10
PHB	0.75	1	0.04	10
PHR	0.75	1	0.04	10

Tabla IIII. Componentes utilizados en el ensayo enzimático PHB y PHR inmovilizadas en microesferas de quitosán.

Peroxidasa	Guayacol (ml)	Buffer Tri-HCl (ml)	H₂O₂ (ml)	Unidades
PHB	0.75	1	0.04	10
PHR	0.75	1	0.04	10

4.4 Síntesis de matrices para inmovilización

Se hicieron esferas de alginato de sodio y quitosán como matrices de inmovilización para las enzimas utilizadas en el experimento.

- **Esferas de alginato de sodio**

El alginato de sodio utilizado para la obtención de las esferas fue marca Sigma-Aldrich con número de producto W201502. Para la obtención de enzima inmovilizada, cada enzima se disolvió en buffer de fosfatos a una concentración de 0.05 mg/mL. Enseguida se mezclaron 2.5 mL de la disolución de enzima con 2 mL de disolución de alginato de sodio al 1.8% p/v en

manitol 0.3 M a un pH de 7.4. Las microesferas se hicieron mediante el goteo de ésta solución, con la ayuda de una jeringa de insulina, al ras de la superficie de una disolución de CaCl_2 75 mM manteniéndose en constante agitación para favorecer la formación de las esferas de alginatos con enzima inmovilizada. Después de 10 minutos se realizó la extracción de las esferas mediante decantación y se dejaron secar a temperatura ambiente.

- **Esferas de quitosán**

El quitosán utilizado para obtener las esferas de inmovilización fue marca Sigma-Aldrich con número de producto 448869. De tal manera que, cada enzima se disolvió en buffer de fosfatos a una concentración de 0.05 mg/mL. Enseguida se mezclaron 2.5 mL de la disolución de enzima con 2 mL de disolución de quitosán al 1.25% p/v en ácido acético al 5%. Las esferas se hicieron mediante el goteo de ésta solución, con la ayuda de una jeringa de insulina, al ras de la superficie de disoluciones de NaOH al 20% y de NH_4OH al 50 % manteniéndose en constante agitación para favorecer la formación de las esferas de alginatos con enzima inmovilizada. Después de 10 minutos se realizó la extracción de las esferas mediante decantación y se dejaron secar a temperatura ambiente.



Figura 5. Microesferas de quitosán formadas en disoluciones de NH_4OH y NaOH, respectivamente.

5. Resultados y discusión

5.1. Aislamiento y purificación de peroxidasas de origen natural

Las muestras de *Lactarius* sp. y *Russula* sp. fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Se realizó una curva de calibración para cada gel (Fig. 7). Todas las curvas de calibración fueron similares ya que se utilizaron los mismos marcadores moleculares. De acuerdo con lo observado en las electroforesis, se identificó una proteína de 37,000 Da en las dos muestras.



Figura 6. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 4.0 %. En el carril 7,9, 10 se observan las muestras. En el carril 1 se observan los marcadores moleculares de 250,000 Da a 10,000 Da.

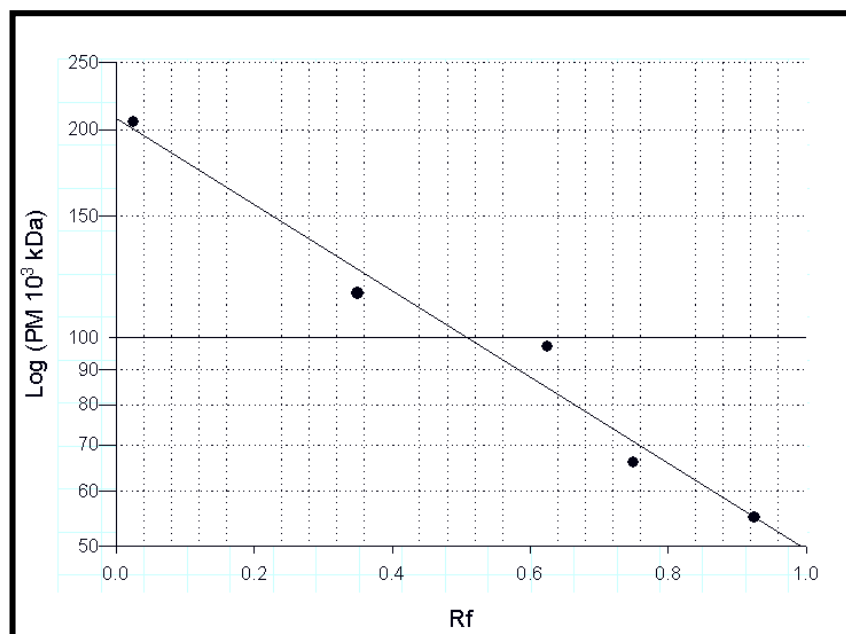


Figura 7. Curva de calibración para la determinación del peso molecular de las muestras correspondientes a cada grupo de experimentación ($r=0.998$).

Los pesos moleculares que se identificaron son similares a los pesos moleculares que Le *et al.*, 2015, reportaron para tirosinasas semipurificadas a partir de dos actinomicetos.

5.2. Actividad enzimática

Se determinó la actividad enzimática de la peroxidasa HRP y de dos muestras aisladas a partir de dos macromicetos colectados en El Salto, Baja California. La actividad de la HRP se probó con dos sustratos ABTS y Guaicol ya que son los dos sustratos más utilizados para la determinación de la actividad de las oxidasas. En este trabajo, se observó que la actividad fue mayor con el Guayacol, la diferencia en la actividad puede deberse a la diferencia en tamaño que hay entre los dos sustratos. El Guayacol es una molécula más pequeña por lo que se difunde con mayor facilidad hacia el sitio activo, no así, el ABTS que en algunas ocasiones se oxida por factores del entorno celular antes de alcanzar el sitio activo. Con estos resultados, se determinó que las

actividades de peroxidasa de las dos muestras de macromicetos se llevarían a cabo utilizando Guayacol como sustrato. Por otra parte, la actividad de la HRP disminuyó sensiblemente al ser inmovilizada en las esferas de alginato. Esta disminución podría atribuirse a la difusión del sustrato a través de la matriz de alginato; sin embargo, es necesario que se realicen ensayos de estabilidad para evaluar si esta matriz ayuda a mantener la actividad de peroxidasa en otros valores de pH, fuerza iónica y temperatura.

Como parte de este trabajo, la HRP también se inmovilizó en esferas de quitosán utilizando Guayacol como sustrato, en este caso se pudo observar que la actividad de la HRP fue menor que la enzima sin inmovilizar y que el de la enzima inmovilizada en alginato utilizando ABTS como sustrato. Al comparar los dos sustratos en la enzima libre se observó que el mejor sustrato era el Guayacol; sin embargo, las enzimas inmovilizadas en alginato tuvieron mejor actividad que las inmovilizadas en quitosán. La diferencia en las matrices es un factor a considerar en los procesos de inmovilización ya que se ha demostrado que el alginato tiene una estructura que le permite un mejor encapsulamiento y en liberación de enzimas (Fuenzalida *et al.*, 2016). Kar *et al.*, 2008, demostraron que la inmovilización de la xilanasa de *Bacillus licheniformis* mejoró el proceso biocatalítico ya que la estructura de la enzima se estabilizaba.

En cuanto a las actividades que se determinaron en las muestras de *Lactarius* sp. y *Russula* sp.; en *Lactarius* sp., se observó actividad tanto en la enzima semipurificada como en la enzima inmovilizada en esferas de alginato y quitosán. La mayor actividad se obtuvo en la enzima inmovilizada en las esferas de quitosán y la menor en las esferas de alginato. A diferencia de lo que se observó en la peroxidasa de rábano, la matriz de quitosán parece ser la mejor opción para inmovilizar ésta enzima ya que la actividad mejoró al ser encapsulada en comparación con la

enzima libre. Efecto similar se observó en la enzima semipurificada de *Russula* sp. en donde no se observó actividad en el ensayo con el extracto semipurificado pero en las muestras inmovilizadas tanto con alginato como con quitosán se observaron actividades similares a las que se obtuvieron con el *Lactarius* sp.

Los resultados obtenidos sugieren que el alginato es mejor matriz que el quitosán para la inmovilización de la peroxidasa de rábano, no así para las extraídas a partir de *Lactarius* sp. y *Russula* sp. en donde la actividad mejoró considerablemente cuando se utilizó quitosán.

Tabla IX. Actividad enzimática de peroxidasa comercial (HRP) y dos muestras semipurificadas de macromicetos de Baja California.

Muestra	Sustrato	$\mu\text{moles min}^{-1} \mu\text{g proteína}^{-1}$
Peroxidasa comercial	ABTS	0.2400
Peroxidasa comercial	Guayacol	1.9186
Peroxidasa comercial en esferas de alginato	ABTS	0.1790
Peroxidasa comercial en esferas de quitosán	Guayacol	0.0989
Hongo blanco (<i>Lactarius</i> sp.)	Guayacol	0.01252
Hongo blanco en esferas de alginato	Guayacol	0.0164
Hongo blanco en esferas de quitosán	Guayacol	0.0548
Hongo rojo (<i>Russula</i> sp.)	Guayacol	0
Hongo rojo en esferas de alginato	Guayacol	0.0274
Hongo rojo en esferas de quitosán	Guayacol	0.1041

6. Conclusiones

- La técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS PAGE) permitió el aislamiento de dos enzimas semipurificadas con peso molecular menores a 37, 000 Da a partir de los hongos *Lactarius* sp. y *Russula* sp, extraídos de la localidad del Salto en Ensenada, Baja California
- Con base en los ensayos con HRP, el Guayacol, como sustrato, permite monitorear la actividad enzimática de peroxidasas en comparación con el ABTS, ya que este segundo sustrato, al parecer presenta problemas de difusión, lo que le dificulta llegar al sitio activo de la enzima
- La implementación de alginato como matriz de inmovilización favorece a la actividad enzimática de la peroxidasa de rábano y la implementación de quitosán favorece a la actividad enzimática de las enzimas extraídas de *Lactarius* sp., y de *Russula* sp.
- Los organismos *Lactarius* sp. y *Russula* sp., son candidatos idóneos para el aislamiento de una variedad de sustancias que pueden ser útiles para biorremediación, además de ser productos con valor comercial para otros sectores como el farmacéutico, cosmético o alimenticio

7. Referencias

- AccessScience Editors. (2014). *Bioremediation*. De AccessScience. McGraw-Hill Education. <https://doi.org/10.1036/1097-8542.BR0107142>
- Bansal, N. & Kanwar S, S. (2013). *Peroxidase(s) in Environment Protection*. The Scientific World Journal., 2013, 9. 4, De Hindawi Base de datos.
- Blandino, A., Macías, M. (2001). *Materiales utilizados como matriz de inmovilización*. *Process Biochemistry* , 36, 601-606. De El sevier Base de datos.
- Bonifert, G., Folkes, L., Gmeiner C., Dachs, G. & Spadiut, O. (2016). *Recombinant horseradish peroxidase variants for targeted cancer treatment*. De Cancer Medicine Sitio web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4924378/pdf/CAM4-5-1194.pdf>
- Brena, B., González, P. & Batista, F. (2013). *Immobilization of Enzymes*. *Immobilization of Enzymes and Cells*, 1051, 15-31. De Springer Base de datos.
- Bynum, F. (1996). *Factors affecting enzyme activity*. De PURDUE University. Sitio web: http://www.chem.purdue.edu/teacher/table_of_contents/spectronic%20educator/enzyme.pdf
- Cabrera-Padilla, R.Y., Lisboa, M.C., Fricks, A.T. *et al.* (2012). *Immobilization of Candida rugosa lipase on poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate): a new eco-friendly support*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 39, 289-298. De Springer Base de datos.
- Cheng, J. Ming, S. & Zun, P. (2005). *Horseradish peroxidase immobilized on aluminum-pillared interlayered clay for the catalytic oxidation of phenolic wastewater*. *Water Research*, 40, 283-290. De El sevier Base de datos.
- Chiong T, Lau SY, Khor EH, Danquah MK (2014). *Enzymatic approach to phenol removal from wastewater using peroxidases*. *Biochemical Engineering & Bioprocess Engineering*, 3:1-6. OA biotechnology.
- Chiou, S. & Wu, W. (2004). *Immobilization of Candida rugosa lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups*. *Biomaterials*, 25, 197-204. De El sevier Base de datos.
- Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2013). *Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials*. *Biotech*, 3(1), 1–9. <http://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>
- Demirbas, A. (2001). *Concentrations of 21 metals in 18 species of mushrooms growing in the East Black Sea region*. *Journal of Food and Chemistry*, 75, 453-457. De Elsevier base de datos.
- Dey G, Nagpal V, Banerjee R. *Immobilization of alpha-amylase from Bacillus circulans GRS 313 on coconut fiber*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2002 Jul-Dec;102-103(1-6):303-13. PubMed PMID: 12396132.

Dilna, R., Mohan, B & Vidya, B. (2011). Mushrooms in the remediation of heavy metals from soils. *International Journal of Environmental Pollution Control & Management*, 3, 89-101. De Serials Journals Base de datos.

Durán N., Esposito, E. (2000). *Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review*. *Applied Catalysis B: Environmental*, 28, 83–99. d, De Elsevier Base de datos.

Gan, S. & Patel, K. (2013). *Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. *Journal of Investigative Dermatology*, 133, 1-3. 5. <https://doi:10.1038/jid.2013.287>

Hamid, M.& Rehman, K. (2009). *Potential applications of peroxidases*. *Food Chemistry*, 115, 1177–1186. De Elsevier Base de datos.

Hanachi, P., Jafari, F., Jafari, F. & Motamedi, S. (2015). *Immobilization of the Alkaline Phosphatase on Collagen Surface via Cross-Linking Method*. *Iranian Journal of Biotechnology*, 13, 32-38.

Hsieh, HJ., Liu, PC. & Liao, WJ. . (2000). *Immobilization of invertase via carbohydrate moiety on chitosan to enhance its thermal stability*. *Biotechnology letters*, 22, 1459. 1464, De Springer Base de datos

Juwarkar, A.A., Singh, S.K. & Mudhoo, A. (2010). *A comprehensive overview of elements in bioremediation*. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 9: 215. doi:10.1007/s11157-010-9215-6

Kadnikova, E. & Kostic, N. (2002). *Oxidation of ABTS by hydrogen peroxide catalyzed by horseradish peroxidase encapsulated into sol–gel glass*. Effects of glass matrix on reactivity. *Journal of Molecular Catalysis*, 18, 39-48. De Elsevier Base de datos.

Kosanic, M., Rankovic, B., Rancic, A & Stanojkovic, T. (2016). *Evaluation of metal concentration and antioxidant, antimicrobial, and anticancer potentials of two edible mushrooms Lactarius deliciosus and Macrolepiota procera*. *Journal of food and drug analysis*, 24, 477-484. D, De Elsevier Base de datos.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *Journal of Biological Chemistry*, 196, 265-275.

Maddhinni, V., Vurimindi, H., & Yerramilli, A. (2006). *Degradation of azo dye with horse radish peroxidase (HRP)*. *Journal Indian Institute of Science*, 86, 507-514.

Matto, M & Husain, Q. (2006). *Entrapment of porous and stable concanavalin A–peroxidase complex into hybrid calcium alginate–pectin gel*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81, 1316-1323. De Wiley Base de datos.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=460, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/460>

Niculescu-Duvaz, I. & Springer, C.J. (1996). *Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT): a review*. Advanced Drug Delivery Reviews, 26, 151–172. De El sevier Base de datos.

Nuytinck, J. (2005). *Lactarius section Deliciosi (Russulales, Basidiomycota) and its ectomycorrhiza: a morphological and molecular approach*. De Universiteit Gent Faculteit Wetenschappen Vakgroep Biologie Sitio web:
http://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/000/883/015/RUG01-000883015_2010_0001_AC.pdf

Pascual J., Moreno, J., Ros, M. & Vargas, M. (2012). Aspectos biológicos de la estabilización aeróbica II.1. España: Mundi-Prensa.

Pastircakova, K. (2004). *Determination of trace metal concentrations in ashes from various biomass materials*. Energy Education Science and Technology, 13 (2), 97-104. De Research Gate Base de datos.

Rao, M.A., Scelza, R., Scotti, R. & Gianfreda, L. (2010). *Role of enzymes in the remediation of polluted environments*. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 10, 333-353. De SciELO Base de datos.

Regalado, C., G, Blanca & Duarte, M. (2004). *Biotechnological applications of peroxidases*. Phytochemistry Reviews, 3, 243-256. De Springer Base de datos.

Sardar, M. & Gupta, M. (2005). *Immobilization of tomato pectinase on Con A–Seralose 4B by bioaffinity layering*. Enzyme and Microbial Technology, 37, 355-359. W, De El sevier Base de datos.

Shen Q, Yang R, Hua X, Ye F, Zhang W, Zhao W (2011) *Gelatintemplated biomimetic calcification for β -galactosidase immobilization*. Process Biochem 46:1565–1571

Sirisha, V.L., Jain, A. & Jain, A. (2016). *Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes*. Advances in Food and Nutrition Research, 79, 179-211. De Elsevier Base de datos.

Solis-Oba, M., Bárzana, E., García-Garibay, M., & Viniegra-González, G. (2007). *the ABTS an oxidant agent of different chemical compounds and its recycling process between laccase and substrate*. Revista mexicana de ingeniería química, 6, 275-281. De sciELO Base de datos.

Tien, M & Koduri, R. (1995). *Oxidation of Guayacol by Lignin Peroxidase*. The Journal of Biological Chemistry, 270, 22254 –22258. De The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Base de datos.

Veitch, N. (2004). *Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme*. Phytochemistry, 65, 249-259. De Elsevier Base de datos.

Vidali, M. (2001). *Bioremediation. An overview*. De IUPAC Sitio web: 0

Volk, T. (2004). *Russula emetica, the vomiting Russula*. University of Wisconsin-La Crosse Sitio web: http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/sep2004.html

Xu,S., Zhang, X., Wan, T. & Zhang, C. (2010). *A third-generation hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase cross-linked to multi-wall carbon nanotubes*. Microchimica Acta, 172, 199-205. De Springer Base de datos.

Yong, K. & Mooney, D. (2012). *Alginate: Properties and biomedical applications*. Progress in Polymer Science, 37, 106–126. De Elsevier Base de datos.

Zapanta, L. & Tien, M. (1997). The Roles of veratryl alcohol and oxalate in fungal lignin degradation. Journal of Biotechnology, 53, 93-102. d, De Elsevier Base de datos.

Zubuike, C.C., Chikere, C.B. & Okpokwasili. (2016). *Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects*. G.C. World J Microbiol Biotechnol 32: 180. Doi: 10.1007/s11274-016-2137-x