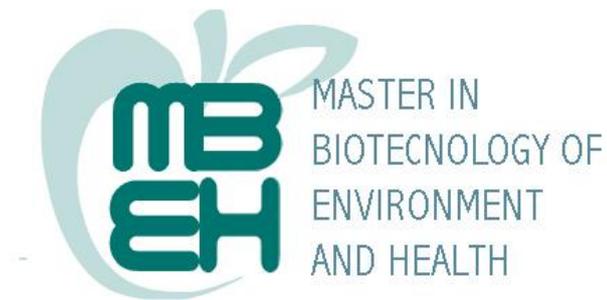


“CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE PEGILACIÓN DE LA LACASA DE *PLEUROTUS OSTREATUS*”



RAMÓN JOSÉ FRANCO GONZÁLEZ

CURSO ACADÉMICO 2023-2024

“Caracterización del proceso de PEGilación de la lacasa de *Pleurotus ostreatus*”



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo



María Teresa Fernández Sánchez, Catedrática de la Universidad de Oviedo

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “Caracterización del proceso de PEGilación de la lacasa de *Pleurotus ostreatus*” ha sido realizado por la Graduada/o en Máster Universitario en Biotecnología del Medio Ambiente y la Salud D./Dña. Ramón José Franco González en Universidad de Oviedo bajo su supervisión, constituyendo el Trabajo Fin de Máster del/la interesado/a, cuya presentación se autoriza.

Oviedo, a 12 de Julio 2024

Fdo. (nombre del tutor)

Fdo (nombre del co-tutor)

Índice

1.	RESUMEN.....	4
2.	INTRODUCCIÓN.	5
2.1.	Antecedentes.	5
	Aplicaciones de las lacasas.	11
	Reacción de PEGilación.....	12
2.2.	Justificación.....	14
2.3.	Planteamiento y objetivos.	16
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1.	Reacción de PEGilación de la lacasa.	16
3.2.	Purificación de la lacasa utilizando cromatografía.....	17
3.3.	Caracterización de la lacasa.	19
	Determinación del pH óptimo para los ensayos de actividad.....	19
	Determinación de los parámetros cinéticos.....	19
	Determinación de radio hidrodinámico y potencial Z (ZP).....	19
3.4.	Métodos analíticos.....	20
	Cuantificación de proteína total por el método de Bradford.	20
	Ensayo de actividad enzimática.	20
	Técnica de electroforesis.....	21
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
4.1.	Purificación de la lacasa de <i>P. ostreatus</i> utilizando cromatografía líquida.....	23
	Cromatografía de Intercambio Iónico (IEC)	24
	Cromatografía de Exclusión por Tamaño	26
4.2.	Caracterización de la lacasa nativa.....	29
	Parámetros cinéticos.....	29
	Determinación del efecto del pH sobre la actividad de la lacasa	30
	Determinación del Radio Hidrodinámico y Potencial Zeta.....	31
4.3.	Reacción de PEGilación de la lacasa.	32
	Aminación Reductora con PEG-aldehídos:.....	32
4.4.	Conclusiones y recomendaciones para Futuras Investigaciones.	42
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

“Caracterización del proceso de PEGilación de la lacasa de *Pleurotus ostreatus*”

1. RESUMEN.

La lacasa es una oxidasa que actúa sobre una amplia variedad de sustratos, lo que permite su explotación en distintas de aplicaciones biotecnológicas. Esta enzima despierta un creciente interés debido a la sostenibilidad de los productos de reacción, y a que su materia prima es en muchos casos subproducto de la industria fúngica alimentaria. Además, recientemente se ha demostrado actividad inhibitoria de la lacasa sobre el crecimiento de células tumorales, y por ello este enzima se ha situado en el foco de muchas investigaciones biomédicas. Se ha sugerido que el uso de conjugados de la lacasa con polietilenglicol (PEG), puede ser una opción para mejorar las propiedades farmacológicas del enzima. Las proteínas PEGiladas presentan una mayor estabilidad, si bien la PEGilación puede producir una reducción de la actividad enzimática como efecto adverso. El hecho de que la PEGilación no haya sido una técnica más explorada en el área de bioprocesos, se atribuye a la dificultad del proceso, y en particular en la caracterización y en la separación de los productos. Con el objetivo de ayudar a sobrepasar estas dificultades, el objetivo de este trabajo ha sido la caracterización de la reacción de PEGilación del amino N-terminal de la lacasa de *Pleurotus ostreatus*.

Se llevó a cabo la purificación de la enzima a partir de un liofilizado comercial de lacasa de *Pleurotus ostreatus* con métodos cromatográficos, cuyos resultados mostraron un factor de purificación de 7.22, que solo el 5.95% de la preparación corresponde a la forma de lacasa con las propiedades elegidas, y la cual tuvo rendimiento de actividad enzimática del 42.93% tras la purificación. En la caracterización de la lacasa en su forma nativa se observó variabilidad en los resultados de determinación de la actividad, que podría ser debido al tipo de lacasa o las condiciones de reacción (disolución tampón, los mediadores redox o los sustratos utilizados). Nuestros experimentos mostraron una masa molecular de la enzima de 63 kDa, un radio hidrodinámico de 4.45 nm y una carga superficial de -3.07 mV. Se determinaron los parámetros cinéticos de la lacasa con los sustratos DMP (2,6-dimetoxifeno, $K_m=0.36$ mM, $V_{max} = 1.48$ μ mol/min) y ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico, $K_m=0.73$ mM, $V_{max} = 14.99$ μ mol/min). Además, se observó que la enzima exhibe diferente pH óptimo para DMP y ABTS, y se fijaron pH 4.5 y 4 respectivamente como óptimos, mostrando similitudes con la isoforma de lacasa conocida como POXA1b.

En cuanto al proceso de PEGilación, se realizaron en primer lugar 3 PEGilaciones para determinar el pH óptimo de reacción en una solución de cianoborohidruro de sodio a concentración fija de 20mM, con mPEG-propioaldehído de 30 kDa y pH variable. Cuando este se fijó, trabajamos con tres valores diferentes de Temperatura (4, 15, 25 °C), relación molar enzima:PEG (1:4, 1:8, 1:12) y tiempo de reacción (4, 8, 12h). Finalmente, con el uso de técnicas electroforéticas, se visualizaron los productos de las diferentes reacciones, mostrando la pérdida significativa de actividad enzimática.

Abstract: Laccase is an oxidase that acts on a wide variety of substrates, which allows its exploitation in different biotechnological applications. This enzyme is of increasing interest due to the sustainability of the reaction products and the fact that its raw material is in many cases a by-product of the fungal food industry. In addition, laccase inhibitory activity on tumour cell growth has recently been demonstrated, and this enzyme has therefore become the focus of much biomedical research. It has been suggested that the use of polyethylene glycol (PEG) conjugates of laccase may be an option to improve the pharmacological properties of the enzyme. PEGylated proteins are more stable, although PEGylation may lead to a reduction in enzyme activity as an adverse effect. The fact that PEGylation has not been a more explored technique in the bioprocessing area is attributed to the difficulty of the process, and in the characterisation and separation of the products. In order to help overcome these difficulties, the aim of this work was to characterise the PEGylation reaction of the amino N-terminal laccase from *Pleurotus ostreatus*.

Purification of the enzyme from a commercial lyophilised laccase from *Pleurotus ostreatus* was carried out by chromatographic methods, the results of which showed a purification factor of 7.22, that only 5.95% of the preparation corresponds to the laccase form with the chosen properties, and which had an enzyme activity yield of 42.93% after purification. In the characterisation of laccase in its native form, variability was observed in the results of activity determination, which could be due to the type of laccase or the reaction conditions (buffer solution, redox mediators or substrates used). Our experiments showed an enzyme molecular mass of 63 kDa, a hydrodynamic radius of 4.45 nm and a surface charge of -3.07 mV. The kinetic parameters of laccase were determined with the substrates DMP (2,6-dimethoxyphenol, $K_m=0.36$ mM, $V_{max} = 1.48$ μ mol/min) and ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin)-6-sulfonic acid, $K_m=0.73$ mM, $V_{max} = 14.99$ μ mol/min). Furthermore, it was observed that the enzyme exhibits different pH optima for DMP and ABTS, and pH 4.5 and 4 respectively were set as optimum, showing similarities with the laccase isoform known as POXA1b.

As for the PEGylation process, 3 PEGylations were first performed to determine the optimal pH of reaction in a 20mM fixed concentration sodium cyanoborohydride solution, with 30 kDa mPEG-propioaldehyde and variable pH. When this was fixed, we worked with three different values of temperature (4, 15, 25 °C), enzyme:PEG molar ratio (1:4, 1:8, 1:12) and reaction time (4, 8, 12h). Finally, using electrophoretic techniques, the products of the different reactions were visualised, showing the significant loss of enzyme activity.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1. Antecedentes.

Descubierta en 1883, la lacasa (EC 1.10.3.2, bencenodiol: oxidorreductasa) es una enzima de propiedades catalíticas únicas. Las lacasas son enzimas que catalizan la oxidación de diversos sustratos, tanto orgánicos como inorgánicos, mediante la transferencia de electrones. Este proceso implica la reducción del oxígeno molecular a agua (Dwivedi *et al.*, 2011). Un ejemplo de la reacción global que lleva a cabo es la mostrada en la *tabla 1*.

Específicamente, la lacasa puede oxidar una amplia gama de sustratos que poseen características similares al p-difenol. Además, esta enzima también actúa sobre otros compuestos, incluyendo complejos metálicos, ferrocianidas, anilinas, benzotioles y otros compuestos biológicos. La versatilidad de la lacasa en la oxidación de diferentes sustratos la convierte en una enzima de gran interés en diversas aplicaciones biotecnológicas y ambientales (Giardina *et al.*, 2010), como la degradación de lignina en procesos de biorremediación y la producción de biocombustibles (García-Oduardo & Bermúdez-Savón, 2017; K. Mayolo-Deloisa *et al.*, 2009).

La lacasa está ampliamente distribuida por todos los reinos de la vida, y es una de las primeras enzimas descritas como capaces de unir cobre (ver *figura 2*) (Janusz *et al.*, 2020). Se ha propuesto que el origen evolutivo de las lacasas está vinculado a la presencia de oxígeno en la atmósfera. La disponibilidad de oxígeno podría haber impulsado el desarrollo de sistemas eficientes para su manejo y utilización, incluyendo el aprovechamiento de metales biodisponibles con potenciales redox adecuados (Andrews *et al.*, 2003; Janusz *et al.*, 2020). Y en este contexto, estas enzimas habrían evolucionado para cumplir funciones protectoras en los organismos, siendo la degradación de lignina una especialización derivada de esta función básica. En la *figura 1* se resumen las funciones descritas para la enzima lacasa en distintos organismos.

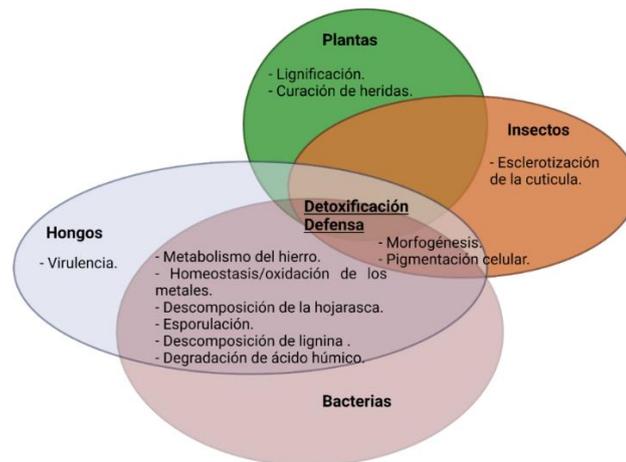


Figura 1. Representación de las funciones de las lacasas en diversos organismos. Imagen adaptada de (Janusz *et al.*, 2020).

Se ha observado que las lacasas participan en la formación de estructuras biofílmicas, y en la remodelación de la matriz extracelular en bacterias y hongos, facilitando la protección de condiciones ambientales adversas, y contribuyendo a la colonización de nuevas superficies, lo que sugiere que son importantes para la defensa y adaptación del organismo a diversos entornos (Janusz *et al.*, 2020).

Estos estudios también indican que las lacasas se manifiestan en los organismos durante sus primeras etapas evolutivas, lo que sugiere que podrían haber sido evolutivamente de las primeras metaloproteínas (Janusz *et al.*, 2020). Además, esta temprana aparición evolutiva refuerza la hipótesis de que su función primordial podría haber estado más relacionada con la protección celular y la gestión del estrés oxidativo que con la degradación de lignina, una actividad que habría surgido posteriormente como una especialización en ciertos organismos (Janusz *et al.*, 2020).

Concretamente en los hongos, las lacasas son producidas en exceso, especialmente por aquellos que descomponen madera como *Pleurotus ostreatus* (Charles Guest & Rashid, 2016), que también es altamente apreciado tanto en gastronomía por su sabor y facilidad de cultivo, así como en la medicina tradicional asiática por sus propiedades beneficiosas (Janusz *et al.*, 2020), y desempeñan una variedad de roles fisiológicos que incluyen morfogénesis, interacción planta-patógeno, defensa ante el estrés y degradación de lignina (Giardina *et al.*, 2010). En el caso de los hongos ligninolíticos, se ha evidenciado que las lacasas oxidativas son esenciales para romper los enlaces fenólicos de la lignina (Janusz *et al.*, 2020), permitiendo así el acceso a nutrientes almacenados en

entornos ricos en biomasa vegetal (Sjaarda *et al.*, 2015). Esta propiedad las convierte en fundamentales en el ciclo del carbono debido a su capacidad para degradar lignina, la segunda biomolécula orgánica más abundante en la biosfera (Bumpus & Aust, 1984).

Las lacasas son mayormente glicoproteínas extracelulares, que generalmente se presentan en forma monomérica, aunque también pueden aparecer asociados en multímeros y en diversas isoformas (Mate & Alcalde, 2017; Riva, 2006). Estas isoformas pueden exhibir diferentes patrones estructurales y funcionales dependiendo del organismo y las condiciones de producción (Contreras-Ordóñez *et al.*, 2007).

Estas enzimas suelen poseer un grado de glicosilación que varía entre el 10% y el 25%, y en algunos casos puede ser superior al 30%. Se han identificado cuatro regiones de secuencia conservadas (L1-L4) mediante alineamientos de más de 100 lacasas, que son útiles para identificarlas entre otras oxidasas multicobre (MCOs). Estas regiones L1-L4 contienen 12 residuos de aminoácidos que son importantes porque están involucrados en la unión y estabilización de los iones de cobre dentro de la estructura (Giardina *et al.*, 2010). Estas regiones también se correlacionan con un motivo conformacional específico en el sitio activo de las lacasas, con una simetría C-2 casi simétrica, lo que sugiere que podría haber ocurrido una duplicación de estas estructuras durante la evolución (Kumar *et al.*, 2003).

Se conoce que las estructuras tridimensionales de lacasas de basidiomicetos y ascomicetos resueltas mediante cristalografía, están organizadas en tres dominios (*figura 2*) que tienen una topología similar a la de las proteínas tipo cupredoxina y con la topología en barril β griega clave, que les proporciona estabilidad y funcionalidad, pues son claves para la transferencia de electrones y la estabilización de iones de cobre. Los puentes disulfuro son fundamentales para estabilizar los dominios en la estructura de las lacasas. En las enzimas de basidiomicetos, se han identificado dos enlaces disulfuro entre los dominios 1 y 3, y entre los dominios 1 y 2. En cambio, las lacasas de ascomicetos presentan tres enlaces disulfuro entre sus dominios, lo que sugiere una estructura más compleja en comparación con las de basidiomicetos (Janusz *et al.*, 2020).

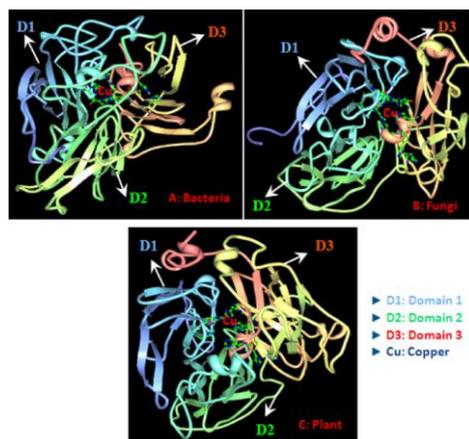


Figura 2. Estructura tridimensional con los diferentes dominios que la componen y los núcleos de cobre de (A) lacasa bacteriana (*Bacillus subtilis*), (B) lacasa fúngica (*Trametes versicolor*) y (C) lacasa vegetal (*Populus trichocarpa*) (Dwivedi *et al.*, 2011).

La lacasa típica de hongos tiene una masa molecular que oscila entre 60 y 80 kDa (Giardina *et al.*, 2010; Preussler *et al.*, 2009) y un punto isoeléctrico de 3.5 a 4 (Giardina *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2014). Estas propiedades contribuyen a la versatilidad de su actividad y estabilidad bajo diferentes condiciones ambientales y de sustrato. En particular, las lacasas de hongos son mayormente estables a pH neutro y temperatura ambiente, y exhiben una amplia flexibilidad en cuanto a la especificidad de sustratos, actividad catalítica, rango efectivo de pH y temperatura de trabajo (Baldrian, 2006).

En la Tabla 1 se resumen las principales características estructurales de las lacasas. Como se ha indicado, estas enzimas se caracterizan por contener cobre, en concreto cuatro núcleos de cobre diferenciados según su potencial redox y que participan en la oxidación del sustrato y en la reducción del oxígeno molecular a agua (Tinoco *et al.*, 2001).

Tabla 1. Características estructurales y mecanismo de acción de las lacasas (Dwivedi *et al.*, 2011).

Aspecto	Descripción
Estructura de las Lacasas	Glicoproteínas diméricas o tetraméricas con cuatro átomos de cobre por monómero.
Tipos de Centros de Cobre	<ul style="list-style-type: none"> - Tipo-1 (Centro de Cobre Azul): Coordinación triangular plana de histidina, cisteína y metionina, fundamental para una absorción intensa cerca de 600 nm que da el color azul profundo característico. - Tipo-2 (Cobre Normal): Coordinación de dos histidinas y una molécula de agua. No muestra absorción en el espectro visible, pero exhibe un espectro de resonancia paramagnética electrónica (EPR) característico. - Tipo-3 (Centro Bicuádrico Acoplado): Coordinación de tres histidinas y un puente hidroxilo. Acoplamiento antiferromagnético fuerte entre dos átomos de cobre y son EPR-silenciosos. Absorbe a 330 nm.

Potencial Redox de las Lacasas	Lacasas de alto potencial redox: Típicas de hongos basidiomicetos, especialmente los que descomponen la lignina.
Mecanismo de Acción	- Reducción del Cu Tipo-1 por el sustrato que se oxida. - Transferencia interna de electrones al clúster trinuclear de Cu Tipo-2 y Cu Tipo-3. - Reducción de oxígeno a agua en Cu Tipo-2 y Cu Tipo-3.
Reacción Catalítica	$4RH + O_2 \rightarrow 4R\cdot + 2H_2O$

El cobre tipo 1, limita el conjunto de sustratos a moléculas que contienen elementos fenólicos, ya que su potencial redox es generalmente entre 420 y 790 mV en relación con el electrodo Normal de Hidrógeno (NHE) (Giardina *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2017). Sin embargo, en las lacasas de alto poder redox, la gama de sustratos se amplía considerablemente, puesto que el mecanismo de transferencia de electrones desde el sustrato reductor al TNC (centro trinuclear de cobre) se facilita a través de un tripéptido conservado His-Cys-His y está mediado por la reducción del Cu1. Estudios cinéticos y espectroscópicos sugieren que la formación de intermediarios de oxígeno y su reducción secuencial es esencial para la actividad de la lacasa, y es facilitada por mediadores, que son pequeñas moléculas derivadas de sustratos fenólicos oxidados (Cañas & Camarero, 2010). En presencia de estos mediadores como el ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)), la especificidad de sustratos de las lacasas puede ampliarse, permitiendo la oxidación de sustratos más complejos (Dwivedi *et al.*, 2011).

Como se ha indicado, las lacasas de alto potencial redox pueden oxidar una gama más amplia de sustratos, como complejos metálicos orgánicos fenólicos o no fenólicos, como las anilinas y los benzotioles, y complejos inorgánicos, como las ferrocianidas (Freixo *et al.*, 2012). Además, son capaces de oxidar otros compuestos biológicos con potenciales redox menores a 1 V, como la lignina (Dwivedi *et al.*, 2011). Las enzimas con bajo potencial redox se encuentran repartidas principalmente en bacterias, insectos y plantas, mientras que las de alto potencial redox aparecen ampliamente distribuidas en hongos (Munk *et al.*, 2015). Esto se ve reflejado en las diferencias en el potencial redox, punto isoeléctrico (pI) y pH óptimo entre las lacasas de diferentes orígenes. Las lacasas fúngicas tienen un pI de 3.0 a 7.0 y un pH óptimo de 3.6 a 5.2, favoreciendo su actividad en condiciones ácidas, mientras que las lacasas vegetales presentan un pI de aproximadamente 9 y un pH óptimo de 6.8 a 7.4 (Dwivedi *et al.*, 2011; Madhavi & Lele, 2009). Por otro lado, las lacasas bacterianas tienden a ser más estables a altas temperaturas y a variaciones de pH, lo que las convierte en la opción más adecuada para aplicaciones biotecnológicas e industriales que requieren condiciones extremas, como la

biorremediación de contaminantes específicos (Mayer & Staples, 2002; Rodríguez Sánchez, 2006; Tonin *et al.*, 2016). En la tabla 2 se resumen las principales características de estos enzimas según su origen.

Tabla 2. Principales similitudes, diferencias y particularidades de las lacasas bacterianas, fúngicas y de plantas (Dwivedi *et al.*, 2011).

Característica	Lacasas Bacterianas	Lacasas Fúngicas	Lacasas de Plantas
Origen y Ambiente Natural	Asociadas principalmente con bacterias del suelo y la rizosfera (p. ej., <i>Azospirillum</i> , <i>Bacillus subtilis</i>).	Ampliamente distribuidas en hongos (ascomicetes, basidiomicetes), incluidos descomponedores de madera.	Presentes en una variedad de plantas como parte de una familia multigénica (p. ej., <i>Pinus</i> , <i>Populus</i>).
Localización	Mayormente intracelulares.	Mayormente extracelulares, secretadas para degradación de lignina y otros procesos metabólicos.	Varias formas, algunas secretadas como multicobre oxidasas en suspensiones celulares y tejidos xilemáticos.
Actividad y Estabilidad	Muy estables y activas a altas temperaturas, pH alto y concentraciones elevadas de iones de cobre.	Eficientes en la degradación de lignina, con alta actividad en basidiomicetes descomponedores de madera.	Funciones variadas, incluyendo polimerización de lignina y oxidación del hierro.
Funciones Adicionales	Implicadas en la formación de pigmentos y protección contra radiación UV y peróxidos.	Desarrollo, pigmentación, morfogénesis, detoxificación, patogénesis, dependiendo de la especie fúngica.	Polimerización de lignina, cicatrización de heridas, y modulación del metabolismo fenólico.
Regulación de Producción	Influenciada por condiciones del suelo y la planta huésped.	Sensibles a la concentración de nitrógeno (alta o baja, dependiendo de la especie).	Reguladas por desarrollo y respuesta a estrés, produciendo múltiples isoformas.
Glicosilación	Menos glicosiladas en comparación con las fúngicas y de plantas.	Moderadamente glicosiladas, contribuyendo a la estabilidad y actividad enzimática.	Altamente glicosiladas, afectando la secreción, retención de cobre y estabilidad térmica.
Aplicaciones Biológicas e Industriales	Potencial para aplicaciones industriales debido a su estabilidad y actividad en condiciones extremas.	Importancia en biotecnología para degradación de lignina, biorremediación, y producción de bioenergía.	Utilización en biotecnología para mejorar la producción de energía, fitorremediación, etc.

Las lacasas presentan ciertos inconvenientes que limitan su eficacia y aplicación práctica. Uno de los principales desafíos es su sensibilidad a condiciones extremas de pH y temperatura, lo cual puede afectar tanto su actividad enzimática como su estabilidad estructural (Madhavi & Lele, 2009). Además, la baja solubilidad y estabilidad en medios acuosos o en presencia de sustratos complejos también son puntos críticos que considerar para maximizar su rendimiento biotecnológico (Baldrian, 2006).

La PEGilación ha surgido como una estrategia prometedora para abordar estos problemas. Esta técnica implica la conjugación de polietilenglicol (PEG) con la molécula de la enzima, lo que puede mejorar significativamente su solubilidad, estabilidad térmica y resistencia a condiciones extremas de pH (K. Mayolo-Deloisa *et al.*, 2015). Además, la PEGilación puede modificar el perfil de actividad de las lacasas, haciéndolas más efectivas en entornos biológicos e industriales variados.

Estas mejoras no solo amplían las aplicaciones potenciales de las lacasas en biorremediación, producción de biocombustibles y síntesis de productos químicos, sino que también fortalecen su utilidad en bioprocesos que requieren estabilidad y actividad enzimática bajo condiciones desafiantes (Dwivedi *et al.*, 2011)

Aplicaciones de las lacasas.

Las lacasas y en concreto la de *Pleurotus ostreatus* tienen un gran potencial para diversas aplicaciones industriales y ambientales. Estas aplicaciones no solo enfatizan su importancia en la optimización de procesos industriales y ambientales, sino que también subrayan su relevancia en el desarrollo de soluciones innovadoras para enfrentar problemas de salud pública y medioambientales a nivel global. Algunas de sus principales aplicaciones incluyen:

- **Industria Alimentaria:** Utilizadas como aditivos y en el procesamiento de bebidas para la clarificación de vinos y la degradación de metabolitos fúngicos tóxicos como la alfa-toxina B1 (Mayer & Staples, 2002; Tonin *et al.*, 2016).
- **Industria del Papel y Madera:** Actúan como agentes de reticulación de monómeros y en la degradación de polímeros como la lignina (Mayer & Staples, 2002; Tonin *et al.*, 2016).
- **Industria Textil:** Utilizadas en procesos de blanqueamiento y tinción (Mayer & Staples, 2002; Tonin *et al.*, 2016).
- **Producción de Biocombustibles:** Facilitan la transformación de lignocelulosa en moléculas más pequeñas, cruciales para la producción de biocombustibles (Mayer & Staples, 2002; Tonin *et al.*, 2016).
- **Biorremediación:** Degradan contaminantes fenólicos y colorantes sintéticos difíciles de gestionar, como el azul de bromofenol y el verde de malaquita (Mayer & Staples, 2002; Preussler *et al.*, 2009; Tonin *et al.*, 2016) En particular,

se destacó su capacidad para degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), que son contaminantes ambientales de gran preocupación (Rodríguez Sánchez, 2006).

- **Terapéutica:** Empleadas en el desarrollo de biosensores para el diagnóstico de enfermedades (Mayer & Staples, 2002; Tonin *et al.*, 2016) y muestran propiedades antiproliferativas contra células tumorales y actividad inhibitoria sobre la retrotranscriptasa inversa del VIH-1 (Pankaj *et al.*, 2016; Sondhi *et al.*, 2021; Wang & Ng, 2004; Zhang *et al.*, 2011).

Reacción de PEGilación.

La PEGilación es una técnica de modificación de proteínas que implica la conjugación de poli-etilenglicol (PEG) (ver *figura 3*) para mejorar sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas como moléculas terapéuticas (Frokjaer & Otzen, 2005; Milton Harris *et al.*, 2001; Milton Harris & Chess, 2003).

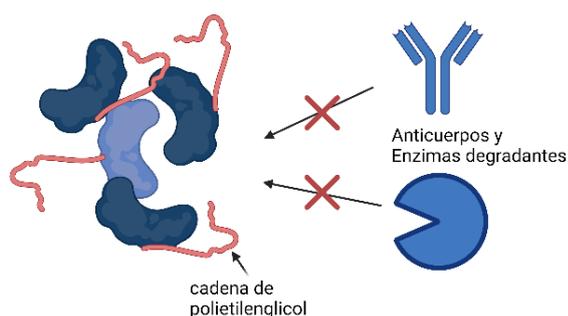


Figura 3. Representación del efecto protector del PEG sobre la inmunogenicidad de la proteína conjugada. Se muestra en azul la proteína y con líneas rojas el PEG. Indicando que la PEGilación impide el acceso para proteger la proteína de la degradación o la unión de anticuerpos.

La modificación de proteínas, péptidos y otros fármacos mediante la unión de moléculas de PEG se ha demostrado que altera favorablemente sus propiedades bioquímicas y reduce la inmunogenicidad (González-Valdez *et al.*, 2012; Ko & Maynard, 2018; Santos *et al.*, 2018). Este método, aprobado por la FDA desde 1990 para el uso con formulaciones inyectables, tópicas, rectales y nasales (Milton Harris & Chess, 2003), se caracteriza por su alta reproducibilidad validación y optimización y consiste en la unión de metoxi-polietilenglicol (mPEG) unidireccionalmente en un solo paso, porque el mPEG solo tiene un único grupo hidroxilo disponible, y garantiza que el PEG se una a un sitio específico de una única molécula proteica (ver *figura 4*), evitando ligamientos cruzados (González-Valdez *et al.*, 2012; Roberts *et al.*, 2012). EL PEG presenta escasa

toxicidad y se elimina del organismo intacto por los riñones (para PEG < 30 kDa) o en las heces (para PEG > 30 kDa) (Yamaoka *et al.*, 1993). Esto ha llevado al desarrollo y comercialización de diversas moléculas terapéuticas modificadas (Coronel-Meneses, 2021; Duncan, 2003).

El PEG, un polímero sintético biocompatible, no tóxico y no inmunogénico, posee características que lo hacen ideal para la conjugación con proteínas. Estas incluyen su alta solubilidad en agua y solventes orgánicos, baja polidispersidad y una adecuada eliminación del (Jevševar *et al.*, 2010; Veronese & Pasut, 2005). La conjugación de PEG a proteínas generalmente se realiza a través de los grupos amino (ver *figura 4*) debido a su accesibilidad y reactividad bajo condiciones fisiológicas (Pasut & Veronese, 2007).

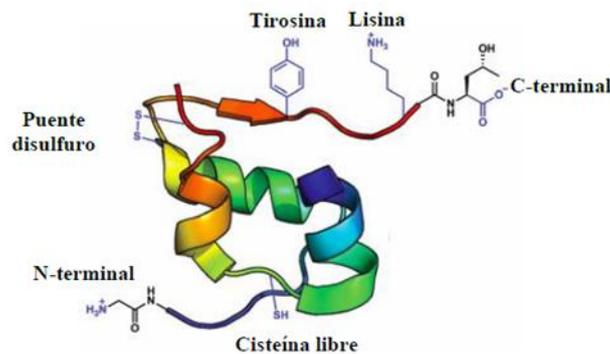


Figura 4. Posibles sitios de PEGilación entre proteína y PEG. Adaptación de Ko & Maynard (2018) realizada por Coronel-Meneses (2021).

La PEGilación aumenta la vida media de los fármacos en el organismo, reduce la frecuencia de dosificación y mejora la solubilidad y estabilidad estérica de las proteínas, lo que a su vez mejora su comportamiento farmacológico (Basu *et al.*, 2006; Fee & Van Alstine, 2006; Greenwald *et al.*, 2003). La formación de una película altamente hidratada en la superficie proteica también contribuye a reducir la tasa de agregación de proteínas hidrofóbicas y a prevenir la inmunogenicidad (González-Valdez *et al.*, 2012).

Un aspecto crucial en la PEGilación es la conservación de la actividad biológica de la proteína, lo cual se logra controlando el número de moléculas de PEG y su posición de conjugación. Generalmente, el PEG se une primero al sitio más reactivo de la proteína, formando conjugados mono-PEGilados, y posteriormente a sitios menos reactivos para formar formas di y tri-PEGiladas (Hooftman *et al.*, 1996; Santos *et al.*, 2018). La

PEGilación dirigida al extremo N-terminal de la proteína es preferida para preservar la actividad enzimática (Mayolo-Deloisa *et al.*, 2015).

El desarrollo de métodos dirigidos, como el uso de PEG-aldehidos para la alquilación reductora, ha permitido obtener productos homogéneos con alta actividad biológica y los beneficios de la PEGilación (Kinstler *et al.*, 2002). La elección del tipo de PEG, ya sea lineal o ramificado, depende del tamaño del fármaco y su aplicación terapéutica. En el caso de la lacasa, se emplea un PEG de 30 kDa para asegurar una adecuada excreción y un mayor tiempo de residencia del fármaco en el organismo (Pasut & Veronese, 2007).

2.2. Justificación

La presente investigación se centra en la PEGilación de la lacasa de *Pleurotus ostreatus* como una estrategia innovadora para mejorar su estabilidad y biodisponibilidad, y posibilite su uso en terapias antitumorales. En España, los tumores se situaron como el principal responsable de la mortalidad en el año 2023, representando el 26,6% de las defunciones totales, según los datos del Instituto Nacional de Estadística (INE) (<https://www.ine.es>). El cáncer continúa siendo una de las principales causas de enfermedad y muerte a nivel mundial. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) calculó que en 2020 se diagnosticaron alrededor de 18,1 millones de nuevos casos de cáncer en todo el mundo, sin contar los tumores cutáneos no melanoma. Asimismo, se prevé que la cantidad de nuevos diagnósticos anuales ascenderá a 28 millones para 2040 (Sociedad Española de Oncología Médica, 2023). La alarmante tasa de mortalidad por cáncer destaca la necesidad de tratamientos más efectivos y accesibles, especialmente aquellos que puedan ofrecer opciones personalizadas debido a la variabilidad en la respuesta a terapias convencionales entre pacientes. Estudios previos han demostrado que la lacasa posee propiedades anti proliferativas sobre células tumorales y sobre la acción de hormonas que pueden tener un papel importante en el desarrollo de algunos tipos de tumores como el de mama (Charles Guest & Rashid, 2016). Además, la lacasa de *Tricholoma giganteum* posee actividad inhibitoria frente a la retrotranscriptasa inversa del VIH-1 (Wang & Ng, 2004), emergiendo, así como un candidato prometedor para la innovación biomédica.

Además de su potencial terapéutico, la lacasa aprovecha el efecto EPR (Enhanced Permeability and Retention), que permite a las macromoléculas acumularse

selectivamente en tumores sólidos debido a características como la angiogénesis activa y una mayor actividad de endocitosis en tejidos tumorales (Matsumura & Maeda, 1986; Russell-Jones, 1996; Takakura *et al.*, 1998). Este fenómeno no solo mejora la eficacia terapéutica al dirigir los tratamientos hacia el sitio de la enfermedad, sino que también ayuda a reducir los efectos secundarios asociados con terapias convencionales.

En el contexto biomédico, la lacasa de *Pleurotus ostreatus* sobresale por varias razones que la hacen una candidata ideal frente a otras especies de lacasas. Primero, muestra una **actividad y estabilidad notable en condiciones biológicas** relevantes, como pH fisiológico y temperaturas moderadas, esenciales para aplicaciones en entornos complejos como el cuerpo humano (Gianfreda & Rao, 2004). Además, se caracteriza por su **baja citotoxicidad**, lo que la hace segura para terapias terapéuticas (Claus, 2004). Su especificidad y **capacidad para modificar una amplia gama de biomoléculas**, como proteínas y polisacáridos, sin alterar sus propiedades esenciales, la hace versátil (Baldrian, 2006). Asimismo, es **fácil de cultivar a gran escala**, y hay una industria existente, cuyos residuos podrían servir para la extracción (K. Mayolo-Deloisa *et al.*, 2015; Wesenberg *et al.*, 2003). Finalmente, su **estabilidad a largo plazo** garantiza su utilidad clínica y biomédica incluso después de períodos prolongados de almacenamiento (Rodríguez Couto & Toca Herrera, 2006; Rodríguez-Couto, 2019).

Como hemos mencionado, el avance en la biotecnología ha impulsado significativamente el desarrollo de nuevos medicamentos, destacando aquellos derivados de proteínas y péptidos por sus propiedades terapéuticas específicas y efectivas para el tratamiento de diversas enfermedades multifactoriales. Sin embargo, estos fármacos enfrentan desafíos significativos en términos de estabilidad in vivo, corta vida media y potencial inmunogenicidad de proteínas y enzimas, especialmente cuando se utilizan proteínas heterólogas (Pasut & Veronese, 2007). La PEGilación emerge como una estrategia crucial para mitigar este problema, ya que el acoplamiento de PEG a las proteínas mejora su estabilidad y biodisponibilidad en entornos biológicos, prolongando su vida media y reduciendo las respuestas inmunes adversas (Choe *et al.*, 2002; Pasut & Veronese, 2007). En este contexto, el presente estudio tiene como objetivo contribuir al conocimiento fundamental sobre las interacciones enzimáticas mediadas por PEG, así como explorar aplicaciones potenciales en biomedicina y

biotecnología, abriendo nuevas posibilidades en el desarrollo de terapias más eficaces y accesibles (Thordarson *et al.*, 2006; Veronese, 2009).

2.3. Planteamiento y objetivos.

Planteamiento: Se emplearán cromatografía de intercambio aniónico (IEC) y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para separar la enzima monomérica de otras isoformas y moléculas libres, basándose en los cambios en tamaño y carga superficial en la matriz de la lacasa. Se estudiará el impacto de la variación del pH durante la reacción de PEGilación, considerando los distintos puntos isoelectrónicos de los grupos amino de la lacasa. Se modulará la relación molar de enzima, la temperatura y el tiempo de reacción para influir en la formación del conjugado mono-PEGilado activo, analizando la disponibilidad física para la unión de la lacasa con mPEG.

Objetivo general y objetivos específicos:

Caracterizar la reacción de PEGilación del amino N-terminal de la lacasa de *Pleurotus ostreatus*.

1. Purificar la lacasa proveniente de un liofilizado comercial de *P. ostreatus* utilizando diferentes técnicas cromatográficas.
2. Caracterizar la lacasa nativa de *P. ostreatus* determinando parámetros cinéticos, radio hidrodinámico, masa molecular y carga superficial.
3. Caracterizar la reacción de PEGilación del amino N-terminal de la lacasa de *P. ostreatus* variando la relación molar (enzima:PEG), pH, temperatura y tiempo de reacción.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reacción de PEGilación de la lacasa.

Las reacciones de PEGilación se llevaron a cabo utilizando la lacasa purificada en viales de vidrio de 5 mL con cierre hermético. Se utilizó una cantidad fija de 400 µg de proteína por reacción, a una concentración de 3.5 mg/mL ($6.3 \cdot 10^{-7}$ M). Para cada reacción de 1 mL se añadieron las cantidades indicadas en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición de las reacciones de PEGilación con diferentes relaciones molares.

Relación molar proteína: PEG	1:4	1:8	1:12
cantidad de PEG (mg)	0.76	1.52	2.28
volumen stock PEG (µl)	50.7	101.5	152.3

volumen solvente (µl)	574.6	523.8	473.1
------------------------------	-------	-------	-------

*Stock de PEG: 15 mg/mL en fosfato de sodio 0.1 M a pH 5.1 (también se utilizó a pH 5.5 y 6.0).

En cada vial se agregó mPEG-propionaldehído de 30 kDa, disolución tampón de fosfato de sodio 0.1 M pH 5.1, lacasa purificada (Sigma Aldrich – 75117) y cianoborohidruro de sodio (NaBH₃CN, 20 mM) como catalizador de aminación reductora selectivo del N-terminal en pH ácido, siguiendo el protocolo descrito por Kinstler *et al.*, (2002).

La cantidad de catalizador solido necesario para preparar una solución estándar a molaridad de 20mM, se calculó midiendo la diferencia de peso entre el vial empleado antes y después de añadir el catalizador, debido a que es crucial conocer con precisión la concentración del catalizador utilizada en la reacción de la misma, puesto que afecta directamente la eficiencia de la PEGilación (demasiado catalizador puede resultar en efectos no deseados o reacciones secundarias, mientras que una cantidad demasiado baja puede afectar la eficiencia de la conjugación) y además es muy tóxico. En estos experimentos se utilizó una concentración de NaBH₃CN 20 mM en tampón fosfato de sodio 0.1 M pH 5.1.

Finalmente, los productos de la reacción se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida tanto en condiciones nativas como desnaturalizantes.

3.2. Purificación de la lacasa utilizando cromatografía.

Se utilizó una preparación comercial de lacasa de *Pleurotus ostreatus* liofilizada (Sigma Aldrich – 75117) con una concentración de 5 mg/mL. Sin embargo, la concentración real de proteína, medida mediante el método de Bradford, resultó ser de 1.25 mg/mL. Para su preparación, se diluyó en agua milli-Q, se filtró con la ayuda de una jeringa y filtros Acrodisc® Premium 25mm con membrana GHP (membrana de polipropileno hidrofílico) con 0.2µm de poro.

Se emplearon un total de 94 cromatografías de intercambio aniónico (IEC), utilizando una resina PRAESTO Jetted Q35 (PuroLite) con un ligando amino cuaternario. La resina fue empaquetada en una columna Tricorn 5/50 (Cytiva) y se utilizó una disolución tampón Tris-HCl 20 mM + NaCl 400 mM para el proceso. La elución se realizó utilizando un equipo Äkta Avant 150 bajo condiciones específicas detalladas en la Tabla 4. Las fracciones de elución (1 mL) se recogieron y se determinó la actividad enzimática de lacasa en cada una de ellas.

Tabla 4. Condiciones utilizadas en la cromatografía de intercambio aniónico.

Fases	Parámetros	Condiciones
Inicio	Flujo (mL/min)	2
	Límite de presión (MPa)	0.4
	λ (nm)	210, 280 y 606
Fase de equilibrio	Disolución tampóntris-HCl 20 mM pH 8.0 (VC)	10
Inyección de muestra	Volumen de inyección (mL)	2
Lavado	Disolución tampóntris-HCl 20mM (VC)	2
Elución	Disolución tampóntris-HCl 20mM + NaCl 1 M	Gradiente de 0 a 0.5 M de NaCl
	Longitud del gradiente de elución (VC)	30
Lavado	Disolución tampóntris-HCl + NaCl 1 M (VC)	9
Regeneración y reequilibrado	Disolución tampóntris-HCl 20 mM pH 8.0 (VC)	5

* VC = Volúmenes de columna: este término se utiliza para expresar el volumen de disolución tampón que se pasa a través de la columna cromatográfica y es igual al volumen total interno de la columna cromatográfica. Permite comparar experimentos con diferentes columnas, normalizar volúmenes para facilitar la reproducibilidad y estandarizar tiempos y volúmenes, optimizando las condiciones de separación.

Las fracciones obtenidas de lacasa que presentaron actividad enzimática (5 fracciones de 1 mL por cromatografía) fueron concentradas usando una cámara Amicon® Stirred Cell 50 mL (EMD Millipore Corporation) y filtros Ultracel® 10 kDa de celulosa regenerada (PLGC04310- EMD Millipore Corporation) obteniendo un total de 20mL de concentrado.

Posteriormente, la lacasa purificada y concentrada se sometió a cromatografía de exclusión de tamaño utilizando una columna HiLoad 16/60 Superdex 75 pg (prep grade) con disolución tampón fosfato de sodio 0.1 M pH 5.1 conforme a las condiciones mostradas en la *Tabla 5*. La columna empleada tiene un volumen de columna de 120.63 mL, y permite separar moléculas con una masa molecular de entre aproximadamente 3,000 y 70,000 Daltons.

Tabla 5. Condiciones utilizadas en la cromatografía de exclusión de tamaño.

Fases	Parámetros	Condiciones
	Flujo (mL/min)	0.4
Equilibrado	Volumen de equilibrado (VC)	0.20
Inyección de muestra	Volumen de inyección (mL)	5
Elución	Volumen de fracciones en el colector (mL)	4
	Volumen de elución (VC)	1.30

Finalmente, las fracciones recogidas y con actividad lacasa (48 mL) se concentraron mediante un filtro Vivaspin® 6 10 kDa MWCO (código 28932296) hasta un volumen final de 4 mL durante 10, a 8000 g y 4°C (Sartorius Stedim Biotech, 2015).

3.3. Caracterización de la lacasa.

Determinación del pH óptimo para los ensayos de actividad.

Se evaluó la actividad enzimática de la lacasa a diferentes pH (2.5 a 7.0) utilizando disoluciones de tampón de acetato sódico 0.1 M para pH 2.5-5.5 y disolución de tampón fosfato sódico 0.1 M para pH 6-7. Los sustratos utilizados fueron ABTS (1 mM) y 2,6-DMP (6 mM), siguiendo los métodos descritos por Mayolo-Deloisa *et al.*, (2009, 2015)

Determinación de los parámetros cinéticos.

Para determinar los parámetros cinéticos ($V_{m\acute{a}x}$ y K_m) de la lacasa, se utilizaron diferentes concentraciones de sustratos (ver *Tabla 6*). Los datos cinéticos se analizaron utilizando el método de Lineweaver-Burk.

Tabla 6. Concentraciones de sustratos empleadas para la obtención de parámetros cinéticos.

Concentración DMP (mM)	Concentraciones ABTS (mM)
7	7
5	3
3	2
1	1.5
0.5	1
0.25	0.5
0.1	0.125

Determinación de radio hidrodinámico y potencial Z (ZP).

Se utilizó un equipo Malvern Zeta sizer NANO ZSP para medir el potencial Z (ZP) y el radio hidrodinámico de la lacasa en disolución tampón fosfato de sodio 0.1 M pH 5.1. Estas mediciones proporcionaron información sobre la carga superficial y el tamaño de partícula de la enzima.

Para la preparación de las muestras se siguieron las instrucciones del manual de usuario (Ohue & Ohtake, 1984). Todas las muestras fueron filtradas con filtros Acrodisc® Premium 25 mm con membrana GHP 0.2µm y ultrasonificadas para evitar la interferencia de burbujas de aire. Y, el resto de material necesario, como las cubetas específicas, se limpiaron con aire comprimido.

3.4. Métodos analíticos.

Cuantificación de proteína total por el método de Bradford.

Para determinar la cantidad de proteína soluble total en las muestras, se utilizó el método de Bradford, (1976), midiendo la absorbancia con un lector de microplacas Biotek Sinergy HT tras la incubación con el reactivo de Bradford (Sigma B6916).

Ensayo de actividad enzimática.

La actividad enzimática de la lacasa se evaluó midiendo cambios de absorbancia durante una cinética de 5 minutos, debido a la coloración producida por la oxidación de los sustratos listados en la *Tabla 7*.

Tabla 7. Sustratos utilizados con sus propiedades para determinar la actividad enzimática de la lacasa.

Sustrato	Longitud de onda (nm)	Coefficiente de Absorción molar (ϵ) ($M^{-1}cm^{-1}$)	Cita bibliografica
ABTS	436	29.3×10^3	(Mayolo-Deloisa <i>et al.</i> , 2015)
DMP	468	27.53×10^3	(Mayolo-Deloisa <i>et al.</i> , 2015)
Siringaldazina	526	6.5×10^4	(Flores <i>et al.</i> , 2009; Mayolo-Deloisa <i>et al.</i> , 2015)

La reacción se llevó a cabo en placas Costar® de 96 pocillos por cuadruplicado, mezclando 3 μ L de muestra, 222 μ L de disolución tampón de acetato sódico (0.1 M; pH 4.0 para el sustrato ABTS y pH 5.0 para Siringaldazina y DMP) y 25 μ L de sustrato (ABTS 1 mM, siringaldazina 0.1 mM y DMP 6 mM). El cambio de absorbancia en 5 minutos a la longitud de onda indicada en la tabla 7, se midió en un espectrofotómetro Biotek Sinergy HT.

Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1.0 μ mol del producto de reacción por minuto (Mayolo-Deloisa *et al.*, 2009, 2015). La actividad enzimática (μ mol/min (U)) se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$U = \frac{A}{\epsilon \times L} \times 1000 \times \frac{\text{Volumen de reacción } (\mu\text{L})}{\text{Volumen de muestra enzimática } (\mu\text{L})} \times \text{Factor dilución}$$

Donde:

- A es la pendiente que representa el cambio de absorbancia por minuto (min^{-1}).

- ϵ es el coeficiente de absorción molar.
- L es la distancia que atraviesa el haz de luz (cm).

Técnica de electroforesis.

Se utilizó electroforesis en gel de poliacrilamida para analizar muestras de proteína bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Laemmli *et al.*, 1976) para evaluar su pureza y contenido proteico (Iasur Kruh *et al.*, 2020) y no desnaturizantes, omitiendo el SDS y el DTT en el tampón de carga y en la composición del gel. Se utilizó una concentración de poliacrilamida de 12% en el gel de separación y de 5% en el gel de empaquetamiento. Las muestras se corrieron a 90 V en un sistema mini-PROTEAN tetra cell (BIO-RAD).

Revelado de los geles.

Geles de Actividad enzimática (zimograma).

Este revelado se aplicó únicamente a geles en condiciones no desnaturizantes, donde se conserva la estructura de la proteína y su sitio activo es funcional, permitiendo observar la actividad enzimática de la lacasa. El procedimiento fue el siguiente:

1. Lavado del gel con 50 mL de Tritón™ X100 (Sigma T8787) al 0.5% (v/v) durante aproximadamente 60 minutos para eliminar los reactivos de la electroforesis que puedan afectar la actividad enzimática.
2. Tres lavados de 5 minutos con tampón de acetato sódico 0.1 M, pH 5.0, hasta que deje de salir espuma.
3. Adición de DMP (6mM) durante el tiempo necesario para observar las bandas enzimáticas.

Tinción de plata.

Entre los diferentes tipos de tinción de proteínas, la aplicación de nitrato de plata sobre los geles es uno de los más sensibles, produciendo una coloración café claro o en escala de grises (Carrillo Soto *et al.*, 2012).

Respecto a la tinción de plata, todo el proceso hasta la fase de revelado se debe hacer en condiciones de oscuridad y manejar los tiempos mostrados en la tabla 8 cuidadosamente.

Tabla 8. Protocolo de tinción de plata.

Fase	Reactivos	Cantidad
------	-----------	----------

“Caracterización del proceso de PEGilación de la lacasa de *Pleurotus ostreatus*”

1.- Fijación (40-60 min)	Metanol	30 mL
	Ácido acético glacial	7.2 mL
	Formaldehido	30 µL
	H ₂ O milli-Q	22.8 mL
2.- Lavado (30 min)	Etanol	40 mL
	H ₂ O milli-Q	80 mL
3.- Pretratamiento (1 min)	Tiosulfato de sodio *	20 mg
	H ₂ O milli-Q	100 mL
3 lavados (20 s)	H ₂ O milli-Q	50 mL
4.- Tinción	Nitrato de plata	666 µL
	Formaldehido	45 µL
	H ₂ O milli-Q	60 mL
2 lavados (20 s)	H ₂ O milli-Q	50 mL
5.- Revelado	Carbonato de sodio anhidro	3.6 mg
	Tiosulfato de sodio (paso 3)	1.2 mL
	Formaldehido	30 µL
	H ₂ O milli-Q	60 mL
6.- Detener la reacción	Metanol	15 mL
	Ácido acético glacial	3.6 mL
	H ₂ O milli-Q	11.4 mL

Tinción de yodo.

Este proceso se realiza para determinar la presencia de polisacáridos basada en la formación de un complejo de yoduro de bario con el PEG (Kurfürst, 1992) Se añadió sobre el gel 4 mL de cloruro de bario 5% disuelto en Ácido clorhídrico (HCl) 1M y 2 mL de yodo molecular 1.27% disuelto en HCl 1M, conservando una relación volumétrica de 2 a 1.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En este proyecto, se empleó un método de purificación combinando dos técnicas cromatográficas, cromatografía de intercambio aniónico (IEC) y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), para purificar un liofilizado comercial de la lacasa de *Pleurotus ostreatus*, siguiendo un protocolo similar al establecido previamente por Coronel-Meneses (2021). Adicionalmente, se aplicaron diversas técnicas analíticas para caracterizar las propiedades de la lacasa de *P. ostreatus*. Finalmente, se compararon los

productos de las reacciones de PEGilación utilizando técnicas electroforéticas bajo diferentes combinaciones de parámetros.

4.1. Purificación de la lacasa de *P. ostreatus* utilizando cromatografía líquida.

La lacasa de *Pleurotus ostreatus* es una enzima disponible comercialmente, si bien las muestras comerciales, como se observa en las *figuras 5 y 6*, suelen contener impurezas. Estas impurezas pueden interferir con la interacción entre la proteína y el sustrato y comprometer su actividad enzimática, además de afectar negativamente en la eficiencia de procesos como la PEGilación (Brown, 1997; Kessler & Fanestil, 1986). Por tanto, la purificación rigurosa de esta enzima es crucial para asegurar su efectividad y minimizar la contaminación cruzada.

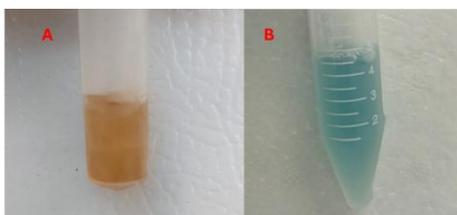


Figura 5. Comparación del aspecto de una disolución de lacasa antes y después del proceso de purificación. A) Lacasa comercial: se observa un color marrón que podría deberse a la presencia de otros componentes o impurezas en la solución. B) Lacasa purificada: se observa el color azul debido a la presencia de centros de cobre tipo 1, que absorbe a 600 nm, lo que sugiere una mayor pureza y concentración.

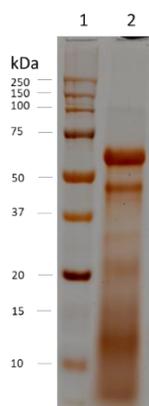


Figura 6. Gel SDS-PAGE teñido con plata de la muestra comercial de lacasa. Calle 1: marcadores de masa molecular "Precision Plus Protein Dual Color Standard" (BIO-RAD); Calle 2: liofilizado comercial de lacasa de *P. ostreatus*. Se observan varias bandas de proteínas de diferentes masas moleculares.

En este estudio, se emplearon técnicas de cromatografía, específicamente la cromatografía de intercambio iónico (IEC) y la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), para purificar la lacasa de *P. ostreatus*.

Cromatografía de Intercambio Iónico (IEC)

La cromatografía de intercambio iónico (IEC) es una técnica de separación basada en la carga neta de las proteínas y su interacción con una matriz cargada. Las proteínas con diferentes cargas iónicas superficiales compiten por unirse a una matriz cargada, lo que permite su separación según su carga neta. La elección de la fase estacionaria en IEC depende de varios factores, incluyendo la fuerza del intercambiador de iones, el flujo y volumen de la muestra, y las propiedades específicas de la muestra (Mayolo-Deloisa, 2012).

En la IEC pueden ocurrir dos situaciones: intercambio iónico, donde se forman enlaces iónicos competitivos, y exclusión iónica, donde las moléculas con cargas similares se repelen (Cummins *et al.*, 2011). La interacción de las proteínas con la fase estacionaria está influenciada por el pH de la solución en comparación con el punto isoeléctrico de la proteína. Por ejemplo, si el pH de la solución es mayor que el punto isoeléctrico de la proteína, esta se unirá a una matriz con carga positiva (intercambiador aniónico). En cambio, si el pH es inferior, la proteína se unirá a una matriz cargada negativamente (intercambiador catiónico).

La IEC permitió obtener fracciones en las que se determinó la actividad lacasa, las cuales fueron posteriormente analizadas mediante electroforesis en gel SDS-PAGE para evaluar su pureza y contenido proteico.

Los resultados obtenidos en la IEC se representan en la *figura 7*. Las fracciones con actividad enzimática obtenidas se agruparon en tres grupos principales, denominados P1, P2 y P3. Estos grupos se establecieron en base a la actividad enzimática medida para cada fracción eluida, y por su contenido proteico (absorbancia a 210 nm en la *figura 7A*). En la *Figura 7B* se presentan los cromatogramas de actividad enzimática, donde se señala claramente la distribución de estas fracciones.

“Caracterización del proceso de PEGilación de la lacasa de *Pleurotus ostreatus*”

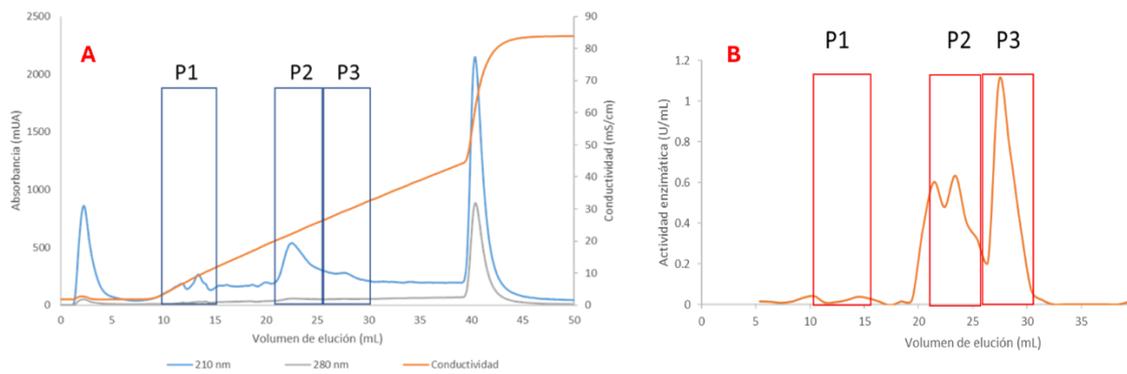


Figura 7. Cromatograma de purificación de lacasa utilizando IEC. Las zonas señaladas corresponden a los tres grupos de fracciones analizadas (P1, P2, P3). A) Conductividad y la absorbancia a 210 nm y a 280 nm. B) Actividad enzimática de la lacasa.

La presencia de un gran pico a 210 nm y un pico casi imperceptible a 280 nm sugiere la presencia de contaminantes no proteicos o proteínas con baja absorción a 280 nm. Mediante el análisis electroforético de los grupos de fracciones P1, P2 y P3 (Figura 8) se observó una masa molecular de aproximadamente 63 kDa, como se esperaba según la bibliografía (Giardina *et al.*, 1999). El gel muestra la purificación parcial de las fracciones eluidas de la cromatografía respecto a la preparación de liofilizado comercial (figura 6). Además, se observan perfiles diferentes entre P1, P2 y P3. P2 es el más similar al de la muestra de lacasa comercial, aunque con menos impurezas. Por otro lado, P1 y P3 presentan perfiles con diferentes bandas que podrían ser debidas a la presencia de isómeros de lacasa o impurezas. Es posible que las diferencias en el patrón de P3 se deban a que son dímeros que eluyen de manera distinta en el cromatograma. Sin embargo, al someterlas al SDS-PAGE, las proteínas se desnaturalizan y quedan individualizadas, lo que podría explicar el perfil diferente en comparación con la lacasa monomérica (P2).

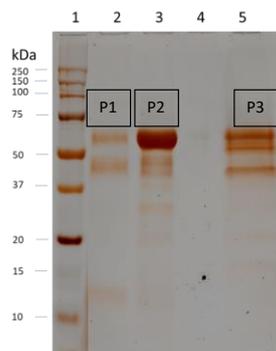


Figura 8. Gel SDS-PAGE teñido con plata. Las muestras son: Calle 1: marcadores de masa molecular "Precision Plus Protein Dual Color Standard" (BIO-RAD); Calle 2: conjunto de fracciones de P1; Calle 3: conjunto de fracciones de P2; Calle 5: conjunto de fracciones de P3.

Las fracciones con la mayor actividad enzimática y contenido proteico, como es el caso del conjunto de fracciones P2, fueron seleccionadas para continuar con el proceso de purificación mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Esta técnica adicional permitió concentrar la enzima y eliminar aún más las impurezas, mejorando la pureza del producto final. Se utilizó un volumen de 470 mL de la fracción P2 purificada obtenida de 94 cromatografías de intercambio iónico.

Cromatografía de Exclusión por Tamaño

La SEC es una técnica que separa las moléculas según su tamaño y masa molecular. En este método, la fase estacionaria está compuesta por un material poroso que facilita la separación de las moléculas según su capacidad para entrar en los poros (Gutiérrez Bouzán *et al.*, 2009). Las moléculas más pequeñas entran en los poros y son retenidas, saliendo de la columna en último lugar, mientras que las moléculas más grandes, que no pueden entrar en los poros, pasan rápidamente y salen primero.

Los 470 mL de producto obtenido en IEC se concentraron mediante ultrafiltración en una cámara Amicon® Stirred Cell 50 mL hasta obtener un volumen de 20 mL con la finalidad de reducir el número de cromatografías de exclusión de tamaño a un total de 4. En la *Figura 9* se muestra un cromatograma representativo de los resultados obtenidos en estos experimentos.

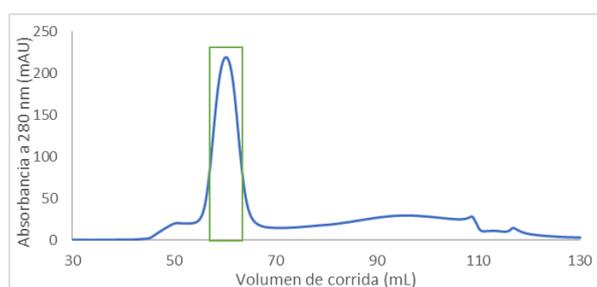


Figura 9. Cromatograma SEC del conjunto de fracciones P2. Se remarca en el rectángulo verde la fracción de proteína identificada a una longitud de onda de 280 nm, utilizada comúnmente para medir concentración de proteínas en una solución debido a la absorbancia de aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina y fenilalanina).

La presencia de un gran pico a 280 nm indica una purificación exitosa y la eliminación de muchas impurezas, ya que las proteínas absorbentes a 280 nm son típicamente

proteínas más puras. Las fracciones obtenidas de SEC se analizaron mediante un gel SDS-PAGE (Figura 10), y se observó mayor intensidad en la concentración de lacasa respecto a la purificación con IEC. Sin embargo, aún se siguen observando bandas de menor masa molecular, que podrían ser debidas a la presencia de isoformas, o a péptidos originados por la degradación proteolítica de la lacasa durante la purificación o manipulación de la muestra, fenómenos comunes en la separación electroforética SDS-PAGE (Baldrian, 2006; Xu *et al.*, 2020).

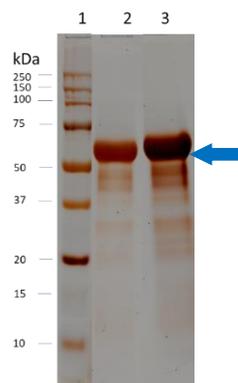


Figura 10. Gel SDS-PAGE teñido con plata. Las muestras son: Calle 1: marcadores de masa molecular "Precision Plus Protein Dual Color Standards" (BIO-RAD); Calle 2: conjunto de fracciones de P2 obtenido por IEC; Calle 3: fracción de proteína obtenida por SEC tras purificar P2. La banda correspondiente a la lacasa se señala con una flecha azul.

Finalmente, se determinó la cantidad de proteína total con el método Bradford y la actividad enzimática lacasa en las fracciones obtenidas tras cada proceso de purificación y concentradas, obteniéndose los datos mostrados en la Tabla 9.

Tabla 9. Tabla de purificación de la lacasa de *P. ostreatus*.

	Concentración de proteína (mg/mL)	Cantidad de proteína (mg)	Actividad enzimática (U/mL)	Unidades de enzima (U)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento de actividad enzimática (%)	Proteína lacasa respecto a proteína total (%)	Factor de purificación
Liofilizado comercial	1.25	235	13.30	2500.4	10.61	-	-	1
Lacasa purificada IEC	1.61	32.2	44.38	887.6	27.56	35.5	13.7	2.6
Lacasa purificada SEC	3.5	14	268.37	1073.5	76.57	42.93	5.95	7.22

El método de Bradford, al depender de la unión del azul de Coomassie a ciertos aminoácidos específicos (Bradford, 1976), puede no ser completamente preciso para la lacasa de *Pleurotus ostreatus*, ya que estos aminoácidos constituyen solo el 13% del total de la proteína. Esto puede llevar a una sobreestimación de la concentración de la proteína.

El aumento de la concentración de proteína lacasa alcanzado tras ambas cromatografías fue notable, incrementándose de 1.25 mg/mL a 3.5 mg/mL tras los procesos de purificación y concentración. De la cantidad de proteína vendida por el comerciante que se empleó inicialmente, solo el 5.95% corresponde a la forma de lacasa con las propiedades elegidas, alcanzando un factor de purificación de 7.22. Estos resultados destacan la eficacia de las técnicas de cromatografía utilizadas para mejorar la pureza de la lacasa de *P. ostreatus*, proporcionando así una base sólida para su aplicación en procesos industriales y ambientales que requieren degradación eficiente de compuestos fenólicos y lignocelulósicos.

Por otro lado, tras la cromatografía de intercambio iónico (*Tabla 9*) se obtuvo un rendimiento del 35.5% de la actividad enzimática inicial, lo que indica una pérdida significativa de actividad enzimática (U). Sin embargo, después de la cromatografía de exclusión de tamaño aumenta la actividad enzimática (42.93%) respecto al paso anterior. Esto se puede deberse a que tras esta segunda purificación se eliminan más impurezas como la lignina, que pueden inhibir la actividad enzimática o competir con la enzima por los sustratos, además de interferir con las técnicas de cuantificación en las etapas iniciales. También se eliminan proteínas no deseadas, se concentran las isoformas activas (separando las isoformas menos activas o inactivas), se protegen contra la desnaturalización y se remueven agregados y productos de degradación (que suelen tener menor actividad específica porque pueden estar parcialmente desnaturalizadas o con los sitios activos inaccesibles), resultando en una lacasa más eficiente por unidad de proteína, coincidiendo con los resultados obtenidos en la bibliografía existente (Contreras-Ordóñez *et al.*, 2007; Iasur Kruh *et al.*, 2020; K. Mayolo-Deloisa *et al.*, 2015).

Los resultados obtenidos (*tabla 9*) mostraron un aumento considerable en la pureza, lo cual se reflejó visualmente en el cambio de color de la preparación de la enzima, pasando del marrón de la lacasa comercial inicial a un intenso azul turquesa (*figura 5*) característico de la lacasa pura (Ramírez *et al.*, 2003) tras las cromatografías. Este

cambio de color, indicativo de alta pureza, se atribuye a la eliminación de moléculas de lignina y otras impurezas que interferían con la actividad enzimática en la disolución. La presencia del color azul turquesa originario de los núcleos de cobre tipo 1 en la lacasa, confirma la efectividad de la purificación (Coronel-Meneses, 2021; Ramírez *et al.*, 2003).

4.2. Caracterización de la lacasa nativa.

Parámetros cinéticos.

El cálculo de los parámetros cinéticos permite determinar características específicas de la enzima con respecto a cada sustrato. refleja la afinidad de la enzima por el sustrato, indicando la concentración de sustrato requerida para alcanzar una catálisis significativa. Este valor depende de las condiciones ambientales como pH, temperatura y fuerza iónica. Por otro lado, La velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) indica la cantidad máxima de sustrato convertida en producto por unidad de tiempo cuando la enzima está saturada.

En este estudio, se calcularon los parámetros cinéticos de la lacasa utilizando dos sustratos: ABTS y 2,6-DMP, seleccionados por su alta afinidad de unión a la enzima de *P. ostreatus* (Gutierrez *et al.*, 2009) y el liofilizado de lacasa comercial (Sigma Aldrich – 75117) a una concentración de 5 mg/mL con un factor de dilución de X50 en el caso de 2,6-DMP y X100 en el caso de ABTS.

Se obtuvieron datos de velocidad de reacción ($\mu\text{mol}/\text{min}$) frente a distintas concentraciones de sustrato y se linealizaron mediante el modelo de Lineweaver-Burk, obteniendo las siguientes ecuaciones:

- ABTS: $y=0.0489x+0.0667$
- 2,6-DMP: $y=0.0512x+0.0142$

Estas ecuaciones permitieron calcular K_m y $V_{m\acute{a}x}$ para ambos sustratos, como se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10. Parámetros cinéticos calculados a partir de la linealización de Lineweaver-Burk para cada sustrato.

Sustrato	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	K_{cat} (s^{-1})	Referencia
ABTS	0.73	14.99	51.79	Estudio presente
2,6-DMP	0.36	1.48	10.36	Estudio presente

ABTS	46.51	-	244.32	Patel <i>et al.</i> , 2014
2,6-DMP	400	-	208.33	Patel <i>et al.</i> , 2014
ABTS	0.37	-	5.4×10^6	Giardina <i>et al.</i> , 1999
2,6-DMP	0.26	-	2.2×10^7	Giardina <i>et al.</i> , 1999

La K_m es característica para cada sustrato, y los datos obtenidos en este estudio indican que la lacasa de *P. ostreatus* tiene una mayor afinidad por el DMP en comparación con el ABTS, aunque esta diferencia es mínima. Comparando los resultados de K_m obtenidos en este estudio con los reportados por Patel *et al.*, 2014, se observa una notable diferencia en la afinidad de la lacasa de *P. ostreatus* por los sustratos ABTS y 2,6-DMP. Mientras que este estudio muestra valores de K_m significativamente más bajos para ambos sustratos (0.73 mM para ABTS y 0.36 mM para 2,6-DMP), Patel *et al.* reporta valores considerablemente más altos (46.51 mM para ABTS y 400 mM para 2,6-DMP). Estas discrepancias pueden atribuirse a variaciones en las condiciones experimentales, como pH, temperatura y fuerza iónica, así como a posibles diferencias en las variantes enzimáticas de *P. ostreatus* utilizadas en ambos estudios. Tales diferencias resaltan la importancia de estandarizar las condiciones experimentales y validar los resultados para una comparación precisa de las propiedades cinéticas de las lacasas. Este fenómeno con valores más bajos de K_m también se observó en la isoforma POXA1b de *Pleurotus ostreatus*, donde se reportaron diferencias en los valores de K_m para ABTS (0.37 mM) y 2,6-DMP (0.26 mM) bajo condiciones óptimas de pH 3.

Intentamos utilizar guayacol como sustrato, pero no se observó actividad enzimática en ninguna de las condiciones de pH probadas. Este fenómeno también se observó en la isoforma POXA1b (Giardina *et al.*, 1999). Dado que el guayacol es un sustrato común para las lacasas de otras especies, estas observaciones sugieren que estas isoenzimas presentan diferencias de especificidad de sustrato en comparación con otras lacasas conocidas (Thurston, 1994).

Determinación del efecto del pH sobre la actividad de la lacasa

La actividad enzimática de la lacasa en función del pH se evaluó con los sustratos 2,6-DMP y ABTS y los resultados obtenidos se muestra en la *Figura 11*.

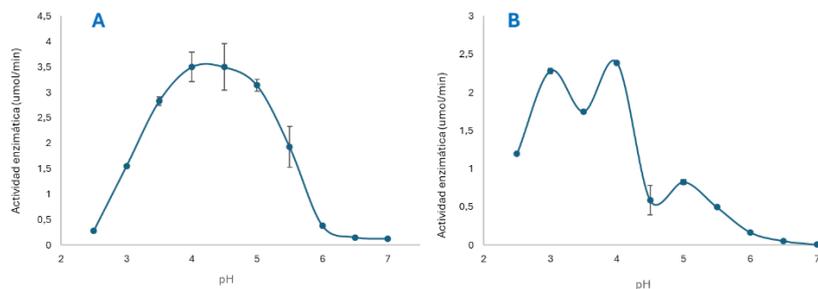


Figura 11. Variación de la actividad lacasa con el pH. A: 2,6-DMP 6mM como sustrato; B. ABTS 1 mM como sustrato.

Con 2,6-DMP, la mayor actividad enzimática se observó en el rango de pH 4-5. En el caso de ABTS, se observó una mayor actividad a pH 4, con un segundo pico a pH 3, lo que concuerda con estudios previos sobre la lacasa de *P. ostreatus* (Ramírez *et al.*, 2003). Estos datos son consistentes asimismo con los reportados para la isoforma POX1b (Giardina *et al.*, 1999).

Determinación del Radio Hidrodinámico y Potencial Zeta

La comprensión del tamaño y la carga superficial de la lacasa es crucial para diseñar y optimizar procesos biotecnológicos que utilizan esta enzima. La información obtenida puede guiar estrategias para mejorar la estabilidad y la eficiencia catalítica de la lacasa en diversos entornos.

El potencial Z, es una medida de la repulsión o atracción electrostática (carga) entre las moléculas, es decir, es una medida de la carga superficial, que puede ser un factor que afecta a la estabilidad de la proteína, y que aporta información importante sobre las partículas porque se relaciona con sus propiedades de dispersión, agregación y suspensión, siendo el pH el parámetro más influyente en las mediciones de este potencial (Bhattacharjee, 2016).

El radio hidrodinámico (radio de la hipotética esfera que difunde con la misma velocidad que las partículas predeterminadas mediante DLS (dynamic light scattering)), calcula el tamaño hipotético de la partícula a partir de su movimiento en solución (Bhattacharjee, 2016; Ohue & Ohtake, 1984). Este se puede ver afectado por la hidratación y por la fuerza iónica del disolvente en el que se encuentre (Dobrovolskaia *et al.*, 2014).

Ambas mediciones se realizaron utilizando tampón fosfato 0.1 M pH 5.1, el mismo que se emplearía en las reacciones de PEGilación. Si bien éste no es el tampón más eficaz

para mantener un pH 5.1, aún puede mantener el pH relativamente constante en un intervalo cercano a este valor y fue elegido debido a que el fosfato es compatible con muchas enzimas y reacciones biológicas, lo que puede ser beneficioso para mantener la estabilidad y la actividad enzimática de la lacasa durante la reacción de PEGilación (Sambrook *et al.*, 1989).

Para la preparación de las muestras se siguieron las instrucciones del manual de usuario (Ohue & Ohtake, 1984). Previamente a esto, es necesario conocer un tamaño de partícula, pues la medición se basa en el movimiento Browniano de las moléculas en una solución.

Para ello, se hizo una estimación del radio molecular a partir de la masa molecular a radio molecular mediante la siguiente fórmula (Hagel *et al.*, 1996):

$$0.0271 \times P.M.^{0.498}$$

resultando un tamaño de partícula dentro del rango de 10 nm a 100 nm, que, según el manual de usuario la concentración mínima debe ser de 0.1 mg/mL y la máxima el 5% de la masa (si es líquido, a una densidad de 1 g/cm³) (Malvern, 2013).

Los resultados mostraron que el radio hidrodinámico o aparente de las partículas de lacasa es de aproximadamente 4.455 nm, y que dichas partículas tienen una potencial zeta de -3.07 mV, lo que indica una ligera carga negativa en las partículas, con un margen de error de ± 22.3 mV. El valor negativo del potencial zeta sugiere que las partículas de lacasa pura tienen una tendencia a repelerse entre sí en solución acuosa, lo que contribuye a su estabilidad coloidal. Esta propiedad es esencial para aplicaciones donde se requiere mantener la integridad y actividad de la lacasa en condiciones de trabajo.

4.3. Reacción de PEGilación de la lacasa.

Aminación Reductora con PEG-aldehídos:

La conjugación de PEGs a proteínas es un proceso que depende significativamente de las condiciones de pH debido a la influencia de las propiedades nucleófilas de los residuos aminoácidos. En particular, la reacción se lleva a cabo en condiciones ácidas para favorecer la unión del PEG con el grupo amino N-terminal de la proteína. Esto se debe a que las aminas primarias tienen diferentes valores de pKa, lo cual afecta su reactividad y la selectividad de la conjugación (Lisandra Herrera *et al.*, 2019).

Cuando se realiza la PEGilación, se busca maximizar la eficiencia y la especificidad de la unión del PEG a la proteína. Bajo condiciones ácidas, los grupos amino presentes en el extremo N-terminal de la proteína tienen una mayor disponibilidad para reaccionar con los PEGs que están activados químicamente, como los PEG-aldehídos. Esto permite que la reacción ocurra de manera controlada y dirigida, minimizando la pérdida de actividad biológica de la proteína y optimizando las propiedades farmacológicas del bioconjugado, por varias razones (Colonna *et al.*, 2008; Mero A *et al.*, 2011):

- **Protonación de los grupos amino:** En un entorno ácido, los grupos amino (NH_2) presentes en el extremo N-terminal de la proteína tienen una mayor tendencia a estar protonados (NH_3^+). Esto puede aumentar la nucleofilia de estos grupos, haciéndolos más reactivos para la reacción con los PEG-aldehídos.
- **Menor competencia con otros grupos amino:** En condiciones ácidas, otros grupos amino presentes en la proteína pueden estar menos protonados que el NH_2 terminal y, siendo, por lo tanto, menos reactivos con los PEG-aldehídos, permitiendo que la reacción se dirija específicamente hacia el extremo N-terminal.

La aminación reductora es una estrategia comúnmente empleada para generar bioconjugados homogéneos y estables. En este proceso, se utiliza un agente reductor, como el cianoborohidruro de sodio, a un pH más bajo para reducir los PEG-aldehídos y formar enlaces estables con los grupos amino de la proteína (Roberts *et al.*, 2002).

El uso de PEG-aldehídos tiene la ventaja de su alta selectividad hacia los grupos amino N-terminales bajo condiciones ácidas, lo cual permite controlar la posición y el número de PEGs conjugados a la proteína. Además, el cianoborohidruro de sodio actúa como un agente reductor suave que facilita la formación de enlaces covalentes sin comprometer la estructura y función de la proteína. Al finalizar este proceso, se obtiene un producto homogéneo en el cual una única cadena de PEG está conjugada al extremo amino N-terminal de la proteína.

Tanto la elección de condiciones ácidas para la reacción como el uso de la aminación reductora con PEG-aldehídos son estrategias clave en la PEGilación de proteínas, asegurando la eficiencia y la especificidad del proceso para optimizar las aplicaciones terapéuticas de los bioconjugados resultantes.

Para determinar con que pH se obtiene mayor cantidad de proteína PEGilada, se llevaron a cabo reacciones a diferentes pHs (5.1, 5.5 y 6.0), y los productos obtenidos se analizaron por electroforesis en gel de acrilamida en condiciones nativas (*Figura 12*).

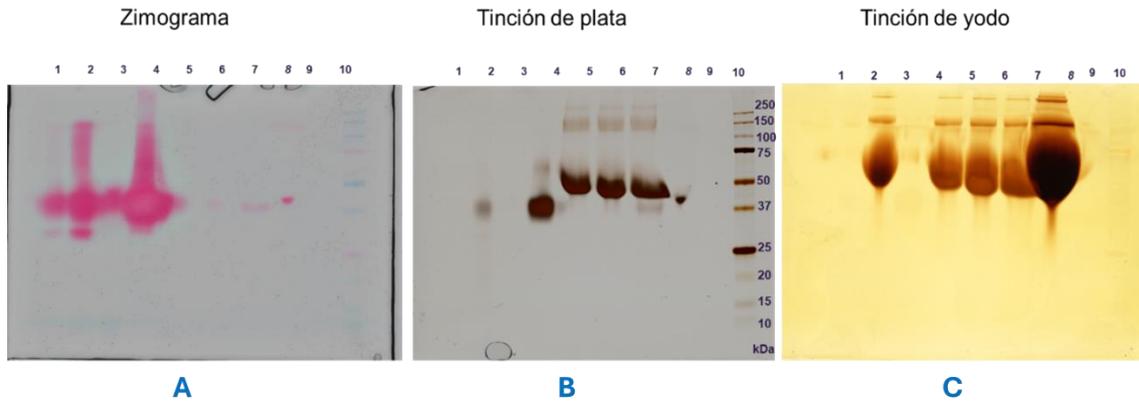


Figura 12. Tinciones de geles de electroforesis en condiciones nativas de las reacciones de PEGilación de lacasa de *P. ostreatus* a 4°C y 18 horas de reacción y diferentes pH. A) Zimograma realizado con siringaldazina 0.1 mM en etanol y tampón de acetato de sodio pH5. B) Tinción de plata que revela las proteínas presentes. C) Tinción de yodo que permite visualizar el PEG. Las muestras son las siguientes: Calle 2: estándar lacasa comercial; Calle 3: stock de PEG a 15 mg/mL. Calle 4: lacasa purificada a 3,9 mg/mL; Calle 5: producto de la PEGilación a pH 5.1; Calle 6: producto de la PEGilación a pH 5.5; Calle 7: producto de la PEGilación a pH 6.0; Calle 8: producto de la PEGilación de lacasa de *T. versicolor* a pH 5.1; Calle 10: marcadores de masa molecular: 34 precisión plus protein color duo estándar.

En el análisis visual del zimograma (*figura 12A*), no se observa ninguna diferencia en la actividad enzimática entre las bandas de las calles que contienen los productos de la reacción a diferentes pH (calles 5, 6 y 7). Sin embargo, aunque se ven bandas de proteína y PEG en las tinciones con plata (*figura 12B*) y con yodo (*figura 12C*), en las calles de los productos de PEGilación casi no se detecta actividad enzimática en ninguna banda, ya sea en las bandas correspondientes con las proteínas PEGiladas (≈ 150 kDa) o no PEGiladas (≈ 50 kDa). Este fenómeno, en el que después de la reacción a 4°C durante 18 horas, se pierde prácticamente toda la actividad en la proteína, incluyendo la no PEGilada, sugiere la exposición prolongada al cianoborohidruro de sodio puede ser tóxica para el enzima. Además, en el propio gel, el sitio activo de la enzima puede quedar encapsulado por las cadenas de PEG. La presencia de PEG también provoca que la proteína no PEGilada migre menos en los geles nativos en comparación con la lacasa nativa sin PEG.

Además, se observa que en los geles nativos (*figura 12 y 16*) la proteína migra más lejos en comparación con los geles desnaturizantes (*figura 17*) debido a la diferencia en su estructura. En su forma desnaturizada, la proteína se desenrolla y adopta una estructura más lineal, lo que le causa más resistencia al moverse a través del gel. En cambio, en su forma nativa puede ser más compacta y moverse más fácilmente a través de los poros del gel nativo. La carga uniforme proporcionada por el SDS en los geles desnaturizantes (SDS-PAGE) hace que la separación dependa únicamente del tamaño de la proteína, mientras que, en un gel nativo, factores adicionales como la conformación y la carga nativa influyen en la migración.

Posteriormente, debido a que la metodología de electroforesis no permitió obtener conclusiones claras sobre las diferencias en las bandas de las proteínas PEGiladas (calles 5, 6 y 7), se realizó un análisis adicional de las muestras mediante SEC, como se muestra en la *Figura 13*. Este análisis reveló que la muestra de PEGilación a pH 5.1 (línea gris) generó la mayor cantidad de partículas proteicas de mayor tamaño, correspondientes a proteínas PEGiladas (elución a 8 mL), y la menor cantidad de partículas de lacasa no PEGilada (elución a 10 mL). Esto indica que el porcentaje de proteínas PEGiladas es mucho mayor en comparación con las muestras analizadas a pH 5.5 y 6.0.

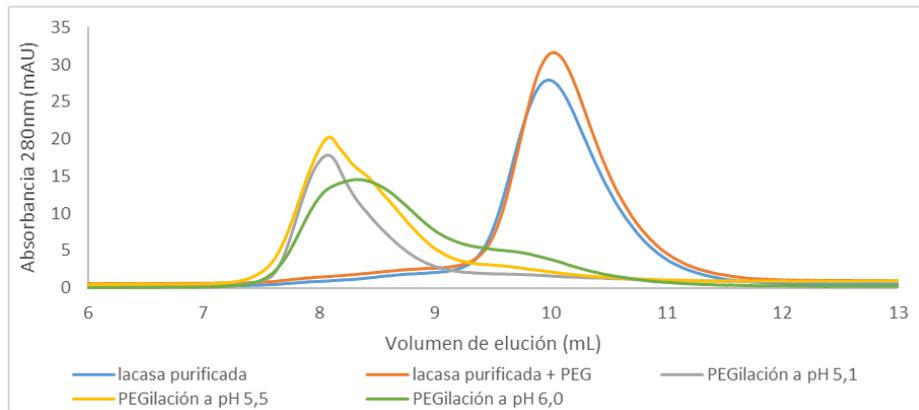


Figura 13. Superposición de los cromatogramas obtenidos por SEC de los productos de PEGilación a diferentes pH. Lacasa pura (línea azul), lacasa con PEG sin catalizador de reacción a pH 5.1 (línea naranja), reacción de PEGilación a pH 5.1 (línea gris), reacción de PEGilación a pH 5.5 (línea amarilla), reacción de PEGilación a pH 6.0 (línea verde).

Además, se analizaron las muestras utilizando el ZetaSizer (*Figura 14*). En este análisis, se observó que el producto de la PEGilación a pH 5.1 (línea verde) contiene un mayor porcentaje de partículas de mayor tamaño (≈ 100 nm, correspondientes a proteínas

PEGiladas) en comparación con las partículas de menor tamaño (≈ 10 nm, correspondientes a proteínas libres de PEG y lacasa no PEGilada).

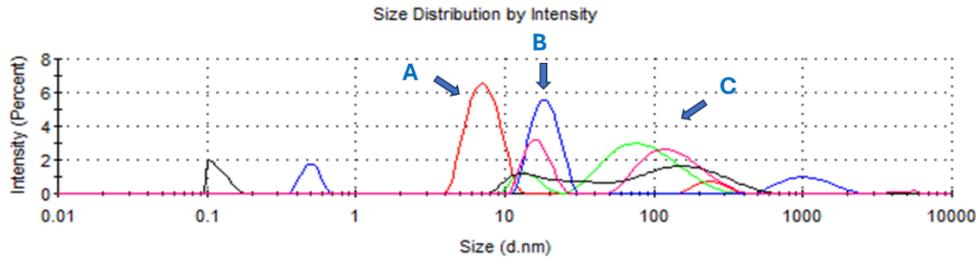


Figura 14. Graficas obtenidas con la medición de diferentes muestras en el Zeta sizer. Línea roja, la lacasa purificada ($0.11 \mu\text{g}/\mu\text{L}$); línea azul, PEG 30 kDa ($15 \mu\text{g}/\mu\text{L}$); línea verde, reacción de PEGilación a pH 5.1; línea negra, reacción de PEGilación a pH 5.5; línea rosa, reacción de PEGilación a pH 6.0. Las muestras de conjugados se diluyeron hasta una concentración de $0.13 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. La flecha A marca el estándar de lacasa pura, la flecha B marca el estándar de PEG, y la flecha C marca los conjugados.

Estos últimos análisis en los que eliminamos las moléculas de PEG y hacemos medición basándonos únicamente en las proteínas (absorbancia a 280 nm de la figura 13) y en el tamaño de las moléculas en disolución (*figura 14*) nos permite concluir que la electroforesis (*figura 12*) no es una buena técnica para análisis de muestras que contengan PEG, pues afecta mucho al correcto funcionamiento del gel de poliacrilamida. Su presencia durante la corrida de muestras de proteína en geles de poliacrilamida puede introducir varios problemas que afectan la separación, la resolución y la detección de las proteínas debido a varios factores. Primero, el PEG puede interferir con la formación del gel al afectar su polimerización, lo que resulta en una estructura defectuosa. Además, su interacción con las proteínas puede alterar su carga neta y promover la formación de complejos o agregados, lo que afecta la migración correcta de las proteínas en el gel. Esto también podría comprometer técnicas posteriores de detección, como tinciones o Western blot, que pueden ser incompatibles con la presencia de PEG. Finalmente, el PEG puede afectar la estabilidad física del gel, aumentando el riesgo de deformación o ruptura, lo que impacta la reproducibilidad y la fiabilidad de los resultados experimentales.

Los resultados de ambas metodologías coinciden en que la PEGilación a pH 5.1, a 4°C durante 18 horas, fue la más eficiente en la producción de proteínas PEGiladas.

La elección de pH 5.1 para la aminación reductora del N-terminal de la lacasa con cianoborohidruro de sodio (NaBH₃CN) es idónea porque este pH balancea la protonación del grupo amino, la estabilidad del NaBH₃CN, y la estabilidad estructural de la proteína asegurando una conjugación específica y homogénea (Pasut & Veronese, 2007). A este pH, el grupo amino en el N-terminal está en su forma protonada (NH₃⁺), necesaria para la reacción, mientras que el NaBH₃CN es suficientemente estable para realizar la reducción sin descomponerse rápidamente (Chen & Speight, 2009). Además, pH 5.1 previene la desnaturalización de la proteína, minimiza reacciones secundarias no deseadas y es compatible con otros reactivos y productos involucrados en la PEGilación (Milton Harris & Chess, 2003; Pasut & Veronese, 2012).

Posteriormente, una vez establecido el pH óptimo para la reacción, se llevaron a cabo reacciones de PEGilación con 27 combinaciones de tiempo de reacción, temperatura y relación molar proteína-PEG como se muestra en la *Figura 15*.

Variables:

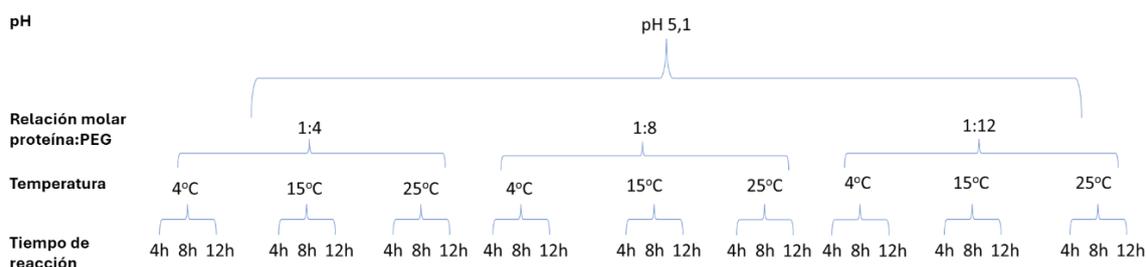


Figura 15. Combinaciones de factores empleadas para la reacción de PEGilación.

Estas reacciones se realizaron para caracterizar y entender mejor la producción de enzimas mono-PEGiladas altamente purificadas. Y tras obtener las reacciones de PEGilación, los productos se analizaron mediante electroforesis tanto en condiciones nativas para detectar la actividad enzimática (zimograma) (*Figura 16*) como en geles SDS-PAGE (*Figura 17*).

“Caracterización del proceso de PEGilación de la lacasa de *Pleurotus ostreatus*”

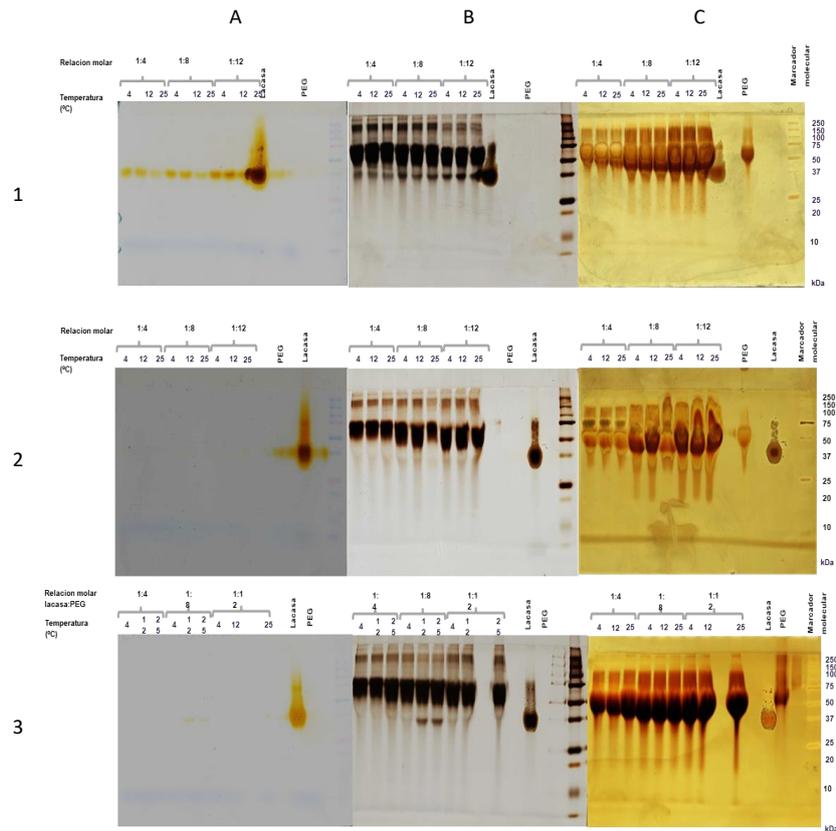


Figura 16. Análisis electroforético en condiciones nativas de los productos de las reacciones de PEGilación de la lacasa. La fila 1 se corresponde con las reacciones a 4h, la fila 2 se corresponde a las de 8h y la fila 3 con las reacciones de 12h. En la columna A se muestran los zimogramas (DMP 6 mM y tampón acetato de sodio 0,1M a pH 5.0), en la columna B la tinción de plata y en la C la tinción de yodo. Marcadores de masa molecular empleado: Precision plus protein color duo standar.

En los zimogramas se observa que la actividad enzimática en las bandas correspondientes a las proteínas no PEGiladas (≈ 37 kDa) va disminuyendo conforme aumenta el tiempo de reacción (Columna 1 > 2 > 3). Esto podría ser debido a una inhibición de la actividad por el NaBH_3CN .

Por otro lado, en ninguna de las bandas correspondientes a la proteína PEGilada (≈ 150 kDa) en la columna A, se visualiza coloración, sugiriendo una pérdida de actividad enzimática como resultado de la reacción. Esto podría ser atribuido a:

1. Alteraciones Estructurales:

- Modificaciones en la conformación proteica: La PEGilación puede inducir cambios conformacionales en la estructura terciaria o cuaternaria de la lacasa. Estos cambios pueden distorsionar el sitio activo de la enzima, impidiendo la

correcta unión del sustrato y, por ende, su catálisis. Este fenómeno se ha observado en estudios donde la PEGilación modifica la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas, afectando su función catalítica (González-Valdez *et al.*, 2012). La estructura tridimensional del sitio activo de las lacasas, como se muestra en estudios cristalográficos, revela interacciones específicas entre residuos de aminoácidos y sustratos reductores, como la 2,5-xilidina. Estas interacciones incluyen puentes de hidrógeno y contactos hidrofóbicos que son clave para la eficiencia de la oxidación de sustratos (Giardina *et al.*, 2010).

- Variaciones Naturales en la Estructura de Lacasas: Las lacasas de bacterias, hongos y plantas exhiben variaciones estructurales naturales que influyen en sus propiedades catalíticas y en su capacidad para interactuar con diferentes sustratos. Estas diferencias estructurales pueden determinar la eficiencia y la especificidad de la enzima para diferentes tipos de reacciones. Estas adaptaciones están estrechamente relacionadas con la estructura de su sitio activo y la disposición de residuos clave que juegan roles críticos en el reconocimiento y la catálisis de los sustratos (Dwivedi *et al.*, 2011).

2. Alteraciones Funcionales:

- Enmascaramiento del Sitio Activo: La unión de moléculas de PEG al entorno del sitio activo puede bloquear físicamente el acceso del sustrato al sitio catalítico. Esto es particularmente relevante si las cadenas de PEG son grandes y/o están ubicadas cerca de los residuos críticos para la actividad enzimática (K. Mayolo-Deloya *et al.*, 2015).
- Interferencia en la Unión del Sustrato: La PEGilación puede modificar las propiedades electrostáticas de la superficie de la lacasa, afectando la afinidad del sustrato por la enzima. Cambios en la carga neta o la distribución de cargas pueden desestabilizar las interacciones enzima-sustrato, cruciales para la actividad catalítica (Basu *et al.*, 2006).
- Reducción de la Flexibilidad: La adición de PEG puede restringir la movilidad y flexibilidad de la lacasa, esencial para los cambios conformacionales necesarios durante el proceso catalítico. La reducción de esta dinámica puede disminuir la eficiencia enzimática o incluso inactivarla completamente (González-Valdez *et al.*, 2012). Además, se debe tener en cuenta que las lacasas de diferentes orígenes biológicos han desarrollado adaptaciones funcionales para optimizar la

eficiencia catalítica bajo diferentes condiciones ambientales. Estas adaptaciones pueden incluir cambios en la dinámica de flexibilidad y en las interacciones electrostáticas que afectan la actividad enzimática (Dwivedi *et al.*, 2011).

3. Alteraciones Fisiológicas:

- **Aumento de la Hidrofobicidad:** Aunque el PEG es altamente hidratado, su presencia puede aumentar la hidrofobicidad global de la lacasa en ciertos entornos. Esto puede alterar la solubilidad y la estabilidad de la enzima en condiciones fisiológicas, comprometiendo su funcionalidad (Fee & Van Alstine, 2006).
- **Afectación de la Interacción con Co-factores:** Algunas lacasas requieren co-factores metálicos para su actividad catalítica. La PEGilación puede alterar la afinidad de la enzima por estos co-factores, o incluso desplazarlos, lo cual es crucial para su función (González-Valdez *et al.*, 2011).

Además de que la PEGilación puede alterar la estructura y función de la lacasa, las lacasas naturales exhiben adaptaciones estructurales y funcionales que influyen en su actividad enzimática. La implementación de estrategias adecuadas en el proceso de PEGilación puede ayudar a mitigar estos efectos adversos y preservar la funcionalidad de la lacasa. Comprender estas relaciones es esencial para avanzar en el campo de la biotecnología enzimática y optimizar el diseño de biocatalizadores para diversas aplicaciones.

Las muestras se analizaron también mediante electroforesis con gel de poliacrilamida SDS-PAGE (*figura 17*), para observar la diferencia de comportamiento con el análisis en condiciones nativas. En condiciones desnaturizantes las proteínas PEGiladas mostraron patrones de migración distintos en comparación con las proteínas nativas debido a la presencia de PEG, que migra de forma distinta por no ser de naturaleza proteica (Carrillo Soto *et al.*, 2012; Olivé *et al.*, 1994).

En los geles nativos, las proteínas migran según su relación carga/masa y estructura de la molécula, mientras que en los geles SDS-PAGE migran según su tamaño. En SDS-PAGE, la proteína PEGilada se ubica más homogéneamente en una banda con un peso molecular mayor, aproximadamente de 63 kDa, pero con diferencias entre calles debido a la influencia del PEG. Por otro lado, el PEG no muestra diferencias de tamaño molecular entre ambos tipos de electroforesis.

“Caracterización del proceso de PEGilación de la lacasa de *Pleurotus ostreatus*”

En la tinción con plata y yodo, las muestras de proteína PEGilada mostraron bandas predominantes en la región correspondiente al peso molecular esperado para las proteínas mono-PEGiladas (≈ 150 kDa). Se ven claramente estas bandas, pero son tienen apariencia difusa, debido a que contienen otras sub-bandas de proteína dentro, causado probablemente por la influencia de las cadenas de PEG o por la heterogeneidad en el grado de PEGilación, lo que sugeriría una PEGilación no específica o incompleta, consistente con estudios previos (Pasut & Veronese, 2007). Este resultado resalta la importancia de optimizar las condiciones de reacción para obtener un producto más homogéneo.

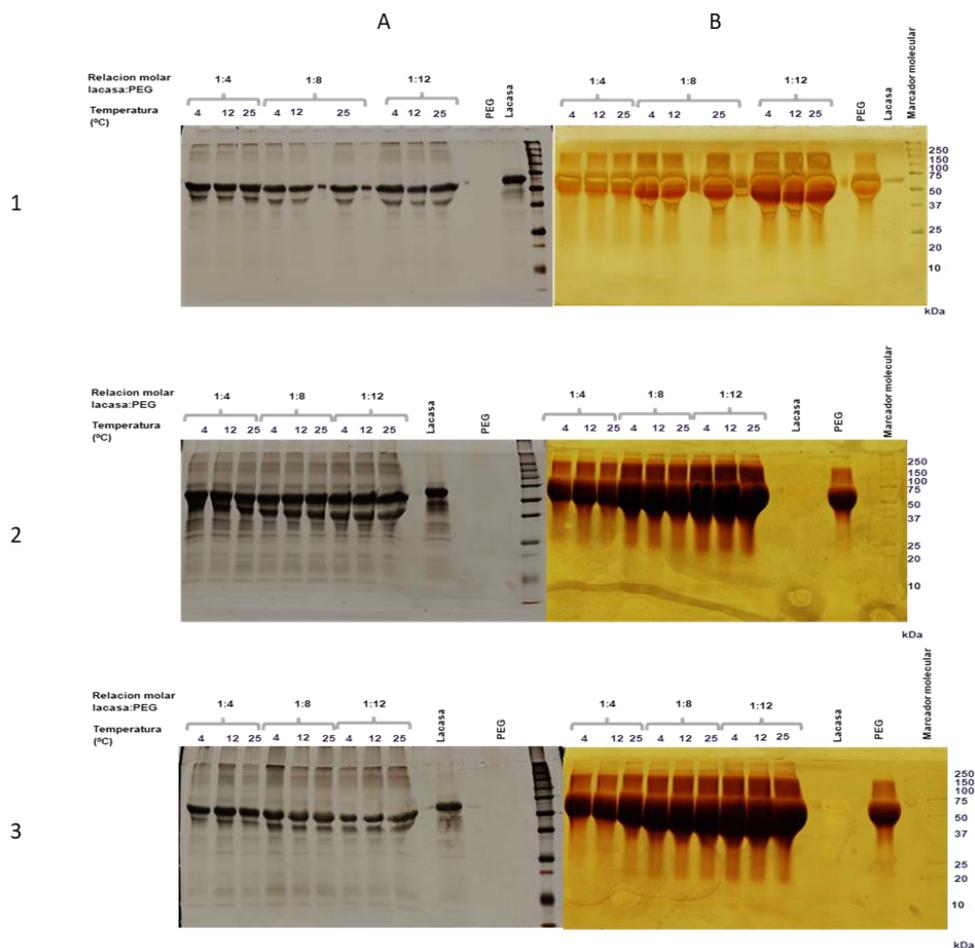


Figura 17. Análisis electroforético de los productos de las reacciones de PEGilación de la lacasa. La fila 1 se corresponde con las reacciones a 4h, la fila 2 se corresponde a las de 8h y la fila 3 con las reacciones de 12h. En la primera columna se muestra la tinción de plata y en la segunda de yodo. Marcadores de masa molecular: Precision plus protein color duo standar.

El estándar de la lacasa no PEGilada, migró a sus masas moleculares esperados (≈ 63 kDa). La comparación entre los estándares y las bandas de proteínas PEGiladas, permite

evaluar el grado de modificación y la eficiencia de la PEGilación. En todos los casos, las proteínas PEGiladas mostraron bandas a 150 kDa que no aparece en el estándar de lacasa pura, lo que confirmaría el éxito de la conjugación del PEG. Sin embargo, sí que aparecen bandas a 150kDa en el estándar de PEG, lo que dificulta el análisis de los resultados, porque puede ser indicativo de que se trata de trazas de proteína que queda enredada en la matriz de cadenas de PEG. Debido a esto, la estimación del grado de PEGilación mediante métodos colorimétricos, como los zimogramas y geles SDS-PAGE, demostró limitaciones causadas por la influencia del PEG.

4.4. Conclusiones y recomendaciones para Futuras Investigaciones.

La combinación estratégica de IEC y SEC no solo permitió una purificación efectiva de la lacasa, La purificación ha revelado que los liofilizados de lacasa comerciales, como los de Sigma-Aldrich, tienen una baja pureza de lacasa activa, y también se ha visto un notable aumento en la actividad enzimática específica, haciendo esencial su purificación para aplicaciones que requieren alta precisión, como las terapéuticas. Este proceso es fundamental, ya que produce una lacasa más pura y eficiente, mejorando su rendimiento en aplicaciones industriales y ambientales. Estos hallazgos subrayan la importancia de técnicas avanzadas de purificación en la optimización de enzimas para aplicaciones industriales y biotecnológicas futuras.

Durante el análisis de los resultados obtenidos se observó un comportamiento similar de la lacasa analizada en estudios previos realizados con la isoforma POXA1b: en la masa molecular (≈ 63 kDa), en los parámetros cinéticos (K_m entre 0 y 1 para ambos sustratos y mayor para ABTS, además de la ausencia de actividad con el sustrato guayacol) y en el pH óptimo (3-4 para ABTS y 4-5 para 2,6-DMP). De este modo, una hipótesis en los resultados de caracterizar la lacasa, puede ser que se corresponde con la isoforma POXA1b, reportada previamente por Giardina *et al.*, 1999. Sin embargo, se recomiendan análisis adicionales, como la secuenciación, para confirmar esta hipótesis (Giardina *et al.*, 1999).

Por otro lado, para mitigar la pérdida de actividad enzimática tras la PEGilación en investigaciones futuras, se recomienda:

1. Selección del Sitio de Conjugación: Dirigir la PEGilación a sitios alejados del sitio activo puede preservar la actividad enzimática (Pasut & Veronese, 2007).

2. Control del Tamaño y Ramificación del PEG: Optar por PEGs de tamaño y estructura adecuados puede reducir la interferencia con la funcionalidad enzimática (Pasut & Veronese, 2007).
3. Optimización de las Condiciones de Reacción: Ajustar el pH, la temperatura y la estequiometría de la reacción puede ayudar a evitar la PEGilación no deseada en sitios críticos (Nie *et al.*, 2006). Para ello se recomienda emplear métodos analíticos que permitan cuantificar los productos de reacción y aplicar un modelo estadístico de optimización.

Para confirmar la especificidad de la PEGilación y la preservación de la actividad enzimática, se recomienda el uso de análisis proteolíticos y espectrometría de masas, además del análisis tridimensional mediante difracción circular. Es crucial continuar investigando las características de diferentes isoformas de lacasa, el efecto de la modificación con polietilenglicol, y las condiciones óptimas para obtener proteínas PEGiladas con mayor pureza y actividad enzimática para mejorar significativamente la eficacia de las enzimas PEGiladas en aplicaciones farmacéuticas y otras industrias.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Andrews, S. C., Robinson, A. K., & Rodríguez-Quñones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*, 27, 215–237. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00055-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00055-X)
- Baldrian, P. (2006). Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, 30, 215–242. <https://doi.org/10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x>
- Basu, A., Yang, K., Wang, M., Liu, S., Chintala, R., Palm, T., Zhao, H., Peng, P., Wu, D., Zhang, Z., Hua, J., Hsieh, M. C., Zhou, J., Petti, G., Li, X., Janjua, A., Mendez, M., Liu, J., Longley, C., ... Filpula, D. (2006). Structure-function engineering of interferon- β -1b for improving stability, solubility, potency, immunogenicity, and pharmacokinetic properties by site-selective mono-PEGylation. *Bioconjugate Chemistry*, 17, 618–630. <https://doi.org/10.1021/bc050322y>
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brown, B. E. (1997). *Brown (1997) Coral bleaching causes and consequences.pdf*. 2100, 129–138.
- Bumpus, J. A., & Aust, S. D. (1984). *Bumpus_et_al-1987-BioEssays*. 6, 166–170.

- Cañas, A. I., & Camarero, S. (2010). Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology Advances*, 28, 694–705. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.05.002>
- Carrillo Soto, J. G. & Noriega Rodríguez, J. A. (2012). Evaluación de procedimientos de tinción para el análisis de proteínas por electroforesis (SDS-PAGE). (Tesis de licenciatura en químico biólogo clínico). Universidad de Sonora. <http://hdl.handle.net/20.500.12984/2145>
- Charles Guest, T., & Rashid, S. (2016). Anticancer Laccases: A Review. *Journal of Clinical & Experimental Oncology*, 5-1. <https://doi.org/10.4172/2324-9110.1000153>
- Choe, Y. H., Conover, C. D., Wu, D., Royzen, M., Gervacio, Y., Borowski, V., Mehlig, M., & Greenwald, R. B. (2002). Anticancer drug delivery systems: Multi-loaded N4-acyl poly(ethylene glycol) prodrugs of ara-C. II. Efficacy in ascites and solid tumors. *Journal of Controlled Release*, 79, 55–70. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00470-9](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00470-9)
- Claus, H. (2004). Laccases: Structure, reactions, distribution. *Micron*, 35, 93–96. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2003.10.029>
- Colonna, C., Conti, B., Perugini, P., Pavanetto, F., Modena, T., Dorati, R., Iadarola, P., & Genta, I. (2008). Site-directed PEGylation as successful approach to improve the enzyme replacement in the case of prolidase. *International Journal of Pharmaceutics*, 358, 230–237. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.03.012>
- Contreras-Ordóñez, M. A., Galindo, E., Nacional, U., México, A. De, & Post, A. (2007). *Caracterización de lacasas producidas por Pleurotus ostreatus y en co-cultivo con Trichoderma viride*. 2006, 62250.
- Coronel-Meneses, D. (2021). *Producción de lacasa PEGilada: optimización de reacción y purificación por cromatografía de intercambio iónico (Tesis de licenciatura)*. INSTITUTO TECNOLÓGICO DE LA PAZ.
- Cummins, P. M., Dowling, O., & O’Connor, B. F. (2011). Ion-exchange chromatography: basic principles and application to the partial purification of soluble mammalian prolyl oligopeptidase. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 681, 215–228. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0_12
- Dobrovolskaia, M. A., Neun, B. W., Man, S., Ye, X., Hansen, M., Patri, A. K., Crist, R. M., & McNeil, S. E. (2014). Protein corona composition does not accurately predict hemocompatibility of colloidal gold nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 10, 1453–1463. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.01.009>
- Duncan, R. (2003). The dawning era of polymer therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2, 347–360. <https://doi.org/10.1038/nrd1088>
- Dwivedi, U. N., Singh, P., Pandey, V. P., & Kumar, A. (2011). Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68, 117–128. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.11.002>
- Fee, C. J., & Van Alstine, J. M. (2006). PEG-proteins: Reaction engineering and separation issues. *Chemical Engineering Science*, 61, 924–939. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ces.2005.04.040>

- Flores, C., Vidal, C., Trejo-Hernández, M. R., Galindo, E., & Serrano-Carreón, L. (2009). Selection of Trichoderma strains capable of increasing laccase production by *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus bisporus* in dual cultures. *Journal of Applied Microbiology*, *106*, 249–257.
- Freixo, M. do R., Karmali, A., & Arteiro, J. M. (2012). Production, purification and characterization of laccase from *Pleurotus ostreatus* grown on tomato pomace. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *28*, 245–254. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0813-4>
- Frokjaer, S., & Otzen, D. E. (2005). Protein drug stability: A formulation challenge. *Nature Reviews Drug Discovery*, *4*, 298–306. <https://doi.org/10.1038/nrd1695>
- García-Oduardo, N., & Bermúdez-Savón, R. C. (2017). *Enzimas lacasa en inóculos de Pleurotus spp.* https://www.imbe.fr/IMG/pdf/ar31_garcia_oduardo_2017.pdf?2722/d78b8f222dd6d63439c3ef3d0d03f30574761fcc
- Gianfreda, L., & Rao, M. A. (2004). Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, *35*(4), 339–354. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.05.006>
- Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., & Sannia, G. (2010). Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *67*, 369–385. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0169-1>
- Giardina, P., Palmieri, G., Scaloni, A., Fontanella, B., Faraco, V., Cennamo, G., & Sannia, G. (1999). Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Journal*, *341*, 655–663. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3410655>
- González-Valdez, J., Rito-Palomares, M., & Benavides, J. (2011). Quantification of RNase a and its PEGylated conjugates on polymer-salt rich environments using UV spectrophotometry. *Analytical Letters*, *44*, 800–814. <https://doi.org/10.1080/00032711003789959>
- González-Valdez, J., Rito-Palomares, M., & Benavides, J. (2012). Advances and trends in the design, analysis, and characterization of polymer-protein conjugates for “PEGylated” bioprocesses. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *403*, 2225–2235. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5845-6>
- Greenwald, R. B., Choe, Y. H., McGuire, J., & Conover, C. D. (2003). Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *55*, 217–250. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00180-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00180-1)
- Gutiérrez Bouzán, M. C., Burdó Expósito, A., & Cegarra Sánchez, J. (2009). La cromatografía de exclusión: análisis de la distribución de pesos moleculares en siliconas por GPC. *Boletín Intexter Del Instituto de Investigación Textil y de Cooperación Industrial*, *135*, 33–40.
- Gutierrez, C., Burdó, A., & Cegarra, J. (2009). La Cromatografía De Exclusión: Análisis de la distribución de pesos moleculares en siliconas por GPC. *Boletín Intexter (U.P.C.)*, *135*, 33–40. <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/13132/LA>

CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN, ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE PESOS.pdf

- Hagel, L., Östberg, M., & Andersson, T. (1996). Apparent pore size distributions of chromatography media. *Journal of Chromatography A*, 743, 33–42. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(96\)00130-6](https://doi.org/10.1016/0021-9673(96)00130-6)
- Hoofman, G., Herman, S., & Schacht, E. (1996). Review: Poly(Ethylene Glycol)s with Reactive Endgroups. II. Practical Consideration for the Preparation of Protein-PEG Conjugates. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 11, 135-159. <https://doi.org/10.1177/088391159601100205>
- Iasur Kruh, L., Bari, V. K., Abu-Nassar, J., Lidor, O., & Aly, R. (2020). Characterization of an endophytic bacterium (*Pseudomonas aeruginosa*), originating from tomato (*Solanum lycopersicum* L.), and its ability to inhabit the parasitic weed *Phelipanche aegyptiaca*. *Plant Signaling & Behavior*, 15, 1766292. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1766292>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2024). *Estadísticas a propósito del Día Mundial contra el Cáncer*. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2024/EAP_CANCER24.pdf
- Instituto Nacional de Estadística y cartografía (2024). Estadística de defunciones según causa de muerte año 2023
- Janusz, G., Pawlik, A., Świdarska-Burek, U., Polak, J., Sulej, J., Jarosz-Wilkolazka, A., & Paszczyński, A. (2020). Laccase Properties, Physiological Functions, and Evolution. In *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 966. <https://doi.org/10.3390/ijms21030966>
- Jevševar, S., Kunstelj, M., & Porekar, V. G. (2010). PEGylation of therapeutic proteins. *Biotechnology Journal*, 5, 113–128. <https://doi.org/10.1002/biot.200900218>
- Kessler, R. J., & Fanestil, D. D. (1986). Interference by lipids in the determination of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 159, 138–142. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90318-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90318-0)
- Kinstler, O., Molineux, G., Treuheit, M., Ladd, D., & Gegg, C. (2002). Mono-N-terminal poly(ethylene glycol)-protein conjugates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 477–485. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(02\)00023-6](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(02)00023-6)
- Ko, J. H., & Maynard, H. D. (2018). A guide to maximizing the therapeutic potential of protein–polymer conjugates by rational design. *Chemical Society Reviews*, 47, 8998–9014. <https://doi.org/10.1039/C8CS00606G>
- Kumar, S. V. S., Phale, P. S., Durani, S., & Wangikar, P. P. (2003). Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnology and Bioengineering*, 83, 386–394. <https://doi.org/10.1002/bit.10681>
- Kurfürst, M. M. (1992). Detection and molecular weight determination of polyethylene glycol-modified hirudin by staining after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 200, 244–248. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90460-O](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90460-O)

- Laemmli, U. K., Amos, L. A., & Klug, A. (1976). Correlation between Structural Transformation and Cleavage of the Major Head Protein of T4 Bacteriophage. *Cell*, 7, 191-203. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(76\)90018-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(76)90018-0)
- Lisandra Herrera, B., De Oliveira Rangel-Yagui, C., Beltrán Lissabet, J. F., Effer, B., Lee-Estevez, M., Pessoa, A., Castillo, R. L., & Farías, J. G. (2019). From synthesis to characterization of site-selective pegylated proteins. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1450. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01450>
- Madhavi, V., & Lele, S. S. (2009). Laccase: properties and applications. *BioResources*, 4, 1694–1717.
- Malvern. (2013). Zetasizer nano user manual. *MAN0485*, 1.1, 4. <https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Malvern%20Zetasizer%20ZS%20DLS%20user%20manual.pdf>
- Mate, D. M., & Alcalde, M. (2017). Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. *Microbial Biotechnology*, 10, 1457–1467. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12422>
- Matsumura, Y., & Maeda, H. (1986). A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumortropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Research*, 46, 6387–6392.
- Mayer, A. M., & Staples, R. C. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60, 551–565. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(02\)00171-1](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(02)00171-1)
- Mayolo-Deloisa, K., González-González, M., Simental-Martínez, J., & Rito-Palomares, M. (2015). Aldehyde PEGylation of laccase from *Trametes versicolor* in route to increase its stability: Effect on enzymatic activity. *Journal of Molecular Recognition*, 28, 173–179. <https://doi.org/10.1002/jmr.2405>
- Mayolo-Deloisa, K. P. (2012). *ESTRATEGIAS PARA LA PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS PEGILADAS UTILIZANDO CROMATOLOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDROFÓBICA: RIBONUCLEASA A COMO MODELO DE ESTUDIO*. Tesis doctoral, INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MONTERREY. <http://hdl.handle.net/11285/572570>
- Mayolo-Deloisa, K., Trejo-Hernández, M. R., & Rito-Palomares, M. (2009). Recovery of laccase from the residual compost of *Agaricus bisporus* in aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*, 44, 435–439. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.12.010>
- Mero A, Clementi C, Veronese FM, & Pasut G. (2011). Covalent conjugation of poly(ethylene glycol) to proteins and peptides: strategies and methods. *Methods Mol Biol*, 751, 95-129. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-151-2_8
- Milton Harris, J., & Chess, R. B. (2003). Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2, 214–221. <https://doi.org/10.1038/nrd1033>
- Milton Harris, J., Martin, N. E., & Modi, M. (2001). Pegylation: A novel process for modifying pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics*, 40, 539–551. <https://doi.org/10.2165/00003088-200140070-00005>

- Munk, L., Sitarz, A. K., Kalyani, D. C., Mikkelsen, J. D., & Meyer, A. S. (2015). Can laccases catalyze bond cleavage in lignin? *Biotechnology Advances*, *33*, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.008>
- Nie, Y., Zhang, X., Wang, X., & Chen, J. (2006). Preparation and stability of N-terminal mono-PEGylated recombinant human endostatin. *Bioconjugate Chemistry*, *17*, 995–999. <https://doi.org/10.1021/bc050355d>
- Ohue, K., & Ohtake, K. (1984). Malvern Zetasizer ZS DLS user manual. *Electronics and Communications in Japan (Part I: Communications)*, *67*, 37–46.
- Olivé, J., Casas, J. M., Garcia, J., & Guadayol, J. M. (1994). Anàlisi instrumental 2: Cromatografia i electroforesi. *Edicions UPC, Barcelona*, 250p.
- Pankaj, K. C., Shashi, L. B., & Chandana, S. (2016). Laccases in pharmaceutical chemistry: A comprehensive appraisal. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, *13*, 430–451. <https://doi.org/10.2174/1570193X13666161019124>
- Pasut, G., & Veronese, F. M. (2007). Polymer-drug conjugation, recent achievements and general strategies. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, *32*, 933–961. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.008>
- Pasut, G., & Veronese, F. M. (2012). State of the art in PEGylation: The great versatility achieved after forty years of research. *Journal of Controlled Release*, *161*, 461–472. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.10.037>
- Patel, H., Gupte, S., Gahlout, M., & Gupte, A. (2014). Purification and characterization of an extracellular laccase from solid-state culture of *Pleurotus ostreatus* HP-1. *3 Biotech*, *4*, 77–84. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0129-1>
- Preussler, C. A., Shimizu, E., Villalba, L. L., & Zapata, P. D. (2009). Inducción con cobre de la enzima lacasa en el hongo de pudrición blanca *Trametes villosa* (sw.: Fr.) Kreisel. *Revista de Ciencia y Tecnología*, *12*, 9–16.
- Ramírez, N. E., Vargas, M. C., Ariza, J. C., & Martínez, C. (2003). Caracterización de la lacasa obtenida por dos métodos de producción con *Pleurotus ostreatus*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *2*, 64–72.
- Riva, S. (2006). Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology*, *24*(5), 219–226. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.03.006>
- Roberts, M. J., Bentley, M. D., & Harris, J. M. (2002). Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *54*, 459–476. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00022-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00022-4)
- Roberts, M. J., Bentley, M. D., & Harris, J. M. (2012). Chemistry for peptide and protein PEGylation. In *Advanced Drug Delivery Reviews*, *64*, 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.025>
- Rodríguez Couto, S., & Toca Herrera, J. L. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. In *Biotechnology Advances* (Vol. 24, Issue 5, pp. 500–513). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.04.003>

- Rodríguez Sánchez, E. (2006). CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LACASAS DE *Pleurotus eryngii*: EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE ESTAS ENZIMAS Y APLICACIONES EN LA DEGRADACIÓN DE CONTAMINANTES AROMÁTICOS. *Universidad Complutense de Madrid*. <https://core.ac.uk/download/pdf/36050263.pdf>
- Rodríguez-Couto, S. (2019). *Fungal Laccase: A Versatile Enzyme for Biotechnological Applications* (pp. 429–457). https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1_13
- Russell-Jones, G. J. (1996). The potential use of receptor-mediated endocytosis for oral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 20, 83–97. [https://doi.org/10.1016/0169-409X\(95\)00131-P](https://doi.org/10.1016/0169-409X(95)00131-P)
- Sambrook, Joseph., Fritsch, E. F., & Maniatis, Tom. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, 1, 676. <https://books.google.es/books?id=G5RqAAAAAMAAJ>
- Santos, J. H. P. M., Torres-Obreque, K. M., Meneguetti, G. P., Amaro, B. P., & Rangel-Yagui, C. O. (2018). Protein PEGylation for the design of biobetters: From reaction to purification processes. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54, 1–17. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902018000001009>
- Sartorius Stedim Biotech. (2015). Instructions: Vivaspin 500, 2, 6 and 20. *GE Healthcare Instructions*. <https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-15156-pdf>
- Sjaarda, C. P., Abubaker, K. S., & Castle, A. J. (2015). Induction of lcc2 expression and activity by *Agaricus bisporus* provides defence against *Trichoderma aggressivum* toxic extracts. *Microbial Biotechnology*, 8, 918–929. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12277>
- Sociedad Española de Oncología Médica. (2023). *Las cifras del cáncer en España*. https://seom.org/images/Las_cifras_del_Cancer_en_Espana_2023.pdf
- Sondhi, S., Kaur, R., & Madan, J. (2021). Purification and characterization of a novel white highly thermo stable laccase from a novel *Bacillus* sp. MSK-01 having potential to be used as anticancer agent. *International Journal of Biological Macromolecules*, 170, 232–238. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.082>
- Su, J., Noro, J., Loureiro, A., Martins, M., Azoia, N. G., Fu, J., Wang, Q., Silva, C., & Cavaco-Paulo, A. (2017). PEGylation Greatly Enhances Laccase Polymerase Activity. *ChemCatChem*, 9, 3888–3894. <https://doi.org/10.1002/cctc.201700849>
- Takakura, Y., Mahato, R. I., & Hashida, M. (1998). Extravasation of macromolecules. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 34, 93–108. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(98\)00006-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00006-4)
- Thordarson, P., Le Droumaguet, B., & Velonia, K. (2006). Well-defined protein-polymer conjugates - Synthesis and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 243–254. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0574-4>
- Thurston, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 1, 19–26. <https://doi.org/10.5771/9783845276564-901>

- Tinoco, Pickard, & Vazquez-Duhalt. (2001). Kinetic differences of purified laccases from six pleurotus ostreatus strains. *Letters in Applied Microbiology*, 32, 331–335. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00913.x>
- Tonin, F., Melis, R., Cordes, A., Sanchez-Amat, A., Pollegioni, L., & Rosini, E. (2016). Comparison of different microbial laccases as tools for industrial uses. *New Biotechnology*, 33, 387–398. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.01.007>
- Veronese, F. M. (2009). PEGylated protein drugs: basic science and clinical applications. *Springer, Basel*. <https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8679-5>
- Veronese, F. M., & Pasut, G. (2005). PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discovery Today*, 10, 1451–1458. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03575-0](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03575-0)
- Wang, H. X., & Ng, T. B. (2004). Purification of a novel low-molecular-mass laccase with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the mushroom *Tricholoma giganteum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315, 450–454. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.01.064>
- Wesenberg, D., Kyriakides, I., & Agathos, S. N. (2003). White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*, 22, 161–187. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2003.08.011>
- Xu, S., Wang, F., Fu, Y., Li, D., Sun, X., Li, C., Song, B., & Li, Y. (2020). Effects of mixed agro-residues (corn crop waste) on lignin-degrading enzyme activities, growth, and quality of: *Lentinula edodes*. *RSC Advances*, 10, 9798–9807. <https://doi.org/10.1039/c9ra10405d>
- Yamaoka, T., Tabata, Y., & Ikada, Y. (1993). Distribution and Tissue Uptake of Poly(ethylene glycol) with Different Molecular Weights after Intravenous Administration to Mice. *J Pharm Sci*. 83, :601-6. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jps.2600830432>
- Zhang, G. Q., Tian, T., Liu, Y. P., Wang, H. X., & Chen, Q. J. (2011). A laccase with anti-proliferative activity against tumor cells from a white root fungus *Abortiporus biennis*. *Process Biochemistry*, 46, 2336–2340. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.09.020>