



# Universidad Autónoma de Tlaxcala

---

---

Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

**“Efecto del pH inicial de crecimiento de *Pleurotus ostreatus*  
sobre la actividad de lacasas obtenidas por fermentación  
sólida”**

## **T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta

I.Q. Ana Laura Velázquez López

Director de Tesis

Dr. Gerardo Díaz Godínez

Comité tutorial

Dr. Octavio Loera Corral

Dra. Martha Dolores Bibbins Martínez

Dra. María del Carmen Sánchez Hernández

Tlaxcala, Tlax.

Octubre de 2011

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala bajo la dirección del Dr. Gerardo Díaz Godínez.

La alumna Ana Laura Velázquez López recibió la beca de maestría 328893 otorgada por el CONACyT.

La Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala está registrada en el Padrón de Posgrados de Excelencia (PNP) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

## RESUMEN

Se evaluó el efecto del pH inicial de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* sobre la actividad de lacasas obtenidas mediante fermentación sólida sobre soporte inerte. Se empleó un medio de cultivo optimizado para la producción de lacasas que contenía glucosa, extracto de levadura, sulfato de cobre y sales minerales, y espuma de poliuretano ( $17 \text{ kg m}^{-3}$ ) como soporte inerte. El pH del medio de cultivo de las fermentaciones fue ajustado a 3.5, 4.5, 6.5, 7.5 y 8.5. Las fermentaciones fueron caracterizadas y se reportaron los parámetros cinéticos de crecimiento de *P. ostreatus* ( $\mu$ ,  $X_{\text{máx}}$ ,  $Y_{X/S}$  y  $q_s$ ). Los máximos valores reportados para  $\mu$  se encontraron en las fermentaciones con pH inicial de 4.5, 7.5 y 8.5 (no se encontraron diferencias estadísticamente significativas). Respecto a la  $X_{\text{máx}}$ , la fermentación con pH inicial de 4.5 reveló la cantidad mayor de biomasa producida. La actividad de lacasas fue determinada empleando 2,6-dimetoxifenol como sustrato y evaluaron los parámetros relacionados con dicha actividad ( $E_{\text{máx}}$ ,  $Y_{E/X}$ ,  $Pro$  y  $q_p$ ). La máxima actividad de lacasas se observó en las fermentaciones con pH inicial de 4.5 y 6.5 (no se encontraron diferencias estadísticamente significativas). El sistema más productivo fue la fermentación con pH inicial de 4.5. Los perfiles zimográficos revelaron la presencia desde ninguna (presumible por la baja actividad de lacasas reportada) hasta siete bandas con actividad de lacasas (fermentación con pH inicial de crecimiento 7.5, revelada a pH 4.5).

Se observó que el pH es un factor que modifica el crecimiento de *P. ostreatus*, la actividad y el patrón de isoenzimas de lacasas. Es notable, que las enzimas producidas bajo cierto pH, presentaron actividad óptima en pH distinto. El pH óptimo de crecimiento y de actividad de lacasas fue 4.5 –de acuerdo con  $\mu$ ,  $X_{\text{máx}}$ ,  $E_{\text{máx}}$  y  $Pro$ –, distinto al reportado hasta entonces como 6.5.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES GENERALES.....	2
2.1. Hongos de pudrición de la madera.....	2
2.1.1. Hongos de pudrición blanda .....	3
2.1.2. Hongos de pudrición oscura .....	3
2.1.3. Hongos de pudrición blanca.....	4
2.2. Género <i>Pleurotus</i> .....	5
2.1.1 Ciclo de vida de <i>Pleurotus</i> .....	8
2.3. Enzimas ligninolíticas de hongos.....	9
2.3.1. Lacasas.....	10
2.4. Fermentación.....	15
2.4.1. Fermentación líquida .....	15
2.4.2. Fermentación sólida.....	16
2.4.2. Microorganismos empleados en FS.....	19
3. ANTECEDENTES PARTICULARES .....	20
3.1. Efecto del medio de cultivo y soporte en la producción de lacasa.....	20
3.2. Efecto del pH en la producción de lacasas.....	30
3.3. Aplicaciones de lacasas .....	32
3.3.1. Industria textil.....	33
3.3.2. Industria alimentaria.....	37
3.3.3. Biorremediación .....	37
3.3.4. Lacasas y sistemas de mediadores químicos.....	38
3.3.5. Aplicaciones sintéticas.....	40
4. JUSTIFICACIÓN .....	42
5. HIPÓTESIS .....	43
6. OBJETIVOS .....	44

6.1.	Objetivo general .....	44
6.2.	Objetivos específicos.....	44
7.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	45
7.1.	Organismo y condiciones de cultivo .....	45
7.2.	Extracto enzimático y evaluación de biomasa .....	45
7.3.	Determinación de actividad enzimática de lacasas .....	46
7.4.	Determinación de actividad enzimática de proteasas.....	46
7.5.	Determinación de azúcares reductores .....	47
7.6.	Determinación del pH de los extractos crudos enzimáticos .....	47
7.7.	Identificación de isoenzimas con actividad de lacasas.....	47
8.	RESULTADOS .....	48
8.1.	Determinación de biomasa .....	48
8.2.	Determinación de actividad enzimática de lacasas .....	52
8.3.	Determinación de actividad enzimática de proteasas.....	60
8.4.	Determinación de concentración de azúcares reductores .....	60
8.5.	Determinación de pH en extractos enzimáticos.....	65
8.6.	Identificación de isoenzimas con actividad de lacasas.....	70
8.6.1.	FS con pH inicial 3.5 .....	71
8.6.2.	FS con pH inicial 4.5 .....	72
8.6.3.	FS con pH inicial 6.5 .....	74
8.6.4.	FS con pH inicial 7.5 .....	76
8.6.5.	FS con pH inicial 8.5 .....	78
8.7.	Parámetros cinéticos .....	80
9.	DISCUSIÓN .....	81
10.	CONCLUSIONES .....	88
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	89

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fase vegetativa y reproductiva del género <i>Pleurotus</i> .....	7
Figura 2. Ciclo de vida del género <i>Pleurotus</i> .....	9
Figura 3. Reacción típica catalizada por lacasa para un difenol.....	11
Figura 4. Modelo de un grupo catalítico de lacasas de <i>Trametes versicolor</i> de cuatro átomos de cobre.....	12
Figura 5. Estructura química de la lignina.....	14
Figura 6. Oxidación de adlerol a adlerona.....	39
Figura 7. Oxidación de alcoholes bencílicos a su correspondientes aldehídos.....	40
Figura 8. Producto de reacción de acoplamiento obtenido del ácido dihidrocafeico (i) y ácido 4-aminobenzoico (ii) .....	41
Figura 9. Cinética de crecimiento de <i>P. ostreatus</i> a pH inicial 3.5.....	48
Figura 10. Cinética de crecimiento de <i>P. ostreatus</i> a pH inicial 4.5.....	49
Figura 11. Cinética de crecimiento de <i>P. ostreatus</i> a pH inicial 6.5.....	50
Figura 12. Cinética de crecimiento de <i>P. ostreatus</i> a pH inicial 7.5.....	51
Figura 13. Cinética de crecimiento de <i>P. ostreatus</i> a pH inicial 8.5.....	52
Figura 14. Actividad enzimática de lacasas a pH inicial 3.5. ....	53
Figura 15. Actividad enzimática de lacasas a pH inicial 4.5. ....	56
Figura 16. Actividad enzimática de lacasas a pH inicial 6.5. ....	57
Figura 17. Actividad enzimática de lacasas a pH inicial 7.5. ....	58
Figura 18. Actividad enzimática de lacasas a pH inicial 8.5 .....	59
Figura 19. Consumo de glucosa de <i>P. ostreatus</i> en FS con pH inicial 3.5.....	61
Figura 20. Consumo de glucosa de <i>P. ostreatus</i> en FS con pH inicial 4.5.....	62
Figura 21. Consumo de glucosa de <i>P. ostreatus</i> en FS con pH inicial 6.5.....	63
Figura 22. Consumo de glucosa de <i>P. ostreatus</i> en FS con pH inicial 7.5.....	64
Figura 23. Consumo de glucosa de <i>P. ostreatus</i> en FS con pH inicial 8.5.....	65
Figura 24. Perfil de pH durante la FS de <i>P. ostreatus</i> con pH inicial 3.5.....	66
Figura 25. Perfil de pH durante la FS de <i>P. ostreatus</i> con pH inicial 4.5.....	67
Figura 26. Perfil de pH durante la FS de <i>P. ostreatus</i> con pH inicial 6.5.....	68

Figura 27. Perfil de pH durante la FS de <i>P. ostreatus</i> con pH inicial 7.5. ....	69
Figura 28. Perfil de pH durante la FS de <i>P. ostreatus</i> con pH inicial 8.5. ....	70
Figura 29. Perfil zimográfico de lacasas de FS 3.5 revelado en buffer a pH 3.5. ....	71
Figura 30. Perfil zimográfico de lacasas de FS 3.5 revelado en buffer a pH 4.5. ....	71
Figura 31. Perfil zimográfico de lacasas de FS 3.5 revelado en buffer a pH 6.5. ....	72
Figura 32. Perfil zimográfico de lacasas de FS 3.5 revelado en buffer a pH 7.5. ....	72
Figura 33. Perfil zimográfico de lacasas de FS 3.5 revelado en buffer a pH 8.5. ....	72
Figura 34. Perfil zimográfico de lacasas de FS 4.5 revelado en buffer a pH 3.5. ....	73
Figura 35. Perfil zimográfico de lacasas de FS 4.5 revelado en buffer a pH 4.5. ....	73
Figura 36. Perfil zimográfico de lacasas de FS 4.5 revelado en buffer a pH 6.5. ....	73
Figura 37. Perfil zimográfico de lacasas de FS 4.5 revelado en buffer a pH 7.5. ....	74
Figura 38. Perfil zimográfico de lacasas de FS 4.5 revelado en buffer a pH 8.5. ....	74
Figura 39. Perfil zimográfico de lacasas de FS 6.5 revelado en buffer a pH 3.5. ....	75
Figura 40. Perfil zimográfico de lacasas de FS 6.5 revelado en buffer a pH 4.5. ....	75
Figura 41. Perfil zimográfico de lacasas de FS 6.5 revelado en buffer a pH 6.5. ....	75
Figura 42. Perfil zimográfico de lacasas de FS 6.5 revelado en buffer a pH 7.5. ....	76
Figura 43. Perfil zimográfico de lacasas de FS 6.5 revelado en buffer a pH 8.5. ....	76
Figura 44. Perfil zimográfico de lacasas de FS 7.5 revelado en buffer a pH 3.5. ....	77
Figura 45. Perfil zimográfico de lacasas de FS 7.5 revelado en buffer a pH 4.5. ....	77
Figura 46. Perfil zimográfico de lacasas de FS 7.5 revelado en buffer a pH 6.5. ....	77
Figura 47. Perfil zimográfico de lacasas de FS 7.5 revelado en buffer a pH 7.5. ....	77
Figura 48. Perfil zimográfico de lacasas de FS 7.5 revelado en buffer a pH 8.5. ....	78
Figura 49. Perfil zimográfico de lacasas de FS 8.5 revelado en buffer a pH 3.5. ....	78
Figura 50. Perfil zimográfico de lacasas de FS 8.5 revelado en buffer a pH 4.5. ....	79
Figura 51. Perfil zimográfico de lacasas de FS 8.5 revelado en buffer a pH 6.5. ....	79
Figura 52. Perfil zimográfico de lacasas de FS 8.5 revelado en buffer a pH 7.5. ....	79
Figura 53. Perfil zimográfico de lacasas de FS 8.5 revelado en buffer a pH 8.5. ....	79

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Isoenzimas de lacasas purificadas en diversos hongos. (Baldrian 2006)....	24
Tabla 2. Actividad enzimática de lacasas.....	55
Tabla 3. Parámetros cinéticos evaluados.....	80



## 1. INTRODUCCIÓN

Las lacasas son enzimas que han sido estudiadas desde el siglo XIX. Inicialmente se obtuvieron del exudado del árbol japonés *Toxicodendron vernicifluum* (antes nombrado *Rhus vernicifera*) y fueron descritas por Yoshida en 1883. En 1896, Bertrand y Laborde mostraron por primera vez la actividad de lacasas en hongos. Éstas, catalizan la oxidación de compuestos fenólicos, aminas aromáticas y sustratos no fenólicos mediante la transferencia de un electrón resultando la formación de radicales libres (Claus 2003), permitiendo la polimerización, despolimerización, metilación y/o desmetilación de compuestos fenólicos (Edens y cols. 1999).

La función fisiológica de las lacasas no ha sido comprendida totalmente; en las plantas participan en la lignificación y en hongos en la morfogénesis, patogénesis, virulencia y degradación de lignina, pero también se ha reportado su actividad en algunos insectos y bacterias, en los cuales todavía no es clara su función (Galhaup y cols. 2002). La estructura molecular de las lacasas se ha establecido a partir de las enzimas aisladas de hongos, las que junto con la lignina-peroxidasa (LiP) y la manganeso-peroxidasa (MnP) forman un sistema que degrada lignina, presente en los hongos de pudrición blanca.

La manipulación de las condiciones de crecimiento de los hongos en nuevas formas, magnifican su diversidad química e incrementan su potencial como fuentes de metabolitos útiles. Si las redes regulatorias que modulan la producción natural son modificadas durante una fermentación, es posible generar nuevos conocimientos sobre el crecimiento de microorganismo y los metabolitos producidos durante el proceso. Por lo que esta investigación evaluó el efecto del pH inicial en el crecimiento de *Pleurotus ostreatus*, sobre la producción de las enzimas lacasas obtenidas a través de fermentación sólida utilizando espuma de poliuretano como soporte inerte.

## 2. ANTECEDENTES GENERALES

Aunque las reacciones de oxidación son esenciales en muchas industrias, la mayoría de las tecnologías convencionales de oxidación tienen inconvenientes como las reacciones secundarias no específicas o indeseables y el uso de químicos que son ambientalmente peligrosos. Esto ha impulsado la búsqueda de nuevas tecnologías de oxidación basadas en sistemas biológicos, tales como la oxidación enzimática. Estos sistemas muestran ventajas, ya que las enzimas son catalizadores específicos y biodegradables y las reacciones enzimáticas son llevadas a cabo en condiciones moderadas (Rodríguez-Couto y Toca-Herrera 2006). Las técnicas de oxidación enzimáticas tienen potencial dentro de una amplia variedad de campos industriales incluyendo a las industrias de pulpa y papel, textiles y alimentarias.

Así, las lacasas son enzimas especialmente prometedoras por los propósitos mencionados anteriormente. Se ha reportado que estas enzimas son producidas por plantas, hongos, insectos y bacterias (Galhaup y cols. 2002). Esta enzima cataliza la oxidación de orto y paradifenoles, aminofenoles, polifenoles, poliaminas, ligninas y aril diaminas, así como algunos iones inorgánicos acoplados a la reducción de oxígeno molecular a agua (Yaropolov y cols. 1994, Solomon y cols. 1996).

Las lacasas fúngicas no tienen un sustrato específico, por lo que pueden transformar gran variedad de contaminantes ambientales (Wilkolazka y cols. 2002), así como degradar compuestos no fenólicos en presencia de mediadores redox apropiados (Li y cols. 1999).

### 2.1. Hongos de pudrición de la madera

Los hongos presentan gran variedad de formas de vida, entre las que se encuentran los de pudrición, que se dividen dependiendo de los cambios químicos y estructurales que ocasionan a la madera. Se han distinguido tres grupos: de pudrición blanda, de pudrición oscura y de pudrición blanca (Schwarze y cols. 2000).

### 2.1.1. Hongos de pudrición blanda

El nombre de pudrición blanda es usado por la consistencia suave de la madera después de su degradación por ascomicetes y deuteromicetes. Existen algunos que hacen a la madera quebradiza, como es el caso de *Ustulina deusta*. Las hifas involucradas en la pudrición blanda crecen dentro de la pared celular en dirección a las microfibrillas de celulosa. La destrucción de la pared celular siempre ocurre en lugares cercanos a la hifa, lo que ocasiona la formación de cavidades sin la pared celular, la cual en una sección transversal aparece como un pequeño círculo, formando hoyos ovalados en la pared secundaria (Schwarze y cols. 2000).

Estos causan dos tipos de degradación: el tipo 1 se caracteriza por la formación de una serie de cavidades sucesivas de forma cónica, después de un periodo de incremento longitudinal de la hifa, el crecimiento se detiene y forma una cavidad alrededor de la hifa. Este mecanismo degradativo podría ser una forma de suministro de nutrimentos.

En el tipo 2 la degradación se lleva a cabo en el exterior del lumen, formando pequeñas erosiones en V. Tienen importancia en el ecosistema porque quizá acelera la caída natural de las ramas en árboles vivos (Schwarze y cols. 2000).

### 2.1.2. Hongos de pudrición oscura

Sólo el 6% de todos los hongos de pudrición conocidos actualmente ocasionan la pudrición oscura. Esta pudrición es causada por hongos basidiomicetes principalmente, lleva este nombre porque al degradar los carbohidratos y polímeros (celulosa y hemicelulosa) presentes en la madera, ésta adquiere un color oscuro y una consistencia quebradiza. Para la degradación de celulosa y hemicelulosa se debe asumir que el peróxido de hidrógeno se forma tal vez en una fase pre-celulolítica y que fácilmente penetra a la pared celular (para que puedan actuar las enzimas dependientes de peróxido) y junto con iones de hierro degraden la matriz de lignocelulosa por despolimerización oxidativa. Esta suposición parece necesaria,

puesto que las enzimas que descomponen la celulosa son proteínas que penetran en los pequeños capilares de la pared celular, por lo que la hemicelulosa cercana a la celulosa es oxidada y la celulosa se hace accesible para las enzimas que degradan este polímero (celulasas).

La degradación preferencial de estos hongos por la celulosa y hemicelulosa está estrechamente asociada con la pérdida de firmeza de la madera después de un corto periodo de degradación (Schwarze y cols. 2000).

Otra característica importante de estos hongos es que se asocian principalmente con coníferas, la razón de esto es probablemente debido a que estos hongos están adaptados a la estructura de la madera blanda de las coníferas, están restringidos en su habilidad de degradar lignina, por lo que se han considerado como hongos muy específicos comparados con los hongos de pudrición blanca, los cuales se pueden encontrar en una gran variedad de árboles (Schwarze y cols. 2000).

### *2.1.3. Hongos de pudrición blanca*

La pudrición blanca es ocasionada principalmente por basidiomicetes y ascomicetes. El nombre de pudrición blanca se deriva de la apariencia blanquecina en la madera al remover la lignina, celulosa y hemicelulosa (Schwarze y cols. 2000).

Son organismos aerobios obligados, su nutrición es por medio de la combustión biológica de la madera y materiales asociados, usando oxígeno molecular como aceptor terminal de electrones. La vía metabólica de producción de energía interna es a partir de la glucólisis en el citoplasma y ciclo de Krebs en la mitocondria que es la misma que la mayoría de los organismos aeróbicos (Kirk y Cullens 1998). Las hifas invaden rápidamente las células de la madera y permanecen en la pared del lumen, secretan enzimas y metabolitos que provocan la despolimerización de la hemicelulosa, celulosa y la fragmentación de la lignina.

Estos hongos presentan dos patrones de descomposición, la pudrición simultánea donde la celulosa, hemicelulosa y lignina, son removidas simultáneamente y la deslignificación, en la cual la lignina es removida antes de la hemicelulosa y celulosa. Los hongos de pudrición blanca rompen la lignina por un proceso oxidativo por medio de fenol-oxidasas que son formadas y liberadas por la hifa, tales como las lacasas, MnP, LiP, tirosinasas y peroxidasas (Schwarze y cols. 2000).

Los hongos basidiomicetos de pudrición blanca como *P. ostreatus* producen enzimas involucradas en la degradación de la lignina en su hábitat natural (lacasas, MnP y LiP) (Stajic y cols. 2006). La degradación de la lignina está estrechamente relacionada con factores ambientales (pH, temperatura, grado de humedad) y con el organismo involucrado en dicha degradación (Palmieri y cols. 1997).

## 2.2. Género *Pleurotus*

Las especies del género *Pleurotus*, comúnmente conocidas como hongo ostra, son hongos comestibles cultivados a lo largo del mundo. El género es caracterizado por su alto contenido proteico (30-40% en base seca) y su calidad alimenticia, la cual supera a muchos otros alimentos (Mandeeel y cols. 2005). Médicamente, ha sido reportado que *P. ostreatus* disminuye los niveles de colesterol en animales experimentales (Bobek y cols. 1995, Bobek y cols. 1998, Hoosain y cols. 2003). Estos organismos son los más fáciles, baratos y rápidos de cultivar, requieren menos tiempo de preparación y menos tecnología de producción.

La bioconversión de residuos lignocelulósicos por las especies de *Pleurotus* ofrece la oportunidad de emplear fuentes renovables durante su producción. Esta tecnología limita la contaminación del aire asociada con la quema de desechos agrícolas (Sánchez y cols. 2002).

El género *Pleurotus* comprende especies generalmente de color blanco, amarillento o rosado a veces grisáceo o de color oscuro. Su forma puede ser de embudo, pétalo de flor o concha de ostra. Las laminillas son longitudinalmente decurrentes sobre la base del estípite, con frecuencia anastomosadas transversalmente al nivel de la inserción del pie. Las esporas son de color blanco, crema o lila pálido, presentan una forma cilíndrica y son lisas. El género es cosmopolita, está distribuido en Europa, Asia, África, Australia, Estados Unidos, Canadá y Latinoamérica. Es un hongo saprótrofo, crece sobre troncos, ramas o árboles muertos y algunas veces se encuentra en el suelo sobre raíces podridas. La temperatura óptima de desarrollo de las especies de este género es variable, *P. ostreatus* y *P. pulmonarius* se desarrollan en un rango de temperaturas desde 15°C hasta 28°C (Guinberteau 1990).

Existen dos fases de desarrollo en los hongos macroscópicos (Figura 1), la fase vegetativa o micelial y la fase reproductiva, en la cual se desarrollan los cuerpos fructíferos. El crecimiento vegetativo está en contacto directo con el sustrato, que proporciona los nutrientes requeridos para el crecimiento (Sánchez 1998).

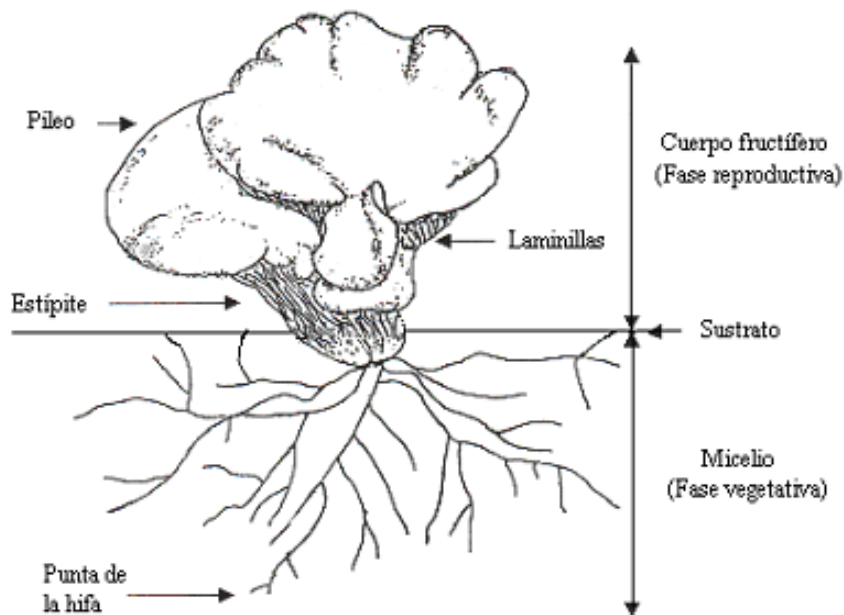


Figura 1. Fase vegetativa y reproductiva del género *Pleurotus* (Sánchez 1998)

La fase vegetativa es en la mayoría de los casos filamentosa, constituida por un conjunto de hifas, denominado micelio (Herrera y cols. 1998). Su crecimiento se realiza sólo en las puntas y se atribuye a un fenómeno complejo en el que participan vesículas, agregados de enzimas hidrolíticas y sintéticas, que degradan y restauran fragmentos de la pared celular. Las vesículas se producen a lo largo del segmento subapical y se transportan por medio de un mecanismo hasta llegar al centro distribuidor de vesículas. Desde ahí son distribuidas en forma radial y aleatoria hacia la pared apical dando lugar al crecimiento de las hifas. El micelio desempeña la función de adquirir y distribuir los nutrientes, así como de crear y formar la estructura de soporte para el desarrollo de los cuerpos fructíferos.

El modo hifal de crecimiento les confiere ventaja sobre algunos organismos unicelulares en la colonización de sustratos sólidos y para el consumo de nutrientes disponibles. La forma básica de crecimiento es una combinación de extensión apical de las puntas de las hifas y la generación de nuevas hifas que se ramifican. Una característica importante de este crecimiento es que, aunque la extensión ocurra sólo

hacia las puntas y en una forma lineal y constante, la frecuencia de ramificación hace el patrón cinético de crecimiento de biomasa exponencial. El crecimiento hifal proporciona a los hongos filamentosos la capacidad de penetrar dentro de los sustratos sólidos. La estructura de la pared celular asociada a la punta de la hifa y a la ramificación del micelio asegura una estructura sólida y firme. Las enzimas hidrolíticas son excretadas por la punta de la hifa, sin diluciones en el medio como es el caso de la fermentación líquida (FL), que hace que la acción de la enzima sea eficiente y permita la penetración en los sustratos sólidos. La penetración incrementa la accesibilidad de todos los nutrientes disponibles dentro del sustrato (Raimbault 1998).

Los hongos no pueden transportar sustratos macromoleculares, pero el crecimiento de sus hifas permite un contacto cercano entre la hifa y la superficie del sustrato. El micelio fúngico sintetiza y excreta cantidades elevadas de exoenzimas hidrolíticas. La catálisis resultante es eficiente y los productos simples están en contacto cercano para entrar por el micelio a través de la membrana celular para promover las actividades de biosíntesis y metabolismo.

### 2.1.1 *Ciclo de vida de Pleurotus*

En los basidiomicetes existen dos modelos sexuales: en el homotalismo los hongos son autocompatibles, es decir la unión sexual puede efectuarse entre elementos de un mismo micelio; y el heterotalismo en el que son necesarios dos micelios para llevar a cabo la reproducción. El género *Pleurotus* está incluido dentro del último modelo (Figura 2). En éste, las basidiosporas con un núcleo germinan formando el micelio primario monocariótico (A). Se fusionan dos micelios primarios compatibles, en los cuales hay un intercambio nucleico recíproco (plasmogamia) (B) formando el micelio secundario dicariótico con la presencia de hifas (C). La fusión nuclear (cariogamia) ocurre en los basidios que se encuentran en las laminillas del cuerpo fructífero (D), posteriormente ocurre la meiosis, dando origen a células haploides (basidiosporas) que son expulsadas hacia el ambiente.



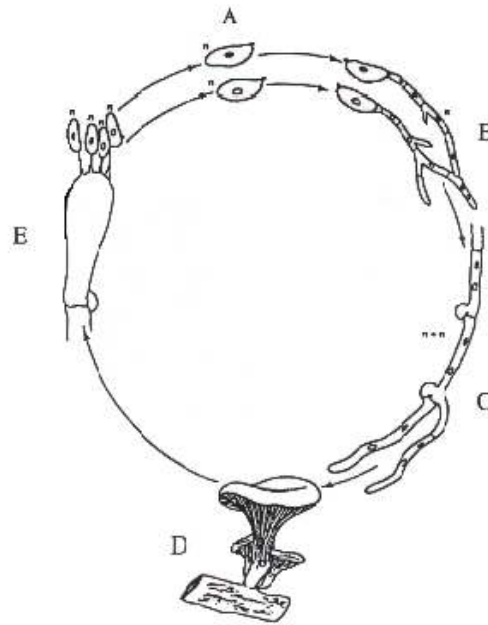


Figura 2. Ciclo de vida del género *Pleurotus* (Guinberteau 1990)

### 2.3. Enzimas ligninolíticas de hongos

Los hongos de pudrición blanca producen cambios en la lignina mediante mecanismos oxidativos. El sistema enzimático ligninolítico es poco específico, ya que las peroxidadas y oxidasas actúan al azar sobre la molécula de lignina, generando radicales libres que son inestables y tienden a polimerizarse. Las principales enzimas que actúan directa o indirectamente sobre la lignina son: LiP, MnP y lacasas.

Las lignina-peroxidadas (LiP; EC 1.11.1.14.) son glicoproteínas que contienen un grupo hemo (Ward y cols. 2002), estas enzimas participan en la despolimerización extracelular de la lignina en hongos de pudrición blanca (Guillén y cols. 2000). La habilidad de la LiP en la degradación de la lignina es atribuida, en parte, a su potencial redox, que se reporta como alto comparado con otras peroxidadas. Se ha reportado que LiP puede oxidar compuestos aromáticos con un potencial de ionización calculado en valores cercanos a 9.0 eV (Ward y cols. 2002).

Las manganeso-peroxidasas (MnP; EC1.11.1.13) son enzimas extracelulares oxido-reductasas, con potencial para oxidar a la lignina, sustancias húmicas y varios compuestos orgánicos contaminantes. Esta característica las hace considerarse atractivas en la aplicación biotecnológica, por ejemplo en el tratamiento de aguas residuales, blanqueamiento de pulpa de papel, remoción de lignin-sulfonas, sustancias húmicas, residuos de plantas en la lana de ovejas, así como en la eliminación de compuestos químicos peligrosos (Nüske y cols. 2002). Estas enzimas son ampliamente encontradas en basidiomicetos y su producción es regulada por la concentración de  $Mn^{2+}$  (D'Souza y cols. 1999).

Las lacasas ( $p$ -difenol: oxígeno oxido-reductasas EC 1.10.3.2) pertenecen a un grupo de enzimas que catalizan la oxidación de un gran número de compuestos fenólicos y aminas aromáticas usando oxígeno como aceptor de electrones, que es reducido a agua (Muñoz-Guillén y cols. 1997).

### 2.3.1. Lacasas

Las lacasas son de las pocas enzimas que han sido estudiadas desde el siglo XIX. Inicialmente se obtuvieron del exudado del árbol japonés de laca *T. vernicifluum*. Posteriormente Bertrand (1896) y Laborde (1896) mostraron por primera vez la actividad de lacasas en hongos, de las cuales se ha establecido su estructura molecular. Estas enzimas forman parte de las enzimas ligninolíticas que presentan los hongos de pudrición blanca para degradar a la lignina y son secretadas en múltiples isoenzimas dependiendo de la especie de hongo y de las condiciones de desarrollo (Giardina y cols. 1999).

Hasta finales del siglo XX, las lacasas se habían encontrado únicamente en organismos eucariotas, sin embargo, existe evidencia sobre la existencia de lacasas intracelulares o periplasmáticas en procariotas. Se describieron por primera vez en *Azospirillum lipoferum* y posteriormente se han hallado en bacterias como *Marinomonas mediterranea*, *Mycobacterium tuberculosis* o en las esporas de *Bacillus*

*sphaericus* y *Bacillus subtilis* (Claus 2004). Probablemente, las lacasas bacterianas mejor caracterizadas sean las de *B. subtilis* y *Sinorhizobium meliloti* (Martins y cols. 2002, Rosconi y cols. 2005).

Las enzimas lacasas son glicoproteínas con pesos moleculares muy amplios (Heinzkill y cols. 1998, Tlecuítl-Beristain y cols. 2008) y temperaturas óptimas entre 50 y 70°C (Morozova y cols. 2007), sin embargo, es posible encontrar enzimas termoestables como la lacasa de *Pycnoporus sanguineus*, con un tiempo de inactivación de 3 horas a 75°C (Litthauer y cols. 2007). Se han clasificado dentro del grupo de oxidasas de cobre azul. La molécula de lacasa, usualmente contiene cuatro átomos de cobre, distribuidos en tres sitios redox (Gianfreda y cols. 1999). Su punto isoeléctrico varía entre 2.6 y 4.5 y presentan actividad en un amplio rango de pH, entre 2.0 y 8.5 aunque el máximo reportado se encuentra entre 3.0 y 5.0 (Leonowicz y cols. 2001, Morozova y cols. 2007). Poseen potenciales de óxido-reducción entre 0.5 y 0.8 eV. Catalizan la oxidación de compuestos fenólicos y no fenólicos, mineralizando un rango amplio de colorantes sintéticos (Toca-Herrera y cols. 2007). La Figura 3 muestra una reacción típica catalizada por lacasas, donde el difenol es oxidado para formar un radical libre, el cual puede alcanzar, tras una segunda reacción de catálisis enzimática, la forma de quinona.

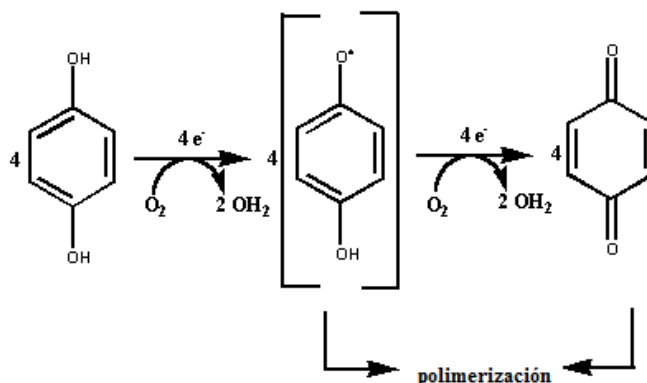


Figura 3. Reacción típica catalizada por lacasa para un difenol (Toca-Herrera y cols. 2007)

También catalizan la remoción de un átomo de hidrógeno para el grupo hidroxil de *ortho* y *para* sustituyendo sustratos monofenólicos, polifenólicos y aminas aromáticas por abstracción de un electrón para formar radicales libres capaces de despolimerizarse, repolimerizarse, metilarse o formar quinonas (Abadulla y cols. 2000).

Las reacciones catalizadas por lacasas proceden por la oxidación monoelectrónica de una molécula de sustrato adecuado (fenoles, aminas aromáticas o alifáticas) a su correspondiente radical reactivo. Los procesos *redox* toman lugar con la asistencia de un grupo de cuatro átomos de cobre que forman el núcleo catalítico de la enzima (Figura 4); también confiere el color azul típico de esas enzimas por la absorción electrónica intensa de los enlaces Cu-Cu (Riva 2006). El resultado global del ciclo catalítico es la reducción de una molécula de oxígeno a dos moléculas de agua de la oxidación concomitante de cuatro moléculas de sustrato para producir cuatro radicales. Estos intermediarios reactivos pueden producir dímeros, oligómeros y polímeros (Claus 2004, Solomon 1996).

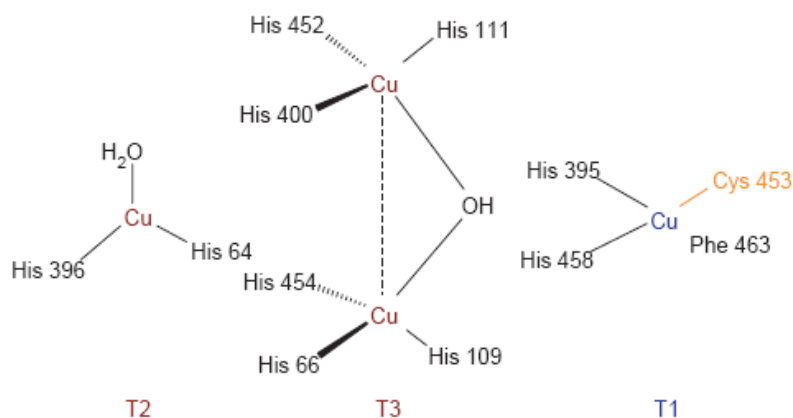


Figura 4. Modelo de un grupo catalítico de lacasas de *Trametes versicolor* de cuatro átomos de cobre.

El cobre tipo 1 (T1) confiere el color azul típico a la proteína y es el sitio donde toma lugar la oxidación del sustrato. El cobre tipo 2 (T2) y 3 (T3) forman un grupo trinuclear donde toma lugar la reducción de oxígeno molecular y liberación de agua (Rivas 2006).

Los genes que codifican las lacasas han sido clonados cuyas secuencias muestran un patrón común codificando polipéptidos de aproximadamente 520-550 residuos de aminoácidos, incluyendo el péptido amino terminal de secreción. Poseen cisteínas y residuos de histidinas que envuelven en su sitio catalítico a los cuatro átomos de cobre necesarios para la catálisis (Palmieri y col. 2000; Sonden y cols. 2001).

Otras reacciones que pueden llevar a cabo las lacasas son desmetilaciones (Kirk y cols. 1987) y deshalogenaciones en el caso de compuestos sustituidos. Su actividad frente a compuestos fenólicos es muy dependiente del pH, ya que el potencial redox de estos compuestos disminuye a medida que se incrementa el pH. Sin embargo, a pH superior a 6 se produce inhibición de la actividad catalítica (Xu 1997). La actividad de lacasas también puede ser inhibida por iones inorgánicos como cloruros y fluoruros (Xu 1997) o por compuestos orgánicos como cisteína o ácido tioglicólico (Morozova y cols. 2007).

Se ha propuesto que las lacasas están involucradas en el proceso de esclerotización de cutícula en insectos y en el ensamblado de esporas resistentes a rayos UV en especies *Bacillus*. En las plantas están involucradas en la formación de la pared celular y, junto con las peroxidasas, en la lignificación. Adicionalmente, las lacasas protegen a los hongos patógenos de fitoalexinas y taninos tóxicos, por lo tanto son un factor importante de virulencia en muchas enfermedades fúngicas (Mayer y Staples 2002).

El propósito fisiológico de las lacasas en plantas es biosintético y en hongos es degradativo de la lignina (Giardina y cols. 1995). La lignina es el segundo polímero orgánico más abundante y renovable en la tierra, es el principal componente de la madera (D'Souza y cols. 1999) y es el polímero aromático más importante en la naturaleza (Leonowicz y cols. 1999).

La lignina es un polímero complejo tridimensional compuesto por subunidades de hidroxifenil-propano interconectados por diferentes enlaces carbono-carbono y carbono-oxígeno-carbono (Giardina y cols. 1995). Leonowicz y cols. (1999) reportaron la estructura de la lignina basándose en estudios de resonancia magnética nuclear realizados en 1974 por Nimz y Glasser a partir de lignina de angiosperma (Figura 5).

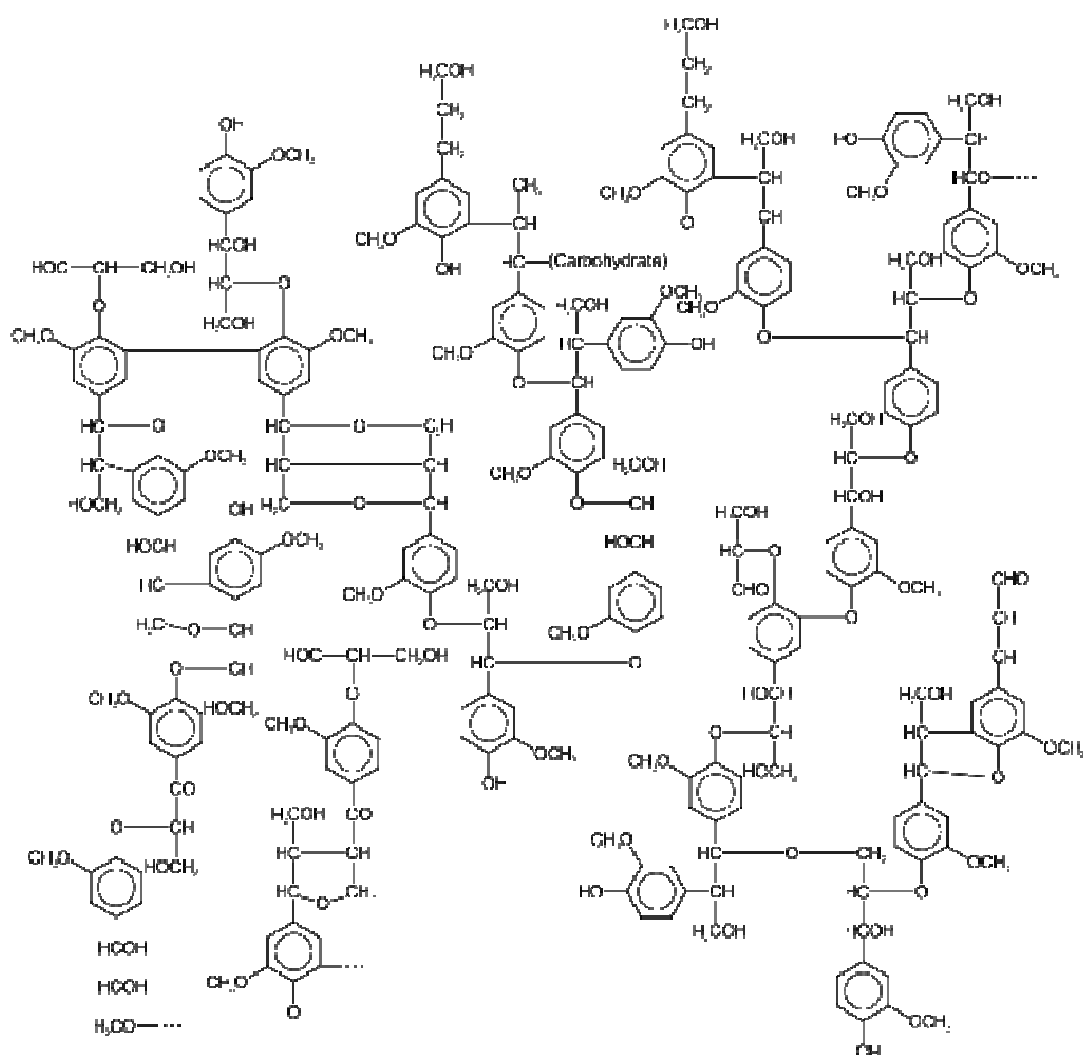


Figura 5. Estructura química de la lignina (Leonowicz y cols. 1999)

## 2.4. Fermentación

La fermentación, comúnmente, está considerada como un proceso para la producción de alcohol, sin embargo, se trata de un proceso más amplio que comprende un cambio metabólico causado por microorganismos que actúa sobre materiales orgánicos (Bailey-Bailey 1995). La fermentación es uno de los procesos bioquímicos más antiguos y en la actualidad se sigue usando para la fabricación de bebidas alcohólicas, pan, quesos, fármacos, antibióticos, hormonas, entre otros.

En biotecnología se denomina fermentación a la producción industrial de biomasa, enzimas o metabolitos en general mediante el crecimiento controlado de células, en biorreactores (Pandey y cols. 1999, Hölker y cols. 2004). Si bien se emplea el término fermentación, cabe destacar que, metabólicamente, las condiciones de cultivo son en la mayoría de los casos aeróbicas a fin de obtener un máximo rendimiento en la producción.

La mayoría de las fermentaciones industriales en la sociedad occidental han utilizado y desarrollado la denominada FL o fermentación sumergida. Sin embargo, existe otra técnica general de fermentación denominada FS, que se ha usado tradicionalmente para la manufactura de varios productos como el pozol que se produce en algunas áreas de México por la fermentación del maíz y quesos madurados de tipo Roquefort y Camembert en Francia. En el ámbito industrial se le da aplicación a la FS para la producción de enzimas de uso en la tecnología de alimentos, diagnóstico clínico, análisis químico, producción de metabolitos como ácidos de gran demanda industrial como el cítrico, gálico, glucónico, antibióticos y proteínas de origen microbiano (Díaz-Godínez 1997, Robinson y cols. 2001, Hölker y cols. 2004).

### 2.4.1. Fermentación líquida

La mayoría de las enzimas son producidas empleando la técnica convencional de FL, en la cual, el microorganismo está suspendido en un volumen grande de agua que es

agitada y aireada usando un dispositivo mecánico. En tales sistemas, la composición química del medio de cultivo es homogénea porque la velocidad de mezcla es más rápida que la velocidad de reacción.

La principal desventaja de las FL es la resistencia a la transferencia de masa impuesta debido a la difusión de O<sub>2</sub> y a otros nutrientes presentes (Krishna y cols. 2005).

#### *2.4.2. Fermentación sólida*

Existe otra técnica alternativa para la producción de enzimas, la FS, donde el microorganismo responsable de tal síntesis, es desarrollado sobre la superficie sólida de materiales porosos. En este sistema, una fracción grande de la mezcla de fermentación es ocupada por aire intersticial y la biomasa está en contacto con un nivel alto de humedad adsorbida a la superficie de la mezcla de fermentación o adsorbida dentro de las partículas sólidas que soportan al microorganismo.

Una FS puede definirse en términos de las siguientes propiedades:

- Una matriz porosa, la cual puede o no ser biodegradable pero con un área superficial grande por unidad de volumen, en el rango de  $10^3$  a  $10^6$  m<sup>2</sup>cm<sup>-3</sup>, para crecimiento microbiano en la interfase sólido-gas.
- La matriz debe absorber cantidades de agua superiores a dos veces su peso seco con una actividad de agua (Aw) alta en la interfase sólido-gas para permitir tasas grandes de los procesos bioquímicos.
- La mezcla de oxígeno con otros gases y aerosoles deben fluir bajo una presión baja y mezclar el medio de cultivo de fermentación.
- La interfase sólido-gas debe ser hábitat propicio para el desarrollo rápido de cultivos específicos de microorganismos.
- Las propiedades mecánicas de la matriz sólida deben soportar compresiones o agitación ligera, lo requerido para cada proceso de fermentación.



- La matriz sólida no debe contaminarse con inhibidores de la actividad microbiana y debe ser capaz de absorber o contener los nutrientes tales como carbohidratos (celulosa, almidón), fuentes de nitrógeno (amonio, urea, péptidos) y sales minerales (Raimbault 1998).

Algunos ejemplos de FS tradicionales son:

- *Koji* japonés, el cual emplea arroz tratado al vapor como sustrato sólido inoculado con cepas de *Aspergillus oryzae*.
- *Tempeh* indoneso o *ragi* hindú, el cual emplea semillas de leguminosa triturado y tratado al vapor como sustrato sólido y una variedad de hongos no tóxicos.
- Queso azul francés, el cual emplea queso fresco perforado como sustrato y *Penicillium roquefortii* como inóculo. (Raimbault 1998).

Los nuevos métodos de fermentación influyen el crecimiento y metabolismo de microorganismos mejorando su valor como fuentes naturales de productos y compuestos con potenciales terapéuticos. La FS esboza una tecnología de la fermentación tradicional fúngica, incluyendo los métodos antiguos de fermentación de alimentos, y aún sigue ofreciendo alternativas para el desarrollo de nuevos bioprocesos de productos naturales. Tales alternativas incluyen el uso de soportes poliméricos para el crecimiento de micelio durante la fermentación (Bigelis y cols. 2006).

La fermentación con soporte sólido e inerte emplean un sustrato natural como fuente de carbono y de energía en presencia de poca o suficiente agua, pero la aproximación más cercana a la FS incluye la aplicación de un sustrato inerte con un medio de nutrientes adecuados (Bigelis y cols. 2006).

Los soportes sólidos en la FS pueden consistir de materiales naturales, una variedad de materiales sintéticos especialmente sustancias poliméricas, o

combinaciones de sustancias naturales y sintéticas, tales como fibras de tejido, incubadas en presencia de nutrientes. Pueden considerarse como inertes si son resistentes a la degradación o son pobremente metabolizados. Los sistemas de soporte sólido aplicados a las FS proveen nuevos caminos para manipular variables que influyen el crecimiento y la fisiología del hongo, y así, explotar la diferenciación fúngica y procesos de desarrollo que a menudo están vinculados a las vías del metabolismo secundario que produce compuestos complejos (Calvo 2002).

El cultivo de hongos sobre soportes estáticos, explora varios estímulos ambientales que influyen en el metabolismo, la morfogénesis y la diferenciación, y consecuentemente, los perfiles de producción natural. Las características fisicoquímicas del sistema de soporte y su interacción con el agua disponible, oxígeno y componentes del medio de cultivo son variables principales que pueden influenciar el crecimiento y metabolismo. Otros factores, algunos sutiles, pueden desempeñar un papel como mediadores en la respuesta de los organismos colonizadores sobre el soporte inerte. Estos factores incluyen la  $A_w$ , absorción y retención de agua, disponibilidad de la fase gaseosa en espacios intersticiales y aeración, porosidad, topografía y arquitectura de superficie, mediadores de adhesión, estimulación aérea, así como difusión de nutrientes (Gervais y cols. 1988, Raimbault 1998, Talbot 2003, Verstrepen y cols. 2004, Wosten y cols. 1999). Algunas características del sistema de soporte pueden cambiar significativamente durante las diferentes etapas de crecimiento del cultivo y pueden generar gradientes de las condiciones ambientales que producen limitaciones de nutrientes. El soporte ambiental por sí solo, puede reflejar características sutiles de los hábitats naturales de los hongos. Algunos soportes, tales como papeles de celulosa o sintéticos, pulpas de celulosa, membranas, espumas plásticas, esponjas, partículas porosas inorgánicas y productos agrícolas pueden imitar los sustratos naturales (Bigelis y cols. 2006).

#### *2.4.2. Microorganismos empleados en FS*

Las bacterias, hongos y levaduras son capaces de crecer en sustratos sólidos, aplicados en procesos de FS. Los hongos filamentosos son los mejor adaptados a las condiciones de FS por sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y enzimáticas. La forma de crecimiento en hifas, su tolerancia a actividades bajas de agua y presiones osmóticas altas hacen a estos hongos eficientes y competitivos en condiciones de microflora natural, por ello, sus estudios han sido sobresalientes y abundantes.

### 3. ANTECEDENTES PARTICULARES

#### 3.1. Efecto del medio de cultivo y soporte en la producción de lacasa

El estudio de las lacasas se ha realizado para conocer a los organismos productores, el número de isoenzimas intra y extracelulares, y sus propiedades fisicoquímicas y con fines de caracterización para utilizarlas en procesos de biorremediación. Las enzimas lacasas son producidas por una gran variedad de hongos de pudrición blanca, son enzimas constitutivas, sin embargo pueden ser inducidas por cobre (Palmieri y cols. 2000, Téllez-Téllez y cols. 2005) o medios ricos en nitrógeno (D'Souza y cols. 1999). Éstas se presentan en diversas isoenzimas con diferentes propiedades fisicoquímicas como: peso molecular, puntos isoeléctricos y contenido de carbohidratos. En algunas especies la adición de inductores al medio de cultivo resulta en la biosíntesis de nuevas isoenzimas extracelulares (Durán y cols. 2002).

Se han realizado trabajos de purificación de lacasas provenientes de hongos comestibles, en los cuales sus enzimas son más seguras para ser utilizadas por los humanos. En el caso de *Lentinula edodes* (shiitake), el tercer hongo comestible más importante a nivel mundial, aislaron una enzima lacasa con una masa molecular de 72.2 kDa, y determinaron su sustrato específico, utilizando ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), pirogalol, guayacol, ácido ferúlico, 2,6-dimetoxifenol (DMP) y catecol. La lacasa de este hongo presentó más afinidad por ABTS ( $K_m=0.108$  mM) en comparación con DMP ( $K_m=0.557$  mM) (Nagai y cols. 2002). De Souza y cols. (2002) reportaron la máxima producción de lacasas (8600 U/g de sustrato) obtenidas del extracto crudo enzimático de *P. pulmonarius*, crecido sobre paja de trigo, a los cinco días de crecimiento. La enzima lacasa fue la única fenoloxidasa producida por este hongo en medio sólido, por lo que parece ser que la paja de trigo es un excelente medio para producción de lacasas, probablemente por su composición ligninocelulósica.

Las isoenzimas de lacasas extracelulares producidas por *P. ostreatus* son varias, son enzimas específicas y pueden oxidar una amplia gama de sustratos estructuralmente diferentes (Tlecuitl-Beristain y cols. 2008). Se ha reportado que algunos hongos tienen más de un gen que codifican la enzima lacasa. Se han encontrado cuatro secuencias de ADN en *Rhizoctonia solani*, cinco genes en *Trametes villosa*, tres secuencias genómicas en *P. ostreatus* y dos genes en *Agaricus bisporus* relacionados con la codificación de las lacasas (Giardina y cols. 2010). La regulación de la expresión de estos genes es diferente en cada especie. *P. ostreatus* produce lacasas en varias isoenzimas, la fenoloxidasa POXC es la isoenzima más abundante producida bajo todas las condiciones de crecimiento que ha sido estudiado este hongo. Otras tres isoenzimas purificadas y caracterizadas por este hongo son POXA1w, POXA2 y POXA1b (Palmieri y cols. 1997, Palmieri y cols. 2000). POXA1w exhibe diferencias propias en su contenido de metales, esta enzima contiene átomos de zinc, un átomo de hierro y un átomo de cobre por molécula. La adición de  $\text{CuSO}_4$  en el medio de cultivo aumenta la actividad de lacasa y la producción total de la isoenzima POXA1b, mientras que POXA1w se ve afectada cuando el cobre se añade. Las principales características de POXA1b son muy similares a las de POXA1w, pero POXA1b produce la lacasa clásica de luz visible de espectro UV y contiene cuatro átomos de cobre por molécula. POXA1w y POXA1b son mucho más estables que POXA2 Y POXC en *P. ostreatus* (Palmieri y cols. 2000).

Las lacasas de basidiomicetes han sido ampliamente estudiadas (Kiiskinen y cols. 2004). *Ceriporiopsis subvermispota* (hongo de pudrición blanca) presentó dos isoenzimas, L1 y L2 con pesos moleculares de 71 y 68 kDa respectivamente. En este estudio se mostraron evidencias sobre dependencia con el sustrato empleado de la afinidad de las isoenzimas y el pH óptimo de actividad; con ABTS como sustrato la  $K_m$  de ambas isoenzimas fue la más baja (0.03 y 0.02 mM), con DMP presentaron una  $K_m$  de 2.9 y 7.7, pero los valores más altos de la  $K_m$  (6.3 y 9.0) se obtuvieron al utilizar vanilina (3-metoxi-4-hidroxibenzaldehído) (Fukushima y Kirk 1995).

Klonowska y cols. (2002) compararon dos isoenzimas de lacasas (LAC1 y LAC2) que produce el hongo C30 de pudrición blanca que coloniza las hojas perennes del roble (*Quercus ilex*) y que fue descrito previamente como *Marasmius quercophilus* –sin embargo, reciente evidencia molecular y fenotípica sugiere que pertenece a otro taxón–, donde encontraron claras diferencias entre las dos isoenzimas en los parámetros cinéticos utilizando como sustratos siringaldazina, guayacol y ABTS. Aunque la afinidad de las enzimas por los tres sustratos es baja como lo reflejan los grandes valores de  $K_m$ , LAC2 mostró ser más eficiente en la oxidación de los sustratos. Las diferencias observadas en la cinética pueden ser consecuencia de la variabilidad de ciertos aminoácidos involucrados en la especificidad de la enzima, dependiendo del sustrato.

Das y cols. (1997), en *P. ostreatus* (cepa *florida*) hallaron dos lacasas  $L_1$  y  $L_2$ . Se emplearon diferentes sustratos para determinar la afinidad de ambas isoenzimas. Para  $L_1$  la  $K_m$  fue de 28.5 mM con guayacol y para  $L_2$  fue de 3.13 mM, con o-dianisidina para la isoenzima  $L_1$  los resultados fueron  $K_m = 0.33$  mM y  $L_2$   $K_m = 0.29$  mM. La catálisis sobre guayacol fue más eficiente en  $L_2$  que en  $L_1$ . Muñoz y cols. (1997) encontraron dos isoenzimas de lacasas (I y II) en el medio de cultivo de *Pleurotus eryngii*. La afinidad de ambas isoenzimas por los sustratos utilizados fue similar excepto para DMP,  $\rho$ -hidroquinona y metil- $\rho$ -hidroquinona, con los cuales presentó alta afinidad la lacasa II y catecol en el caso de la lacasa I. Comparando las constantes cinéticas obtenidas con  $\rho$ -metoxifenol y  $\rho$ -anisidina, se observó que la afinidad de ambas isoenzimas fue más alta para compuestos fenólicos que para aminas aromáticas, aunque la proporción de oxidación de  $\rho$ -metoxifenol fue baja en ambos casos, la lacasa I oxidó más eficientemente los fenoles y la lacasa II las aminas.

Hublik y Schinner (2000) purificaron una isoenzima de lacasa de *P. ostreatus* cepa RK 36 que fue inducida por la adición de ácido ferúlico al medio de cultivo. La enzima presentó un peso molecular de 67 kDa y un punto isoeléctrico de 3.6. Los

centros de cobre fueron identificados por espectrometría encontrando T1 que mostró un pico de absorbencia a 604 nm, responsable del color azul de la enzima. También reportó un pico de absorbencia a 324 nm que sugiere la presencia de T3 que forma un centro binucleado. La actividad de la enzima fue estable en un rango de pH de 5-9 con siringaldazina como sustrato y una temperatura óptima de actividad de 50°C.

Múltiples isoenzimas de lacasas con diversas características fisicoquímicas han sido purificadas. En la Tabla 1 se resumen las características más importantes de las enzimas lacasas de diversos basidiomicetos (Baldrian 2006). Se han identificado isoenzimas de pesos moleculares desde 46 hasta 85 kDa, puntos isoeléctricos desde 3.0 hasta 6.9, temperaturas óptimas de actividad para diversos sustratos que van desde 25°C hasta 70°C y pH óptimos para diversos sustratos desde 2.0 hasta 8.0.

Tabla 1. Isoenzimas de lacasas purificadas en diversos hongos. (Baldrian 2006)

Especies	Peso (kDa)	pI	pH óptimo			K <sub>m</sub> (M)				Temperatura óptima (°C)	
			ABTS	DMP	GUA	SIR	ABTS	DMP	GUA		SIR
<i>Agaricus bisporus</i>	96				5.6						
<i>Agaricus bisporus</i>	65	4.0	2.0	5.5		6.0	63	1026	4307	4	
<i>Agaricus blazei</i>	66	4.0									
<i>Lentinula edodes</i> Lcc1	72	3.0	4.0	4.0	4.0		108	557	917		40
<i>Lentinus edodes</i>	65	3.0									
<i>Pleurotus eryngii</i> I	65	4.1	4.5					1400	7600		55
<i>Pleurotus eryngii</i> II	61	4.2	4.5					400	8000		55
<i>Pleurotus florida</i>	77	4.1							30000		
<i>Pleurotus ostreatus</i>	67	3.6				5.8					50
<i>Pleurotus ostreatus</i> POXA1b	62	6.9	3.0	4.5		6.0	370	260		220	
<i>Pleurotus ostreatus</i> POXA1w	61	6.7	3.0	3.0-5.0	NA	6.0	90	2100	NA	130	45-65
<i>Pleurotus ostreatus</i> POXA2	67	4.0	3.0	6.5	6.0	6.0	120	740	3100	140	25-35
<i>Pleurotus ostreatus</i> POXA3a	83-85	4.1	3.6	5.5	6.2		70	14000		36	35
<i>Pleurotus ostreatus</i> POXA3b	83-85	4.3	3.6	5.5	6.2		74	8800		79	35



Tabla 1. Isoenzimas de lacasas purificadas en diversos hongos (Baldrian 2006) (continuación).

Especies	Peso (kDa)	pI	pH óptimo				K <sub>m</sub> (M)				Temperatura óptima (°C)
			3.0	3.0-5.0	6.0	6.0	280	230	1200	20	
<i>Pleurotus ostreatus</i> POXC	59	2.9	3.0	3.0-5.0	6.0	6.0	280	230	1200	20	50-60
<i>Pleurotus pulmonarius</i> Lcc2	46		4.0-5.5		6.0-8.0	6.2-6.5	210		550	12	50
<i>Pleurotus sajor-cajulu</i>	55	3.6	2.1				92				
<i>Trametes gallica</i> me Lac	60	3.1	2.2	3.0	4.0		12	420	405		70
<i>Trametes gallica</i> LacII	60	3.0	2.2	3.0	4.0		9	410	400		70
<i>Trametes hirsuta</i>	64-68	3.7-4.0							63		
<i>Trametes muricolor</i> II	63	3.0									
<i>Trametes ochracea</i>	64	4.7							99		
<i>Trametes pubescens</i> LAP	65	2.6					14	72	360	6	
<i>Trametes sanguinea</i>	62	3.5					30	410			
<i>Trametes trogii</i>	70	3.3-3.6					37	15			55
<i>Trametes versicolor</i>	68		2.5	3.5		4.0					
<i>Trametes villosa</i> un	63	3.5	2.7			5.0-5.5					
<i>Trametes villosa</i> 3	63	6.0-6.5	2.7			5.0-5.5	25	25	420		50
<i>Trametes</i> sp. AH28-2 A	62	4.2			4.5						
<i>Trichoderma</i> sp.	71										

ABTS: ácido 2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazol-6-sulfónico). DMP: 2,6-dimetoxifenol; GUA: 2-metoxifenol (guayacol); SIR: 4-hidroxi-3,5 azino-dimetoxibenaldehído (sinigaldazina). NA: no activa.

Tinoco y cols. (2001) purificaron y compararon ocho isoenzimas lacasas producidas por FS bajo las mismas condiciones del medio de cultivo, de las cuales seis fueron de diferentes cepas de *P. ostreatus*, una de *Coriolopsis gallica* y otra de *T. versicolor*. Los autores reportaron diferencias significativas entre las lacasas con respecto a la afinidad de la enzima ( $K_m$ ) por los sustratos (siringaldazina, ABTS y guayacol) independientemente de la cepa y la especie. Todas las cepas de *P. ostreatus* mostraron un pH de actividad óptimo igual a 5.0 utilizando siringaldazina como sustrato, así como una temperatura de máxima actividad entre 30 y 40 °C. En contraste, las lacasas de *C. gallica* y *T. versicolor* mostraron alta sensibilidad al pH y la temperatura máxima de actividad fue de 7.0 y 50 °C, respectivamente. Los autores atribuyen las variaciones a las diferencias en los niveles moleculares que afectan significativamente la catálisis.

Tlecuilt-Beristain y cols. (2008) evaluaron la producción de lacasas durante las diferentes fases de crecimiento de *P. ostreatus* en FL, la cual fue correlacionada positivamente con dicho crecimiento. La tasa específica de crecimiento fue  $0.02 \text{ h}^{-1}$ , la biomasa máxima  $7.8 \text{ g L}^{-1}$  (480 h) y la actividad de lacasas máxima  $12200 \text{ U L}^{-1}$  (432 h). Los zimogramas para lacasas revelaron la producción de 4 isoenzimas, una de ellas producida durante toda la fermentación y las restantes solo durante la fase estacionaria. Por otro lado, Téllez-Téllez y cols. (2005) evaluaron la actividad de lacasas de varias cepas del género *Pleurotus* que presentaron actividad intracelular y extracelular sobre diversos sustratos. La actividad fue diferente debido a la presencia de diferentes isoenzimas y a sus patrones de secreción. El número de isoenzimas fue dependiente de la especie de cada cepa.

En un estudio realizado sobre el extracto extracelular de dos cepas de *P. ostreatus* (ATCC-38537 y ATCC-58052) desarrolladas en FL, Degollado-Estrada (2008) mostró que no es suficiente contar con un organismo de pudrición blanca para garantizar la producción de lacasas, sino que también es necesario encontrar la mejor cepa productora. Muchos reportes describen que la producción de enzimas

ligninolíticas depende fuertemente de la cepa, sustrato y las condiciones de cultivo (Stajic y cols. 2006, Tlecuítl-Beristain y cols. 2005, Membrillo y cols., 2008).

Desde la década pasada, muchos estudios acerca de la aplicación de la FS han sido enfocados en proporcionar valor adicional a los residuos agroindustriales; ciertos procesos han sido desarrollados para mejorar el contenido de proteína en residuos de frutas ricos en almidón, producción de enzimas y síntesis de metabolitos (Pandey 2003). En general, en esos procesos las fuentes de nutrientes son simultáneamente el soporte físico para crecimiento microbiano. Por lo tanto, la degradación del sustrato depende de las propiedades físicas de los materiales incluyendo la naturaleza cristalina o amorfa, área accesible, área superficial, porosidad y principalmente el tamaño de partícula (Pandey 2003, Viniegra-González y cols. 2003). Membrillo y cols. (2011), evaluaron la proporción geométrica del tamaño de partícula de sustrato para *P. ostreatus* encontrando que la forma y tamaño de las fibras de bagazo de caña tienen gran influencia en la densidad de embalaje para el sustrato, con un impacto en la producción de enzimas extracelulares, las tasas de crecimiento y cambios en la composición del sustrato, mostrando también que, la lignina y la celulosa se degradan mejor en partículas pequeñas.

Membrillo y cols. (2008) analizaron el efecto de la adición de sulfato de amonio sobre la producción de enzimas ligninolíticas en FS en dos cepas de *P. ostreatus* (IE-8 y CP-50). El sustrato empleado fue bagazo de caña de azúcar (C:N=142) en mezclas de partículas heterogéneas con promedio de 2.9 mm y partículas de dos tamaños (0.92 mm y 1.68 mm). La cepa CP-50 obtuvo los valores de proteína más altos en el medio de cultivo adicionado con sulfato de amonio, 48% adicional en tamaño de partícula 1.68 mm). Sin embargo, la cepa IE-8 produjo los niveles mayores de todas las enzimas: xilanasas  $5.79 \text{ U L g peso seco}^{-1}$  en partículas de 2.9 mm y celulasas  $0.18 \text{ U L g peso seco}^{-1}$  en partículas menores, ambos sin adición de sulfato de amonio. La actividad de lacasas mayor se obtuvo cuando se emplearon

partículas de 1.68 mm en presencia de sulfato de amonio ( $0.040 \text{ U L g peso seco}^{-1}$ ). Los autores atribuyen los resultados a las diferencias intrínsecas que existen entre las cepas, por lo tanto no puede asumirse como un perfil característico.

Las fuentes de carbono en el medio de cultivo tienen un rol importante en la producción de enzimas ligninolíticas. Mansur y cols. (2003) mostraron que el uso de fructosa en lugar de glucosa resultaba en el incremento de 100 veces la actividad de lacasas de basidiomicetes y las enzimas ligninolíticas son producidas durante el metabolismo secundario en condiciones de nitrógeno limitado. Sin embargo, en *P. ostreatus* una concentración elevada de nitrógeno en el medio de cultivo (34 mM, N como glutamato) no reprime, ligeramente estimula la mineralización de la lignina, en comparación con un medio de cultivo con N limitado. Para estudiar los efectos de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo sobre la actividad de lacasas y peroxidasas producidas por cepas del género *Pleurotus* (2 cepas de *P. ostreatus*, una de *P. eryngii* y una de *P. pulmonarius*), Stajic y cols. (2006) seleccionaron diversas fuentes de carbono (carboximetilcelulosa, celulosa, glucosa, maltosa, D-manitol, D-ácido glucónico, xilano, cáscara de mandarina y desechos de uva para vino) y de nitrógeno (cloruro de amonio, nitrato de amonio, fosfato monobásico de amonio, sulfato de amonio, nitrato de potasio, peptona bacteriológica y ácido caseíco hidrolizado libre de vitaminas). Se detectó actividad de lacasas en FS y FL, y en todas las cepas estudiadas, mientras que la producción de peroxidasas solo ocurrió bajo condiciones de FS. La mayor actividad de lacasas se localizó en FL con cáscara de mandarina ( $999.5 \text{ U L}^{-1}$ ). En las diversas fuentes de nitrógeno probadas se encontró actividad de lacasas y peroxidasas, pero los niveles menores se encontraron en la cepa de *P. eryngii*. Los autores concluyeron que la producción de lacasas y peroxidasas depende de las cepas y cepas del género *Pleurotus*, condiciones de cultivo, fuente de carbono y concentración de nitrógeno.

Elisashvili y cols. (2008) evaluaron la actividad de las enzimas ligninolíticas producidas por siete hongos de pudrición blanca (*Cerena maxima*, *Funalia trogii*,

*Trametes pubescens*, *T. versicolor*, *Coriolopsis polizona*, *Pycnoporus coccineus* y *P. ostreatus*) bajo condiciones de FS y FL, y el efecto de una fuente adicional de nitrógeno en la actividad enzimática. Las mayores actividades de endoglucanasas y xilanasas se encontraron en FL con cáscara de plátano por *P. coccineus*. En las mismas condiciones *C. máxima* acumuló la producción mayor de lacasas (7620 U L<sup>-1</sup>). La suplementación de nitrógeno al medio de cultivo control tuvo un efecto negativo en la producción de todas las enzimas en FS con paja de trigo y hojas de árboles. Los autores reportaron que el rendimiento de las enzimas depende significativamente de las especies de hongos, el sustrato lignocelulósico y método de cultivo.

Respecto a la temperatura de cultivo, Snajdr y Baldrian (2007) evaluaron la actividad enzimática en cultivos de *P. ostreatus* y *T. versicolor* con celulosa como única fuente de carbono. Los hongos fueron capaces de crecer y producir lacasas y MnP en un rango de temperatura de 5-35°C, logrando la máxima producción en 25-30°C en *P. ostreatus* y 35°C en *T. versicolor*. La producción de ambas enzimas a 10°C solo alcanzó de 4 a 20% del valor máximo. La temperatura óptima para la actividad enzimática de lacasas fue 50 y 55°C para *P. ostreatus* y *T. versicolor* respectivamente, y 60°C para MnP. Las temperaturas que provocaron la pérdida del 50% de actividad después de 24 h, fueron 32 y 47°C para lacasas y 36 y 30°C para MnP de *P. ostreatus* y *T. versicolor*. La actividad de enzimas pareciera ser despreciable a temperaturas relativamente altas, las cuales podrían influenciar durante la colonización del sustrato. Los autores explican que en condiciones naturales, ocurren cortos periodos de alta temperatura en la superficie de troncos y pueden incrementar la inactivación por calor de las enzimas o inducir una respuesta de *shock* de calor.

Juárez-Hernández (2006) verificó que el incremento en la cantidad de fuente de carbono está relacionado con el incremento de la producción de enzimas, mediante el aumento en la concentración de glucosa en el medio de cultivo. Los resultados mostraron que se logró un incremento de actividad, sin embargo, éste es

considerable cuando está acompañado por un cambio en la concentración de cobre y de inóculo.

Díaz y cols. (2011) compararon el crecimiento de seis cepas de *P. ostreatus* desarrolladas bajo FL modificando la concentración de cobre en los medios de cultivo. Los resultados determinaron que la concentración de Cu fue tóxica para algunas cepas e inhibió su desarrollo mientras que otras, fue observado crecimiento rápido y con mayor rendimiento de biomasa. Encontraron que estas cepas compartían 2 isoenzimas de lacasas las cuales podrían ser constitutivas. En la cepa Po83 reportaron la presencia de hasta 4 isoenzimas de lacasas. Estudios comparativos sobre la producción de lacasas de *P. ostreatus* en FL y FS con soporte inerte realizados por Téllez-Téllez y cols. (2008) sugieren mayor productividad y actividad de lacasas en FL, lo cual resulta ser un comportamiento atípico de este hongo, pues otros autores han reportado ventajas de la FS en producción de enzimas (Viniestra-González y cols. 2003, Téllez-Jurado y cols. 2006).

Krishna y cols. (2005) estudiaron la producción de lacasas por inmovilización de *P. ostreatus* 1804 sobre espuma de poliuretano respecto a la composición del medio de cultivo en sistemas por lotes y reactores de lecho empacado. Las condiciones de cultivo estudiadas (biomasa, pH, concentración de sustrato, concentración de nitrógeno, concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  y concentración de alcohol) mostraron influencia significativa en el rendimiento de lacasas. En comparación con el micelio libre, *P. ostreatus* inmovilizado obtuvo mayor actividad de lacasas en matraces con agitación. Respecto al pH del medio de cultivo, el pH 5.5 fue donde se encontró mayor actividad de lacasas. Sin embargo, no especifican el sistema de fermentación empleado en esta fase experimental.

### 3.2. Efecto del pH en la producción de lacasas

Ha sido mostrada la capacidad de *P. ostreatus* de desarrollarse y producir lacasas a pH diferentes al óptimo (6.5). Díaz (2009) evaluó el efecto del pH de desarrollo de *P.*

*ostreatus* sobre la actividad de lacasas obtenidas mediante FL. Observó que algunas enzimas lacasas producidas a cierto pH presentaron actividad en pH diferente, por lo que se concluyó que el pH de producción de lacasas no es el mismo que el pH óptimo de crecimiento del hongo, ni de la actividad de lacasas.

Mansur y cols. (2003) evaluaron la actividad de lacasas y purificaron y caracterizaron 4 isoenzimas de lacasas sintetizadas por *P. ostreatus* (cepa V-184). Los cultivos mostraron el pico máximo de actividad en el día 5 (310 mU mL<sup>-1</sup>) en un medio de cultivo (Mansur y cols. 1997) ajustado a pH 6, durante 16 días. Después del día 5, fue observado un decremento paralelo del valor de pH (de 6 a 4 al final del crecimiento y de 10 veces la actividad de lacasas (30 mU mL<sup>-1</sup>). Los autores sugieren que la actividad de lacasas está relacionada con el valor de pH del medio de cultivo. Para confirmar, realizaron pruebas en medio de cultivo sintético en 2 pH: 4.5 y 6.5. En pH 6.5 la actividad fue mayor que aquella observada en pH 4.5 alcanzando 2.4 U mL<sup>-1</sup> y 0.8 U mL<sup>-1</sup> determinada con guayacol y ABTS, respectivamente.

Actualmente, no existen estudios que reporten el efecto que tiene el pH de crecimiento en *P. ostreatus* evaluado sobre la actividad de lacasas, obtenidas a través de FS empleando un soporte inerte. Tavares y cols. (2006) reportaron el efecto que tienen la concentración inicial de glucosa (0 y 9 g L<sup>-1</sup>), agitación (100 y 180 rpm) y pH (3.0 y 5.0) sobre la producción de lacasas obtenidas por *T. versicolor* a través de un modelo de optimización de producción de lacasas en un biorreactor. Observaron que el pH del medio de desarrollo tiene un desempeño importante en la producción de lacasas, encontrando en la concentración de 11 g L<sup>-1</sup> de glucosa y pH de 5.2, las condiciones óptimas de modelado. El valor teórico de actividad de lacasas fue 10000 U L<sup>-1</sup> y el experimental 11403 U L<sup>-1</sup>.

En otro estudio, se evaluó la producción de biomasa y de lacasas por el hongo comestible nigeriano *Schizophyllum commune* en medio líquido (Adejoye y Fasidi 2009). El pH inicial fue ajustado a 4.0, 5.5, 6.5, 7.0 y 8.5, donde el pH óptimo

en el cual se obtuvo mayor rendimiento de biomasa y mayor actividad catalítica de lacasa fue 5.5. Por lo que respecta a los pH 4.0 y 8.5, también se encontró rendimiento de biomasa y actividad de lacasas deseables. La producción de lacasas del ascomicete *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 no presentó efecto debido a la modificación del pH inicial de medio de cultivo (3.5-8.0), sin embargo, el mismo medio de cultivo adicionado con alcohol veratrílico mostró un incremento de hasta 15 veces cuando el pH se incrementó de 4.0 a 5.5 (Dekker y cols. 2007). El pH óptimo inicial fue 5.5-6-5, similar a lo reportado por otros autores para la producción de lacasas por *P. ostreatus* (Macaya-Lizano 1975, Sánchez y Viniegra-González 1996, Madeiros y cols. 1999).

Por otro lado, Zawadi y cols. (2008) evaluaron el efecto del pH y la velocidad de agitación sobre el crecimiento y producción de xilanasas por *A. oryzae*. Se observó que la producción de las enzimas se afectó, puesto que a pH de 7.5 la velocidad de crecimiento y producción de estas enzimas fue mayor respecto a lo observado a pH 4.

En un estudio realizado con el basidiomiceto *T. pubescens* cultivado sobre un recipiente agitado sin control de pH (Galhaup 2002), se observó que éste disminuyó al inicio del cultivo y se incrementó después del agotamiento de glucosa, periodo donde se reportaron los títulos más elevados de actividad de lacasas. El autor concluyó que la actividad de lacasas parece depender más de la concentración de glucosa que del pH del medio de cultivo.

### 3.3. Aplicaciones de lacasas

Las enzimas ligninocelulolíticas de basidiomicetos son de fundamental importancia para la eficiente bioconversión de residuos de plantas y tienen prospectiva en algunas aplicaciones biotecnológicas en industrias de pulpa y papel, alimentos, textil y colorantes, biorremediación, cosméticos bioquímica analítica, entre otras. El potencial de la aplicación de estas enzimas en tecnologías ambientales e industriales



requiere grandes cantidades de estas enzimas a bajo costo (Elisashvili y cols. 2008). Por lo tanto, es necesario seleccionar nuevos organismos que produzcan gran cantidad de enzimas y desarrollar estrategias para su sobreproducción.

### 3.3.1. *Industria textil*

Las enzimas han atraído interés en la decoloración y degradación de colorantes textiles e industriales de las aguas residuales, como alternativa a los tratamientos convencionales químicos, físicos y biológicos los cuales poseen limitaciones importantes.

La producción total mundial de colorantes es estimada en 800000 ton año<sup>-1</sup>. Más de 100000 colorantes están comercialmente disponibles y al menos de 10-15% de ellos, son introducidos al ambiente como residuos. Debido a su estructura química, los colorantes son resistentes a la degradación por la exposición a la luz, agua y a algunos químicos (Husain 2001).

El tratamiento enzimático es atractivo debido a la acción de las enzimas sobre los contaminantes, aún cuando éstos se encuentran en soluciones diluidas y recalcitrantes a la acción de microorganismos que participan en la degradación de los colorantes. El potencial de las enzimas (peroxidasas, MnP, LiP, lacasas, polifenol-oxidasas y azoreductasas) ha sido explotado en la decoloración y degradación de colorantes.

Los colorantes reactivos azo forman la clase más grande de colorantes sintéticos solubles en agua y poseen la mayor variedad de colores y estructuras. Generalmente, son resistentes a la degradación aerobia (Chivukula y Renganathan 1995). Durante el proceso de tinción, la mayoría de estos colorantes son hidrolizados y después liberados en cuerpos de agua. Sin embargo, gran parte de ellos, no son tóxicos por sí mismos, sino que al liberarlos al ambiente, pueden convertirse en

aminas potencialmente carcinogénicas que pueden tener impacto en el ecosistema (Husain 2001).

Los métodos fisicoquímicos empleados en la decoloración y degradación de colorantes son oxidación química, ósmosis inversa, coagulación-floculación, filtración, adsorción y foto-degradación. Tienen severas limitaciones: alto costo, alta concentración de sales en el efluente y problemas relacionados con disposición final de concentrados. La ozonificación, coagulación, floculación y métodos electroquímicos no presentan resultados favorables pues se alcanzan bajos rendimientos de decoloración. La coagulación química y ósmosis inversa logran remover grandes cantidades de colorantes pero el costo de dichos procesos es elevado. Entre estos métodos, la coagulación y la adsorción son los más empleados, pero crean volúmenes grandes de lodos contaminantes originándose un nuevo problema.

Los procesos biológicos son más efectivos comparados con los métodos convencionales. La contaminación de cuerpos de agua por residuos de colorantes emitidos por industrias textiles y de colorantes representa la mayor preocupación ambiental. Sin embargo, los procesos biotecnológicos representan una alternativa para el tratamiento de efluentes contaminados por colorantes, pues, muchas bacterias y hongos se han utilizado para el desarrollo de procesos de tratamiento de estos efluentes. El uso de hongos de pudrición blanca degradadores de lignina ha atraído atención porque tienen la capacidad de degradar un rango amplio de contaminantes orgánicos recalcitrantes, incluyendo a colorantes azo, heterocíclicos y poliméricos (Abadulla y cols. 2000, Wesenberg y cols. 2003). El método que incluye la decoloración de contaminantes con dichos hongos, se emplea cuando el principal objetivo no es la completa mineralización, pero sí se pretende lograr la remoción del color. Esto ocurre cuando, por medio del micelio fúngico se adsorbe gran proporción del colorante, ya sea que se logre degradación o mediante la combinación de adsorción y degradación (Aretxaga y cols. 2001).

Se han desarrollado muchos sistemas de biorreactores basados en hongos (Wesenberg y cols. 2003). Por ejemplo, se emplearon cultivos de *T. versicolor* para formar una película estática en un disco rotatorio en reactores decolorantes (Kapdan y Kargi 2002). Se reportó el diseño un biorreactor de cama empacada basado en la inmovilización de células del hongo de pudrición blanca *Pycnoporus cinnabarinus* para tratar el efluente de una industria de pigmentos (Schliephake y cols. 1993). Domínguez y cols. (2001) diseñaron un biorreactor de tambor giratorio que contenía células de *Phanerochaete chrysosporium* creciendo sobre esponja de *nylon* con el potencial de degradar un colorante polimérico modelo.

Las lacasas decoloran algunos colorantes azo sin la directa escisión del enlace azo mediante un mecanismo altamente no específico de radical libre, de tal modo se evita la formación de aminas aromáticas tóxicas (Chivukula y Renganathan 1995). Rodríguez y cols. (1999) emplearon hongos de pudrición blanca para la decoloración de 23 colorantes industriales. Se determinó la actividad de lacasas, MnP, LiP y aril alcohol oxidasas en los extractos crudos de 16 cepas diferentes de hongos desarrollados sobre avena entera. Todas las cepas de *P. ostreatus* mostraron altas actividades de lacasas y MnP, sin embargo, la actividad mayor fue encontrada en *Trametes hispida*. El cultivo sólido sobre avena entera mostró mayor actividad de lacasas y MnP en comparación con el cultivo en medio líquido complejo. La actividad de lacasas fue correlacionada solo con la actividad de decoloración en los extractos crudos.

Marques y cols. (2002) describieron la producción de lacasas por una cepa brasileña de *P. pulmonarius* en FS empleando salvado de trigo como sustrato. Entre las enzimas oxidativas y lignolíticas evaluadas estuvieron lacasas, aril alcohol oxidasas, LiP, MnP, xilanasas y celulasas. Las lacasas fueron las principales enzimas producidas y su actividad se correlacionó con la habilidad del extracto crudo para decolorar muchos colorantes industriales.

Se investigó la habilidad de una cepa brasileña de *P. pulmonarius* para decolorar estructuralmente diferentes colorantes sintéticos (incluyendo colorantes azo, trifenilmetano, heterocíclicos y poliméricos) en cultivos sólidos y sumergidos, los cuales fueron capaces de decolorar parcial o completamente 8 de 10 colorantes (negro amido, rojo congo, azul de tripano, verde de metilo, azul brillante de remazol, violeta de metilo, violeta de etilo, azul brillante de cresil). No se observó decoloración del azul de metileno y poli R 478 por parte de las 4 enzimas oxidantes. La decoloración y actividad de lacasas fue igualmente afectada por el pH y la temperatura. Por lo tanto, concluyeron que la lacasa es la enzima que está más involucrada en la habilidad de *P. pulmonarius* para decolorar colorantes industriales (Zilly y cols. 2002).

Otro estudio indica el empleo de una preparación de lacasas de cultivos de *P. ostreatus* suplementada con cobre y ácido ferúlico para decolorar el colorante antraquinónico RBBR. El desarrollo de este sistema enzimático fue examinado y este tratamiento catalizó 70% de la decoloración en condiciones óptimas (Palmieri y cols. 2005).

Otros autores, evaluaron el efecto de la combinación del tratamiento con lacasas y ultrasonido en la descomposición de colorantes azo. El tratamiento con lacasas mostró alta tasa de decoloración pero no degradó todos los colorantes investigados y su alta fuerza aniónica llevó a la desactivación enzimática. El tratamiento ultrasónico logró decolorar todos los colorantes estudiados después de 3 horas a alta energía y, la prolongada sonicación llevó a la formación de especies iónicas no tóxicas, esto, mostrado por cromatografía de intercambio iónico y pruebas de toxicidad. Se ha mostrado que la aplicación de tratamientos de lacasas y ultrasónicos tienen efectos sinérgicos, los cuales resultan en mayores tasas de degradación (Tauber y cols. 2005).

### 3.3.2. *Industria alimentaria*

Las lacasas pueden ser aplicadas a ciertos procesos para mejorar o modificar la apariencia de los productos como comida o bebidas. La remoción selectiva de derivados fenólicos también es requerida en la estabilización de bebidas, tales como jugo de frutas, vinos y cerveza (Minussi 2002), aunque en estos casos, es necesario que las enzimas se encuentren inmovilizadas porque no han sido aprobado emplearlas como un aditivo alimentario. Adicionalmente, se ha comercializado una lacasa para preparar tapones de corcho para botellas de vino, donde la enzima oxidativamente disminuye manchas en el corcho y/o sabor astringente que frecuentemente adquieren las botellas al ser añejadas (Conrad 2000, Xu 2005).

Las lacasas actualmente presentan interés en horneado debido a su habilidad para reticular biopolímeros. Así, Selinheimo y cols. (2006) mostraron que una lacasa de *Trametes hirsuta* incrementó al máximo la resistencia de masa preparada con harina de trigo y con gluten y también disminuyó su extensibilidad.

### 3.3.3. *Biorremediación*

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos junto con otros xenobióticos son la mayor fuente de contaminación en suelos, por lo tanto, su degradación es de gran importancia para el ambiente. Las propiedades catalíticas de las lacasas pueden ser explotadas para la degradación de dichos compuestos. Las lacasas fueron capaces de mediar el acoplamiento de la reducción de los metabolitos del 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) a una matriz orgánica, la cual resultó en la detoxificación de residuos de municiones (Durán y Esposito 2000). Por otra parte, los hidrocarburos policíclicos aromáticos que son producidos por los depósitos naturales de aceite y por la quema de combustibles fósiles, también pueden ser degradados por las lacasas (Pointing 2001).

Se ha investigado la oxidación del sustrato directo de derivados fenólicos, que resulta de acoplamientos de oxidación catalizados por lacasas, para uso en

biorremediación para descontaminar efluentes industriales. Son usualmente insolubles y pueden ser separados fácilmente por filtración o sedimentación (Torres 2003).

#### 3.3.4. *Lacasas y sistemas de mediadores químicos*

La estructura de la madera puede representarse como un aglomerado de fibras largas y delgadas (principalmente celulosa y hemicelulosa) y lignina, la cual se encuentra presente en la mitad de la lamela, donde actúa como pegamento natural, y, en la pared celular secundaria, donde actúa como matriz y forma vínculos entre las cadenas de celulosa y hemicelulosa (Riva 2006).

Para producir pulpa de papel, es necesario eliminar la lignina, por métodos mecánicos o químicos, particularmente para la producción de “pulpa *kraft*” (obtenida después de cocinar fibras de madera con NaOH y Na<sub>2</sub>S), la cual se empleará más tarde en el proceso y se convertirá en papel. Los procesos químicos de obtención de pulpa *kraft* emplean fuertes químicos para eliminar la fracción de lignina que esta enlazada a las fibras (también llamado proceso de blanqueo). Tradicionalmente, se adicionaba Cl<sub>2</sub>, Cl<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub> al término del proceso de blanqueo, pero actualmente, el uso de Cl<sub>2</sub> ha sido prohibido y el de Cl<sub>2</sub>O ha sido restringido (Riva 2006).

Se sabe que los hongos de pudrición blanca degradan lignina mediante una mezcla de enzimas oxidativas –incluyendo a las lacasas–. Se ha mostrado que el tratamiento de la pulpa con lacasas no cataliza la degradación de lignina pero si permite cambios menores estructurales y repolimerización (Bajpai 1999). Para explicarlo de manera clara, se elaboró la hipótesis que argumenta que las moléculas pequeñas pueden actuar como transportes *redox* entre el sitio activo de la enzima y el núcleo de lignina y provocar pérdida de ramificaciones y degradación del polímero. Actualmente, esta consideración se ha estudiado ampliamente mediante la evaluación de mediadores químicos como el ácido 3-hidroxiantranílico en la degradación de lignina catalizada por lacasas. El primer mediador artificial empleado

en un sistema lacasa-mediador para delignificación en pulpa fue ABTS introducido en 1990 (Bourbonnais y Paice 1990). Éste sistema, ha sido introducido en la industria textil, específicamente para la oxidación de índigo en prendas de mezclilla en la fase de lavado industrial. El cromóforo colorante se divide para producir dos moléculas de isatina, molécula que no presenta color. El sistema comprende una formulación granular de lacasa recombinante de *Mycelyophthora thermophila*, aplicada con el mediador metil-éster de ácido siríngico, en tratamientos de 15 a 20 minutos por ciclo (Galante y cols. 2003).

Se conoce que en el proceso de delignificación mediado por lacasas, los mediadores *redox* conducen a las enzimas hacia la oxidación de sustituyentes no fenólicos, particularmente de grupos alcohol bencílicos en muchos compuestos similares a la lignina, por ejemplo, la oxidación de adlerol a su cetona correspondiente, adlerona (Figura 6) (Barreca 2003).

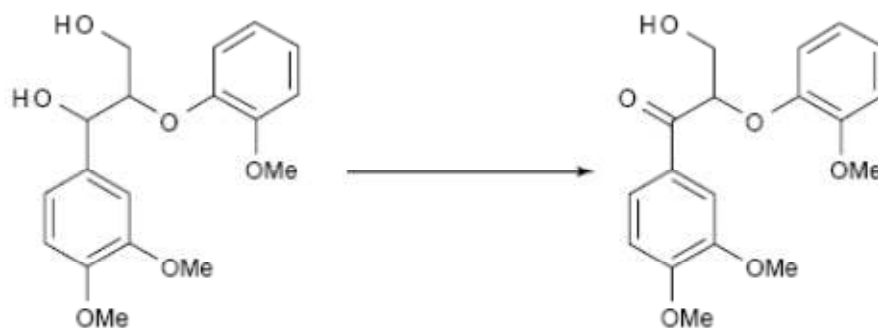


Figura 6. Oxidación de adlerol a adlerona (Rivas 2006)

Como extensión lógica a estos resultados, se ha aplicado esta biotransformación a la oxidación de los alcoholes bencílico (Fabrini 2001), alílico

(Fritz-Langhal y cols. 2003), propargílico (Barilli 2004) y alifáticos (Fabrini 2001) a sus correspondientes cetonas y aldehídos (Figura 7).



Figura 7. Oxidación de alcoholes bencílicos a su correspondientes aldehídos (Rivas 2006)

### 3.3.5. Aplicaciones sintéticas

La preparación enzimática de polifenoles poliméricos por acción de varias oxidoreductasas se ha investigado como una alternativa viable y no tóxica, a la producción habitual de estos compuestos basada en formaldehído (Uyama y Kobayashi 2003). Un ejemplo inusual de la explotación de lacasas en esta área es la preparación del “urishi artificial”, análogo a la laca oriental, urishi: savia resinosa natural producida por el árbol *T. vernicifluum* (Yoshida 1883) por medio de la polimerización enzimática y subsecuente curado de los derivados de catecol (Kobayashi 2001).

Un posible uso de los radicales generados por lacasas es una reacción de acoplamiento cruzado con una molécula diferente, donde los reactivos intermedios son atrapados y no dan lugar a la usual familia de derivados. Esta propuesta no ha sido estudiada a fondo, sin embargo, existen algunos ejemplos significativos, el acoplamiento del ácido dihidrocafeico y ácido 4-aminobenzoico (Figura 8) produce ácido 3-[6-(4-carboxifenil) amino-3,4-dihidroxifenil]- propiónico como principal producto en rendimiento de 80% (Mikolasch 2003) y; el acoplamiento de *p*-hidroquinonas y aminas aromáticas (Manda 2005, Niedermeyer 2005).



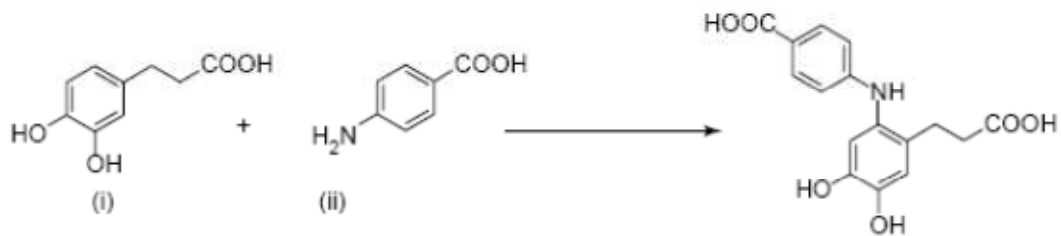


Figura 8. Producto de reacción de acoplamiento obtenido del ácido dihidrocafeico (i) y ácido 4-aminobenzoico (ii) (Rivas 2006).

Semenerov (1993) reportó el uso de lacasas en la síntesis de péptidos, en la cual se removieron grupos selectivos de fenilhidrazida mediante un proceso ligero, en el que no se ocasionaba modificación oxidativa destrucción de cadenas laterales de metionina o triptófano.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Se ha sugerido que la producción de las lacasas está influenciada por un gran número de factores ambientales tales como el pH, temperatura, tipo de cultivo y composición del medio (Giardina y cols. 1999, Téllez-Téllez y cols. 2008). Si las redes regulatorias que modulan la producción natural son manipuladas durante una fermentación, es posible generar nuevos conocimientos sobre el crecimiento del microorganismo y los metabolitos producidos durante el proceso. Hasta el momento existen mínimos reportes que evalúen el efecto del pH en dicha producción (Díaz, 2009), además, el uso de un soporte inerte en el desarrollo de la FS permitiría comprender mejor la fisiología de los microorganismos. Por lo que este trabajo de investigación pretende evaluar el efecto del pH en el crecimiento de *P. ostreatus*, sobre la producción de las enzimas lacasas obtenidas a través de FS utilizando espuma de poliuretano como soporte inerte.

## 5. HIPÓTESIS

El pH del medio de cultivo es un factor que regula la producción de lacasas de *Pleurotus ostreatus*.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del pH inicial de crecimiento de *P. ostreatus* sobre la producción de lacasas obtenidas por FS.

### 6.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar la FS sólida sobre soporte inerte para producción de lacasas de *P. ostreatus* en diferentes condiciones de pH inicial de crecimiento del hongo.
2. Determinar a través de zimografía el número de isoenzimas de lacasas producidas en cada una de las condiciones evaluadas de pH inicial de crecimiento del hongo.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Organismo y condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa de *Pleurotus ostreatus* 32783 de la American Type Culture Collection (Maryland, USA). Se preparó un medio que contenía (en g L<sup>-1</sup>): glucosa, 10; extracto de levadura, 5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.6; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.25; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.05; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.05; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.001. El pH fue ajustado a 3.5, 4.5, 6.5, 7.5 y 8.5 con NaOH 0.1M o HCl 0.1M, según sea el caso. El inóculo para cada matraz de fermentación fue 3 fragmentos de micelio (4mm de diámetro) tomados de la periferia de una colonia crecida sobre agar extracto de malta a 25 °C durante 7 días. La FS se llevó a cabo en un matraz de 250 mL conteniendo 1 g de espuma de poliuretano (PUF; 17 kg m<sup>-3</sup>) en cubos (0.5 x 0.5 x 0.5 cm) (Díaz-Godínez y cols. 2001) como soporte inerte impregnado con 30 mL del medio de cultivo estéril. Previamente, los cubos fueron lavados dos veces con agua destilada, secados en horno a 60°C por 24 h, y después puestos en autoclave a 120°C por 15 min. Los cultivos fueron incubados por 21 días a 25°C.

### 7.2. Extracto enzimático y evaluación de biomasa

El extracto enzimático (EE) de los cultivos crecidos bajo condiciones de FS se obtuvo por filtración. Los cubos de PUF fueron lavados tres veces con agua destilada para remover todos los remanentes del EE y después secados en horno a 60°C por 24 h. La biomasa se determinó por diferencia de peso (Díaz-Godínez y cols. 2001). La evaluación de la biomasa fue realizada por medio de la ecuación logística o de Velhurst-Pearl (Díaz-Godínez y cols. 2001):

$$\frac{dX}{dt} = \mu \left( 1 - \frac{X}{X_{m\acute{a}x}} \right)$$

La solución de la ecuación:

$$X = \frac{X_{m\acute{a}x}}{(1 + Ce^{-\mu t})}$$

Donde,  $\mu$  es la tasa de crecimiento específico,  $X_{m\acute{a}x}$  es el valor de biomasa máximo y  $C$  es una constante definida por:

$$C = \frac{X_{m\acute{a}c} - X_0}{X_0}$$

El rendimiento teórico de la enzima con respecto a la biomasa ( $Y_{E/X}$ ) se estimó como la relación entre la  $E_{m\acute{a}x}$  ( $U L^{-1}$ ) y  $X_{m\acute{a}x}$  ( $g L^{-1}$ ). Se calculó la productividad para la actividad máxima enzimática ( $Pro = E_{m\acute{a}x} \text{ tiempo de fermentación}^{-1}$ ), además de la tasa específica de formación de la enzima ( $q_p = \mu Y_{E/X}$ ) y la tasa específica de consumo de sustrato ( $q_s = \mu Y_{X/S}^{-1}$ ). Los rendimientos teóricos de la biomasa y de la enzima con respecto del sustrato ( $Y_{X/S}$  y  $Y_{E/S}$ ) se estimaron mediante la relación de  $X_{m\acute{a}x}$  y  $E_{m\acute{a}x}$  entre el sustrato.

### 7.3. Determinación de actividad enzimática de lacasas

La actividad enzimática de lacasas ( $E$ ) se determinó en los EE obtenidos en cada punto de la fermentación utilizando DMP como sustrato. La mezcla de reacción fue preparada con 950  $\mu L$  de DMP (2mM en buffer a pH de 3.5, 4.5, 6.5, 7.5 y 8.5) y 50  $\mu L$  de EE. La absorbencia fue leída después de 1 min de reacción a 40°C a una longitud de onda de 468 nm. Una unidad de actividad de lacasas ( $U$ ) se consideró como la cantidad de enzima que provocó un incremento de una unidad de absorbencia por minuto.

### 7.4. Determinación de actividad enzimática de proteasas

La actividad de proteasas se determinó en los EE obtenidos en cada punto de la fermentación por la cuantificación de aminoácidos aromáticos liberados en la mezcla de reacción (450 $\mu L$  caseína al 1% en buffer de fosfatos 0.1M y pH de 6.5 y 50  $\mu L$  de EE), incubada a 35°C por 15 min. La reacción se detuvo por la adición de 750  $\mu L$  de ácido tricloroacético al 5%. La mezcla se centrifugó a 15000 rpm por 15 min a 4°C. Se leyó la absorbencia del sobrenadante a 280 nm. Una unidad de actividad de proteasas se consideró como la cantidad de enzima que liberó aminoácidos

aromáticos provocando un cambio de una unidad en la absorbencia por min de incubación.

#### 7.5. Determinación de azúcares reductores

La concentración de azúcares reductores se determinó en el EE mediante el método de DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico) (Miller 1959). A 50  $\mu$ L de EE se le adicionaron 2 mL de DNS y 950  $\mu$ L de agua destilada. La mezcla de reacción se llevó a ebullición en baño María durante 5 min. Posteriormente, se detuvo la reacción cambiando el agua caliente por agua fría. Se leyó absorbencia a 575 nm. Se elaboró una curva de calibración con concentraciones conocidas de glucosa.

#### 7.6. Determinación del pH de los extractos crudos enzimáticos

Se determinó el pH de cada uno de los extractos crudos enzimáticos por potenciometría.

#### 7.7. Identificación de isoenzimas con actividad de lacasas

En cada muestreo de la fermentación se determinó el número de isoenzimas presentes en los EE a través de zimografía. Ésta se realizó usando la técnica modificada de Leammli (1970) usando dodecil sulfato de sodio en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). La concentración de SDS fue de 0.1% en el gel. El buffer de la muestra contuvo: 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 35% de glicerol, 0.01% de azul de bromofenol y 10% de SDS. Las muestras del EE se separaron en geles de 0.75 mm de espesor en un sistema de electroforesis Mini Protean III (Bio-Rad) a 150 v de 1 a 1.25 h. Después de la corrida, los geles se lavaron con agua destilada y desionizada con ayuda de un agitador orbital (20-30 rpm) durante 1 h, con un cambio de agua cada 15 min para eliminar el SDS y renaturalizar las proteínas. Posteriormente, los geles se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente en buffer a pH de 3.5, 4.5, 6.5, 7.5 y 8.5; y 2 mM de DMP, con el fin de observar la actividad de lacasas (Téllez-Téllez y cols. 2008).

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Determinación de biomasa

La figura 9 describe el crecimiento de *P. ostreatus* en FS sobre espuma de poliuretano a pH inicial de 3.5. La fase de adaptación se mantuvo por aproximadamente 100 h, periodo relativamente corto si se considera que el pH al que fue sometido el hongo es ácido y no es cercano al óptimo de crecimiento. La fase de crecimiento exponencial tuvo duración de aproximadamente 150 h, finalizando en 240 h, en la que se observó el valor máximo de biomasa ( $3.73 \text{ g L}^{-1}$  en 288 h). La fase estacionaria se observó durante 312 h más. La tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) fue  $0.038 \text{ h}^{-1}$ .

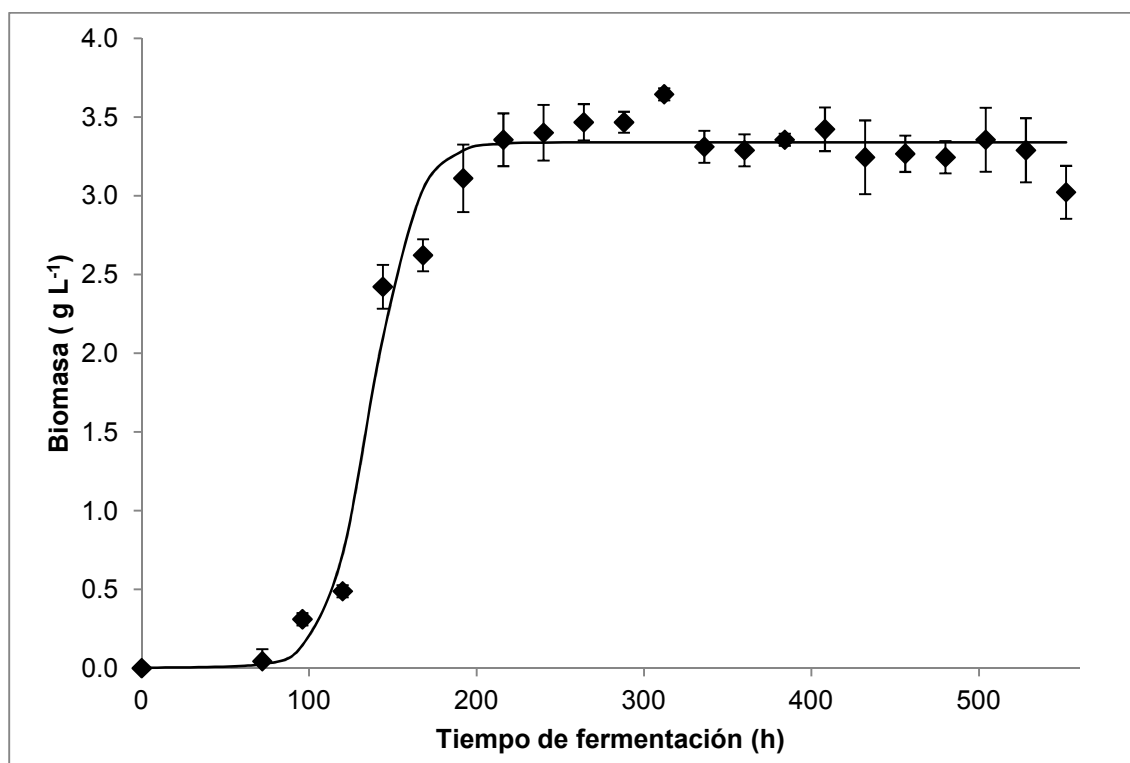


Figura 9. Cinética de crecimiento de *P. ostreatus* en FS sobre soporte inerte a pH inicial de crecimiento 3.5.



La figura 10 muestra el crecimiento de *P. ostretatus* en FS sobre espuma de poliuretano con pH inicial de 4.5. La fase de adaptación tuvo menor duración que la FS con pH inicial de 3.5, aproximadamente 90 h, la tasa de crecimiento específico fue similar ( $\mu=0.047 \text{ h}^{-1}$ ). La fase de crecimiento exponencial tuvo duración de 110 h, a diferencia de la FS con pH inicial 3.5. La biomasa máxima se localizó en las 312 h, fue  $4.43 \text{ g L}^{-1}$ . La fase estacionaria se observó por 240 h.

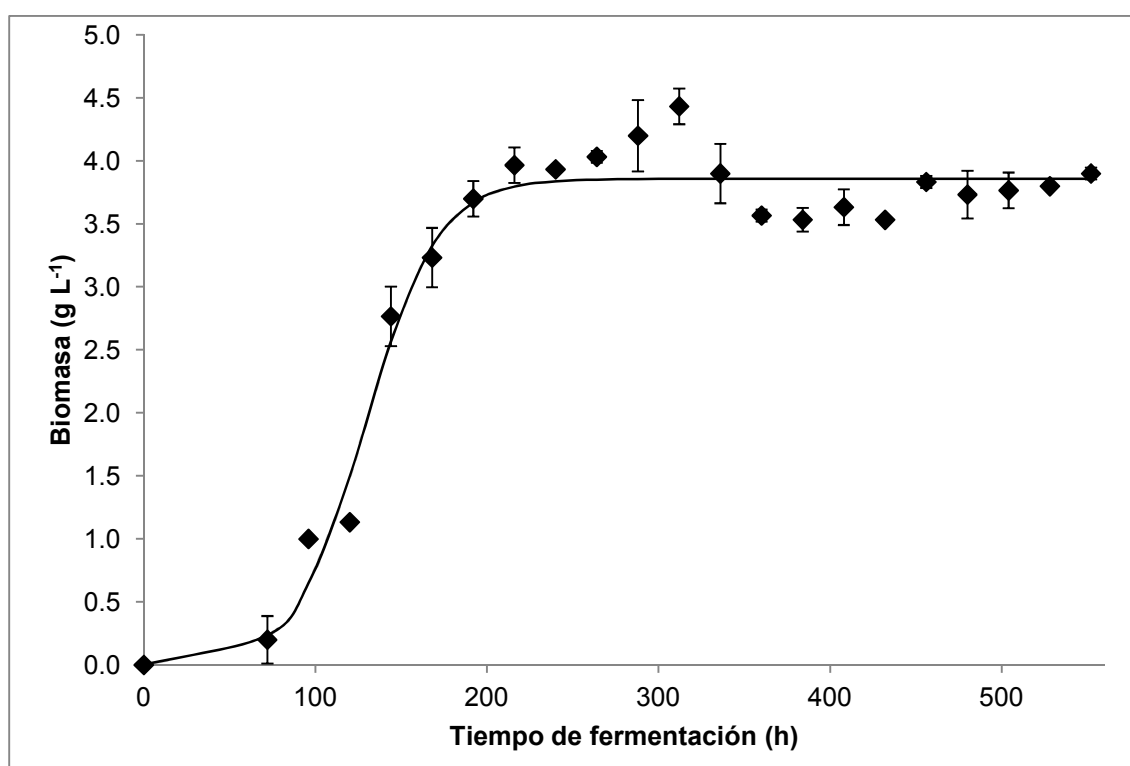


Figura 10. Cinética de crecimiento de *P. ostretatus* en FS sobre soporte inerte a pH inicial de crecimiento 4.5.

El desarrollo de *P. ostretatus* con pH inicial 6.5 se muestra en la figura 11. La fase de adaptación tuvo una duración aproximada de 100 h. El valor de  $\mu$  fue  $0.034 \text{ h}^{-1}$  y la biomasa máxima registrada fue  $3.70 \text{ g L}^{-1}$  en 360 h, durante la fase estacionaria de crecimiento, la que se mantuvo por 312 h.

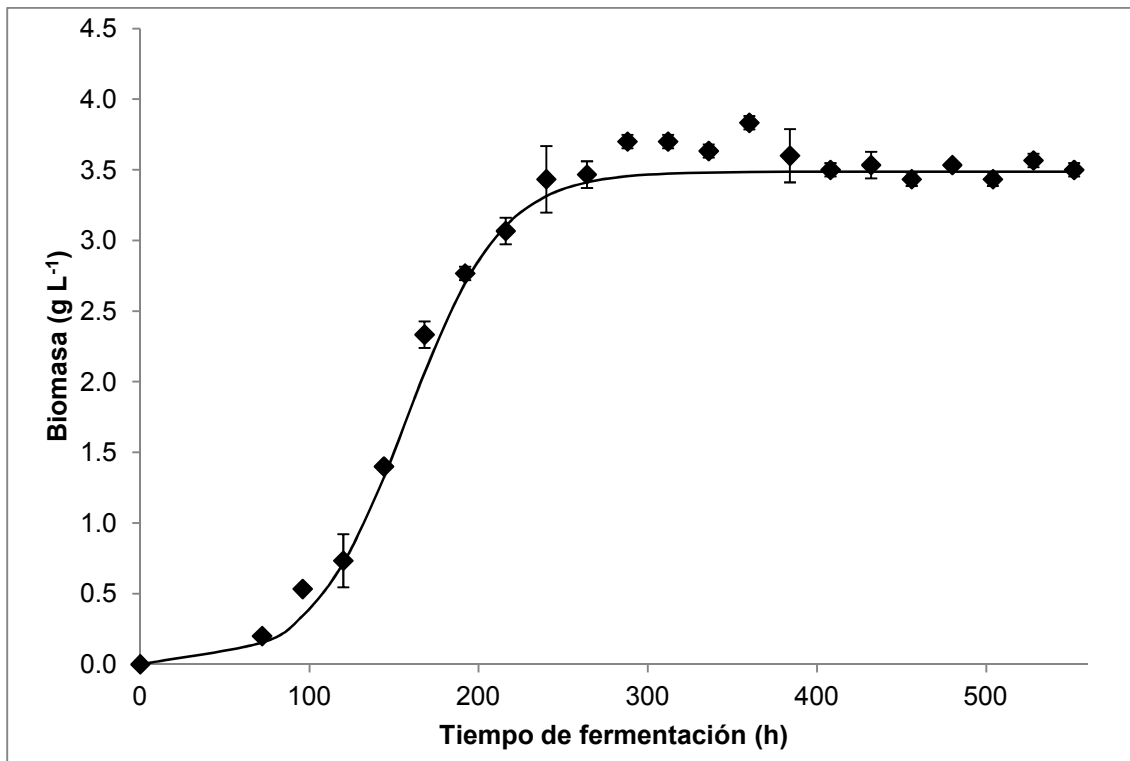


Figura 11. Cinética de crecimiento de *P. ostreatus* en FS sobre soporte inerte a pH inicial de crecimiento 6.5.

En la FS con pH inicial 7.5, la fase de adaptación duró aproximadamente 100 h. La fase de desarrollo exponencial culminó en las 200 h y la fase estacionaria duró aproximadamente 352 h. La biomasa máxima fue observada a las 312 h durante fase estacionaria con valor de 3.64 g L<sup>-1</sup>, siendo  $\mu$  0.047 h<sup>-1</sup> (Figura 12).

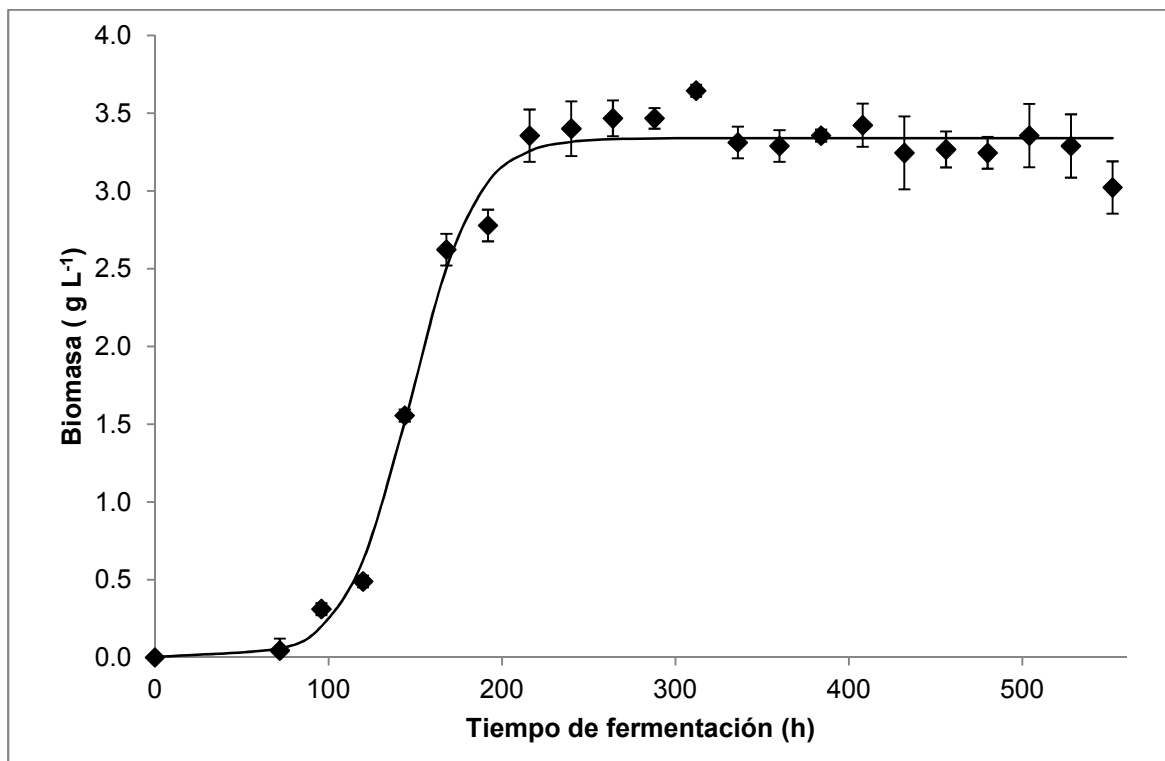


Figura 12. Cinética de crecimiento de *P. ostreatus* en FS sobre soporte inerte a pH inicial de crecimiento 7.5.

El desarrollo de la FS con pH inicial 8.5 es mostrada en la Figura 13. El valor máximo se localizó durante la fase estacionaria a las 192 h, fue 3.80 g L<sup>-1</sup>. La fase de adaptación duró aproximadamente 100 h, la fase exponencial se observó hasta las 192 h y la fase estacionaria se observó por 360 h. El valor de  $\mu$  fue 0.078 h<sup>-1</sup>.

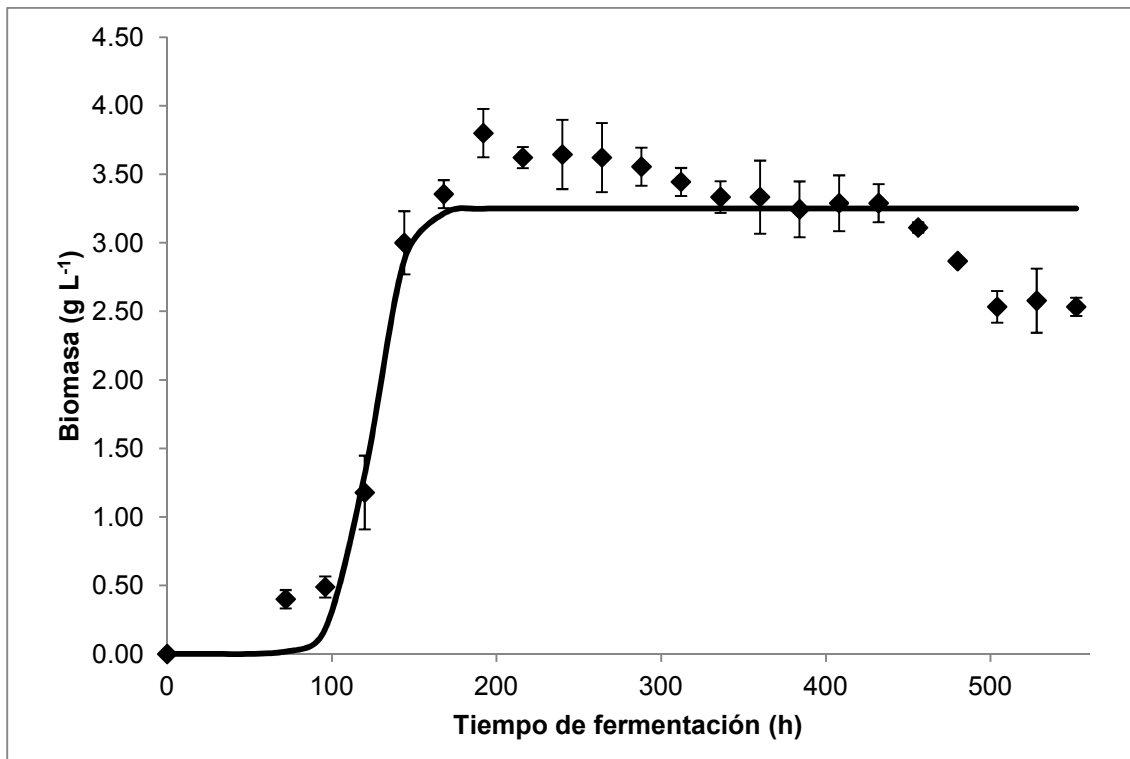


Figura 13. Cinética de crecimiento de *P. ostreatus* en FS sobre soporte inerte a pH inicial de crecimiento 8.5.

## 8.2. Determinación de actividad enzimática de lacasas

La Figura 14 muestra la actividad de lacasas de la FS con pH inicial de crecimiento 3.5. Las actividades máximas observadas en las distintas evaluaciones fueron: en buffer con pH 3.5, 1287 U L<sup>-1</sup> (384 h); en buffer con pH 4.5, 2137 U L<sup>-1</sup> (384 h) –la mayor de todo el sistema–; en buffer con pH 6.5, 375 U L<sup>-1</sup> (432 h); en buffer con pH 7.5, 390 U L<sup>-1</sup> (456 h) y en buffer con pH 8.5, 336 U L<sup>-1</sup> (96 h).

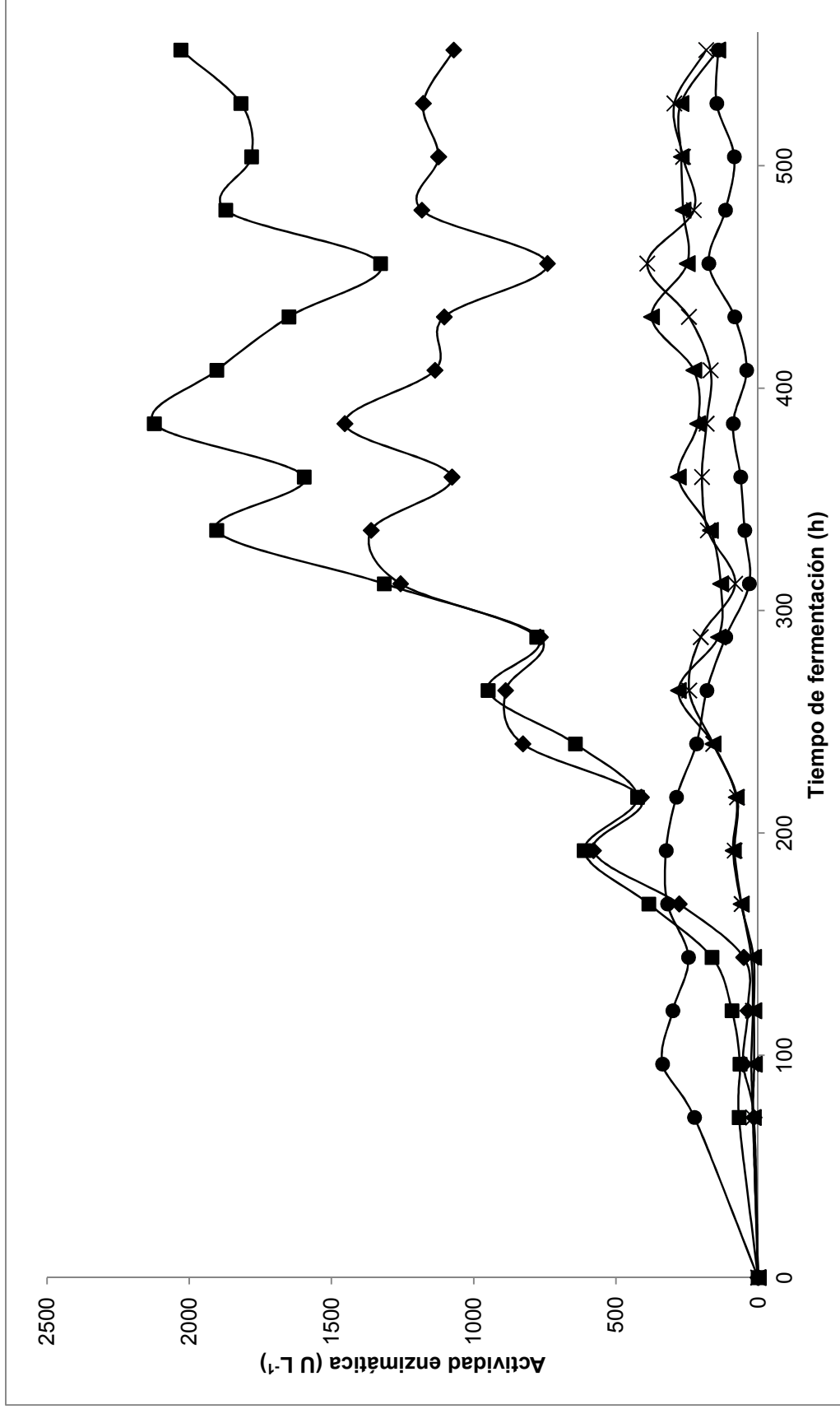


Figura 14. Actividad enzimática de lacasas producidas por *P. ostreatus* en FS sobre soporte inerte con pH inicial de crecimiento 3.5 observada a pH de reacción 3.5 (♦), 4.5 (■), 6.5 (▲), 7.5 (X) y 8.5 (●).

La Figura 15 muestra la actividad de lacasas de la FS con pH inicial de crecimiento 4.5. Los valores de actividad enzimática de lacasas máximos se observaron en buffer con pH 3.5, a 528 h, 17720 U L<sup>-1</sup>; en buffer con pH 4.5, a 552 h, 30230 U L<sup>-1</sup>; en buffer con pH 6.5, a 288 h, 40856 U L<sup>-1</sup>; en buffer con pH 7.5, a 384 h, 27520 U L<sup>-1</sup> y en buffer con pH 8.5, a 96 h, 8290 U L<sup>-1</sup>.

La actividad enzimática de lacasas de la FS con pH inicial de crecimiento 6.5 es mostrada en la figura 16. Los valores de actividad enzimática de lacasas máximos se observaron en buffer con pH 3.5, a 528 h, 31100 U L<sup>-1</sup>; en buffer con pH 4.5, a 384 h, 40368 U L<sup>-1</sup> –actividad más alta–; en buffer con pH 6.5, a 552 h, 17015 U L<sup>-1</sup>; en buffer con pH 7.5, a 384 h, 14460 U L<sup>-1</sup> y en buffer con pH 8.5 en 168 y 288 h, 680 U L<sup>-1</sup>.

La figura 17 muestra las actividades enzimáticas de lacasas obtenidas en la FS con pH inicial de crecimiento 7.5. El valor más alto se encontró en el buffer con pH 3.5, 5440 U L<sup>-1</sup> a 432 h. El valor siguiente en manera decreciente fue 4897 U L<sup>-1</sup> a las 408 h, en el buffer con pH 4.5. Posteriormente, en el buffer con pH 6.5, 1813 U L<sup>-1</sup> (288 h) y en pH 8.5, fueron 1657 U L<sup>-1</sup> (144 h). En el buffer con pH 7.5, el valor máximo de 557 U L<sup>-1</sup> se encontró a las 216 h.

En la FS con pH inicial de crecimiento 8.5, el valor máximo de actividad de lacasas fue encontrado en el buffer con pH 4.5 a las 288 h, 15473 U L<sup>-1</sup>. En orden decreciente, el siguiente valor se encontró en el buffer con pH 3.5, 9727 U L<sup>-1</sup> (288 h). Posteriormente, en el buffer con pH 6.5, 3127 U L<sup>-1</sup> (264 h) y el buffer con pH 7.5, a las 144 h, 1144 U L<sup>-1</sup>. Para finalizar, a las 288 h, el buffer con pH 8.5, el valor fue 204 U L<sup>-1</sup> (Figura 18).

La tabla 2 resume los valores de actividad máxima de lacasas reportados para los diferentes pH de iniciales de crecimiento de *P. ostreatus* a los respectivos pH de reacción.

Tabla 2. Actividad enzimática de lacasas (U L<sup>-1</sup>).

<b><i>pH de reacción</i></b>	<b><i>pH de inicial de crecimiento</i></b>				
	<b>3.5</b>	<b>4.5</b>	<b>6.5</b>	<b>7.5</b>	<b>8.5</b>
<b>3.5</b>	1287	17720	31100	5440	9727
<b>4.5</b>	2137	30230	40368	4897	15473
<b>6.5</b>	375	40856	17015	1813	3127
<b>7.5</b>	391	27520	14460	557	1144
<b>8.5</b>	336	8290	680	1657	204

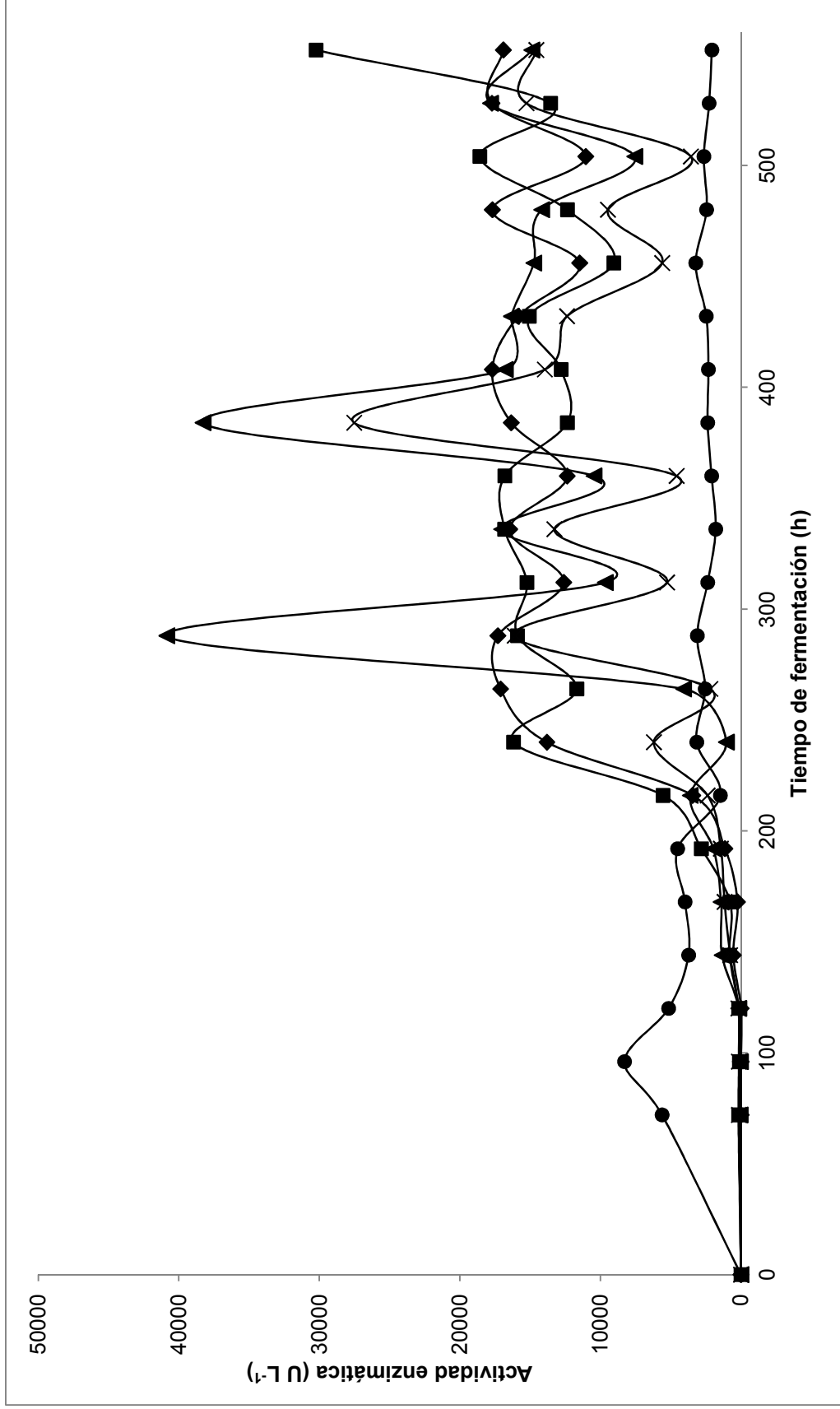


Figura 15. Actividad enzimática de lacasas producidas por *P. ostreatus* en FS sobre soporte inerte con pH inicial de crecimiento 4.5 observada a pH de reacción 3.5 (◆), 4.5 (■), 6.5 (▲), 7.5 (X) y 8.5 (●).



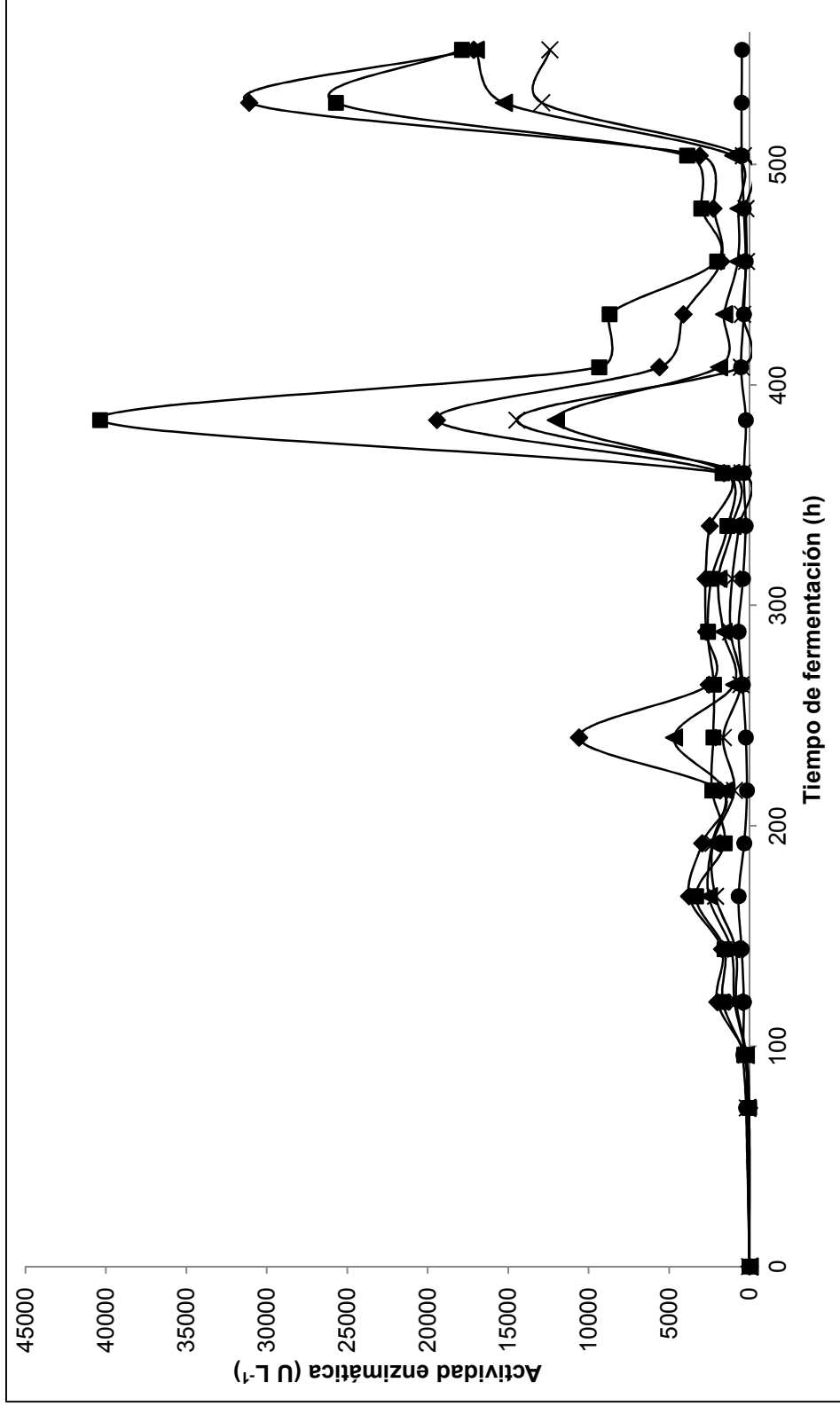


Figura 16. Actividad enzimática de laccasas producidas por *P. ostreatus* en FS sobre soporte inerte con pH inicial de crecimiento 6.5 observada a pH de reacción 3.5 (♦), 4.5 (■), 6.5 (▲), 7.5 (X) y 8.5 (●).

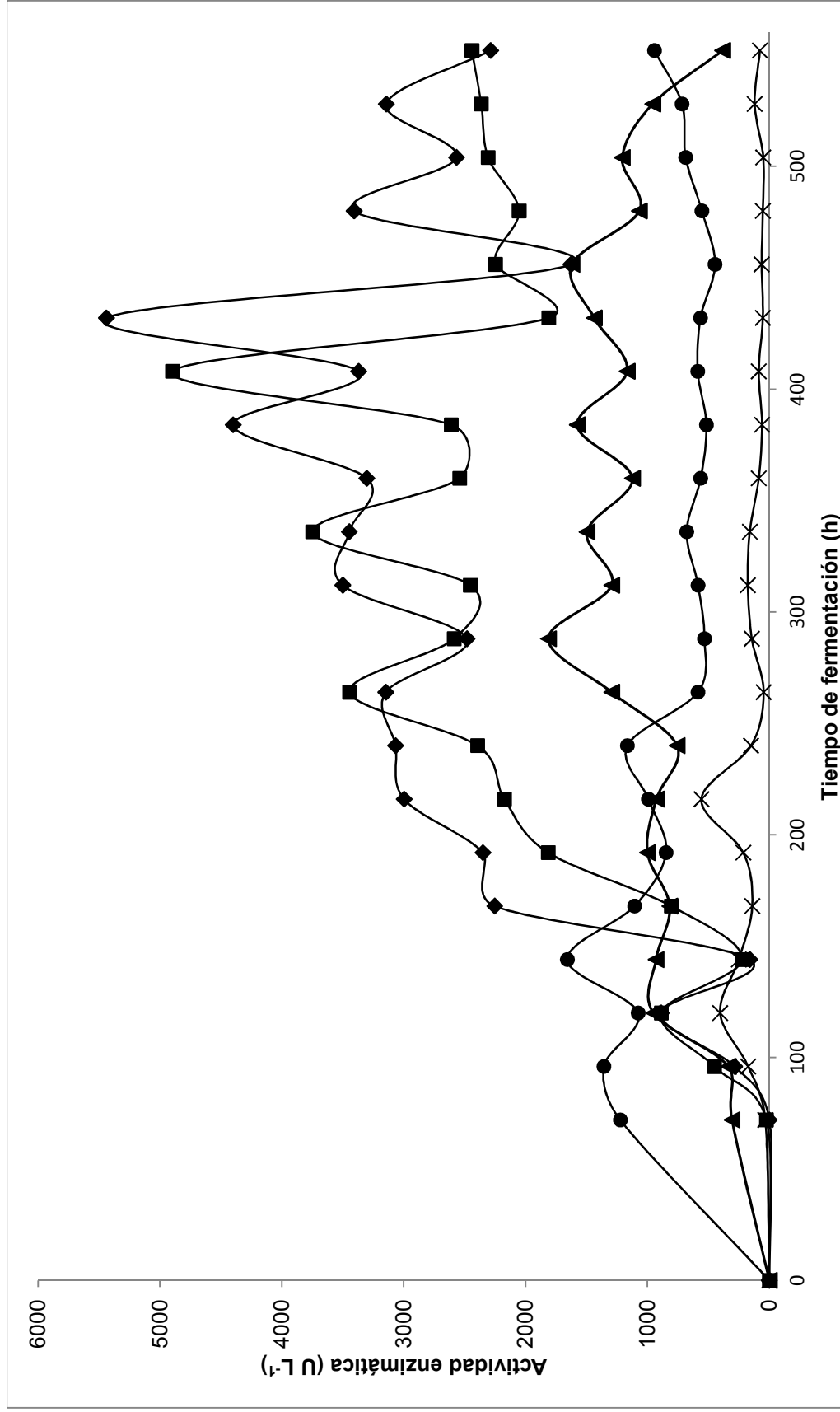


Figura 17. Actividad enzimática de lacasas producidas por *P. ostreatus* en FS sobre soporte inerte con pH inicial de crecimiento 7.5 observada a pH de reacción 3.5 (◆), 4.5 (■), 6.5 (▲), 7.5 (X) y 8.5 (●).

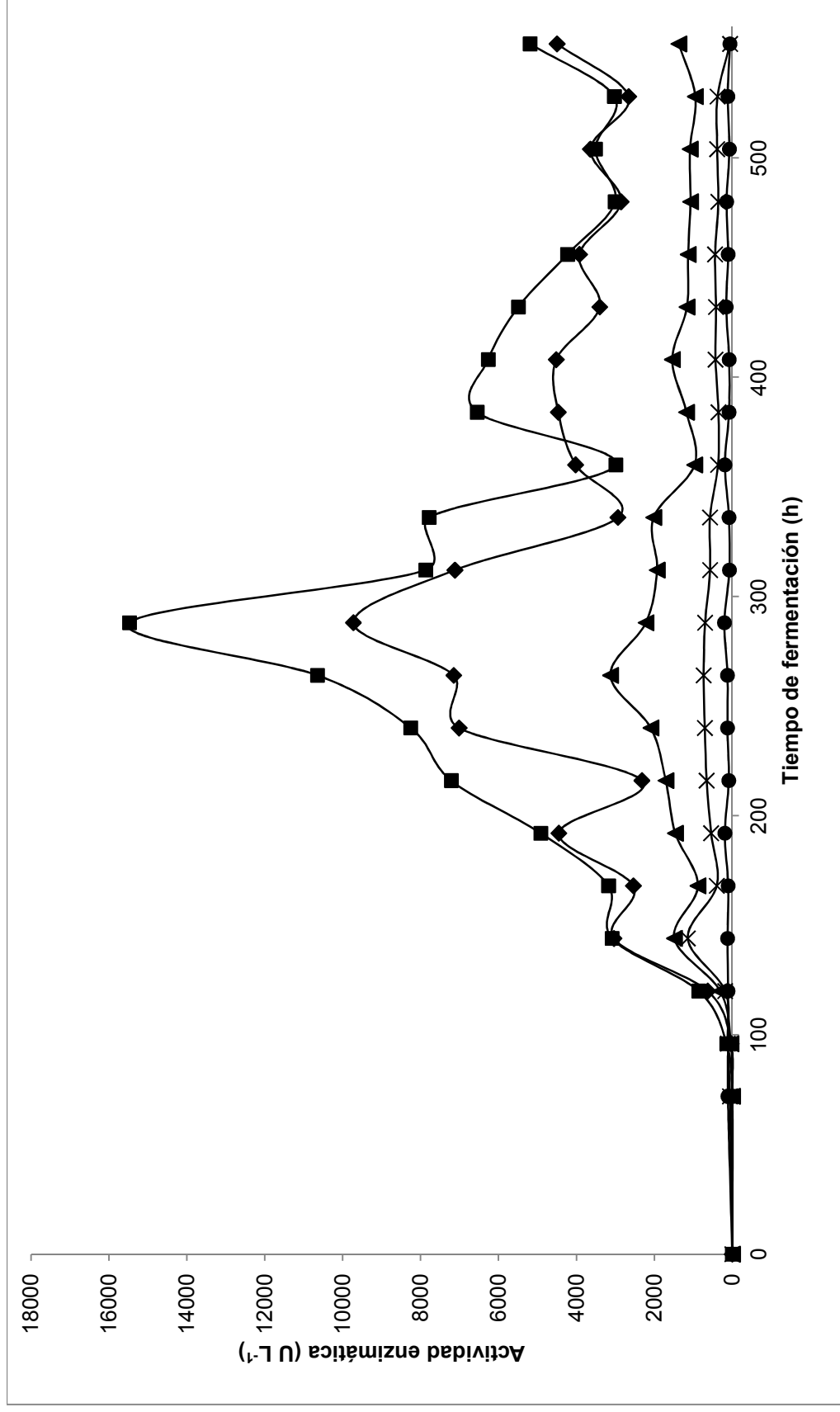


Figura 18. Actividad enzimática de lacasas producidas por *P. ostreatus* en FS sobre soporte inerte con pH inicial de crecimiento 8.5 observada a pH de reacción 3.5 (◆), 4.5 (■), 6.5 (▲), 7.5 (X) y 8.5 (●).

### 8.3. Determinación de actividad enzimática de proteasas

Fue determinada la actividad de proteasas en cada punto de la fermentación por la cuantificación de aminoácidos aromáticos liberados en una mezcla de reacción. No fue observada actividad de proteasas en todas las condiciones ensayadas.

### 8.4. Determinación de concentración de azúcares reductores

A medida que el tiempo transcurre, la cantidad de biomasa incrementa y la cantidad de glucosa presente en el sistema disminuye, hasta conseguir el agotamiento de todo el suministro en el medio de cultivo.

Las figuras de 19 a 23 muestran el consumo de glucosa durante las FS. Al inicio de las fermentaciones, se encontraba en el punto máximo de concentración de glucosa ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ). Una vez alcanzada la fase estacionaria del crecimiento, el suministro de glucosa había sido consumido casi en su totalidad. Durante la fase estacionaria es consumida la mayor parte de glucosa en el sistema.

En la figura 19, para la FS con pH inicial de crecimiento 3.5 se observa que a las 150 h de desarrollo se ha conseguido consumir 50% del suministro total de glucosa y a las 260 h aproximadamente, se había agotado. La  $q_s$  fue  $0.12 \text{ gs gX}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

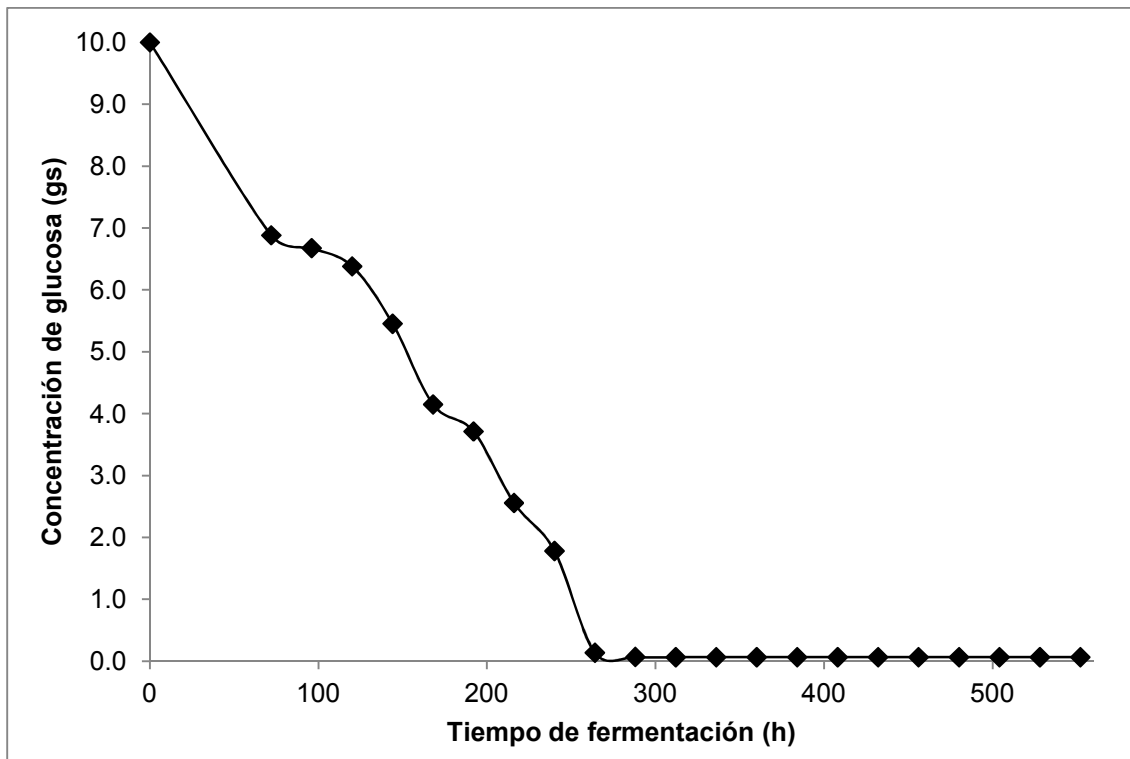


Figura 19. Consumo de glucosa de *P. ostreatus* en FS con pH inicial de crecimiento 3.5.

En la fermentación con pH inicial 4.5, el consumo al 50% de glucosa se consiguió a las 120 h y el consumo al 100% se logró aproximadamente las 290 h (Figura 20). La  $q_s$  fue  $0.13 \text{ gs gX}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

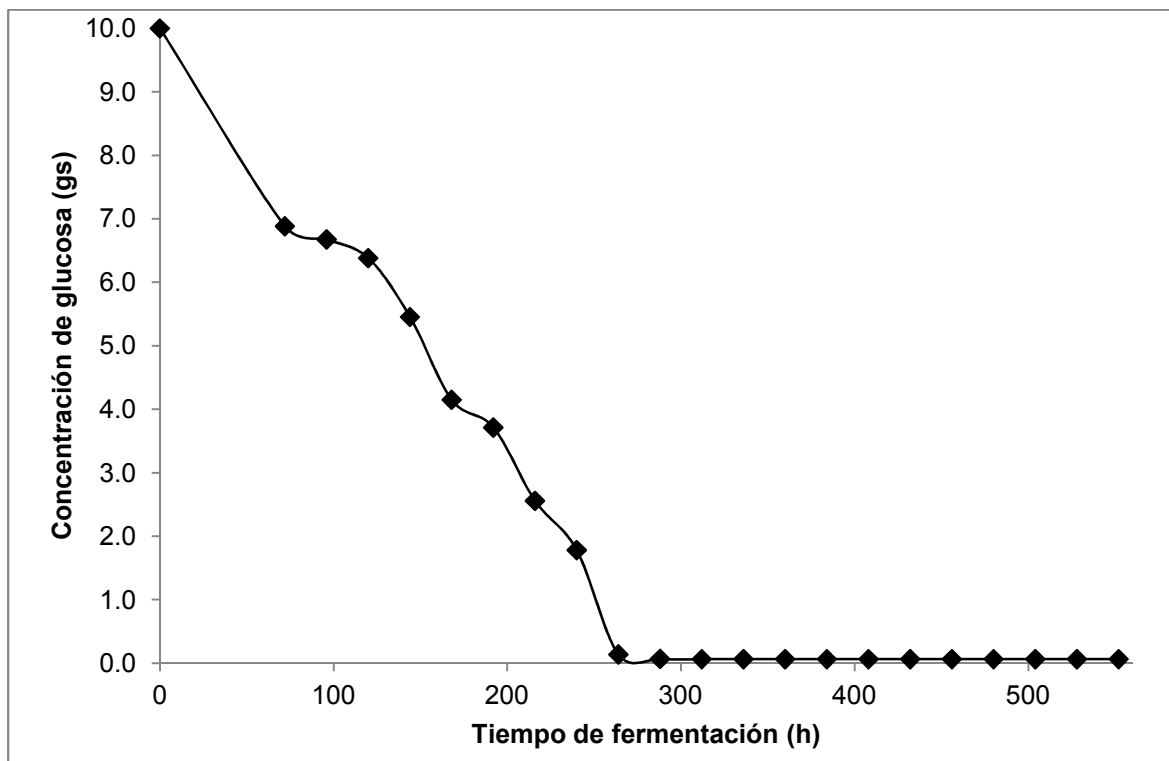


Figura 20. Consumo de glucosa de *P. ostreatus* en FS con pH inicial de crecimiento 4.5.

En la fermentación con pH inicial de 6.5, a las 60 h se consumió el 50% de la cantidad de glucosa presente en el medio de cultivo, lo cual sugiere que el crecimiento del hongo fue rápido. El agotamiento de la glucosa se observó a las 220 h aproximadamente (ver Figura 21). La  $q_s$  fue  $0.11 \text{ gs gX}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

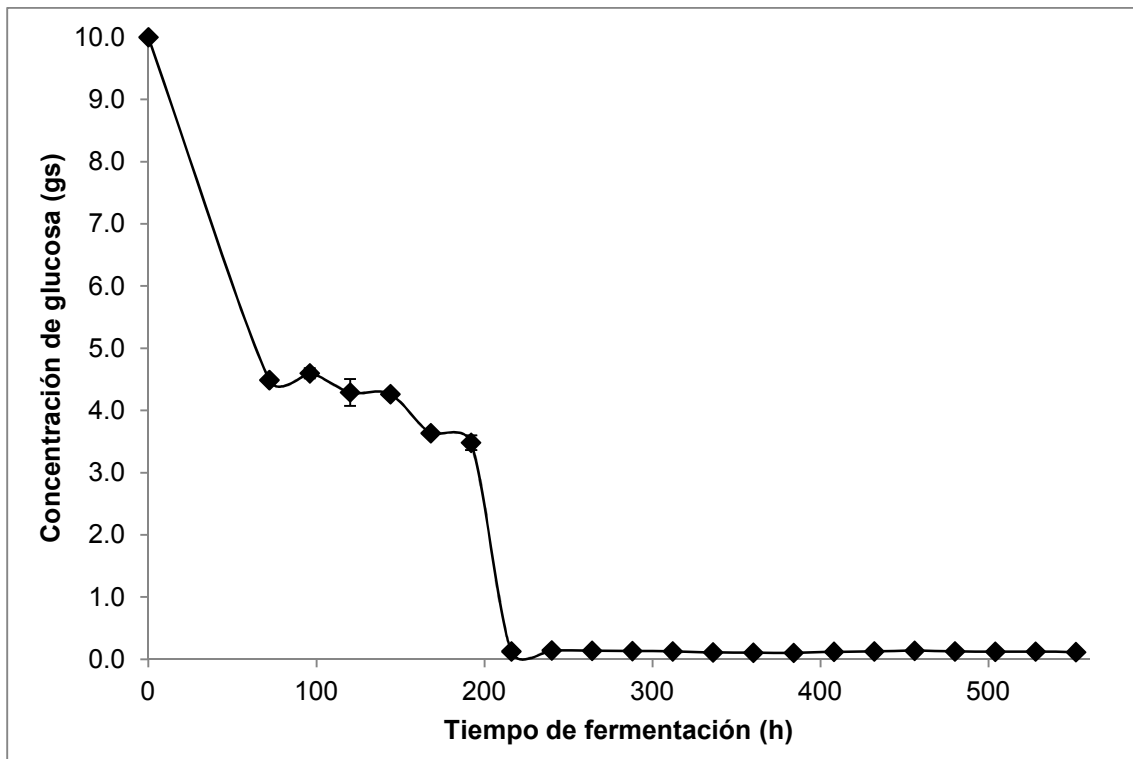


Figura 21. Consumo de glucosa de *P. ostreatus* en FS con pH inicial de crecimiento 6.5.

En la figura 22, se describe el consumo de glucosa en la FS con pH inicial 7.5. El 50% del consumo de glucosa se observó a las 70 h y al 100% a las 190 h. La  $q_s$  fue  $0.17 \text{ gs gX}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

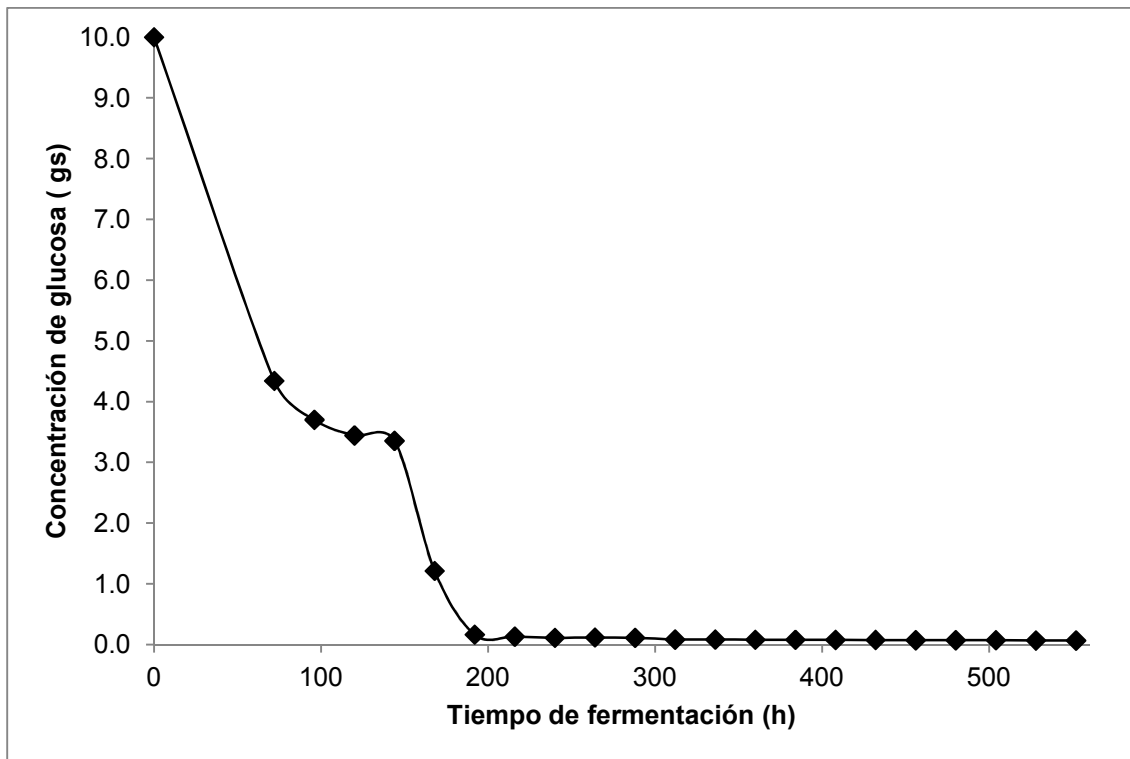


Figura 22. Consumo de glucosa de *P. ostreatus* en FS con pH inicial de crecimiento 7.5.

Para la FS con pH inicial de 8.5, el 50% del consumo de glucosa se observó a las 60 h, mientras que el 100% se alcanzó a las 168 h de la fermentación (Figura 23). De acuerdo con la  $q_s$  ( $0.25 \text{ gs gX}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) indica que la glucosa fue consumida de forma más rápida que en las FS con pH inicial de crecimiento 3.5, 4.5, 6.5 y 7.5.



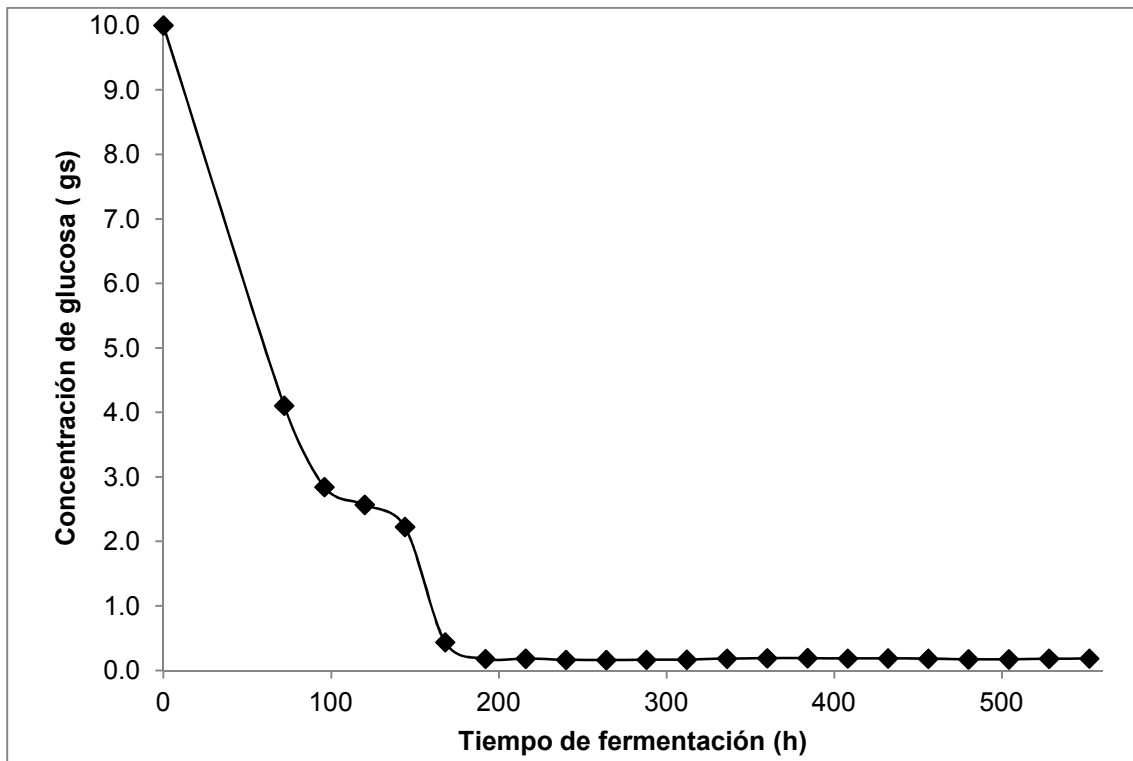


Figura 23. Consumo de glucosa de *P. ostreatus* en FS con pH inicial de crecimiento 8.5.

### 8.5. Determinación de pH en extractos enzimáticos

Durante la FS con pH inicial de crecimiento 3.5 se observó incremento cercano a las 312 h, una vez concluida la fase de crecimiento exponencial. El pH final alcanzado fue 5.87. La variación ocurrida durante la fase estacionaria, se presume que, es debida al consumo de aminoácidos proporcionados por el extracto de levadura, que en estadíos tempranos amortiguó el pH (Figura 24).

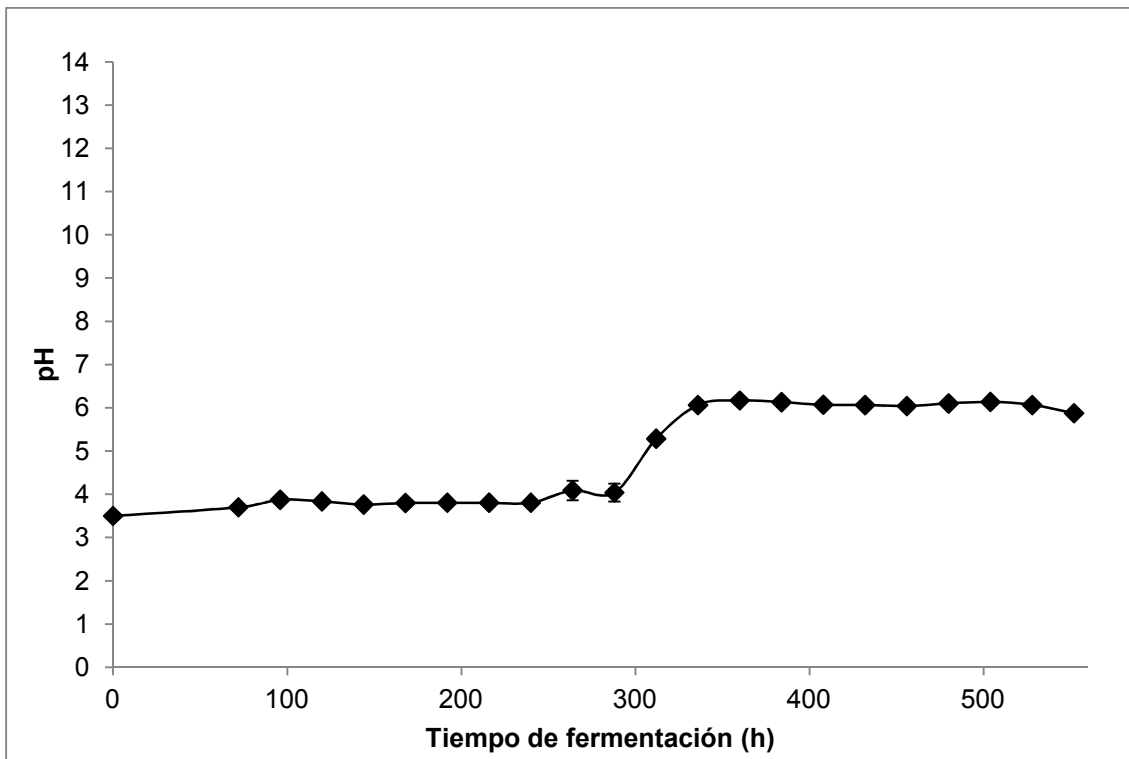


Figura 24. Perfil de pH durante la FS de *P. ostreatus* con pH inicial de crecimiento 3.5.

De manera similar, es explicado el perfil de pH observado en la FS con pH inicial de crecimiento 4.5 (Figura 25). La tasa de crecimiento sugiere que el extracto de levadura no fue capaz de amortiguar el pH hasta el término del proceso. El pH final de la fermentación fue 7.57.

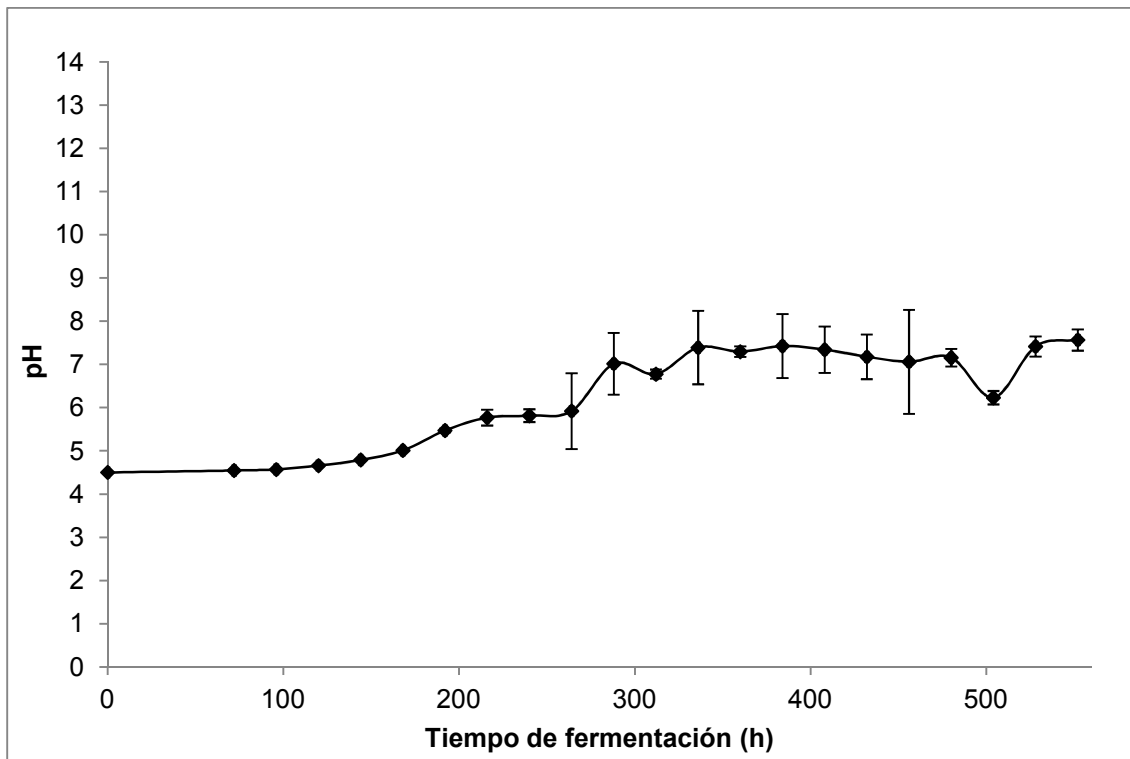


Figura 25. Perfil de pH durante la FS de *P. ostreatus* con pH inicial de crecimiento 4.5.

De acuerdo con la tasa de crecimiento específico de la FS con pH inicial 6.5, el crecimiento fue más lento, y por lo tanto, también el consumo de glucosa. Relacionando esto con la variación de pH durante la FS (Figura 26), el consumo menor de nutrientes permitió que el extracto de levadura amortiguara las variaciones, siendo el valor final 6.72.

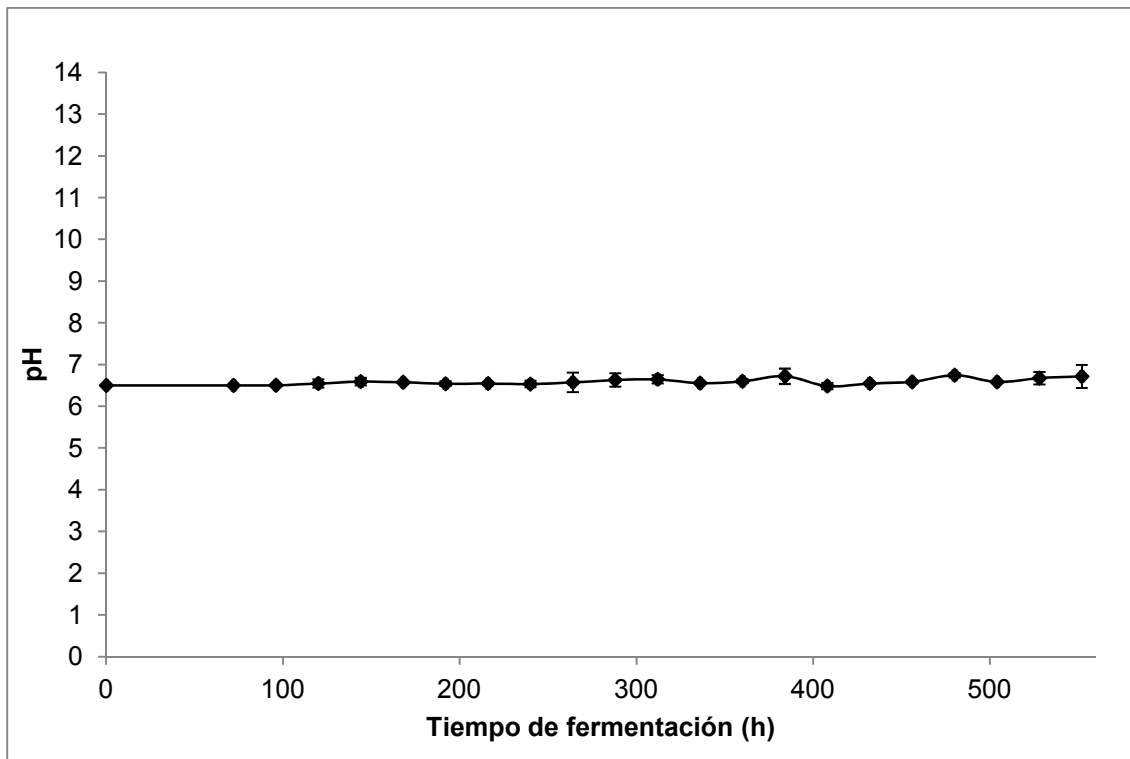


Figura 26. Perfil de pH durante la FS de *P. ostreatus* con pH inicial de crecimiento 6.5.

En la FS con pH inicial de crecimiento 7.5 se observó incremento del pH durante las primeras 96 h (8.15). A las 120 h se registró la disminución del pH hasta 7.55 (valor inicial) y posteriormente, a las 144 h un nuevo descenso hasta 6.33, manteniéndose cercano a 6.6 durante el resto del proceso (Figura 27). Tales variaciones sugieren que *P. ostreatus* es capaz de regular el consumo de la fuente de nitrógeno y la excreción de ácido orgánicos mantener el pH del entorno apto para el desarrollo favorable.

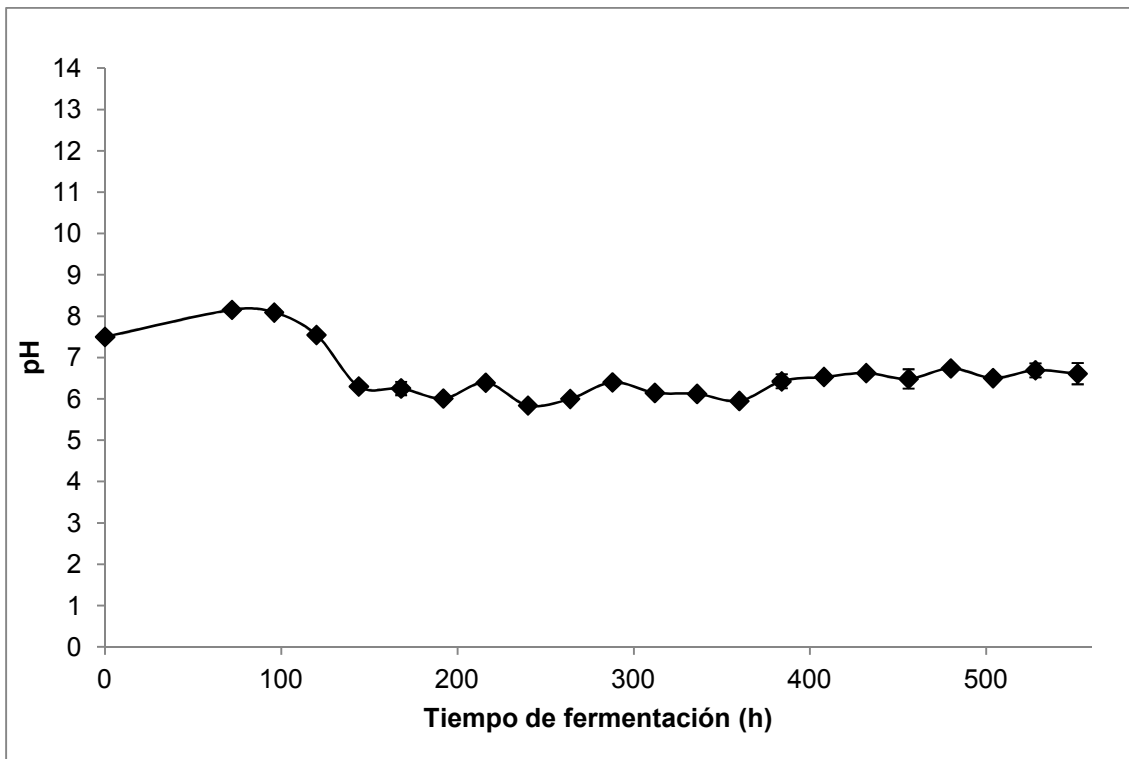


Figura 27. Perfil de pH durante la FS de *P. ostreatus* con pH inicial de crecimiento 7.5.

Durante la FS con pH inicial 8.5 se observó el descenso en el pH desde las 72 h (6.3) manteniendose en 6.5 aproximadamente, hasta el final de la fermentación (Figura 28).

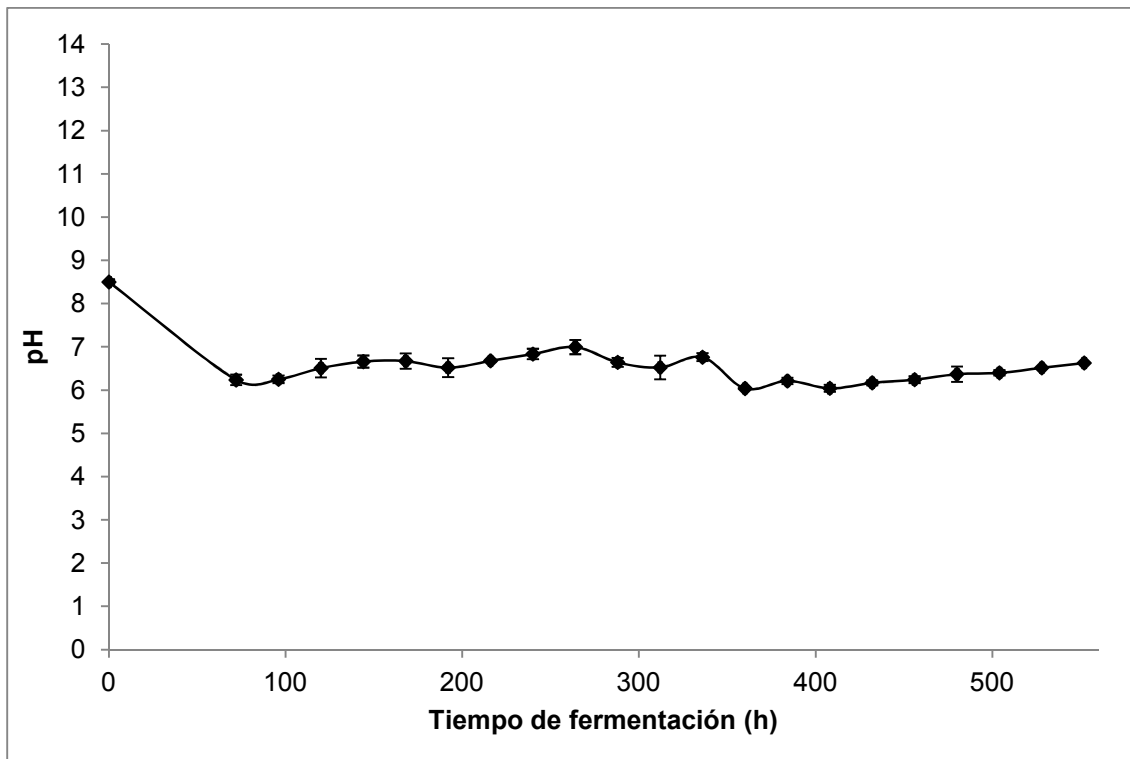


Figura 28. Perfil de pH durante la FS de *P. ostreatus* con pH inicial de crecimiento 8.5.

#### 8.6. Identificación de isoenzimas con actividad de lacasas

Se realizaron zimogramas para lacasas empleando SDS-PAGE, revelados en buffer con pH 3.5, 4.5, 6.5, 7.5 y 8.5 con DMP como sustrato. Cada banda observada corresponde a los puntos de muestreo realizados a lo largo de la FS. Las bandas con mayor intensidad corresponden con los puntos de muestreo donde se registró mayor actividad enzimática de lacasas.

### 8.6.1. FS con pH inicial 3.5

La figuras 29, 30, 31, 32 y 33 corresponden a los zimogramas de lacasas realizados para la FS con pH inicial 3.5 revelados a pH 3.5, 4.5, 6.5, 7.5 y 8.5, respectivamente. Cada carril corresponde a los puntos de muestreo. En el gel revelado a pH 3.5 (Figura 29) se observó a lo largo de toda la FS solo una isoenzima. En el gel revelado a pH 4.5 (Figura 30) se observó una isoenzima presente durante toda la FS y otra que se hizo visible desde las 408 h. En el gel revelado a pH 6.5 (Figura 31) se observó una banda durante toda la FS y en las 360 h se observó una diferente. En la figura 32 se observaron el gel revelado a pH 7.5 donde solo son visibles las bandas de los puntos de muestreo con mayor actividad. En el gel revelado a pH 8.5 (Figura 33) fueron visibles dos bandas de las 144 h hasta las 260 h, correspondiente a los puntos donde se registró la actividad más elevada.

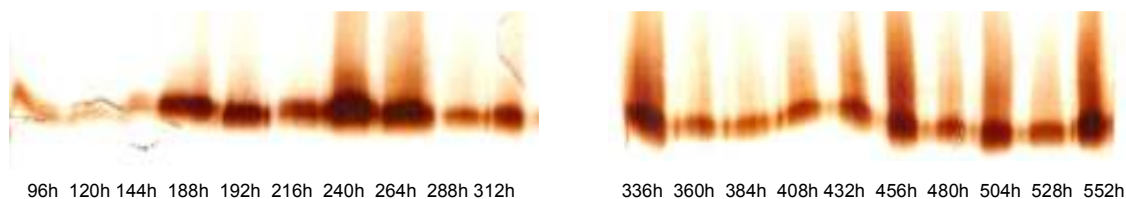


Figura 29. Perfil zimográfico de lacasas de *P. ostreatus* de FS 3.5 revelado en buffer a pH 3.5.

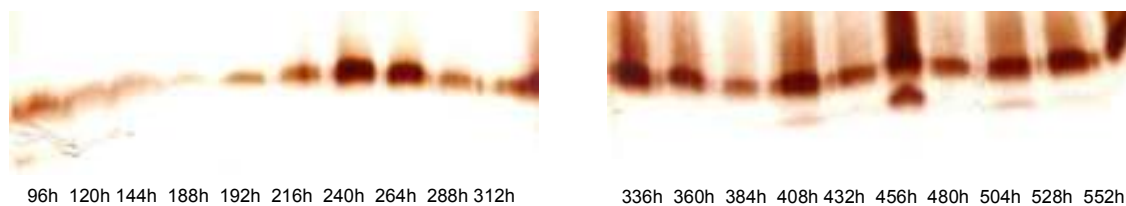


Figura 30. Perfil zimográfico de lacasas de *P. ostreatus* de FS 3.5 revelado en buffer a pH 4.5.

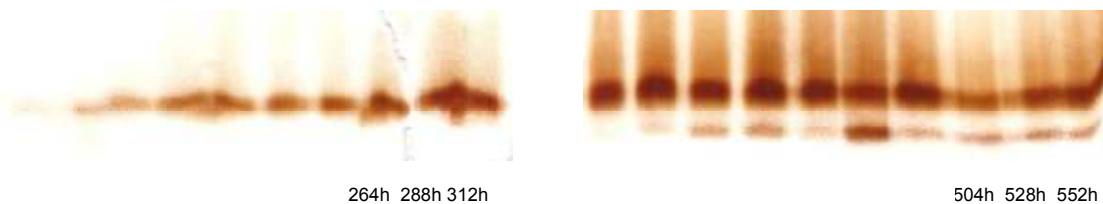


Figura 31. Perfil zimográfico de lacasas de *P. ostreatus* de FS 3.5 revelado en buffer a pH 6.5.

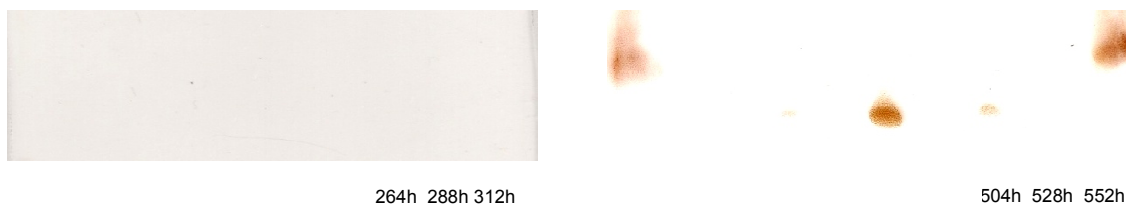


Figura 32. Perfil zimográfico de lacasas de *P. ostreatus* de FS 3.5 revelado en buffer a pH 7.5.



Figura 33. Perfil zimográfico de lacasas de *P. ostreatus* de FS 3.5 revelado en buffer a pH 8.5.

### 8.6.2. FS con pH inicial 4.5

Las figuras 34, 35, 36, 37 y 38 corresponden a los zimogramas de lacasas realizados para la FS con pH inicial 4.5 revelados a pH 3.5, 4.5, 6.5, 7.5 y 8.5. La figura 34 muestra el gel revelado a pH 3.5, donde se percibió una banda durante toda la FS y desde las 480 h hasta el final se observó una segunda banda. El gel revelado a pH 4.5 (Figura 35) mostró dos bandas de actividad; una observable desde las 144 h hasta las 552 h y otra que solo se observó desde las 96 h hasta las 188 h. El gel revelado a pH 6.5 (Figura 36) mostró una banda que se observó a lo largo de toda



la FS excepto en el punto 264 h, y también fue perceptible una segunda banda desde las 96 h hasta las 288 h. En el gel revelado a pH 7.5 (Figura 37) se encontró una banda durante toda la FS y también se observó otra banda muy tenue desde las 96 h hasta las 240 h. En la figura 38 que muestra el gel revelado a pH 8.5 solo fue apreciable una banda hacia el final de la FS, desde las 432 h hasta las 504 h.

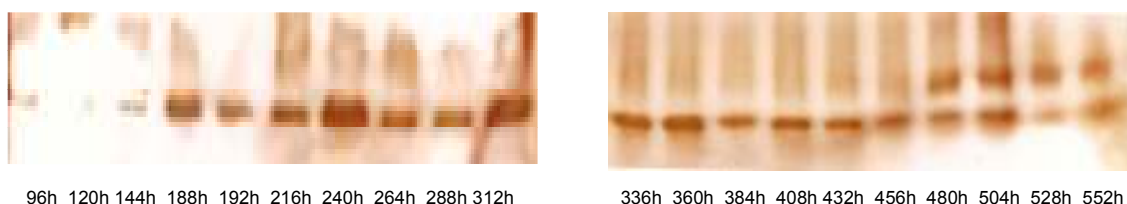


Figura 34. Perfil zimográfico de lacasas de *P. ostreatus* de FS 4.5 revelado en buffer a pH 3.5.

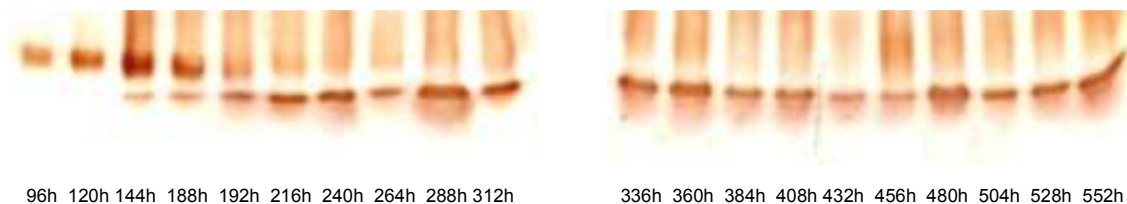


Figura 35. Perfil zimográfico de lacasas de *P. ostreatus* de FS 4.5 revelado en buffer a pH 4.5.

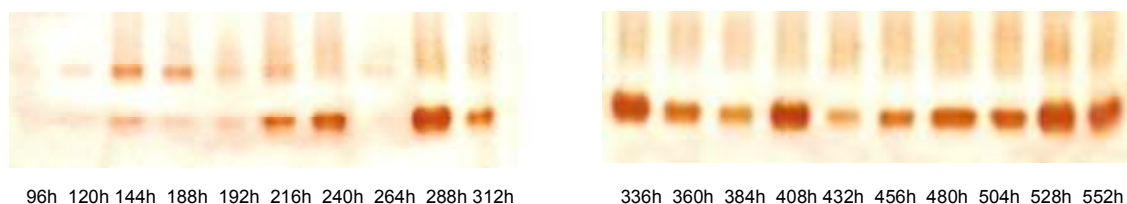


Figura 36. Perfil zimográfico de lacasas de *P. ostreatus* de FS 4.5 revelado en buffer a pH 6.5.

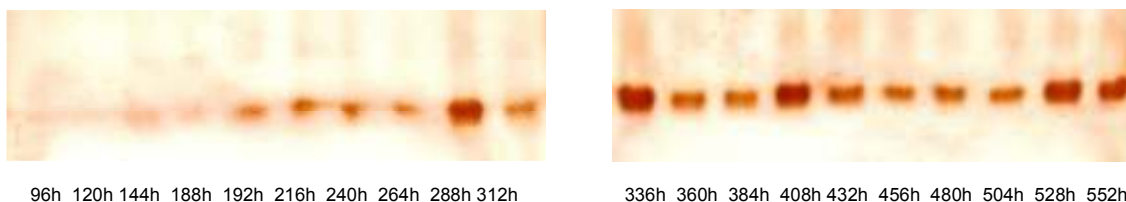


Figura 37. Perfil zimográfico de lacasas de *P. ostreatus* de FS 4.5 revelado en buffer a pH 7.5.



Figura 38. Perfil zimográfico de lacasas de *P. ostreatus* de FS 4.5 revelado en buffer a pH 8.5.

### 8.6.3. FS con pH inicial 6.5

Las figuras 39, 40, 41, 42 y 43 corresponden a los zimogramas de lacasas realizados para la FS con pH inicial 6.5 revelados a pH 3.5, 4.5, 6.5, 7.5 y 8.5. En la figura 39, el gel fue a pH 3.5, se observaron dos bandas de actividad, una que estuvo presente en toda la FS y otra intermitente localizada a las 120 h, de las 188 h a las 288 h, a las 384 h y de las 504 h a las 552 h. La figura 40 muestra el gel revelado a pH 4.5 donde se observaron hasta 3 bandas con actividad de lacasas; la primera se observó en todos los puntos de muestreo; la segunda se observó en las 144 h y desde las 504 h hasta las 552 y la tercera se observó en las 96 y 120 h, desde 188 h hasta las 288 h, a las 338 h y 384 h y desde 504 h hasta 552 h. En el gel revelado a pH 6.5 (Figura 41) se observaron 2 bandas, una que estuvo presente durante toda la FS y otra que estuvo ausente en las 96 h y desde las 432 h hasta las 504 h. En la figura 42 se observa el gel revelado a pH 7.5 donde fueron visibles 2 bandas que se presentaron en algunos puntos de la FS. El gel revelado a pH 8.5 (Figura 43) mostró 2 bandas de

actividad presentes solo en los puntos donde se alcanzó la mayor actividad de lacasas en esta FS.

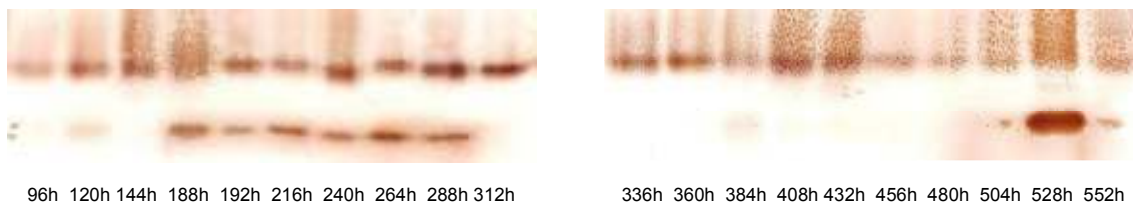


Figura 39. Perfil zimográfico de lacasas de *P. ostreatus* de FS 6.5 revelado en buffer a pH 3.5.

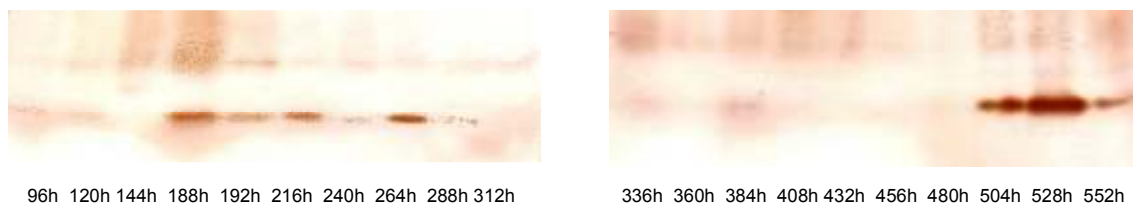


Figura 40. Perfil zimográfico de lacasas de *P. ostreatus* de FS 6.5 revelado en buffer a pH 4.5.



Figura 41. Perfil zimográfico de lacasas de *P. ostreatus* de FS 6.5 revelado en buffer a pH 6.5.

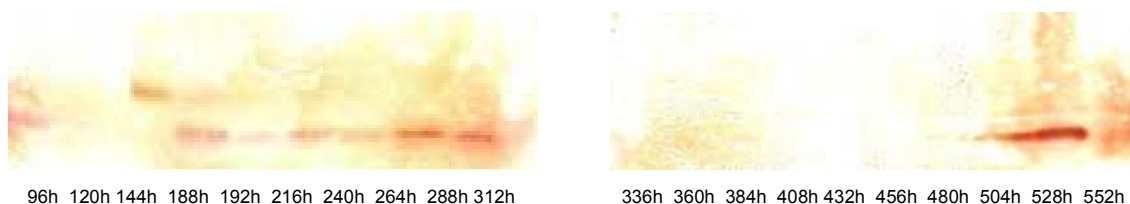


Figura 42. Perfil zimográfico de lacasas de *P. ostreatus* de FS 6.5 revelado en buffer a pH 7.5.

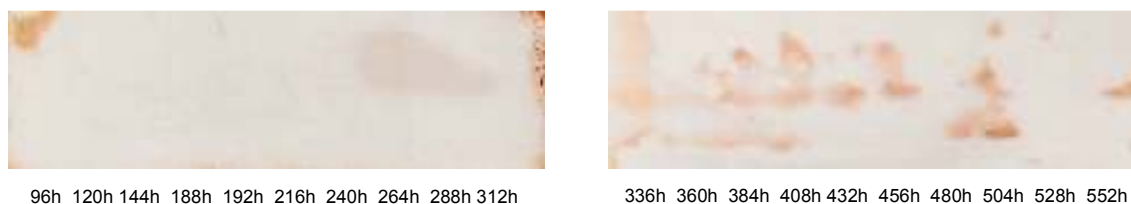


Figura 43. Perfil zimográfico de lacasas de *P. ostreatus* de FS 6.5 revelado en buffer a pH 8.5.

#### 8.6.4. FS con pH inicial 7.5

Las figuras 44, 45, 46, 47 y 48 corresponden a los zimogramas de lacasas realizados para la FS con pH inicial 7.5 revelados a pH 3.5, 4.5, 6.5, 7.5 y 8.5. En la figura 44, el gel fue revelado a pH 3.5 y se observó una banda de actividad durante toda la fermentación y otra que solo se encontró desde las 96 h hasta las 216 h y posteriormente a las 380 h. En el gel revelado a pH 4.5 (Figura 45) se observaron hasta 4 bandas, una de ellas presente durante toda la fermentación. En la figura 46, el gel fue revelado a pH 6.5 y se observaron hasta 7 bandas de actividad de lacasas, de las cuales, solo una, se mantuvo constante durante toda la fermentación. En la figura 47 el gel fue revelado a pH 7.5 y se observaron hasta 4 bandas de actividad. En el gel revelado a pH 8.5 (Figura 48) no se observaron bandas debido a la baja actividad reportada.

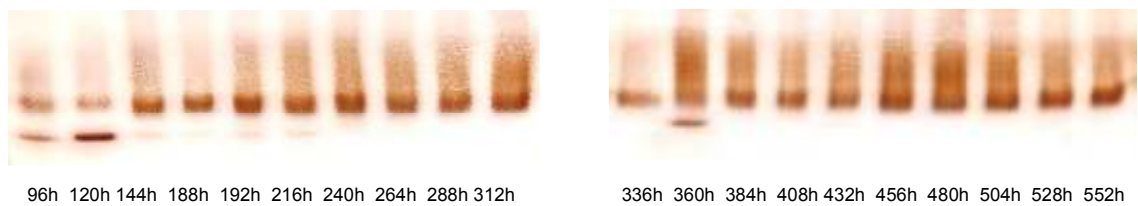


Figura 44. Perfil zimográfico de lacasas de *P. ostreatus* de FS 7.5 revelado en buffer a pH 3.5.

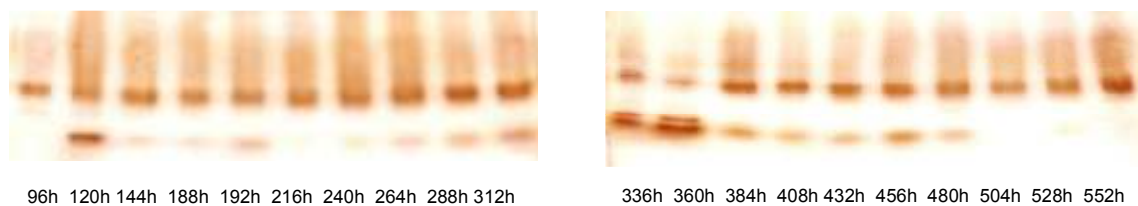


Figura 45. Perfil zimográfico de lacasas de *P. ostreatus* de FS 7.5 revelado en buffer a pH 4.5.

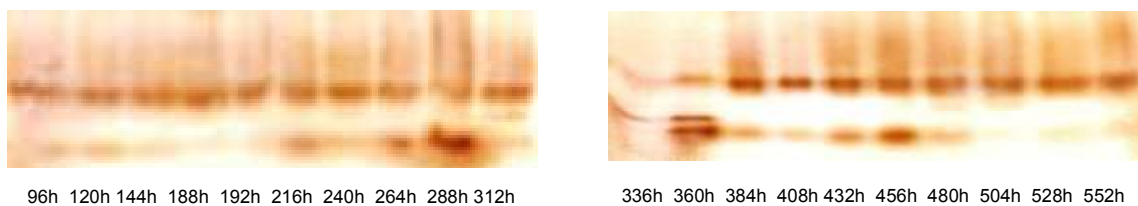


Figura 46. Perfil zimográfico de lacasas de *P. ostreatus* de FS 7.5 revelado en buffer a pH 6.5.

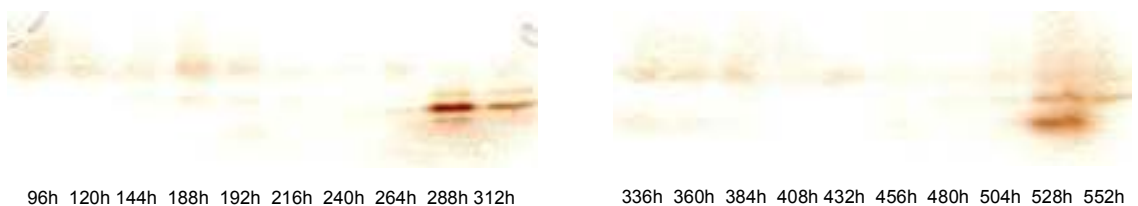


Figura 47. Perfil zimográfico de lacasas de *P. ostreatus* de FS 7.5 revelado en buffer a pH 7.5.

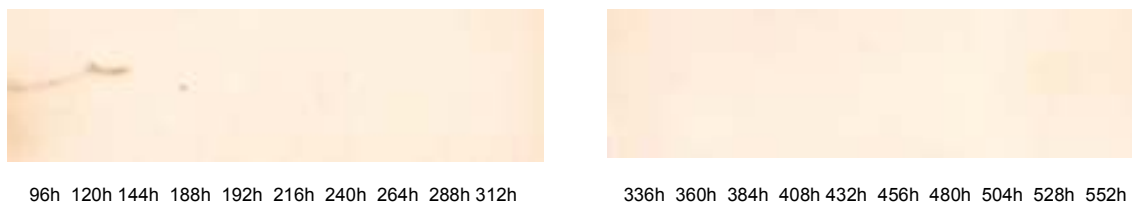


Figura 48. Perfil zimográfico de lacasas de *P. ostreatus* de FS 7.5 revelado en buffer a pH 8.5.

### 8.6.5. FS con pH inicial 8.5

Las figuras 49, 50, 51, 52 y 53 corresponden a los zimogramas de lacasas realizados para la FS con pH inicial 8.5 revelados a pH 3.5, 4.5, 6.5, 7.5 y 8.5. En la figura 49, el gel fue revelado a pH 3.5 y se observaron 3 bandas de actividad de lacasas y 2 de ellas estuvieron presentes durante toda la fermentación. En la Figura 50, el gel fue revelado a pH 4.5 y solo fueron visibles 2 bandas de actividad. En el gel revelado a pH 6.5 (Figura 51) fue posible observar hasta 3 bandas de actividad. En el gel revelado a pH 7.5 (Figura 52) se observaron hasta 4 bandas con actividad de lacasas, solo una se encontró presente durante toda la fermentación y el mayor número de bandas estuvieron concentradas durante la fase estacionaria del crecimiento de *P. ostreatus*. En el gel revelado a pH 8.5 (Figura 53) no fue posible observar bandas con actividad debido a la baja actividad de lacasas reportada.

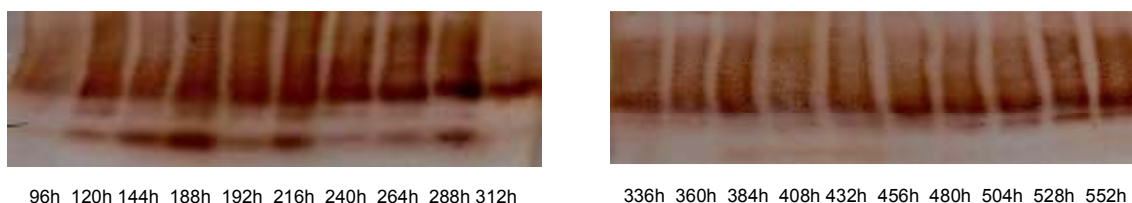


Figura 49. Perfil zimográfico de lacasas de *P. ostreatus* de FS 8.5 revelado en buffer a pH 3.5.



96h 120h 144h 188h 192h 216h 240h 264h 288h 312h



336h 360h 384h 408h 432h 456h 480h 504h 528h 552h

Figura 50. Perfil zimográfico de lacasas de *P. ostreatus* de FS 8.5 revelado en buffer a pH 4.5.



96h 120h 144h 188h 192h 216h 240h 264h 288h 312h



336h 360h 384h 408h 432h 456h 480h 504h 528h 552h

Figura 51. Perfil zimográfico de lacasas de *P. ostreatus* de FS 8.5 revelado en buffer a pH 6.5.

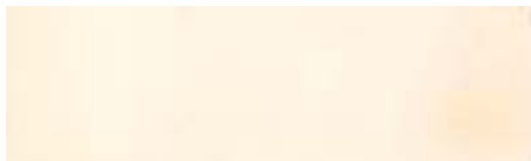


96h 120h 144h 188h 192h 216h 240h 264h 288h 312h

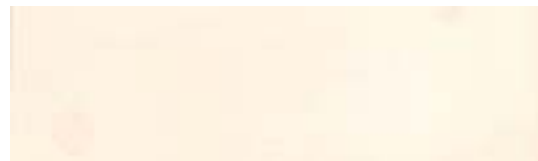


336h 360h 384h 408h 432h 456h 480h 504h 528h 552h

Figura 52. Perfil zimográfico de lacasas de *P. ostreatus* de FS 8.5 revelado en buffer a pH 7.5.



96h 120h 144h 188h 192h 216h 240h 264h 288h 312h



336h 360h 384h 408h 432h 456h 480h 504h 528h 552h

Figura 53. Perfil zimográfico de lacasas de *P. ostreatus* de FS 8.5 revelado en buffer a pH 8.5.

### 8.7. Parámetros cinéticos

La tabla 3 muestra los parámetros cinéticos evaluados en las FS con pH inicial de crecimiento 3.5, 4.5, 6.5, 7.5 y 8.5.

Tabla 3. Parámetros cinéticos evaluados.

	<b>pH inicial de crecimiento de <i>P. ostreatus</i></b>				
	<b>3.5</b>	<b>4.5</b>	<b>6.5</b>	<b>7.5</b>	<b>8.5</b>
<b><math>X_{m\acute{a}x}</math> (<math>g L^{-1}</math>)</b>	3.73 $\pm 0.07(b)$	4.43 $\pm 0.06(a)$	3.70 $\pm 0.04(b)$	3.64 $\pm 0.04(b)$	3.80 $\pm 0.1(b)$
<b><math>E_{m\acute{a}x}</math> (<math>U L^{-1}</math>)</b>	2137 $\pm 102(c)$	40856 $\pm 425(a)$	40368 $\pm 128(a)$	5440 $\pm 378(c)$	15473 $\pm 361(b)$
<b><math>\mu</math> (<math>h^{-1}</math>)</b>	0.038 $\pm 0.001(c)$	0.048 $\pm 0.0003(b)$	0.034 $\pm 0.0003(c)$	0.053 $\pm 0.005(b)$	0.078 $\pm 0.008(a)$
<b><math>Y_{x/s}</math> (<math>gX/gS</math>)</b>	0.31 $\pm 0.003(c)$	0.37 $\pm 0.005(a)$	0.31 $\pm 0.004(cd)$	0.30 $\pm 0.003(d)$	0.32 $\pm 0.003(b)$
<b><math>Y_{E/x}^+</math> (<math>U/gX</math>)</b>	572 $\pm 4.2(c)$	9216 $\pm 78.4(a)$	10910 $\pm 508.6(a)$	1493 $\pm 103.7(c)$	4072 $\pm 82.9(b)$
<b><math>Y_{E/s}^+</math> (<math>U/gS</math>)</b>	178 $\pm 6.9(c)$	3405 $\pm 39.8(a)$	3364 $\pm 57.7(a)$	453 $\pm 31.5(c)$	1289 $\pm 89.6(b)$
<b><math>Pro^+</math> (<math>U h^{-1}</math>)</b>	3.87 $\pm 0.03(d)$	141.86 $\pm 5.8(a)$	105.13 $\pm 17.4(b)$	12.59 $\pm 0.09(d)$	53.72 $\pm 3.7(c)$
<b><math>q_p^+</math> (<math>U gX^{-1} h^{-1}</math>)</b>	21.80 $\pm 1.3(c)$	438.82 $\pm 22.0(a)$	375.89 $\pm 52.5(ab)$	78.51 $\pm 3.9(c)$	317.61 $\pm 22.1(b)$
<b><math>q_s</math> (<math>gS gX^{-1} h^{-1}</math>)</b>	0.12 $\pm 0.005(c)$	0.13 $\pm 0.001(c)$	0.11 $\pm 0.00001(d)$	0.17 $\pm 0.003(b)$	0.25 $\pm 0.002(a)$

La tabla expresa medias  $\pm$  error estándar del experimento realizado por triplicado. En la misma fila, los resultados con la misma letra no indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ).

(<sup>+</sup>) Los valores están referidos a las actividades máximas de lacasas para cada pH inicial de crecimiento.

La FS con pH inicial 4.5 presentó mayor actividad enzimática de lacasas ( $40856 U L^{-1}$ , en buffer con pH 6.5 a las 288 h), mayor producción de biomasa ( $4.43 g L^{-1}$ ) y fue el sistema más eficiente ( $Pro$ ,  $141.86 U h^{-1}$ ). De acuerdo con el valor de  $\mu$ , la FS con crecimiento más rápido fue con pH inicial 8.5. La FS con pH inicial 3.5 se caracterizó por tener la menor actividad de lacasas y menor productividad.



## 9. DISCUSIÓN

Existen diversos reportes que han comparado la FS con la FL, principalmente, la producción de metabolitos como enzimas (Díaz-Godínez y cols. 2001, Téllez-Téllez y cols. 2008). Téllez-Téllez y cols. (2008) obtuvieron mayor rendimiento de biomasa y producción de lacasas en FL ( $13000 \text{ U L}^{-1}$ ,  $5.6 \text{ g L}^{-1}$ ) comparado con FS ( $2430 \text{ U L}^{-1}$ ,  $4.5 \text{ g L}^{-1}$ ) probablemente por la alta actividad de proteasas presente en FS y no en FL. En contraste, las mayores actividades de lacasas de *L. edodes*, *Panus tigrinus* y *P. ostreatus* se obtuvieron en FS y no en FL (Fenice y cols. 2003, Elisashvili y cols. 2008, Mazumder y cols. 2009). Estos resultados muestran que los rendimientos de lacasas no solo varían entre las técnicas de cultivo, sino que también está influenciada por el sustrato empleado en la FS. En este trabajo, la producción de lacasas empleando las mismas condiciones de cultivo que Téllez-Téllez y cols. (pH 6.5), fue 7 veces mayor en el pH inicial de crecimiento 4.5, lo que sugiere que el pH es tan importante para la producción de lacasas como la fuente de carbono y nitrógeno y la presencia de inductores en el medio de cultivo. En adición, la variación de la actividad de lacasas y rendimientos (entre fermentaciones) puede ser atribuida al gasto energético realizado por *P. ostreatus* para buscar un medio con pH adecuado para su crecimiento.

Al emplear bagazo, paja o cualquier material de residuos ligninocelulósicos en las FS se pueden obtener ventajas económicas sobre la FL, sin embargo, se encuentran desventajas pues la composición del medio de cultivo es compleja, y la caracterización de la misma se torna complicada.

A pesar que la fermentación es un bioproceso ampliamente estudiado, poco se conoce sobre su variante sobre soportes inertes. Particularmente, es un proceso que concede ventajas como la fácil cuantificación de biomasa y la resistencia a la represión catabólica (Viniegra-González 2006) debido al sistema de regulación de difusión que otorgan los soportes sólidos. Las FS parecen trabajar en forma similar a

la natural o como reactores por lotes con oxigenación alta y bajo suministro de azúcar.

El modelo empleado para describir el crecimiento de *P. ostreatus* en cada una de las condiciones de FS fue altamente predictivo, arrojando valores de ajuste superiores a 95% de los datos experimentales. La productividad de las fermentaciones es un parámetro que mide la eficiencia de producción de enzimas, relacionando la actividad enzimática de lacasas con el tiempo en que son producidas, siendo las fermentaciones con pH inicial de crecimiento 4.5 y 6.5 las más productivas con 141.86 y 105.13 U h<sup>-1</sup>, y la menos productiva fue la FS con pH inicial de crecimiento 3.5 con 3.87 U h<sup>-1</sup>.

Contrastando los resultados obtenidos en este experimento con reportes presentados que indican que el pH óptimo de crecimiento de *P. ostreatus* es 6.5 obtenido en FL (Madeiros y cols. 1999, Sánchez y Viniegra-González 1996, Macaya-Lizano 1975), en este trabajo, los pH en los cuales se observó crecimiento más rápido fue 4.5, 7.5 y 8.5 ( $\mu$ ; 0.048, 0.053 y 0.078 h<sup>-1</sup>) y donde se observó mayor producción de biomasa en el pH inicial de crecimiento 4.5 ( $X_{m\acute{a}x}$ , 4.43 g L<sup>-1</sup>). En concordancia, Díaz (2009) reportó al pH 4.5 en el que *P. ostreatus* mejor se desarrolló FL ( $\mu$ , 0.034 h<sup>-1</sup> y  $X_{m\acute{a}x}$ , 5.5 g L<sup>-1</sup>). Las elevadas tasas de crecimiento específico (en pH inicial de crecimiento 7.5, 0.053 h<sup>-1</sup> y pH inicial de crecimiento 8.5, 0.078h<sup>-1</sup>) podrían estar relacionadas con el corto periodo de adaptación requerido por *P. ostreatus* en medios con pH alcalinos.

El pH de un cultivo puede modificarse en respuesta de las actividades metabólicas de un microorganismo. En las fermentaciones con pH inicial de crecimiento 3.5 y 4.5 se observó incremento en el valor de pH respecto al valor inicial. La razón aparente de este aumento puede deberse a la hidrólisis de compuestos nitrogenados presentes en el medio de cultivo o desaminación de proteínas. Se sugiere que durante el crecimiento de *P. ostreatus* existe una

alteración metabólica como respuesta a los pH ácidos del medio de cultivo, expresado en la  $\mu$  elevada, en comparación con Díaz (2009) y se interpreta como el consumo temprano de la fuente de nitrógeno, no permitiendo otorgar al sistema la amortiguación necesaria en hasta el término del proceso. Sin embargo, la situación no es la misma para la FS con pH inicial de crecimiento 6.5 en la que se observa que el crecimiento de *P. ostreatus* fue menor, realizando el consumo gradual del nitrógeno presente, proporcionando la posibilidad al sistema de amortiguar el pH hasta el término del bioproceso. Por otro lado, durante las fermentaciones con pH inicial de 7.5 y 8.5 se observa decremento en el pH llegando a valores próximos a 6 y tasa de crecimiento específico elevada de hasta 1.5 veces mayor al pH inicial 4.5 – donde se reportó la mayor cantidad de biomasa–. La acidificación del medio de cultivo durante el crecimiento de *P. ostreatus* está relacionada con la producción de ácidos orgánicos. Las primeras 100 h del proceso son importantes, pues el hongo regula el pH del medio para garantizar el crecimiento, mediante el flujo de protones y cationes a nivel la membrana celular y así, desarrollarse en un rango amplio de  $[H^+]$ . En general, los hongos crecen en un rango amplio de pH, y el óptimo se ha situado en el rango ácido. En estos organismos, el pH no solo afecta el crecimiento sino también la producción de metabolitos debido a la permeabilidad celular y la disponibilidad de algunos metales como magnesio, fósforo, hierro, calcio. Similar al comportamiento observado en *P. ostreatus*, Tekere y cols. (2001) observaron alteraciones en el valor de pH inicial del medio de cultivo durante el crecimiento de algunos basidiomicetes: el pH tendía a incrementarse cuando el pH inicial era menor a 4.0 y cuando el pH era mayor a 4.5, se observó lo opuesto. Moreyra-Neto y cols. (2009) reportaron que el pH del medio de cultivo de *Lentinus crinitus* y *Psilocybe castanella* fue modificado por los hongos, ajustándolo a un valor óptimo para su crecimiento. Durante el crecimiento de *L. crinitus*, se alteró el pH del medio de cultivo (de 2.5 a 4.0) y durante el crecimiento de *P. castanella* se observó un fenómeno similar, sin embargo, cuando el pH inicial fue mayor a 4.0, éste no se estabilizó durante el periodo de incubación.

Mouso y cols. (2008) reportaron que para el hongo de pudrición blanca *Stereum hirsutum*, la regulación del pH inicial del medio de cultivo es importante no solo por las implicaciones propias del pH, sino por las interacciones posibles con otros compuestos. Los autores reportaron que la máxima producción de lacasas bajo condiciones estudiadas, se obtuvo a pH 5.5, y a medida que el pH se incrementaba (alcalinidad), ésta, se afectaba negativamente. Esta conclusión es aplicable en parte a nuestros resultados, porque a medida que el pH inicial es elevado, la actividad enzimática se disminuye, sin contemplar la FS con pH inicial 3.5, donde se cuantifica a la menor actividad de lacasas. Se sabe que los pH ácidos son preferidos para la producción de enzimas ligninolíticas (Mansur y cols. 2003), sin embargo, nuestros resultados muestran que el pH más bajo fue el favoreció en menor grado la actividad de lacasas.

La actividad enzimática de lacasas fue evaluada empleando DMP como sustrato en diferentes soluciones amortiguadores de pH (3.5, 4.5, 6.5, 7.5 y 8.5). La actividad máxima de lacasas reportada se encontró en las FS con pH inicial de crecimiento 4.5 y 6.5 (40856 y 40368 U L<sup>-1</sup>). La FS con pH inicial de crecimiento 3.5 ha sido descrita por los parámetros cinéticos de menor rendimiento. Las mejores actividades catalíticas están asociadas positivamente con pH inicial de crecimiento ligeramente ácido (4.5 y 6.5) y con el agotamiento de glucosa. El pH óptimo, en el cuál la actividad enzimática es máxima, es característico para cada enzima. En este rango de pH óptimo, los grupos aceptores y donadores de protones del núcleo activo están en el estado ionizado necesario para que la enzima se encuentre activa. Fuera de este rango, la unión con el sustrato no es posible y si el valor de pH excede cierto límite, la enzima puede ser desnaturalizada de forma irreversible. Este pH óptimo depende de la composición del medio, la temperatura y la estabilidad de la enzima en ambientes ácidos o alcalinos. El rango de estabilidad del pH no coincide necesariamente con el rango pH de óptimo de reacción (Xu 1997). Ha sido reportado que la actividad de lacasas y de otras enzimas ligninolíticas está relacionada con la fase estacionaria de crecimiento (Mansur y cols. 2003), en esta investigación, los

títulos mayores de actividad de lacasas se observaron durante la fase estacionaria del crecimiento de *P. ostreatus*.

Díaz-Godínez (2001) reportó que la producción indeseable de proteasas en FS (empleando espuma de poliuretano) fue mínima. En este estudio, sólo se observó actividad enzimática de proteasas hacia el término (520 h) de la FS con pH inicial de crecimiento 3.5, sin embargo, ésta no es significativa. Durante las cuatro FS restantes, no se presentó actividad.

Los hongos de pudrición blanca producen varias isoenzimas de oxidasas y peroxidasas extracelulares las cuales están involucradas en la degradación de lignina en su ambiente natural. Ha sido mostrada la existencia de múltiples genes que participan en la codificación de las isoenzimas de lacasas y la dependencia de las condiciones de cultivo en la expresión del gen de lacasa (Faraco 2003). La función biológica de las lacasas está estrechamente relacionada con el desarrollo celular, formación de primordios, degradación de lignina, patogénesis y degradación de algunos contaminantes.

En *P. ostreatus*, Palmieri y cols. (2003) reportó la presencia de 8 isoenzimas de lacasas, de las cuales, actualmente solo 6 han sido caracterizadas. En *P. ostreatus*, Téllez-Téllez y cols. (2005) observaron 2 isoenzimas de lacasas cuando fue desarrollado en cajas de Petri y Tlecuítl-Beristain y cols. (2008) reportó la producción de 4 isoenzimas en FL. Téllez-Téllez y cols. (2008) obtuvieron de los cultivos en medio líquido y sólido 4 isoenzimas de lacasas. Díaz (2009) reportó la presencia de 6 isoenzimas de lacasas obtenidas por FL a pH inicial 8.5 observadas en pH 4.5 y en el pH de producción solo fueron encontradas 2. Nuestros perfiles zimográficos revelan la presencia de 7 bandas con actividad de lacasas, hasta ahora se desconoce si corresponden a 7 isoenzimas de las 8 isoenzimas reportadas encontradas en la FS con pH inicial 7.5 y observadas a pH 3.5. En el pH de producción, solo fue posible observar hasta 4 de las 7 isoenzimas observadas.

Respecto a la FS donde se obtuvo la mayor actividad de lacasas, en la FS con pH inicial 4.5 únicamente se observaron 2 isoenzimas de lacasas mientras que en la FS con pH inicial 6.5 se observaron hasta 3. No se observa que las isoenzimas tengan algún patrón respecto a la etapa del crecimiento en que fueron localizadas. Sin embargo, las isoenzimas observadas durante las fases de adaptación y exponencial de crecimiento podrían estar relacionadas con la degradación del sustrato y las isoenzimas observadas durante la fase estacionaria podrían relacionarse con la morfogénesis del hongo y con los procesos de pigmentación. Díaz y cols. (2011) reportaron dos bandas de actividad de lacasas producidas por *P. ostreatus*, una de ellas presente durante toda la fermentación y otra presenta cuando se observó incremento en el pH del medio de 3.5 a 6.5. Los autores sugieren que algunas isoenzimas de lacasas pueden ser reguladas por señales de pH. Das y cols. (1997) reportaron que del cultivo micelial de *P. florida* se produjeron al menos dos isoenzimas de lacasas, una de ellas, aparentemente relacionada con el crecimiento micelial del hongo. Es posible que las isoenzimas observadas durante toda las FS, sean isoenzimas constitutivas y relacionadas directamente con el crecimiento de *P. ostreatus*. La presencia de diferentes isoenzimas de lacasas en *P. ostreatus* y en otros organismos está relacionada con diversas funciones fisiológicas y metabólicas, y es explicada por la existencia de múltiples genes que participan en su codificación.

Algunos autores han reportado que las enzimas extracelulares del complejo ligninolítico existen en múltiples formas. Las síntesis de isoenzimas puede deberse a productos de genes diferentes, aunque también pueden deberse a cambios postraduccionales como proteólisis y glicosilación. Se pueden sintetizar como consecuencia de estados fisiológicos diferentes (composición del medio de cultivo, pH, temperatura) a partir de genes regulados diferencialmente. En medios de cultivo ligeramente diferentes se sintetizan diferentes formas de una misma enzima, que a pesar de poseer características catalíticas similares, difieren notablemente de sus características fisicoquímicas. En la naturaleza, *P. ostreatus* se encuentra con diversos sustratos y condiciones ambientales, entonces las diferentes isoenzimas se

producen en función de las necesidades generadas, es decir, con propiedades adecuadas a las circunstancias que le permitan la sobrevivencia.

## 10. CONCLUSIONES

Las diferencias observadas en la actividad enzimática de lacasas son atribuidas al crecimiento de *P. ostreatus* en los diferentes pH, y no son efecto de la variación del pH ya que este se mantuvo constante durante la etapa de adaptación y exponencial del crecimiento.

El pH es un factor importante durante el crecimiento de *P. ostreatus*. Opuesto a diversos autores, hasta ahora, *P. ostreatus* mostró el crecimiento óptimo en pH 4.5.

Es evidente que el pH de crecimiento es diferente al pH de producción de lacasas y al pH en el que las enzimas presentaron su mayor actividad catalítica.

La actividad enzimática de lacasas y la síntesis de isoenzimas son dependientes de las condiciones del medio de cultivo, es decir, el pH promueve la síntesis de diferentes isoenzimas de lacasas. A medida que el pH se incrementó, el número de isoenzimas de lacasas aumentó. Se observaron hasta 7 bandas de actividad lacasas en la FS con pH inicial de crecimiento 7.5.



## 11. PERSPECTIVAS

Se ha observado que la cepa de la ATCC 32783 de *P. ostreatus* es versátil y es capaz de crecer en un rango amplio de pH. Es posible que éste atributo, permita la modificación de parámetros termodinámicos como la  $A_w$ . Las variaciones en la  $A_w$  pueden afectar la tasa de crecimiento, la composición celular y la actividad metabólica de los microorganismos, por lo tanto, se propone modificar y evaluar la producción y actividad de lacasas.

Se lograron observar hasta siete bandas de actividad de lacasas en los zimogramas, sin embargo, se desconoce si las 7 corresponden a isoenzimas reportadas o a subunidades de lacasas diméricas. Se propone la caracterización de las isoenzimas observadas mediante técnicas bioquímicas y moleculares para identificar y comparar con las isoenzimas reportadas (Palmieri y cols. 2003).

Es posible que la actividad proteolítica haya generado pérdida de la actividad de lacasas. A pesar que no fue reportada actividad de proteasas en esta investigación, se sugiere realizar nuevamente para confirmar o descartar su presencia en el medio de cultivo.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Abadulla E, Tzanov T, Costa S, Robra K-H, Covaco-Paulo A. 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsute*. Applied and Environmental Microbiology 66: 3357-3362.
- Adejoye OD, Fasidi IO. 2009. Effect of cultural conditions on biomass and laccase production in submerged medium by *Schizophyllum commune* (Fr.). A Nigerian edible mushroom. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry, 8(11): 1186-1193.
- Aretxaga A, Romero S, Sarra M, Vincent T. 2001. Adsorption step in the biological degradation of a textil dye. Biotechnology Progress 17: 664-698.
- Bailey SP, Bailey AC. 1995. Química orgánica, conceptos y aplicaciones. Quinta edición. Prentice Hall. México DF. pp. 265.
- Bajpai P. 1999. Application of enzymes in the pulp and paper industry. Biotechnology Progress 15: 147-157.
- Baldrian P. 2006. Fungal laccases occurrence and properties. FEMS Microbiology Reviews. 30: 215-242.
- Barilli A. 2004. Enzyme-assisted enantioselective synthesis of the alkaloid (C)-aloperine. Tetrahedron Asymmetry 15: 2921-2925.
- Barreca AM. 2003. Laccase-mediated oxidation of lignin model for improved delignification procedures. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 26: 105-110.
- Bertrand G. 1896. Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l Academie des Sciences 9: 463-465.
- Bigelis R, He H, Yang H, Chang L, Greenstein M. 2006. Production of fungal antibiotics using polymerics solids supports in solid-state and liquid fermentation. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 33: 815-826.
- Bobek P, Ozdin O, Mikus M. 1995. Dietary oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) accelerates plasma cholesterol turnover in hypercholesterolaemic rats. Psysiological Research 44: 287-291.
- Bobek P, Ozdin L, Galbavy S. 1998. Dose- and time-dependent hypercholesterolaemic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rats. Nutrition 14: 282-286.
- Bourbonnais R, Paice MG. 1990. Oxidation of nonphenolic substrates –an expanded role for laccase in lignin biodegradation. FEBS Letters. 267: 99-102.
- Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. Microbiological and Molecular Biology Review 66: 447-459.

- Chivukula M, Renganathan V. 1995. Phenolic azo dye oxidation from *Pyricularia oryzae*. Applied and Environmental Microbiology 4374-4377.
- Claus H. 2003. Laccases and their occurrence in prokaryotes. Archives Microbiology 179: 145-150.
- Claus H. 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. Micron 35: 93-96.
- D' Souza TM, Merritt SC, Reddy A. 1999. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. Applied and Environmental Microbiology 65 (12): 5307-5313.
- Degollado-Estrada A. 2008. Evaluación sobre diferentes sustratos de la actividad de lacasas de dos cepas de *Pleurotus ostreatus* producida por fermentación sumergida. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala. México.
- De Souza C, Zilly A, Peralta R. 2002. Production of laccase as the sole phenoloxidase by a Brazilian strain of *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation. Journal of Basic Microbiology 42: 83-90.
- Dekker R, Barbosa AM, Giesse E, Godoy S, Covizzi L. 2007. Influence of nutrients on enhancing laccase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. International Microbiology 10: 177-185.
- Díaz R. 2009. Efecto del pH inicial de desarrollo de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida sobre su actividad de lacasas. Tesis de Maestría en Biotecnología Aplicada. Instituto Politécnico Nacional-Universidad Autónoma de Tlaxcala. México.
- Díaz R, Alonso S, Sánchez C, Tomasini A, Bibbins-Martínez M, Díaz-Godínez G. 2011. Characterization of the growth and laccase activity of strains of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. Bioresources 6 (1): 282-290.
- Díaz R, Sánchez C, Bibbins-Martínez M, Díaz-Godínez G. 2011. Efect of medium pH on laccase zymogram patterns produced by *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. African Journal of Microbiology Reserch (en prensa).
- Díaz-Godínez G. 1997. Producción de exopoligalacturonasas de *Aspergillus niger* por fermentación en medio sólido utilizando como soporte espuma de poliuretano. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México.
- Díaz-Godínez G, Soriano J, Augur C, Viniegra-González G. 2001. Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 64: 271-275.
- Domínguez A, Rivela I, Rodríguez-Couto S, Angeles-Sanroman M. 2001. Design of a new rotating drum bioreactor for ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on an inert support. Process Biochemistry Journal 37: 549-554.
- Durán N, Rosa AM, D'Ammnibale A, Gianfreda L. 2002. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. Enzyme and Microbial Technology. 31: 907-931.

- Edens W, Goins T, Dooley D, Henson J. 1999. Purification and characterization of secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3071-3074.
- Eggert C. 1996. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Letters*. 391: 144-148.
- Elisashvili V, Kachlishvili E, Penninckx M. 2008. Effect of growth substrate, methods of fermentation, and nitrogen source on ligninocellulose-degrading enzymes production by White-rot basidiomycetes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35: 1531-1538.
- Faraco V, Giardina P, Sannia G. 2003. Metal-responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters. *Microbiology* 149: 2155-2162.
- Fabbrini M. 2001. An oxidation of alcohols by oxygen with the enzyme laccases and mediation by TEMPO. *Tetrahedron Letters*. 42: 7551-7553.
- Fenice M, Giovannozzi SG, Federici F, D'Annibale A. 2003. Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. *Journal of Biotechnology* 100: 77-85.
- Fritz-Langhals E, Kunath B. 1998. Synthesis of aromatic aldehydes by laccase-mediator assisted oxidation. *Tetrahedron Letters*. 39: 5955-5956.
- Fukushima, Kirk. 1995. Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispora* lignin degrading system. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 872-876.
- Galante YM, Formantici C. 2003. Enzyme applications in detergency and in manufacturing industries. *Current Organic Chemistry*. 7: 1399-1422.
- Galhaup C, Goller S, Peterbauer C, Strauss J, Haltrich D. 2002. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology* 148: 2159-2169.
- Gervais P, Molin P, Grajek W, Bensoussan M. 1988. Influence of the water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. *Biotechnology and Bioengineering* 31: 457-463.
- Giardina P, Faraco V, Pezzella C, Piscitelli A, Vanhulle S, Sannia G. 2010. Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67: 369-385
- Gianfreda L, Xu F, Bollag JM. 1999. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal* 3: 1-25.
- 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.
- Giardina P, Cannino R, Martirani L, Marzullo L. 1995. Cloning and sequencing of the laccase gen from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (6): 2408-2413.

- Guillén F, Muñoz C, Gómez-Torobio V, Martínez TA y Martínez JM. 2000. Oxygen activation during oxidation of methoxyhydroquinones by laccase from *Pleurotus eryngii*. *Applied Microbiology Biotechnology* 66: 700-7006.
- Guinberteau J. 1990. Definition and taxonomical place of the genus *Pleurotus* in the mushrooms classification. *Bulletin de la Federation Nationale des Syndicats Agricoles de Cultivateurs de Champignons*. 48: 261-264.
- Hawksworth DL. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycology Research* 105: 1422-1432.
- Herrera T, Ulloa M. 1998. *El reino de los hongos: micología básica y aplicada*. Fondo de cultura económica. México, DF.
- Hölker U, Höfer M, Lenz J. 2004. Biotechnology advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64: 175-186.
- Hossain S, Hashimoto M, Choudhury E, Alam N, Hussain S, Hasan M, Choudhury S, Mahmud I. 2003. Dietary mushroom (*Pleurotus ostreatus*) ameliorates atherogenic lipid in hypercholesterolaemic rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 30, 470-475.
- Hublik G, Schinner F. 2000. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. *Enzyme and Microbial Technology*. 27: 330-336.
- Husain Q. 2006. Potential applications of the oxidoreductive enzymes in the decolorization and detoxification of textile and other synthetic dyes from polluted water. *Critical Reviews in Biotechnology* 26: 201-221.
- Juárez-Hernández J. 2006. Estudio de las condiciones de fermentación sumergida para la producción de lacasas de *Pleurotus ostreatus*. *Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas*. Universidad Autónoma de Tlaxcala. México.
- Kapdan IK, Kargi F. 2002. Biological decolorization of textile dyestuff containing wastewater by *Coriolus versicolor* in a rotation biological contactor. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 195-199.
- Kiiskinen L, Cruz K, Bailey M, Ylösmäki E, Siika-aho M, Saloheimo M, 2004. Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of a purified enzyme. *Microbiology* 150: 3065-3074.
- Kirk TK, Farrell RL. 1987. Enzymatic combustion: The microbial degradation of lignin. *Annual Review Microbiology*. 41: 465-505.
- Klonowska A, Gaudin C, Fournel A, Asso M, Le Petit J, Georgi M, Tron T. 2002. Characterization of a low redox potential laccase from the basidiomycete C30. *European Journal of Biochemistry* 269: 6119-6125.
- Kobayashi S. 2001. Artificial urushi. *Chemistry* 7: 4754-4760

- Krishna K, Ventaka S, Bhaskar V, Ramanaiah S, Lalit V, Pati B, Sarma P. 2005. Laccase production using *Pleurotus ostreatus* 1804 immobilized on PUF cubes in batch and packed bed reactors: influence of culture conditions. *Journal of Microbiology* 43: 301-307.
- Laborde J. 1896. Sur lacasse des vins. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences* 123: 1074-1075.
- Leonowicz A, Matuszewska A, Luterek J, Ziegenhagen D. 1999. Review: Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology* 27: 175-185.
- Leonowicz A, Cho NS, Luterek J, Wilkolazka A, WojtasWasilewska M, Matuszewska A, Hofrichter M, Wesenberg D, Rogalski J. 2001. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *Journal Basic Microbiology*. 41: 185-227.
- Li K, Xu F, Eriksson KL. 1999. Comparison of fungal laccase and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2654-2660.
- Litthauer D, van Vuuren MJ, Tonder A, Wolfaardt FW. 2007. Purification and kinetics of a thermostable laccase from *Pycnoporus sanguineus* (SCC 108). *Enzyme and Microbiology Technology* 40: 563-568.
- Macaya-Lizano AV. (1975). *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Quélet, forms et espèces affines. Comportment cultural et systématique. *Revue de Mycologie* 39: 1-57.
- Manda K. 2005. Laccase-induced cross-coupling of 4-aminobenzoic acid with p-dihydroxylated compounds 2,5-dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamide and 2,5-dihydroxybenzoic acid methyl esters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 35: 86-2.
- Mandeel Q, Al-Laith A, Mohamed S. 2005. Cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus* spp.) on various lignocellulosic wastes. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21: 601-607.
- Mansur M, Suárez T, Fernandez-Larrea JB, Brizuela MA, González AD. 1997. Identification of a laccase gene family in the new lignin-degrading basidiomycete CETC 20197. *Applied Environmental and Microbiology* 63: 2637-2646.
- Mansur M, Arias ME, Flärdh M. 2003. The White rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isoenzymes with different substrate specificities. *Mycologia* 95 (6): 1013-1020.
- Martins LO, Soares CM, Pereira MM, Teixeira M, Costa T, Jones GH, Henriques AO. 2002. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase which occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *The Journal of Biological Chemistry*. 277: 18849-18859.
- Mayer AM, Staples RC. 2002. Laccases: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60: 551-565.
- Mazumder S, Basu SK, Mukherjee M. 2009. Laccase production in solid-state and submerged fermentation by *Pleurotus ostreatus*. *Engineering in Life Sciences* 9: 45-52.

- Medeiros MB, Bento AV, Nunes ALL, Oliveira SC. 1999. Optimization of some variables that affect the synthesis of laccase by *Pleurotus ostreatus*. *Bioprocess Engineering* 21: 483-487.
- Membrillo I, Sánchez C, Meneses M, Favela E, Loera O. 2008. Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of ligninocellulotic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. *Bioresource Technology* 99: 7842-7847.
- Membrillo I, Sanchez C, Meneses M, Favela E, Loera O. 2011. Particle geometry affects differentially substrate composition an enzyme profiles by *Pleurotus ostreatus* growing on sugar cane bagasse. *Bioresource Technology* 102: 1581-1586.
- Mikolasch A. 2002. Synthesis of 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-propionic acid derivatives by N-coupling of amines using laccase. *Tetrahedron Letters* 58: 7589-7593.
- Miller G. 1959. Use of dinitrosalicilic acid for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31 (3): 426-428.
- Minussi, RC. 2002. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology* 13: 205-216.
- Mouso N, Papinutti L, Forchiassin F. 2003. Efecto combinado del cobre y pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de lacasa y manganeso peroxidasa por *Stereun hirsutum* (wild) *Revista Iberoamericana de Micología* 20: 176-178.
- Moreyra-Neto SL, Roberto-Matheus D, Gomes-Machado KM. 2009. Influence of pH on the growth, laccase activity and RBBR decolorization by tropical basidiomycetes. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52: 1075-1082.
- Morozova V, Shumakovich GP, Gorbacheva MA, Shleev SV, Yaropolov AI. 2007. Blue laccases. *Biochemistry-Moscow* 72:1136-1150.
- Muñoz C, Guillén F, Martínez AT, Martínez MJ. 1997. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mg<sup>2+</sup> oxidation. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2166-2174.
- Nagai M, Sato T, Watanabe H, Saito K, Kawata M, Enei H. 2002. Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60: 327-335.
- Niedermeyer THJ. 2005. Nuclear amination catalyzed by fungal laccases: reaction products of p-hydroquinones and primary aromatic amines. *Journal of Organic Chemistry* 70: 2002-2008.
- Nüske J, Scheibner K, Domberger U, Ullrich R, Hofrichter M. 2002. Large scale production of manganese-peroxidase using agaric white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 556-561.
- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Scaloni A, Capasso A, Sannia G. 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biological Chemistry* 272: 31301-31307.

- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Fontanella B, Sannia G. 2000. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 920-924.
- Palmieri G, Cennamo G, Faraco V, Amoresano A, Sannia G, Giardina P. 2003. Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 220-230.
- Palmieri G, Cennamo G, Sannia G. 2005. Remazol brilliant blue R decolorization by fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. *Enzyme and Microbial Technology* 36: 17-24.
- Pandey A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13: 81-84.
- Pandey A, Selvakumar P, Soccol CR, Nigam P. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science* 77: 149-162.
- Pointing SB. 2001. Feasibility of biorremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology Biotechnology* 57: 20-33.
- Raimbault M. 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal Biotechnology* 1: 1-15.
- Robinson T, Singh D, Nigam P. 2001. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55: 284-289.
- Rochefer D. 2004. Electron-transfer mediator systems for bleaching of paper pulp. *Green Chemistry Articles*. 6: 14-24.
- Rodríguez-Couto S, Toca-Herrera JL. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances* 24: 500-513.
- Rodríguez-Couto S, Toca-Herrera JL. 2007. Potential of solid-state fermentation for laccase production. *Applied Microbiology* 391-400.
- Rosconi F, Fraguas LF, Martínez-Drets G, Castro-Sowinski S. 2005. Purification and characterization of a periplasmic laccase produced by *Sinorhizobium mehloti*. *Enzyme and Microbial Technology*. 36: 800-807.
- Sánchez A, Ysunza F, Beltrán-García M, Esqueda M. 2002. Biodegradation of viticulture wastes by *Pleurotus*: a source of microbial and human food and its potential use in animal feeding. *Journal of Agricultural and food Chemistry* 50: 2537-2542.
- Sánchez C. 1998. Ultrastructural physiological and histological study de *Pleurotus* species. Ph. D. Dissertation. Manchester UK; the University of Manchester.
- Sánchez C, Viniegra-González G. 1996. Detection of highly productive strains of *Pleurotus ostreatus* by their tolerance to 2-deoxy-D-glucose in starch-based media. *Mycology Research* 100: 455-461.
- Schliephake K, Lonergan GT, Jones IK, Baker W. 1993. Decolorization of pigment plant effluent by *Pycnoporus cinnabarinus* in packed-bed reactor. *Biotechnology Letters* 15: 1185-1188.



- Semenov AN. 1993. Peroxidase and laccase as catalysts for removal of the phenylhydrazide protecting group under mild conditions. *Biotechnology and Bioengineering* 42: 1137-1141.
- Snajdr J, Baldrian P. 2007. Temperature affects the production, activity and stability of ligninolytic enzymes in *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor*. *Folia Microbiologica* 52 (5): 498-502.
- Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE. 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews* 96: 2563-2605.
- Sonden B T, Endo K, Ito Tsujibo H, Miyamoto K, Inamori Y. 2001. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence and expression. *Bioscience and Biotechnology Biochemical*. 6 (10): 2167-2175.
- Stajic M, Persky L, Friesem D, Hadar Y, Wasser S, Nevo E, Vukojevic J. 2006. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme and Microbial Technology* 38: 65-73
- Talbot NJ. 1997. Fungal biology: growing into the air. *Current Biology* 7: 78-81.
- Talbot NJ. 2003. Aerial morphogenesis: enter the chaplins. *Current Biology* 13: 696-698.
- Tauber MM, Guebitz GM, Rehoek A. 2005. Degradation of azo dyes by laccase and ultrasound treatment. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 2600-2607.
- Tekere M, Mswaka A, Zvauya YR, Read JS. 2001. Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 28: 420-426.
- Téllez-Jurado A, Arana-Cuenca A, González-Beccerra AE, Viniegra-González G, Loera O. 2005. Expression of a heterologous laccase by *Aspergillus niger* cultured by solid-state and submerged fermentations. *Enzyme and Microbial Technology* 38: 665-669.
- Téllez-Téllez M, Fernández FJ, Sánchez C, Montiel-González AM, Díaz-Godínez G. 2008. Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81: 675-679.
- Téllez-Téllez M, Sánchez, C, Montiel-González A.M, Díaz-Godínez G. 2005. Laccases activity of the peripheral and central zones of the vegetative mycelium of colonies of *Pleurotus* spp. *Agro Food Industry Hi-Tech* 2: 38-40.
- Tinoco R, Pickard AM, Vazquez-Duhalt R. 2001. Kinetics differences of purified laccases from a six *Pleurotus ostreatus* strains. *Letters in Applied Microbiology* 32: 331-335.
- Tlecuítl-Beristain S, Sánchez C, Loera O, Robson GD, Díaz-Godínez G. 2008. Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: Production of a novel laccases isoform. *Mycological Research* 112: 1080-1084.
- Torres E. 2003. Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental* 46: 1-15.
- Uyama H, Kobayashi S. 2003. Enzymatic synthesis of polyphenols. *Current Organic Chemistry* 7: 1387-1397.

- Verstrepen KJ, Reynolds TB, Fink GR. 2004. Origins of variation in the fungal cell surface. *Nature Reviews Microbiology* 2: 533-540.
- Viniegra-González G, Favela-Torres E. 2006. Why solid-state fermentation seems to be resistant to catabolite repression? *Food Technology and Biotechnology* 44: 397-406.
- Viniegra-González G, Favela-Torres E, Aguilar CN, Romero-Gómez S, Díaz-Godínez G, Augur C. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biotechnology Engineering Journal* 13: 157-167.
- Ward G, Belinky AP, Hadart Y, Bilkis I, Dosoretz GC. 2002. The influence of non-phenolic mediators and phenolic co-substrates on the oxidation of 4-bromophenol by lignin peroxidase. *Enzyme and Microbiology Technology* 30: 490-498.
- Wesenberg D, Kyriakides I, Agathos SN. 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advanced* 22 (1-2): 161-87.
- Wosten HAB, van Wetter MA, Lugones LG, van der Mei HC, Busscher HJ, Wessels JGH. 1999. How a fungus escapes the water to grow into the air. *Current Biology* 9: 85-88.
- Wilkolazka AJ, Kochmanska-Rdest J, Malarczyk E, Wardas W, Leonowicz A. 2002. Fungi and their ability to decolorize azo and anthraquinonic dyes. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 566-572.
- Xu F. 1997. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 924-928.
- Xu F. 2005. Applications of oxidoreductases: recent progress. *Industrial Biotechnology* 1: 38-50.
- Yaropolov AI, Skorobogat'ko OV, Vartanov SS, Varfolomeyev SD. 1994. Laccase. Properties, catalytic mechanism, and applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 49: 257-80.
- Yoshida H. 1883. Chemistry of lacquer (*urushi*). *Journal of the Chemical Society* 43: 472-486.
- Zawadi CA, James C. 2008. Effect of cultivation pH and agitation rate on growth and xylanase production by *Aspergillus oryzae* in spent sulphite liquor. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 35: 587-594.
- Zilly A, de Souza CGM, Barbosa-Tessman IP, Peralta RM. 2002. Decolorization of industrial dyes by a brazilian strain of *Pleurotus pulmonarius* producing laccase as the sole phenol-oxidizing enzyme. *Folia Microbiologica* 47: 315-319.