



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado en Ciencias Biológicas

Nombre de la Tesis

Efecto de la temperatura de crecimiento de *Pleurotus ostreatus*
en fermentación sólida sobre su actividad de lacasas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Gustavo Montalvo Galicia

Director:

Dr. Gerardo Díaz Godínez



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado en Ciencias Biológicas

Nombre de la Tesis

Efecto de la temperatura de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en
fermentación sólida sobre su actividad de lacasas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Gustavo Montalvo Galicia

Comité Tutorial

Director

Dr. Gerardo Díaz Godínez

Tutores

Dra. María del Carmen Sánchez Hernández

Dr. Octavio Loera Corral

Dra. Maura Téllez Téllez

Dr. Saúl Tlecuil Beristain

M. en B. Rubén Díaz Godínez



**COORDINACIÓN DE LA MAESTRÍA
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que Gustavo Montalvo Galicia realiza para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es “Efecto de la temperatura de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en fermentación solida sobre su actividad de lacasas”.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., ENERO 14 DE 2013

DR. GERARDO DÍAZ GODÍNEZ

DRA. MARÍA DEL CARMEN SÁNCHEZ HERNÁNDEZ

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

DRA. MAURA TÉLLEZ TÉLLEZ

DR. SAÚL TLECUHTL BERISTAIN

M. EN B. RUBÉN DÍAZ GODÍNEZ



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado Bajo la Norma:
ISO 9001:2000-NMX-CC-9001-IMNC-2000



AGRADECIMIENTOS

- Al posgrado en Ciencias Biológicas del CTBC, UAT, por el apoyo durante estos dos años.
- Al apoyo recibido durante estos dos años por CONACYT con la beca número372605.
- Al Dr. Gerardo Díaz Godínez por apoyarme durante todo este tiempo, por aceptarme en su laboratorio y por ser un muy buen amigo.
- Al Dr. Octavio Loera Corral por apoyarme durante estos dos años, por tomarse la molestia y el tiempo de ayudarme con mi trabajo y por asistir desde tan lejos a mis exámenes.
- A la Dra Ma. del Carmen Sánchez Hernández por su apoyo y su dirección en la realización de este trabajo.
- Al M. en B. Ruben Díaz Godínez por dirigir esta tesis, por enseñarme e impartirme clases y por su apoyo en el laboratorio.
- A la Dra. Maura Téllez Téllez por su dirección y por su ayuda en el laboratorio. Además, por tenerme paciencia durante estos 2 años.
- Al Dr. Saúl Tlecuítl Beristain por aceptar evaluar este trabajo.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

A mis padres por apoyarme siempre y por darme todo por mí, por su incondicional amor y por no darse por vencidos nunca y seguir de pie ante las dificultades.

A mi hermano por su inquebrantable confianza y por ser la persona que más fe me ha tenido.

A Ixchel por ayudarme y apoyarme por todo este tiempo, además por haberme dado un regalo muy hermoso.

A todas las personas que participaron en mi formación académica y personal.

**POR TODO ESTO LES DOY LAS GRACIAS
SE LOS AGRADEZCO DE CORAZON**

RESUMEN

Los hongos son organismos eucariontes, que se caracterizan por ser inmóviles, presentar talos, que pueden ser estructuras ramificadas llamadas micelios o cuerpos más compactos denominados basidiocarpos, en lugar de tejidos. Todos los hongos son heterótrofos, es decir, requieren materia orgánica preformada que utilizan como fuente de carbono y energía para la síntesis de estructuras celulares. En el cuerpo fructífero de los hongos macroscópicos, el estípite o pie y el característico píleo o sombrero están conformados por micelio ramificado; en la parte inferior del píleo se encuentran las laminillas, mismas que constituyen el himenio, lugar donde se forman y se liberan las esporas una vez que el cuerpo fructífero ha madurado.

Los hongos del género *Pleurotus* son basidiomicetos de pudrición blanca, con un alto valor nutricional, propiedades terapéuticas y variadas aplicaciones biotecnológicas. Una de sus principales características es su capacidad de degradar compuestos lignocelulósicos, gracias a sus enzimas, dentro de este género encontramos a la especie *Pleurotus ostreatus*, este es un hongo degradador de materia orgánica que se alimenta principalmente de lignina y celulosa entre otros, esto debido a que presenta un complejo enzimático en donde podemos encontrar a celulasas, hemicelulasa, manganeso peroxidasa (MnP), versátil peroxidasa (VP), alcohol aril oxidasa (AAO) y lacasa.

En esta investigación se realizaron fermentaciones en matraces de 250 ml adicionando 0.5 g de espuma de poliuretano (0.5 cm por lado) y 15 ml de medio de cultivo diseñado para la producción de enzimas lacasa. Las temperaturas en las que se incubó este hongo fueron desde 10 hasta 35 °C con intervalos de 5 °C, durante 24 días tomando muestras cada 24 horas. Las muestras se tomaron por triplicado para cada experimento. Los resultados nos muestran que la actividad enzimática fue mayor a 30 °C con un valor de 62500U/l en un tiempo de 384 h de incubación. Mientras que para la producción de biomasa y la tasa específica de crecimiento fue mayor a 25 °C con valores de μ de 0.040 h y de X_{max} de 5.13 g/l respectivamente. En las fermentaciones realizadas a 10 y 35 °C no se observó crecimiento.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	14
1.1 Generalidades de los hongos.....	15
1.2 Características de <i>Pleurotus spp.</i>	17
1.3 Ciclo de vida de <i>Pleurotus spp.</i>	18
1.4 Importancia ambiental de <i>Pleurotus spp.</i>	21
1.5 <i>Pleurotus ostreatus</i>	22
1.6 Fisiología de <i>Pleurotus ostreatus</i>	22
1.7 Morfología de <i>Pleurotus ostreatus</i>	23
1.8 Fermentación sólida	24
1.9 Microorganismos utilizados en FMS	25
1.10 Humedad y Actividad de Agua (AW) en FMS.....	25
1.11 Soportes utilizados en FMS	26
1.12 Poliuretano	27
1.13 Lacasas	28
1.14 Usos potenciales de las lacasas	32
1.15 Temperatura	35
1.16 Temperatura de crecimiento de los microorganismos	36
2. ANTECEDENTES.....	37
3. JUSTIFICACIÓN.....	42
4. HIPOTESIS.....	43
5. OBJETIVOS.....	43
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	43
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
6. METODOLOGÍA	44
6.1 Cepa e inóculo	44
6.2 Condiciones de cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i>	44
6.3 Obtención del extracto enzimático.....	44
6.4 Biomasa y parámetros cinéticos de crecimiento del hongo	45
6.5 Determinación de la concentración de proteína soluble	45
6.6 Determinación de la actividad enzimática	45
6.7 Determinación del pH de los extractos crudos enzimáticos	46

6.8	Identificación de isoformas con actividad de lacasas	46
6.9	Cuantificación de azúcares residuales	46
7.	RESULTADOS	47
7.1	Fermentación 15 °C.....	47
7.1.1	Actividad enzimática.....	47
7.1.2	Biomasa.....	47
7.1.3	pH de la fermentación	48
7.1.4	Concentración de proteína.....	49
7.1.5	Azúcares residuales	49
7.1.6	Isoformas de lacasas.....	50
7.2	Fermentación 20°C.....	51
7.2.1	Actividad enzimática.....	51
7.2.2	Biomasa.....	52
7.2.3	pH de la fermentación	53
7.2.4	Concentración de proteína.....	53
7.2.5	Azúcares residuales	54
7.2.6	Isoformas de lacasas.....	55
7.3	Fermentación 25 °C.....	56
7.3.1	Actividad enzimática.....	56
7.3.2	Biomasa.....	56
7.3.3	pH de la fermentación	57
7.3.4	Concentración de Proteína	58
7.3.5	Azúcares residuales	58
7.3.6	Isoformas de lacasas.....	59
7.4	Fermentación 30°C.....	61
7.4.1	Actividad enzimática.....	61
7.4.2	Biomasa.....	61
7.4.3	pH de la fermentación	62
7.4.4	Concentración de proteína.....	63
7.4.5	Azúcares residuales	63
7.4.6	Isoformas de lacasas.....	64

7.5	Parámetros cinéticos	66
8.	DISCUSIONES.....	67
9.	CONCLUSIONES	72
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol filogenético de los principales linajes de hongos basados en datos moleculares (Lutzoni y cols. 2004).	15
Figura 2. Ciclo sexual de <i>Pleurotus</i>	19
Figura 3. Micrografías de micelios de <i>Pleurotus</i> spp. (a) dicariótico (con fíbulas) y (b) monocariótico (sin fíbulas).	20
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Pleurotus</i> spp. (Valencia del Toro 2002).	21
Figura 5. Morfología de <i>Pleurotus ostreatus</i> (http://www.hydenvironment.com.mx/catalogo/index.php?mainpage=page&id=130&chapter=12).	23
Figura 6. Esporas de <i>Pleurotus ostreatus</i> (Tomado de Escobedo disponible en línea en formato PDF).	24
Figura 7. Estructura terciaria de la enzima lacasa (Viikari 2006).	29
Figura 8. Estructura química de la Lignina (Leonowicz y cols. 1999).	31
Figura 9. Ciclo catalítico de lacasa (Solomon y cols.1996).	32
Figura 10. Efecto de la temperatura en los procesos que ocurren en las células de los microorganismos (Tomado de Brock 1993).	35
Figura 11. Actividad de lacasas de <i>P. ostreatus</i> obtenidas por fermentación sólida a 15°C.	47
Figura 12. Curva de crecimiento a 15 °C de <i>P. ostreatus</i> en fermentación sólida. ...	48
Figura 13. Grafica de pH de la fermentación.	48
Figura 14. Concentración de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de <i>P. ostreatus</i> en fermentación sólida a 15°C.	49
Figura 15. Gráfico de consumo de azúcares de <i>P. ostreatus</i> en fermentación sólida a 15 °C.	50
Figura 16. Geles de isoformas de lacasas (números en recuadros son las horas de fermentación).	51
Figura 17. Actividad de lacasas de <i>P. ostreatus</i> obtenidas por fermentación sólida a 20°C.	52
Figura 18. Curva de crecimiento a 20°C de <i>P. ostreatus</i> en fermentación sólida. ...	52
Figura 19. Grafica de pH de la fermentación.	53
Figura 20. Concentración de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de <i>P. ostreatus</i> en fermentación sólida a 20°C.	54
Figura 21. Gráfico de consumo de azúcares de <i>P. ostreatus</i> en fermentación sólida a 20°C.	54
Figura 22. Geles de isoformas de lacasas (números en recuadros son las horas de fermentación).	55
Figura 23. Actividad de lacasas de <i>P. ostreatus</i> obtenidas por fermentación sólida a 25°C.	56

Figura 24. Curva de crecimiento a 25°C de <i>P. ostreatus</i> en fermentación sólida. ...	57
Figura 25. Grafica de pH de la fermentación.	57
Figura 26. Concentración de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de <i>P. ostreatus</i> en fermentación sólida a 25°C.	58
Figura 27. Gráfico de consumo de azúcares de <i>P. ostreatus</i> en fermentación sólida a 25 °C.	59
Figura 28. Geles de isoformas de lacasa (números en recuadros son las horas de fermentación).	60
Figura 29. Actividad de lacasas de <i>P. ostreatus</i> obtenidas por fermentación sólida a 30 °C.	61
Figura 30. Curva de crecimiento a 30 °C de <i>P. ostreatus</i> en fermentación sólida. ..	62
Figura 31. Grafica de pH de la fermentación.	62
Figura 32. Concentración de proteína de <i>P. ostreatus</i> obtenida a 30°C	63
Figura 33. Gráfico de consumo de azúcares de <i>P. ostreatus</i> en fermentación sólida a 30°C.	64
Figura 34. Geles de isoformas de lacasa (números en recuadros son las horas de fermentación).	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sustratos posibles de las lacasas.....	34
Tabla 2. Parámetros cinéticos.....	66

1. INTRODUCCIÓN

La sistemática de los hongos se está modificando con gran rapidez mediante estudios filogenéticos basados en la comparación de secuencias de ADN. Así, actualmente se excluye del reino fungi algunos grupos de eucariotas heterótrofos que tradicionalmente se consideraban hongos. Por ejemplo, los hongos plasmodiales y mucilaginosos (Myxomycota y Dictyosteliomycota), y los mohos acuáticos (Oomycota). Por el contrario, eucariotas unicelulares que se consideraban protistas, hoy se sabe que pertenecen al reino de los hongos. Este es el caso de *Pneumocystis carinii*, un peligro para los humanos inmunodeprimidos. Ocurre lo mismo con Microsporidia, organismos carentes de mitocondrias que viven como parásitos intracelulares de animales.

Los estudios moleculares apoyan la separación de los grandes grupos de hongos que se han reconocidos tradicionalmente (Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota), Aunque Chytridiomycota y Zygomycota no son grupos monofiléticos, sino un conjunto parafilético que representa las primeras líneas de diversificación de los hongos (figura 1).

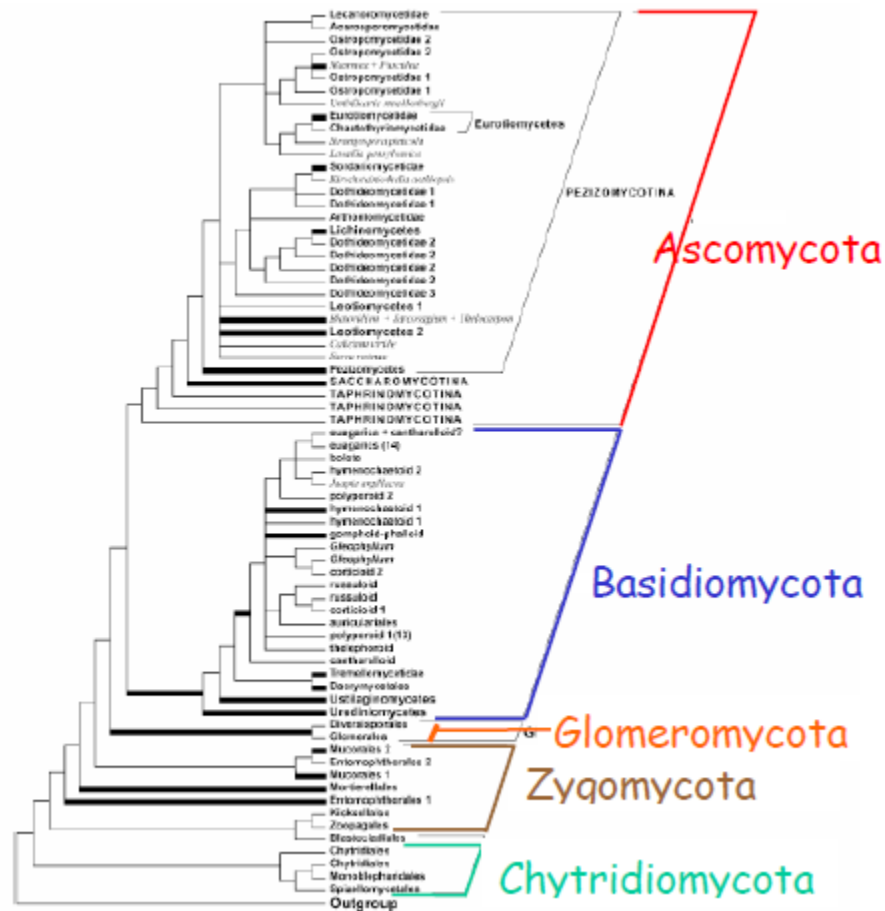


Figura 1. Árbol filogenético de los principales linajes de hongos basados en datos moleculares (Lutzoni y cols. 2004).

1.1 Generalidades de los hongos

Alrededor de 70,000 especies de hongos han sido descritas, sin embargo, se estima que pueden existir alrededor de 1.5 millones de especies (Hawksworth y cols. 1995). Los hongos también son de gran importancia económica ya que tienen efectos tanto negativos como positivos en nosotros. Algunos son usados en la industria de la cerveza y la champaña, proveen numerosos medicamentos como la penicilina y otros antibióticos, hongos comestibles(trufas y colmenillas). Algunos también son estudiados como organismos modelo los cuales pueden ser usados para ganar conocimiento de procesos básicos tales como la genética, fisiología, bioquímica y biología molecular que pueden ser aplicables a muchos organismos (Taylor y cols. 1993). Al mismo tiempo, los hongos han contribuido en la perdida de millones de dólares en daños en alimentos completamente

echados a perder, destrucción o degradación de materiales usados por el humano y enfermedades de plantas sanas así como también en el humano y en los animales (Mueller y cols. 2004).

Los hongos no realizan la fotosíntesis pues son heterótrofos que viven a partir de la materia orgánica producida por otros organismos. Pueden reproducirse por esporas o por medio de la ramificación de estructuras tubulares y arborescentes llamadas hifas. Una hifa es una estructura cilíndrica que consta de una pared celular que recubre a una membrana en cuyo interior pueden existir uno o varios núcleos. Además, pueden tener septos que son paredes internas que cortan la continuidad del citoplasma dentro de la hifa y en algunos casos estos septos pueden presentar poros que permiten el paso del citoplasma, incluyendo a sus organelos, estableciendo así, la continuidad citoplásmica dentro de la hifa. Las hifas crecen por extensión apical o de las puntas y se multiplican por ramificación. En los extremos de estas células es donde se lleva a cabo la asimilación de nutrientes del medio y la excreción de las hidrolasas que son enzimas extracelulares necesarias para la degradación de una gran variedad de sustratos complejos (Herrera y Ulloa 1990, Guzmán y cols. 1993, Alexopoulos y cols. 1996).

Todos los hongos son heterótrofos, es decir, requieren materia orgánica preformada que utilizan como fuente de carbono y energía para la síntesis de estructuras celulares. La pared rígida (compuesta en mayor proporción por quitina y otros polisacáridos estructurales) con la que cuenta la mayoría de las especies fúngicas ligninocelulósicas, les impide fagocitar su alimento y por ello deben absorber nutrientes simples y solubles que obtienen mediante la degradación de biopolímeros tales como la celulosa, hemicelulosa y lignina, por acción de un complejo sistema de enzimas hidrolíticas que liberan al medio (Guzman y cols. 1993, Deacon 1993, Moore-Landecker 1996). Al conjunto de hifas ramificadas de los hongos se le conoce como micelio, mismo que puede encontrarse en forma monocariótica (un solo núcleo) o dicariótica (dos núcleos). En el caso de los basidiomicetos, bajo condiciones fisiológicas ambientales específicas, el micelio dicariótico comienza a formar estructuras reproductoras denominadas cuerpos fructíferos (también llamados carpóforos, esporóforos o basidiocarpos) y este proceso es acompañado por la transcripción de genes específicos que producen abundante ácido ribonucleico mensajero (ARNm) (Futoshi y cols. 2004). En

el cuerpo fructífero de los hongos macroscópicos, el estípite o pie y el característico píleo o sombrero están conformados por micelio ramificado; en la parte inferior del píleo se encuentran las laminillas, mismas que constituyen el himenio, lugar donde se forman y se liberan las esporas una vez que el cuerpo fructífero ha madurado.

Los basidiomicotas son los hongos más conocidos. Se caracterizan por formar basidios, células donde se producen externamente esporas sexuales (basidiosporas) tras la cariogamia y la meiosis. Algunos basidiomicetes tienen ciclos vitales muy complejos, especialmente algunos hongos patógenos como las royas (Uredinales, Basidiomycota), que pueden tener dos hospedantes distintos y hasta cinco tipos diferentes de estructuras productoras de esporas.

1.2 Características de *Pleurotus spp.*

El cultivo de hongos comestibles es una industria biotecnológica en continuo proceso de expansión y que poco a poco va cobrando mayor importancia en el ámbito económico de muchos países. Hasta 1980, las cuatro especies de hongos comestibles más importantes por su cultivo eran *Agaricus bisporus* (champiñón), *Pleurotus spp.* (Seta, ostra), *Lentinula edodes* (Shiitake) y *Volvariella volvacea*. Desde entonces el género *Agaricus* ha sido el hongo comestible más cultivado y consumido en Europa, Norteamérica y México. Por su parte, *Lentinula edodes* es producido en su mayor parte en Japón, *Volvariella* en países Asiáticos y *Pleurotus* en México y Sudamérica (Chang 1999).

En lo que se refiere a los hongos del género *Pleurotus*, han incrementado su popularidad mundial en los últimos años, debido a su habilidad para crecer en un amplio intervalo de temperaturas y su capacidad para utilizar como sustrato diversos materiales ricos en lignina y celulosa tales como rastrojo de maíz, paja de cereales (Bonatti y col., 2004), papel (Baysal y cols. 2003), pulpa de café (Salmones y cols. 2005), viruta de madera (Pérez y Mata 2005), residuos vegetales así como desechos ligninocelulósicos de la industria alimenticia (Cohen y cols. 2002, Shashirekha y cols. 2002); para la preparación y acondicionamiento de estos sustratos, se han utilizado varias técnicas tales como la

inmersión en agua caliente, pasteurización, esterilización con inyección de vapor, composteo, etc. (Vogel y Salmones 2000, Valencia del Toro 2003, Moda y cols. 2005).

1.3 Ciclo de vida de *Pleurotus spp.*

En el ciclo de vida de los Basidiomicetos, se presentan tres fenómenos importantes (Moore-Landecker 1996, Herrera y Ulloa 1998):

Plasmogamia o anastomosis: Fusión de dos células del micelio que se aparean, a través de la cual los núcleos de dos cepas coexisten en un citoplasma común.

Cariogamia: Fusión de los núcleos.

Meiosis: División nuclear en la cual el número de cromosomas es reducido del estado diploide al estado haploide.

Como se muestra en la figura 2, la fase haploide se presenta cuando existe un número n de cromosomas y las células o grupos de células en este estado se denomina haplontes. La fase diploide se obtiene cuando hay un número $2n$ de cromosomas y las células o grupos de células en este estado se llaman diplontes. En algunos basidiomicetos como en el caso de *Pleurotus*, la cariogamia no se lleva a cabo de manera inmediata a la plasmogamia de tal forma que se produce una fase dicariótica o dicariofase en la cual, se obtiene una célula denominada dicariocito o dicariote misma que posee dos núcleos con diferentes factores de incompatibilidad y cada uno de ellos se conoce como dicarión (Herrera y Ulloa 1998).

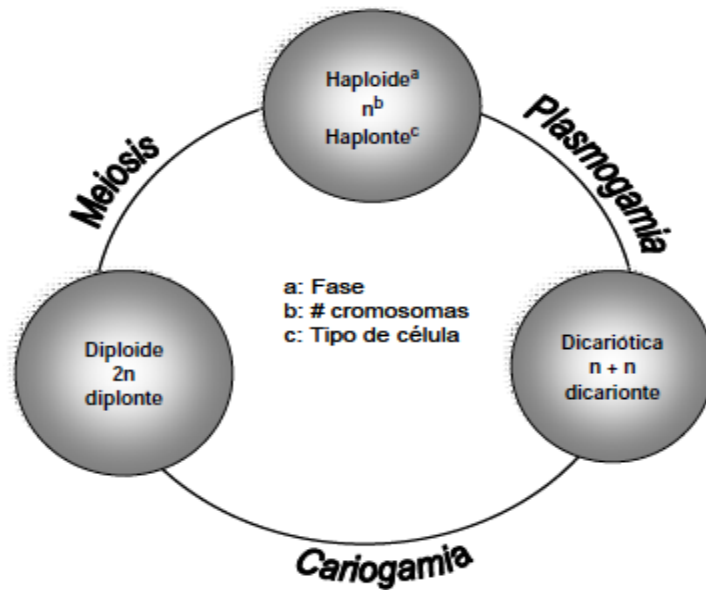


Figura 2. Ciclo sexual de *Pleurotus*.

La fase dicariótica es prerrequisito para que se lleve a cabo la reproducción sexual del hongo aunque el micelio puede permanecer en estado vegetativo de manera ilimitada y normalmente solo en este estado del desarrollo se pueden formar células especializadas como los basidios que son la estructura en las cuales se lleva a cabo la cariogamia dando comienzo a la fase diploide la cual está limitada a una generación nuclear simple y que inmediatamente después da paso al proceso de meiosis (Koltin y cols. 1972).

De manera general, durante el ciclo biológico de *Pleurotus*, se presentan tres fases del desarrollo micelial correspondientes a los tipos primario, secundario y terciario. El micelio primario se forma a partir de la germinación de una basidiospora y está constituido por hifas en estado haploide cuyo único núcleo en cada compartimento celular se encuentra separado por una estructura denominada septo o doliporo. El micelio secundario por su parte consta de células binucleadas o dicarióticas, derivada del micelio primario y se caracteriza por la presencia de fíbulas (estructuras que permiten la migración nuclear entre hifas en proceso continuo de elongación, figura 3) y finalmente, el micelio terciario se origina a partir del micelio secundario, se encuentra organizado en tejidos especializados que forman los cuerpos fructíferos y es el tipo de micelio característico en la reproducción

sexual de este basidiomiceto (Koltin y cols. 1972, Guzmán y cols. 1993, Herrera y Ulloa 1998).

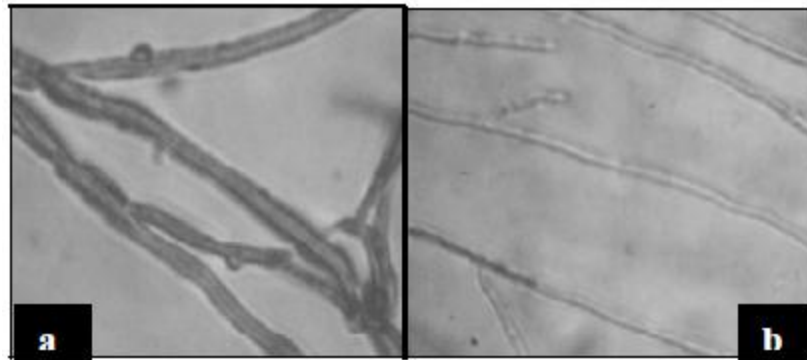


Figura 3. Micrografías de micelios de *Pleurotus* spp. (a) dicariótico (con fíbulas) y (b) monocariótico (sin fíbulas).

En la figura 4 se puede apreciar el ciclo de vida de las especies pertenecientes al género *Pleurotus* mediante el cual, la germinación de una basidiospora produce el desarrollo de hifas filamentosas monocarióticas y haploides quienes al ramificarse conforman el micelio, mismo que continua creciendo de forma monocariótica hasta que pueda realizarse la plasmogamia con otro micelio contiguo que sea sexualmente compatible. Después de que ambas células se fusionan, el septo o doliporo (que permanecía cerrado para evitar el intercambio intracelular) se abre para que pueda ocurrir la migración nuclear y posteriormente la formación del micelio secundario dicariótico mediante la división conjugada simultanea de los dos núcleos iniciales y la distribución de los pares de núcleos hermanos compatibles o dicariones en las células hijas. Una vez formado el cuerpo fructífero, a partir del micelio indiferenciado generado por crecimiento vegetativo, se llevan a cabo los procesos de cariogamia y meiosis. Como producto de este último, se obtienen núcleos haploides (quienes poseen de manera aislada un factor de incompatibilidad), que emigran a una tétrada de esporas formadas en la parte externa del basidio y una vez allí, son liberados durante el proceso de esporulación del basidiocarpo maduro. Si encuentran condiciones ambientales apropiadas, estas basidiosporas germinan produciendo micelio

monocariótico y comienza nuevamente el ciclo (Larraya y cols. 1999, Ramírez y cols. 2000, Valencia del Toro 2002).

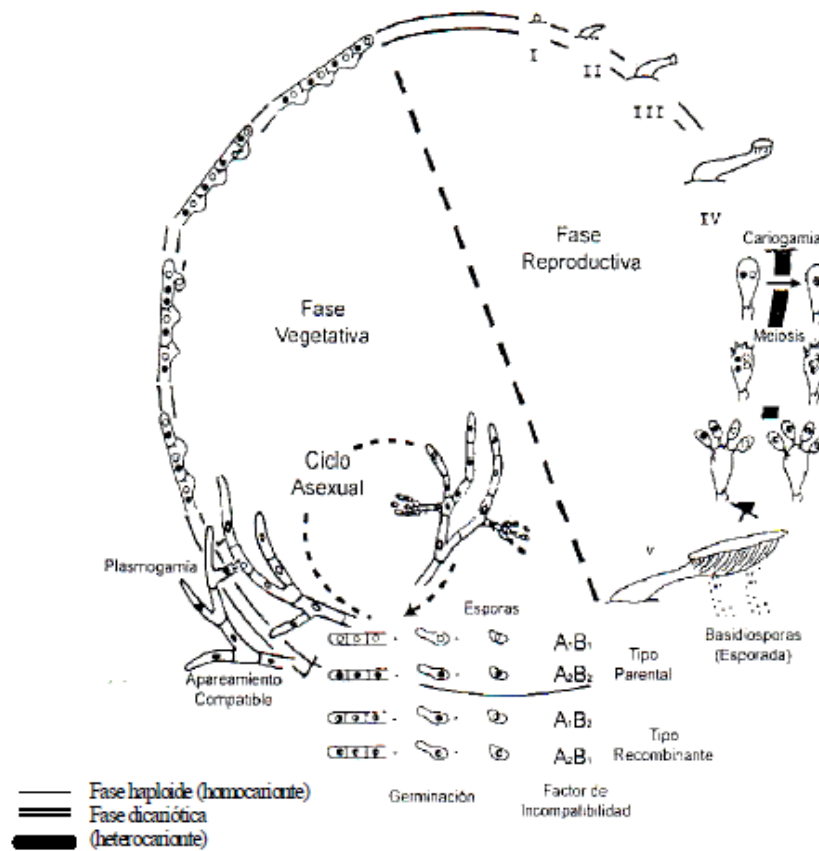


Figura 4. Ciclo de vida de *Pleurotus* spp. (Valencia del Toro 2002).

1.4 Importancia ambiental de *Pleurotus* spp.

Los hongos del género *Pleurotus* son basidiomicetos de pudrición blanca, con un alto valor nutricional, propiedades terapéuticas y variadas aplicaciones biotecnológicas. Una de sus principales características es su capacidad de degradar compuestos lignocelulósicos, gracias a sus enzimas.

Al igual que la celulosa, la lignina es un biopolímero vegetal muy abundante en la biosfera; es un compuesto aromático que provee rigidez, impermeabilidad al agua y resistencia al ataque microbiano hacia las paredes vegetales; debido a sus características estructurales, este compuesto impone una barrera física y química que restringe su degradabilidad (Coheny cols. 2002). Los sustratos utilizados para el cultivo de basidiomicetos, están

conformados básicamente por compuestos ligninocelulósicos y para degradarlos, estos organismos poseen un complejo sistema enzimático entre las que destacan las enzimas celulasas, hemicelulasa, manganoso peroxidasa (MnP), versátil peroxidasa (VP), alcohol aril oxidasa (AAO) y lacasa, mismas que son capaces de hidrolizar los polímeros de celulosa, hemicelulosa y lignina de diversos materiales.

1.5 Pleurotus ostreatus

La producción de *Pleurotus ostreatus* que es un hongo comestible, se ha realizado a pequeña escala, debido a que la tecnología no es conocida por la gran mayoría de productores. La tecnología empleada hasta ahora por los pequeños y medianos productores está basada en el manejo incorrecto de información, generando pérdidas económicas a los productores de hongos comestibles en las comunidades rurales (Martínez y cols. 2000). La tecnología aplicada al cultivo de hongos comestibles permite obtener grandes producciones en relativamente poco espacio, tiene una amplia aceptación a nivel urbano y rural por sus propiedades alimenticias, ya que el hongo seta representa un alimento con 350 calorías comparado con la carne roja que solo contiene 150 calorías o el pescado que contiene 101. La población rural conoce este hongo con los nombres de “hongo seta”, “hongo del maguey”, “hongo blanco”, “hongo del rastrojo”, y “hongo de la pulpa de café” (Guzmán 1997). A nivel comercial se han obtenido sus fructificaciones en paja de cebada, paja de trigo y pulpa de café (Guzmán y cols.1993).

1.6 Fisiología de Pleurotus ostreatus

Pleurotus ostreatus es un hongo degradador de materia orgánica que se alimenta principalmente de lignina y celulosa. La lignina y celulosa son azúcares que se encuentran disponibles en la materia, por ejemplo la paja, rastrojo de maíz, caña, trigo, cebada, etc. (Bermúdez y cols. 2003).

El micelio tiene a su disposición la fuente de carbono que constituye la base nutricional. Todos los hongos necesitan este tipo de fuente dado que están desprovistos de clorofila, y no pueden realizar la fotosíntesis. Por ese motivo pueden vivir y prosperar sobre materia orgánica muerta (Rodríguez 2007).

1.7 Morfología de *Pleurotus ostreatus*

El cuerpo de las setas se constituye principalmente de: Sombrero (Pileo), Pie reducido (Estípite) y Laminas (Himenio) (Bermúdez y cols. 2003).

Sombrero: Tiene forma de paraguas, más o menos circular, su desarrollo se da en forma de una ostra u oreja, figura 5. (Gaitán y cols. 2006).



Figura 5. Morfología de *Pleurotus*

ostreatus (<http://www.hydreenvironment.com.mx/catalogo/index.php?mainpage=page&id=130&chapter=12>).

Laminas: Están dispuestas radialmente como las varillas de un paraguas, que van desde el pie o tallo que lo sostiene, hasta el borde. Son anchas, espaciadas unas de otras, blancas o crema, a veces bifurcadas, y en ellas se producen las esporas destinadas a la reproducción de la especie (Clyde 1964).

Pie: Es firme, blanco, algo peludo en la base, (García 1986). Muy corto, algo lateral u oblicuo, ligeramente duro, con el principio de las laminillas en la parte de arriba, (López 2002).

Esporada: Pálida, con ligero tono gris rosado, (García 1986).

Esporas: Son blancas a cremosas, cilíndricas de $8-11 \times 3-4 \mu\text{m}$, hialinas y lisas (figura 6) (Clyde 1964).



Figura 6. Esporas de *Pleurotus ostreatus* (Tomado de Escobedo disponible en línea en formato PDF).

1.8 Fermentación sólida.

La fermentación sólida puede ser definida como un cultivo de microorganismos adheridos a un soporte sólido poroso y humedecido en el cual el medio líquido está extendido en una capa muy fina en contacto con una interface aérea. Las bacterias, levaduras y hongos son los microorganismos que pueden crecer en fermentación sólida, pero la mayoría de las investigaciones se llevan a cabo con hongos filamentosos. El crecimiento en forma de micelio y su tolerancia a bajas actividades de agua y condiciones de alta osmolaridad hacen que los hongos sean la microflora natural más adecuada para la fermentación sólida.

La fermentación en medio sólido (FMS) se ha utilizado durante siglos para la fabricación de alimentos, bebidas y otros productos (Mitchell y cols. 2000). En tiempos recientes, la aplicación de procesos biotecnológicos que involucran la FMS ha generado gran interés debido a que estos procesos se han convertido en una herramienta biotecnológica importante para la producción de diferentes bioproductos (Pandey 1992, Pandey 1994, Pandey, 1996 Pandey y cols. 2000, Pandey cols. 2001) como enzimas, ácidos orgánicos, etanol, biogás, antibióticos, surfactantes, biopesticidas, entre otros. Se han sugerido varias ventajas de la fermentación sólida sobre la fermentación líquida (Mitchell y cols. 2000) entre las que destacan la menor represión catabólica, la alta productividad de enzimas y la mayor concentración de enzimas (Romero-Gómez y cols. 2000).

Aproximadamente el 90% de todas las enzimas industriales son producidas por fermentación líquida usando frecuentemente microorganismos manipulados genéticamente. Por otro lado, todas las enzimas pueden ser producidas por FMS con microorganismos sin manipular (Hölker y cols. 2004).

La FMS se ha utilizado por siglos, en un principio para la producción de alimentos, en las últimas 2 o 3 décadas el interés por los procesos de fermentación sólida se ha orientado a la síntesis de bioproductos como antibióticos (Barrios-González y Mejía 1996), metabolitos secundarios (Trejo-Hernández y cols. 1992), entre otros.

Existen varios aspectos importantes que deben ser considerados para el desarrollo de cualquier bioproceso en FMS. Estos incluyen, la selección del microorganismo apropiado, la selección del sustrato, la cantidad de agua en el sistema, entre otros.

1.9 Microorganismos utilizados en FMS

Bacterias, levaduras y hongos pueden crecer en sustratos sólidos con aplicación en procesos de fermentación sólida. Las bacterias se utilizan principalmente en composteo, ensilaje y algunos procesos de alimentos (Doelle y cols. 1992). Las levaduras pueden ser usadas en la producción de etanol y alimentos (Saucedo-Castañeda y cols. 1992).

Los hongos filamentosos es el grupo de microorganismos más importante usado en los procesos de FMS debido a sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y enzimológicas (Raimbault 1998).

Los hongos filamentosos tienen características que presentan una ventaja sobre los organismos unicelulares. Las hifas pueden crecer en busca de nutrientes disponibles, además muchos hongos filamentosos producen enzimas hidrolíticas como amilasas, celulasas, proteasas y lipasas para degradar las macromoléculas de los sustratos sólidos (Mitchell y cols. 2000).

1.10 Humedad y Actividad de Agua (AW) en FMS

Una de las características más importantes de la fermentación en medio sólido es la baja disponibilidad de agua en el sistema. La actividad de agua es un importante control de

crecimiento microbiano y es menor que la encontrada en fermentación líquida. Valores de A_w entre 0.95-0.98 pueden ser considerados típicos para sustratos sólidos, estos valores son ideales para el crecimiento de muchos hongos, especialmente hongos filamentosos, los cuales tienen un crecimiento óptimo a A_w de 0.96-0.98 y aún pueden crecer a A_w de 0.9. Como resultado de esto, la mayoría de los procesos de FMS utiliza hongos filamentosos. En contraste muchas bacterias y levaduras crecen a actividades de agua de aproximadamente 0.99, este crecimiento disminuye cuando la A_w baja y es completamente inhibido a actividades de agua de 0.9 (Mitchell y cols. 2000).

El nivel de humedad en los procesos de FMS puede variar entre 30 y 85% y tiene un marcado efecto en la cinética de crecimiento (Oriol y cols. 1988).

El óptimo contenido de humedad para el crecimiento y la utilización de sustratos varían entre 40 y 70% pero depende del microorganismo y del sustrato usado para el cultivo (Raimbault 1998).

1.11 Soportes utilizados en FMS

Dos tipos de sistemas de FMS pueden ser distinguidos dependiendo de la naturaleza de la fase sólida usada. El primero y más comúnmente usado (y el más estudiado) involucra sistemas de cultivo en materiales naturales. El segundo sistema que es menos usado, se basa en cultivos con soportes inertes impregnados con medios líquidos definidos (Ooijkaas y cols. 2000).

Los sustratos naturales usados en FMS sirven como soporte y como fuente de nutrientes, esto es una desventaja ya que la fuente de carbono forma parte de su estructura (Ooijkaas y cols. 2000). Durante el crecimiento del microorganismo el sustrato sólido es degradado y como resultado la geometría y las características físicas del medio cambian y consecuentemente la transferencia de masa y calor pueden disminuir (Barrios-González y Mejía 1996).

Los soportes inertes del segundo sistema pueden ser de origen natural y sólo sirven como punto de anclaje para los microorganismos. Estos materiales incluyen cáñamo, perlita, espuma de poliuretano (PUF), bagazo de caña y vermiculita (Ooijkaas y cols. 2000).

Una de las ventajas de los soportes inertes sobre los sustratos naturales es la menor dificultad para recuperar los productos. Por ejemplo, las esporas de *Penicillium roquefortii* formadas dentro de granos de trigo sólo pueden recuperarse rompiendo el sustrato, mientras que las esporas producidas en partículas de pozolano (material volcánico) pueden recuperarse rápidamente sin destruir el soporte, por lo tanto, el proceso de recuperación se simplifica y el soporte puede ser reusado (Larroche y Gros 1989).

Otras ventajas de los soportes inertes son: 1) Se puede diseñar un medio de producción adecuado y 2) Los balances de masa para procesos de modelamiento más avanzados y procesos de control son más fácilmente establecidos (Zhu 1994) debido a que las concentraciones de todos los nutrientes del medio de producción son conocidas y pueden ser analizadas (Ooijkaas y cols. 2000).

Para la utilización de soportes inertes impregnados con medios definidos en fermentación en medio sólido deben considerarse aspectos como costos y disponibilidad del soporte, factibilidad económica de utilizar un medio sintético o semisintético, impacto ambiental de los residuos sólidos generados, costos del proceso y formulación, costo de los registros y por supuesto el valor del producto (Ooijkaas y cols. 2000).

1.12 Poliuretano

Un novedoso método de fermentación en estado sólido se ha desarrollado utilizando (PUF) como soporte inerte impregnando sobre él un medio de cultivo líquido sintético, donde se simula la composición nutricional y condiciones de cultivo que anteriormente se llevaba a cabo en salvado de trigo. Con este sistema, la biomasa, que es un parámetro importante para la evaluación de la fermentación en estado sólido puede ser medido directamente (Zhu y cols. 1994). El PUF anteriormente fue utilizado por Fujishima en 1972 para la producción enzimática de varias especies de hongos. En 1994 Zhu y col., utilizaron PUF para producir nucleasas P1 de *Penicillium citrinium*. Desde entonces el PUF ha sido utilizado más como un proceso de inmovilización celular que como un proceso limpio de producción enzimática para la búsqueda de diseño de reactores más eficientes (inmovilización, detoxificación, obtención de metabolitos).

La composición del medio de cultivo es factor importante ya que influye sobre la diversidad y la calidad de las enzimas. La producción de enzimas en medio sólido con medios de cultivo sintéticos impregnados sobre soporte inerte, permite estudiar el comportamiento de los hongos filamentosos con relación a la composición del medio de cultivo, la influencia de la actividad del agua, la liberación de calor, así como la influencia de la transferencia de gases. La recuperación de metabolitos en estas condiciones se realiza por prensado lo que permite obtener un producto concentrado. En cultivos sólidos en los cuales el soporte es también el sustrato, es difícil evaluar la influencia de un solo factor sobre el comportamiento de un microorganismo ya que en gran parte, estos sustratos son muy complejos y dada su composición se dificulta la determinación de los diferentes parámetros importantes en cultivos sólidos (Oriol y cols. 1988).

El uso de este soporte permite regular perfectamente la presencia de inductores que determinan la producción de enzimas. Otra ventaja es que el poliuretano es no biodegradable, lo que permite llevar a cabo la determinación del peso seco real del hongo por gravimetría. La tercera ventaja está en la porosidad del material, que permite que los espacios del poliuretano se llenen de aire que es fácilmente utilizado por el hongo y que cumple con todos los requerimientos estipulados por Raimbault (1998) como necesarios para un soporte inerte de fermentación sólida.

1.13 Lacasas

Las lacasas (p-difenol: oxígeno oxidoreductasa E.C. 1.10.3.2) han sido estudiadas por más de cien años. Son enzimas que catalizan la oxidación de sustratos utilizando al oxígeno molecular como aceptor de electrones. Estas enzimas deben su nombre a que fueron primeramente aisladas de los exudados del árbol japonés, *Rhus vernicifera* (Yoshida 1883). Posteriormente caracterizadas por Bertrand en 1895.

La lacasa fúngica típica es una proteína de aproximadamente 60-70 kDa con un punto isoeléctrico ácido de alrededor de pH 4.0, y con un óptimo de actividad entre 50°C y 70°C (Baldrian 2006). Es una glicoproteína cuya glicosilación es responsable de la estabilidad estructural de la enzima (Vite-Vallejo y cols. 2009). También se ha encontrado que protege a la enzima de la proteólisis y la inactivación por radicales libres (Morozova y cols. 2007).

La lacasa es una enzima comúnmente monomérica que normalmente contiene 4 átomos de cobre unidos a 3 sitios redox, clasificados de acuerdo a sus características espectroscópicas (Battistuzzi y cols. 2005): El sitio tipo 1 (T1) es mononuclear y le confiere el color azul a la enzima en solución y se caracteriza por una banda de absorción a 600 nm ($5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Morozova y cols. 2007). El sitio tipo 2 (T2) también es mononuclear y presenta una geometría metálica trigonal y propiedades de resonancia paramagnética nuclear comparables con los complejos tetragonales de Cu(II). Finalmente, el sitio tipo 3 (T3) es dinuclear y presenta un estado basal diamagnético que se origina por el acoplamiento antiferromagnético fuerte entre los dos iones Cu(II), conectados por un ión hidroxilo. En el sitio T1 el sustrato interactúa con la enzima y se lleva a cabo la sustracción de un electrón, mientras que en el sitio T2/T3 se lleva a cabo la reducción del oxígeno a agua (figura 7).

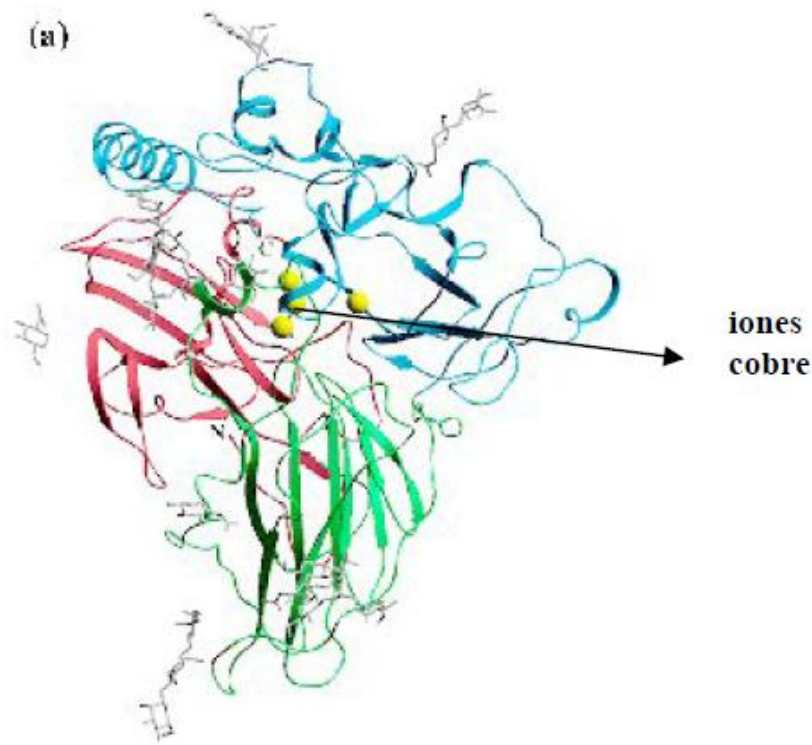


Figura 7. Estructura terciaria de la enzima lacasa (Viikari 2006).

Las lacasas son producidas por muchos hongos de pudrición blanca, pero su importancia como enzima delignificante varía en diferentes especies. Las lacasas además cumplen otros

roles, como en la morfogénesis del hongo, formación de cuerpos fructíferos, conidiogénesis, coloración y biosíntesis de melanina, y patogénesis (Thurston 1994). Forman parte de las enzimas ligninolíticas que presentan los hongos de pudrición blanca para degradar a la lignina. Requieren cobre y oxígeno para oxidar fenoles, polifenoles, aminas aromáticas y diferentes sustratos no fenólicos (Claus 2003), lo que permite que se lleve a cabo la polimerización, dipolimerización, metilación y/o dimetilación de compuestos fenólicos (Edens y cols. 1999). Son enzimas que tiene gran importancia biotecnológica debido a sus diferentes aplicaciones: clarificación del vino, análisis de drogas, delignificación y procesos de biorremediación. Las especies del género *Pleurotus* son organismos de gran interés para la obtención de estas enzimas, debido a que pertenecen a los hongos de pudrición blanca, sin embargo, la actividad de lacasas depende en gran medida de la especie y cepa que se utilice para su producción así como de las condiciones de desarrollo.

Se consideran que las lacasas fúngicas juegan un rol en la degradación de lignina y/o remover fenoles potencialmente tóxicos durante la morfogénesis, esporulación, o fitopatogénesis y virulencias fúngicas (Gianfreda y cols. 1999). El rol de las lacasas en la degradación de lignina (figura 8) y compuestos fenólicos ha sido evaluada en un gran número de aplicaciones biotecnológicas como la degradación de tintes y en la biorremediación de algunos químicos tóxicos de uso común (Wong y Yu 1999, Glen y Gold 1983, Swammy y Ramsay 1999, Mayer y Staples 2002).

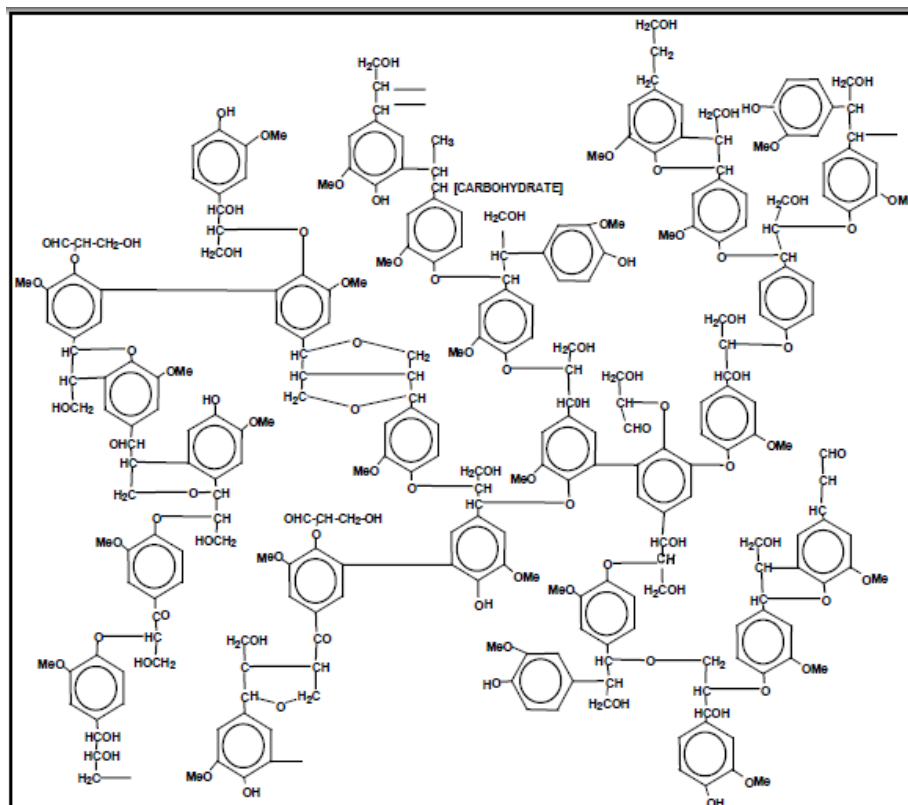


Figura 8. Estructura química de la Lignina (Leonowicz y cols. 1999).

Las lacasas catalizan el rompimiento de los enlaces del $C\alpha-C\beta$ en los dímeros β -1 y β -O-4 por la oxidación del carbono α y por el rompimiento de los enlaces alkyl-aryl (figura 9) (Higuchi 1989, Youn y cols. 1995). También puede modificar la lignin-DHP sintética formando productos de agua soluble (Imuray cols. 1995) y causa demetoxilación (Eriksson y cols. 1990).

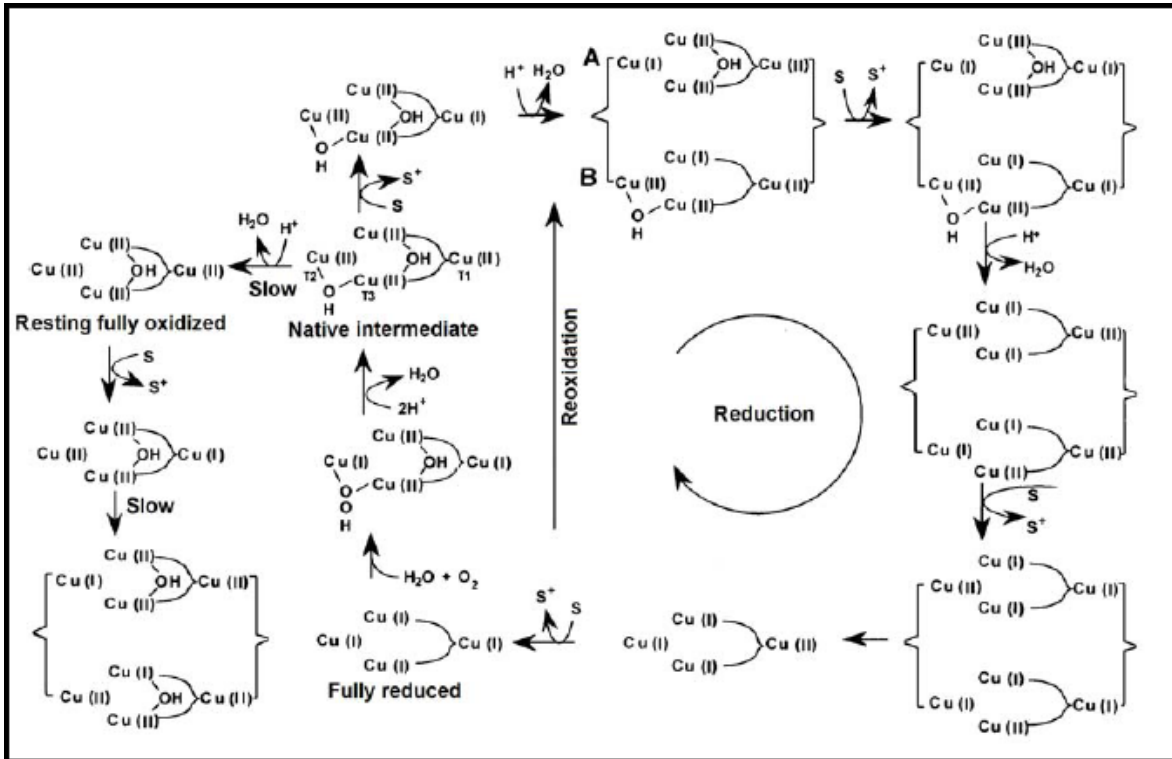


Figura 9. Ciclo catalítico de lacasa (Solomon y cols.1996).

1.14 Usos potenciales de las lacasas

La baja especificidad de la lacasa es una característica que ha sido explotada en una gran variedad de procesos industriales. La función natural de la lacasa, la degradación de lignina, ha sido utilizada principalmente por la industria de la producción de papel. En 1997 Novo Nordisk patentó el sistema Lignozym® que utiliza un sistema lacasa-mediador para disminuir el contenido de lignina y aumentar la brillantez del papel (Call y Mücke 1997). Este mismo sistema ha sido aplicado en la industria alimentaria para la clarificación de jugos, cervezas y vinos (Rodríguez-Couto y Toca-Herrera 2006). La lacasa tiene un potencial importante en procesos de biorremediación debido a su eficiencia en la transformación de contaminantes como hidrocarburos poliaromáticos, plaguicidas, explosivos, disruptores endócrinos, bifenilospoliclorados y colorantes sintéticos, entre otros (Pointing 2001). Por su capacidad de transformar gran variedad de colorantes industriales, se ha sugerido su uso tanto para el saneamiento de efluentes de plantas industriales como para el tratamiento de fibras textiles (Rodríguez y cols. 1999, Robinson y Nigam 2008.). En

1996 Novozyme patentó un producto basado en la lacasa llamado DeniLite® y en la actualidad es utilizado ampliamente en la producción de mezcilla (Rodríguez-Couto y Toca-Herrera 2006). La industria cosmética también ha aprovechado la capacidad de decoloración de esta enzima para sustituir al H₂O₂ en los tintes para el cabello (Yoshino y cols. 2001), e incluso es utilizada en formulaciones para el aclarado de la piel (Rodríguez-Couto y Toca-Herrera 2006). En la industria farmacéutica puede ser utilizada para la síntesis de antibióticos, como cefalosporinas, y nuevas variedades de penicilinas, así como para llevar a cabo reacciones de acoplamiento de compuestos fenólicos y para la producción de polímeros biológicamente activos (Witayakran y Ragauskas 2009). Al generar un flujo de electrones durante la catálisis, la lacasa se ha utilizado para la fabricación de biosensores. Por ejemplo, para la detección de compuestos fenólicos en el vino (Fernandes y Rebelo 2009), determinar la presencia de morfina y codeína, de algunos tipos de flavonoides, e incluso de algunos neurotransmisores (Rodríguez-Couto y Toca-Herrera 2006). Esta misma característica se ha explotado para la producción de celdas de combustible como una fuente de energía limpia (Szot y cols. 2009). Una ventaja más de la lacasa es que sus aplicaciones pueden ampliarse a través del uso de mediadores, por lo que el diseño de nuevos compuestos que sean mediadores eficientes y no tóxicos es de suma importancia (Torres-Duarte y cols. 2009). Por ejemplo, en la transformación de hidrocarburos aromáticos policíclicos la actividad mejoró significativamente en presencia de mediadores (Vandertol-Vanier y cols. 2002, Pickard y cols. 1999). Por otro lado, las técnicas de inmovilización deben ser mejoradas con el fin de lograr que la enzima sea reusable y estable por largos tiempos y así facilitar su aplicación tanto en procesos a gran escala como en sistemas nanométricos.

Las lacasas son enzimas extracelulares y tienen baja especificidad de sustrato, es decir, oxidan un amplio rango de sustratos (difenoles simples; fenoles sustituidos por un grupo metoxi, diaminas, etc.)(Tabla 1).

Tabla 1. Sustratos posibles de las lacasas (Saparrat 2000)

Sustratos posibles de las lacasas (Saparrat 2000)	
Sustratos fenólicos	Ác. Protocatéquico Ac. Siríngico Ac. Vainíllico Catecol 2,6-dimetoxi- <i>p</i> -hidroquinona 2,6-dimetoxifenol Guayacol <i>p</i> -hidroquinona <i>o</i> -metoxifenol <i>p</i> -metoxifenol rojo fenol siringaldehído vainillina
Sustratos no fenólicos	ABTS <i>p</i> -anisidina
No sustrato	AHV 4-clorofenol fenol <i>m</i> -metoxifenol <i>p</i> -nitrofenol pentaclorofenol tirosina

En biotecnología se ha desarrollado el adecuado uso del potencial de las enzimas lacasas en grandes cantidades. La producción de lacasas se ve afectada por ciertos factores de la fermentación como son, la composición del medio, el pH, la temperatura y la aireación. Esto ha sido reportado describiendo un incremento en la producción de lacasas extracelulares en muchas especies de hongos de pudrición blanca que pueden crecer en sustratos naturales, como en el tallo de algodón, salvado de trigo y cebada de trigo (Ardon y cols. 1996, Kahraman y Gurdal 2002, Souza y cols. 2002, Couto y cols. 2002).

Muchos trabajos han investigado el efecto de la temperatura y el pH en hongos de pudrición blanca para la biorremediación de diferentes compuestos. El efecto de ambos factores varía en diferentes sustratos estudiados. Se ha reportado que la temperatura y el pH óptimos identificados en los basidiomicetos de pudrición blanca usados en la decoloración de algodón se encontraron que es de 27°C y un pH de 4-5 respectivamente (Zhang y cols.1999).

La eficiencia de estas enzimas depende del potencial redox del (T1)(Cu1). Por ejemplo, se ha mostrado que en el caso de sustratos N-OH esta dependencia es lineal (Xu y cols. 2000). En general se buscan lacasas con alto potencial redox para aplicaciones biotecnológicas.

1.15 Temperatura

La temperatura es un factor que influye en el crecimiento de los microorganismos y en la formación del producto durante el cultivo sólido. Conforme la temperatura aumenta, las velocidades de las reacciones químicas y enzimáticas, que ocurren en el interior de las células de los microorganismos, se vuelven cada vez más rápidas, al igual que la velocidad de crecimiento. Sin embargo, hay un límite de temperatura dentro del cual las funciones metabólicas pueden ocurrir y, cuando este se sobrepasa, las funciones celulares empiezan a decaer drásticamente (figura 10).

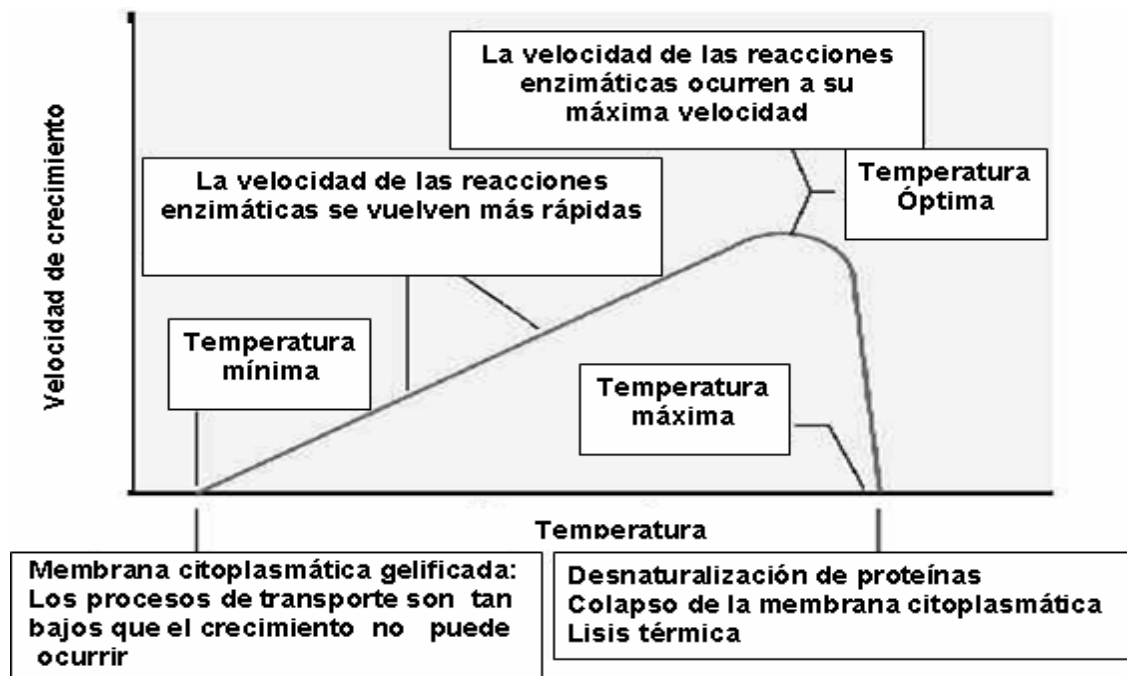


Figura 10. Efecto de la temperatura en los procesos que ocurren en las células de los microorganismos(Tomado de Brock 1993).

En cultivo sólido, la variación de temperatura puede acelerar ó desacelerar la velocidad de producción de enzimas lignocelulolíticas (Tao y cols.1997), incrementar ó mermar su producción (Jecu, 2000; Azin y cols. 2007), y detener la producción por completo (Shah y Madamwar 2005). En otros casos, la temperatura de cultivo puede ocasionar pérdidas excesivas de agua de los soportes usados para la producción de enzimas, afectando seriamente la producción de estas (Mazutti y cols.2007). Por ello, la temperatura debe ser explorada con el objetivo de elevar la producción de enzimas lignocelulolíticas durante el cultivo sólido.

1.16 Temperatura de crecimiento de los microorganismos

En la naturaleza existe una gran variedad de microorganismos que pueden crecer a distintas temperaturas, por lo que se les ha clasificado con base en esta, en tres grupos principales: psicrófilos, mesófilos y termófilos. Los microorganismos psicrófilos son capaces de crecer entre -5 y 20 °C, pero la temperatura donde proliferan mejor se encuentra entre 15 y 18 °C.

Por su parte, los microorganismos mesófilos pueden crecer entre 12 y 47 °C, pero el crecimiento es favorable entre 30 y 37 °C. A parte de estos, existen los microorganismos termófilos, que crecen desde 42 °C y hasta más de 110 °C, pero la temperatura ideal para su crecimiento, generalmente, oscila entre 50 y 75 °C (Brock 1993). La clasificación anterior no debe tomarse en forma absoluta por que se ha determinado que el intervalo de crecimiento de los microorganismos respecto a la temperatura varía de acuerdo a las condiciones de cultivo (Maheshwari y cols. 2000). Normalmente, la producción de enzimas lignocelulolíticas se lleva a cabo con microorganismos mesófilos y termófilos, obteniéndose los niveles de producción de enzimas más altos entre 25 y 32 °C para mesófilos, y para termófilos entre 45 y 55 °C (Chahal 1984, Tao y cols. 1997, Ovando y Waliszewski 2005, Polizeli y cols. 2005, Rodríguez-Couto y Sanromán 2005, Yang y cols. 2005).

2. ANTECEDENTES

El grupo de enzimas que ha sido utilizado con gran amplitud en las aplicaciones biotecnológicas, son las lacasas, las cuales se manejan para eliminar contaminantes en algunos procesos; como por ejemplo, los colorantes derivados de la industria textil y los polifenoles presentes en los licores negros de la industria de la celulosa y elpapel (Flinckinger y Drew 1999). La oxidación de los compuestos en estos procesos se realiza con facilidad usando hipoclorito de sodio, pero esta reacción produce compuestos como los cloro-bencenos que son cancerígenos y por tanto, peores contaminantes. Por otro lado, una alternativa es utilizar lacasas u otras oxidasas que utilicen al oxígeno como aceptor de hidrógenos y así generen peróxidos y su peróxidos de cobre en los sitios de esas enzimas (Muñoz y cols. 1997). A su vez, estos superóxidos pueden oxidar compuestos orgánicos como los polifenoles o algunos mediadores, que al elevarse su concentración pueden oxidar compuestos que no son oxidados por el sitio activo de la enzima (Thurston 1994). De este modo, las polifenoloxidasas se pueden utilizar para reducir la contaminación de los efluentes con compuestos aromáticos, para alcanzar los niveles permitidos cumpliendo las nuevas reglamentaciones ambientales a un menor costo.

Una lacasa, la enzima ligninolítica producida por el hongo *P. ostreatus* cepa RK 36 fue purificada para homogeneizarla y caracterizarla. La enzima es una proteína manométrica con un peso molecular de 67 000 Da y un punto isoeléctrico de 3.6. Se han identificado por medio de espectrofotometría centros de cobre Tipo I y Tipo III. Con siringaldazina como sustrato, las lacasas mostraron altas tasas de oxidación a pH de 5.8, 50°C, y en bufer de fosfatos a 40 mM. Entre los parámetros de estabilización de la prueba las lacasas retienen más de esta actividad en buffers elevados, pH 10, -20°C, en presencia de ácido benzoico al 10 mM y con 35% de etilen glicol respectivamente. La pérdida de actividad de lacasa almacenadas durante 10 días a 25°C fue del 2% respectivamente. Se evaluó la solubilidad del polimeristerase del siringaldazina oxidasa, o-dianisidina y 2,6-dimetoxifenol con respecto a la temperatura, valores del pH y solventes orgánicos. Los precipitados se encontraron siendo insolubles bajo condiciones ambientales normales (Gerd Hublik y Franz Schinner 2000).

La viabilidad de la producción de lacasas de *P. ostreatus* inmovilizado en cubos de espuma de poliuretano con respecto a la composición media fue estudiada en both batch y en un sistema de reactor. Se demostró que la inmovilización aumento la producción de lacasas. Un relativo incremento en la actividad máxima de lacasas de 312.6 U se observó en el micelio inmovilizado en matraces comparado a la actividad máxima de lacasas del micelio libre (272.2 U). Los análisis de geles de electroforesis mostraron bandas de peso molecular de lacasas producidas por Po inmovilizado de 66 kDa. La producción de lacasas fue significativamente mayor y más rápida en el reactor que en los matraces. Una producción máxima de lacasas de 392.9 U se observó dentro del periodo de fermentación de 144 h con una completa extinción de glucosa del medio (Krishna Prasad y cols. 2005).

Muhammad y Muhammad en el 2011, trabajaron con *Schizophyllum commune* IBL-06 sometiénola a diferentes factores de crecimiento, tiempo de incubación, diferente pH del medio, diferentes temperaturas de desarrollo, variaciones en las fuentes de carbono y nitrógeno, el uso de iones metálicos, entre otros, sobre la producción y la actividad enzimática de Mn-Peroxidasa, Li-Peroxidasa y lacasas, encontrando que de todas las condiciones evaluadas en este estudio, en todas hay actividad de las mismas, teniendo los valores más bajos la enzima lacasa.

Los inductores, juegan un papel muy importante en la producción de enzima lacasa extracelular en *P. chrysosporium*. El cobre en forma de sulfato de cobre a 30 mM acelera considerablemente los niveles de producción de enzima lacasa extracelular. Solo en fermentación solida se expresa el máximo de actividad de lacasa comparado con la fermentación liquida (Gnanamani y cols. 2006).

Por su parte, Gómez-Dorado y cols. 2005, estudiaron el efecto de $MnSO_4$ y $CuSO_4$, como inductores enzimáticos del hongo *Trametes versicolor* sobre un efluente estéril y uno no estéril, sobre la producción y la actividad de enzimas Mn-Peroxidasas y Lacasas. Encontraron que estos parámetros no afectaron la producción y la actividad de enzimas lacasas, caso contrario, el $CuSO_4$ tuvo un efecto significativo en la producción y en la actividad enzimática de Mn-Peroxidasas, pero este aumento puede estar más relacionado a las concentraciones de sulfatos que a la misma acción del ión Cu.

La producción de manganeso peroxidasa y de lacasa es máxima cuando la concentración de Cu^{++} agregado ronda los valores de 250 μM y en un pH de cultivo de alrededor de 5.5. El ajuste de los valores de producción enzimática a una ecuación lineal mostró que existen interacciones negativas entre el aumento del valor de pH y la concentración de cobre (Nora y cols. 2003).

Rodríguez y cols. 2002 Llevaron a cabo un estudio en donde evaluaron el efecto del sulfato de cobre como inductor, la producción enzimática y la purificación de enzimas lacasa de *Pleurotus ostreatus* desarrollado sobre Vinaza de destilería, Residual líquido procedente de la fermentación de mieles finales y posterior destilación. En este trabajo, obtuvieron un incremento en la actividad enzimática de hasta cien veces más sobre vinaza que en un medio sintético, y que al adicionar sulfato de cobre sobre los dos medios residuales, este aumenta el doble de la producción enzimática.

Snajdr y Baldrian 2007. Determinaron la actividad enzimática en cultivos de *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor* sobre celulosa como única fuente de carbono y energía. Los hongos fueron capaces de crecer y producir lacasas y Mn-peroxidasas a 5-35 °C, la mayor producción se encontró a 25-30 °C en *P. ostreatus* y a 35 °C en *T. versicolor*. La temperatura óptima para la actividad enzimática de lacasas fue de 50 y 55 °C para *P. ostreatus* y *T. versicolor*, respectivamente, y 60 °C para Mn-peroxidasas.

Dritsa y Rigas 2006. Estudiaron la producción y la actividad enzimática de manganeso peroxidasa y lacasa de 8 diferentes cepas de hongos desarrolladas a diferentes temperaturas (15, 20, 25 y 30 °C), confirmando que la temperatura de incubación afecta la expresión y los patrones de las enzimas ligninolíticas.

Téllez-Téllez y cols. 2008. Evaluaron el crecimiento y la producción de lacasas de *P. ostreatus* en fermentación líquida y en fermentación sólida. El crecimiento de *P. ostreatus* fue mayor en la fermentación líquida que en la fermentación sólida, mostrando una mayor generación de biomasa y una mayor actividad enzimática. El consumo de glucosa fue más rápido en la fermentación sólida que en la fermentación líquida. Los zimogramas revelaron que en cultivos crecidos en fermentación líquida mostraron más de 4 isoformas durante el transcurso del experimento. Por otro lado, Los cultivos crecidos en fermentación sólida

mostraron 1 isoforma en la fase lag, 2 o posiblemente 3 en la fase exponencial y 2 en la fase estacionaria.

Mei y cols. 2005. Aislaron un gen que codificante de lacasa (*Lcc1*) de *Trametes versicolor*, clonada dentro de *Pichia methanolica* obteniendo una proteína con un peso molecular de 64 kDa similar a la lacasa nativa. También evaluaron los efectos de la concentración del cobre, temperatura de incubación, pH y concentración de metanol. La lacasa recombinante, mostro valores de actividad máxima de 12.6 U/ml⁻¹.

Cuatro genes de isoenzimas de lacasas *Psc lac1*, 2, 3 y 4 fueron clonados del hongo *Pleurotus sajor-caju*. Los genes mostraron un alto grado de homología con otras lacasas de otros basidiomicetes (55-99%) en los niveles de aminoácidos. De los genes de lacasa aislados, *Psc lac1* y 4 muestran el alto grado de similitud (85% en los niveles de aminoácidos) mientras que *Psc lac3* muestra altos niveles de divergencia, exhibiendo solo 52-57% de aminoácidos similares para la otra secuencia de genes de lacasa de *Pl. sajor-caju*. La actividad de lacasa en *Pl. sajor-caju* es afectada por nutrientes como nitrógeno y carbono, y por la adición de cobre y manganeso en el medio de cultivo. En adición, 2,5-xilidina, ácido ferulico, ácido veratrico y 1-hidroxibenzotriazol inducen la actividad de lacasa en los hongos. Mientras que los niveles de transcripción de *Psc lac3* parecen ser expresados de manera constitutiva, los niveles de transcripción para para los otros genes de isoenzimas lacasa, *lac1*, 2 y 4, son regulados bajo condiciones inducibles (Declan y Alan 2001).

Se analizó la producción de biomasa y enzimas ligninolíticas de *Pleurotus ostreatus* en medio sintético con extracto de levadura a diferentes concentraciones de glucosa (0,5-20 g/l), diferentes pH (3,5-6,5) y temperaturas de incubación (23-32°C). Las mejores condiciones de cultivo fueron: concentración de glucosa inicial de 5 g/l, pH inicial entre 5,5-6,5 y una temperatura de incubación entre 26-29°C. Se obtuvieron aproximadamente 307 U/l de enzima lacasa y 0,41 U/l de manganeso peroxidasa en medio liquidoextracelular y 0,015 U/g de lacasa y 0,809 U/g de manganeso peroxidasa en sustrato sólido(Gricelda y cols. 1998).

Nubia y cols. 2003. Evaluaron diferentes métodos de purificación y separación cromatografía de un caldo rico en enzimas lacasa, producidas por una variedad del basidiomicete *Pleurotus ostreatus* en dos diferentes procesos de producción: fermentación líquida y fermentación sólida. En este trabajo encontraron tres isoenzimas de lacasa I, II y III. En donde las isoenzimas lacasa I y lacasa II, tuvieron un aumento de 1.5 veces la actividad específica y de 3.1 para la isoenzimas lacasa III. La temperatura óptima de reacción de las isoenzimas lacasa I y II, fueron de 50 °C y 40 °C respectivamente.

El estudio de *Pleurotus djamor* desarrollado sobre residuos de Plátano (*Musa Paradisiaca*) y sobre aserrín de abarco (*Cariniana pyriformis*) en diferentes muestras y sometidas a tres diferentes temperaturas de desarrollo (15, 20 y 26 °C) muestran que, de los dos residuos agroindustriales mezclados entre sí, *Pleurotus djamor* tiene mejor desarrollo y producción de enzimas lacasa sobre las mezclas de hojas de plátano con aserrín, y que la temperatura que mejores resultados de crecimiento y producción de enzimas fue a 26 °C (Karina y cols.2006).

3. JUSTIFICACIÓN

Las lacasas se encuentran ampliamente distribuidas en el ambiente y se han descrito en hongos, plantas, insectos y más recientemente en bacterias. El rol biológico de las lacasas de hongos y de plantas ha sido exhaustivamente estudiado para degradación y síntesis de lignina, respectivamente.

Por lo que el éxito de la utilización de enzimas lacasas en procesos de biorremediación, así como usos biotecnológicos de enzimas lacasas se basa principalmente en contar con organismos altamente productores de enzimas con las mejores características catalíticas, así como las condiciones de desarrollo del hongo en las cuales se obtenga la mayor cantidad de estas enzimas. Dado lo anterior, en este trabajo se evaluará el efecto de la temperatura de desarrollo en fermentación sólida de *Pleurotus ostreatus* sobre la actividad de lacasas, y número de isoformas, tratando de contribuir en la búsqueda de las mejores condiciones de producción de estas enzimas.

4. HIPOTESIS

La producción de enzimas lacasas y el número de isoenzimas obtenidas por fermentación sólida dependen de la temperatura en la que se desarrolle el hongo.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto que tiene la temperatura de desarrollo de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sólida, sobre su actividad de lacasas y número de isoenzimas.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar la fermentación sólida para la producción de enzimas lacasas de *Pleurotus ostreatus* 6 diferentes temperaturas (10, 15, 20, 25, 30 y 35 °C) de desarrollo del hongo.
- Determinar a través de zimografía el número de isoformas de lacasas producidas en cada una de las condiciones evaluadas de la temperatura de desarrollo del hongo.

6. METODOLOGÍA

6.1 Cepa e inóculo

Se utilizó la cepa de *Pleurotus ostreatus* 32783, de la American Type Culture Collection (Maryland, USA). La cepa stock se desarrolló en agar extracto de malta a 25°C por 7 días y se mantuvo a una temperatura de 4°C, resemebrándose cada mes. El inóculo para las fermentaciones fue de 1 fragmentos de micelio de 4 mm de diámetro para cada caja Petri cortados de la periferia de la colonia, el cual se desarrolló en las mismas condiciones que la cepa stock.

6.2 Condiciones de cultivo de *Pleurotus ostreatus*

Se utilizó la cepa de *Pleurotus ostreatus* 32783 (Po83), de la American Type Culture Collection (Maryland, USA). Se preparó un medio que contubo (en g por litro): glucosa, 10; extracto de levadura, 5; KH_2PO_4 , 0.6; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; K_2HPO_4 , 0.4; $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.25; $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05; $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.05; $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001. El pH de fermentación se ajustó a 6.5 con NaOH 0.1M. Las temperaturas de fermentación fueron 10, 15, 20, 25, 30 y 35. El inóculo para las fermentaciones fue de 3 fragmentos de micelio (4mm de diámetro) tomados de la periferia de una colonia crecida sobre agar dextrosa de papa (PDA) a 25 °C por 7 días. La fermentación se llevó a cabo en matraces de 250 ml conteniendo 1 g de espuma de poliuretano de baja densidad (PUF: 17 kg⁻³) cortado en cubos (0.5×0.5×0.5: Díaz-Godínez y cols. 2001) como soporte inerte impregnado con 30 ml de medio de cultivo estéril. Previamente, los cubos se lavaron con agua destilada, se secaron a 60 °C por 24 h, y se esterilizaron en un autoclave a 120 °C por 15 min (Tellez-Tellez y cols. 2005).

6.3 Obtención del extracto enzimático

El extracto enzimático (EE) de los cultivos crecidos bajo condiciones de FS se obtuvieron mediante el uso de filtro Millipore (0.45 µm) y una jeringa de 50 ml. Los cubos de PUF se lavaron 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 una diferencia de peso (gramo por litro; Díaz-Godínez y cols. 2001).

6.4 Biomasa y parámetros cinéticos de crecimiento del hongo

La biomasa (X) producida se separó por filtración y se séco en horno a 60°C durante 24 h; y se reportó el peso seco (Díaz-Godínez y cols. 2001, Tlecuitl-Beristain y cols. 2003).

Para determinar los parámetros de crecimiento se consideró la evolución de la biomasa $X = X(t)$ por la ecuación logística (1) por la minimización del error cuadrático con la herramienta Solver de la hoja electrónica de Excel (Microsoft) (Díaz-Godínez y cols. 2001, Viniegra-González y cols. 2003).

$$\frac{dX}{dt} = \mu \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right) X \dots\dots\dots (1)$$

La solución de la ecuación logística es (2):

$$X = \frac{X_{\max}}{(1 + C \exp^{-\mu t})} \dots\dots\dots (2)$$

Donde μ es la velocidad específica de crecimiento, X_{\max} es el valor de biomasa máxima o de equilibrio y $C = \frac{X_{\max} - X_o}{X_o}$ con $X=X_o$.

El rendimiento teórico de la enzima con respecto a la biomasa ($Y_{E/X}$) se estimó como la relación entre la E_{\max} (U/L) y X_{\max} (g/L). Se calculó la productividad en el pico máximo de actividad ($P_{RO} = E_{\max}/$ tiempo de fermentación), además de la tasa específica de formación de la enzima ($q_p = \mu Y_{E/X}$).

6.5 Determinación de la concentración de proteína soluble

La proteína total excretada se determinó en el EE libres de células por el método de Bradford 1976. A 100 μ l de EE se le adiciono 40 μ l del reactivo de Bradford, el volumen se ajustara a 1 ml con agua destilada y la absorbancia se leyó a 595 nm. Se usó albúmina sérica bovina como proteína estándar.

6.6 Determinación de la actividad enzimática

La actividad enzimática de lacasas (E) se determinó en el EE obtenido en diferentes tiempos de la fermentación utilizando 2,6-dimetoxifenol (DMP) como sustrato. La mezcla de reacción se preparó con 900 μ l de DMP 2mM en buffer de fosfatos pH 6.5 0.1 M y 100 μ l de EE. La absorbancia se leyó con un equipo Jenway 6405 UV/Vis spectrophotometer a

una longitud de onda de 468 nm después de 1 min de incubación a 40 °C en la celda Peltier. Una unidad de actividad de lacasas (U) se consideró como la cantidad de enzima que provoque un incremento de una unidad de absorbancia por minuto.

6.7 Determinación del pH de los extractos crudos enzimáticos

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

6.8 Identificación de isoformas con actividad de lacasas

En cada muestreo de la fermentación se determinó el número de isoformas presentes en el 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). El gel de separación y de empaquetamiento contuvo 12 y 4% de acrilamida, respectivamente. 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 voltios durante un tiempo 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. Posteriormente, los geles se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente en DMP 2mM. Se realizó un gel para cada combinación de temperatura de desarrollo y de actividad de lacasas.

6.9 Cuantificación de azúcares residuales

La determinación de los azúcares residuales se realizó por medio de la técnica de DNS (Miller 1956). La mezcla de reacción contuvo 950 µl de agua destilada, 50 µl de EE y 2 ml del reactivo de DNS, se puso en baño María a temperatura de ebullición durante 5 minutos deteniendo la reacción sumergiendolos tubos en agua fría. Se leyó la absorbancia a 575 nm. Se preparó una curva con concentraciones conocidas de glucosa.

7. RESULTADOS

7.1 Fermentación 15 °C

7.1.1 Actividad enzimática

Los resultados obtenidos en la fermentación a una temperatura de incubación de 15 °C muestra una actividad máxima de 12048 U/L en un tiempo de 552 horas (figura 11). Las mayores actividades enzimáticas en esta fermentación, se presentaron en la fase estacionaria de crecimiento de este microorganismo.

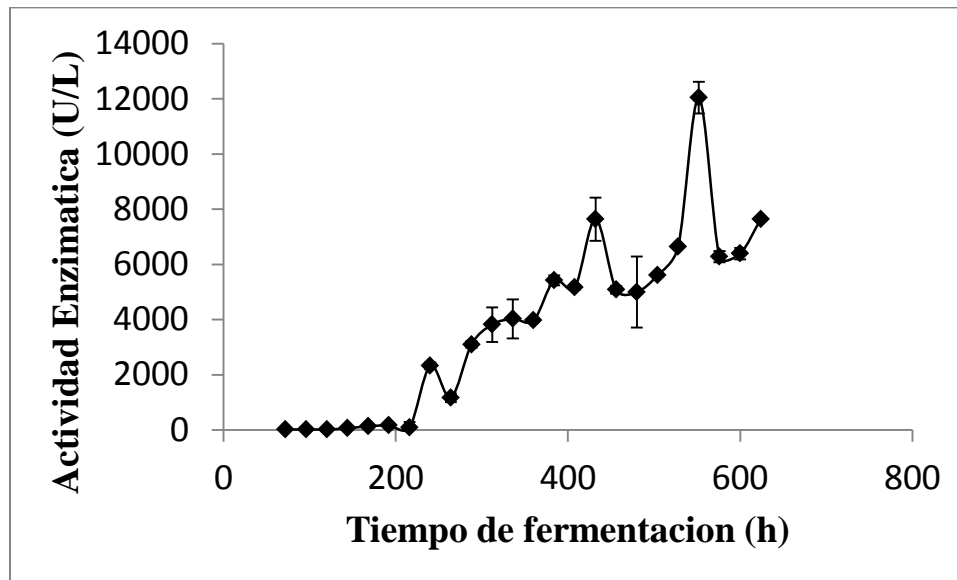


Figura 11. Actividad de lacasas de *P. ostreatus* obtenidas por fermentación sólida a 15°C.

7.1.2 Biomasa

La biomasa máxima generada por este hongo en la fermentación a 15 °C fue de 4.61 g/L, esta es similar a lo ya reportado anteriormente en trabajos de laboratorio y en otros trabajos. El hongo alcanzó la fase estacionaria de crecimiento a las 336 horas, mostrando un crecimiento más lento comparado con las otras condiciones de desarrollo (figura 12).

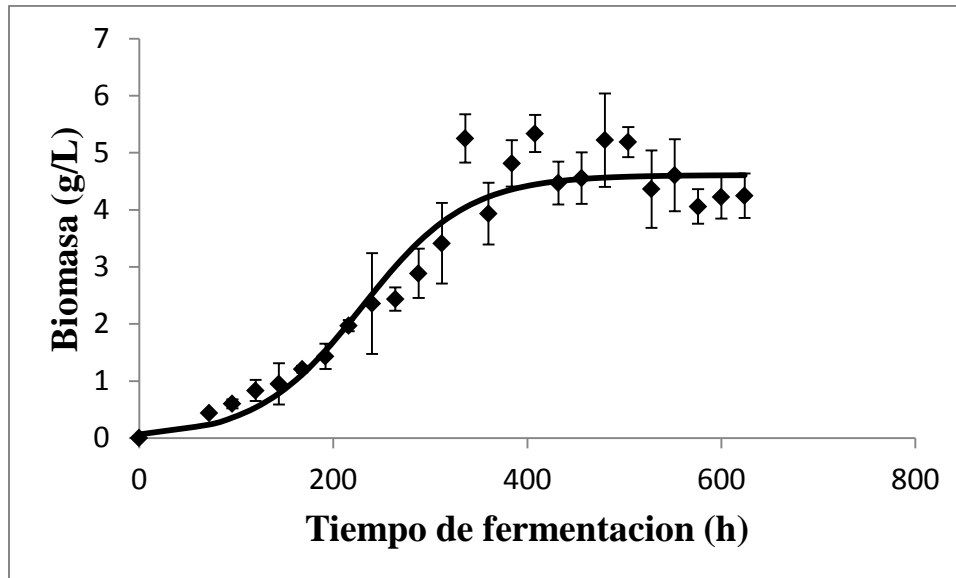


Figura 12. Curva de crecimiento a 15 °C de *P. ostreatus* en fermentación sólida.

7.1.3 pH de la fermentación

El pH del medio presento variaciones en las primeras 200 horas de la fermentación, posteriormente, el pH se mantuvo constante con valores cercanos a 6 (figura13).

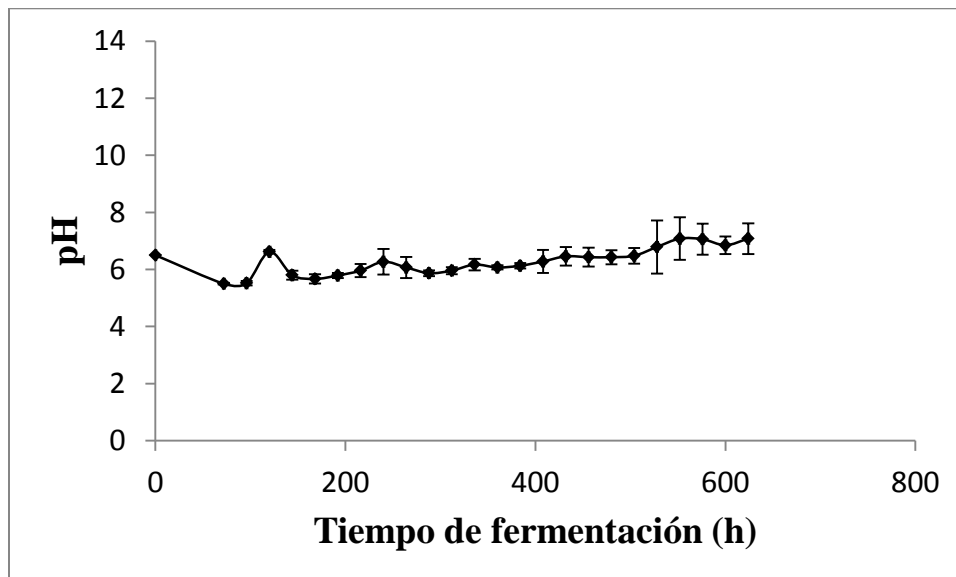


Figura 13. Grafica de pH de la fermentación.

7.1.4 Concentración de proteína

La concentración de proteína en la fermentación desarrollada a 15°C, fue de 0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, esta cantidad de proteína fue la más alta de esa fermentación presentándose a las 432 horas de la fermentación, este resultado se muestra en la fase estacionaria de crecimiento del hongo (figura 14).

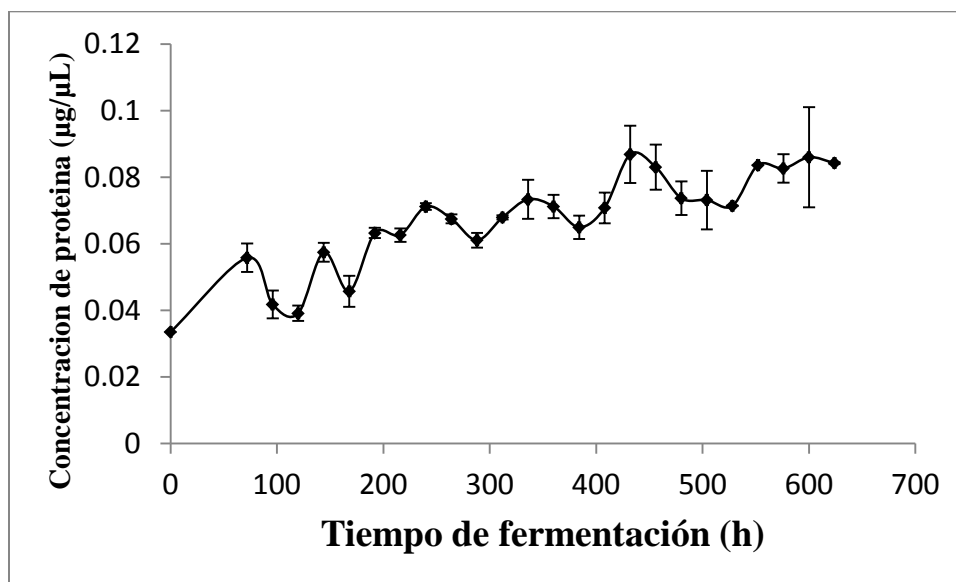


Figura 14. Concentración de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de *P. ostreatus* en fermentación sólida a 15°C.

7.1.5 Azúcares residuales

La curva de consumo de azúcares muestra que el hongo agota completamente su fuente de nutrientes a las 480 horas, presentando el agotamiento de la fuente de carbono en la fase de crecimiento estacionaria, en los últimos tiempos de la fermentación (figura 15).

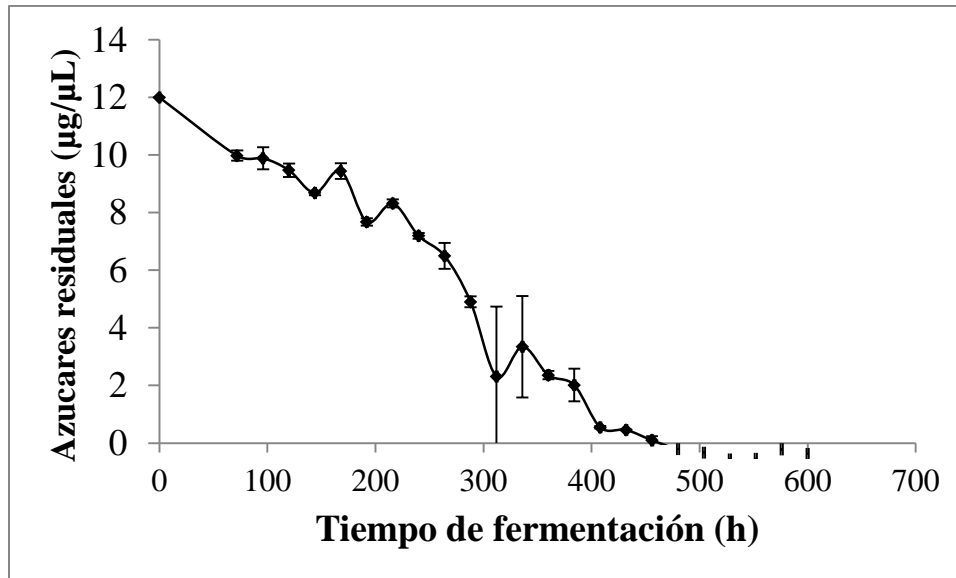
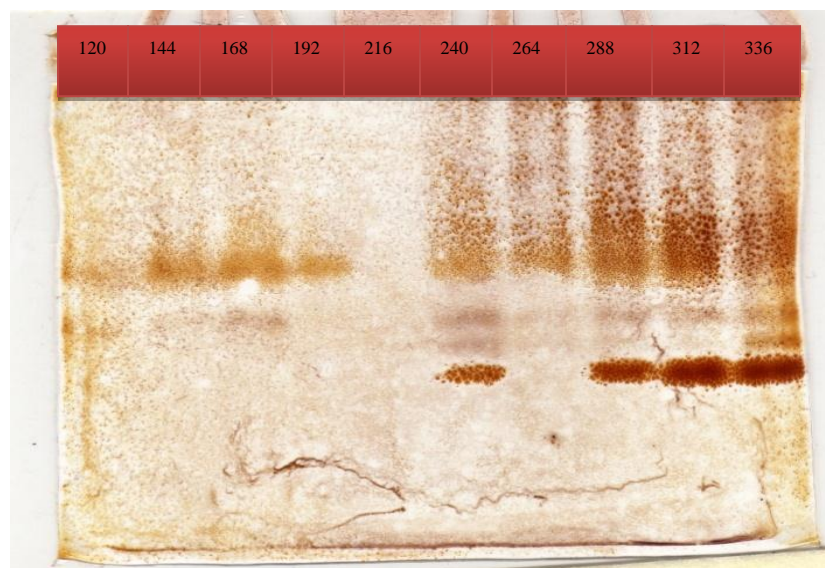


Figura 15. Gráfico de consumo de azúcares de *P. ostreatus* en fermentación solida a 15 °C.

7.1.6 Isoformas de lacasas

En esta fermentación realizada a 15 °C, el hongo, muestra dos bandas de isoformas de lacasas en la fase de adaptación, cuatro isoformas en la fase logarítmica y tres en la fase estacionaria de crecimiento del hongo (figura 16).



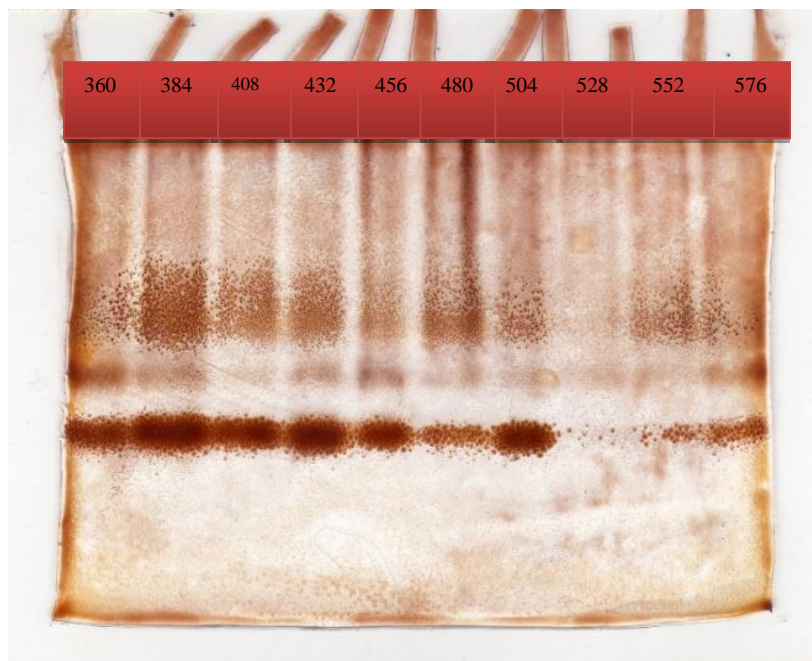


Figura 16. Geles de isoformas de lacasas (números en recuadros son las horas de fermentación).

7.2 Fermentación 20°C

7.2.1 Actividad enzimática

La actividad enzimática de lacasas de la fermentación a 20°C mostro niveles muy bajos en comparación con la fermentación de 30°C obteniendo un máximo de 4559.9 U/L en un tiempo de 528 h. como se puede observar, la mayor actividad se presentó en los tiempos finales de la fermentación (figura17).

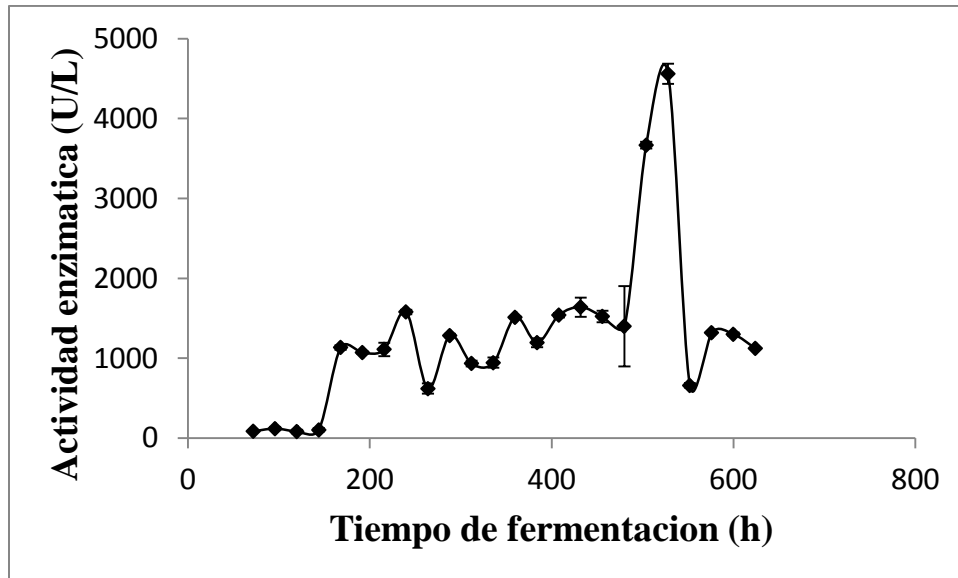


Figura 17. Actividad de lacasas de *P. ostreatus* obtenidas por fermentación solida a 20°C.

7.2.2 Biomasa

La generación de biomasa de *P. ostreatus* en la fermentación desarrollada a 20°C (figura18) se mostró mayor (4.31 g/L,) que la generada a 30°C, alcanzando la fase estacionaria a las 240 horas.

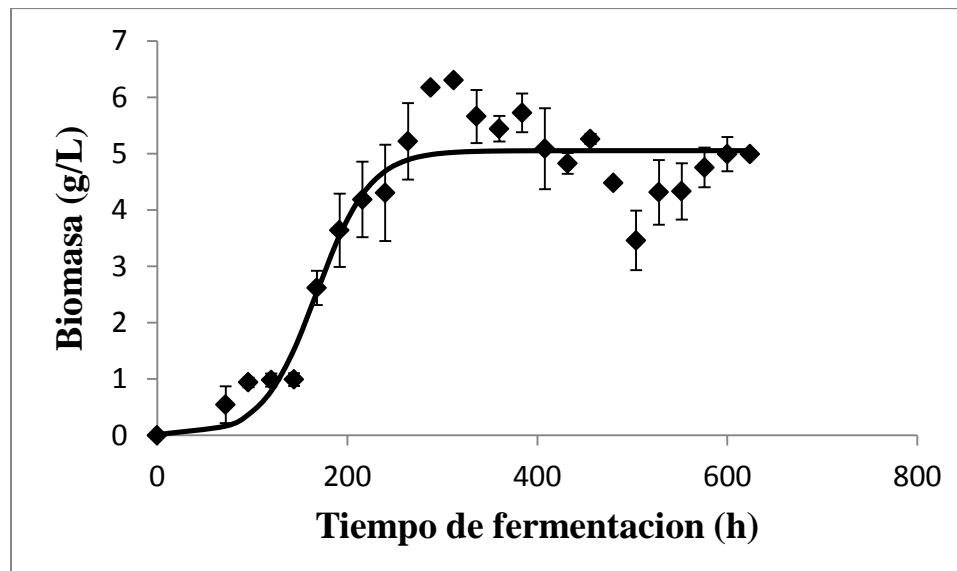


Figura 18. Curva de crecimiento a 20°C de *P. ostreatus* en fermentación sólida.

7.2.3 pH de la fermentación

El pH de la fermentación descendió a 6 durante las primeras 48 horas manteniéndolo durante el resto de la fermentación sin tener mucha variación (figura 19).

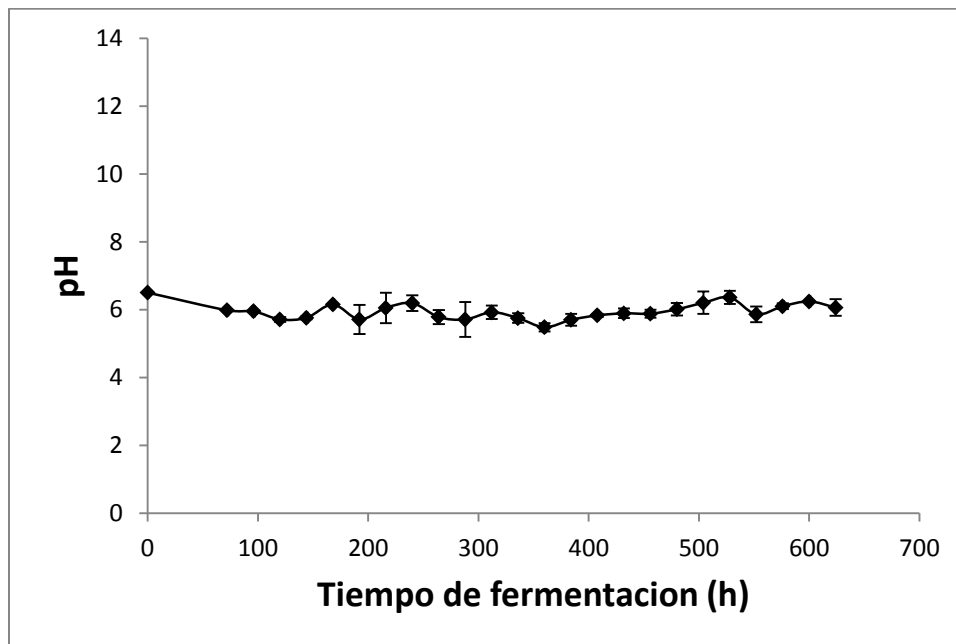


Figura 19. Grafica de pH de la fermentación.

7.2.4 Concentración de proteína

La mayor concentración de proteína obtenida en la fermentación a 20°C fue de 0.11 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en un tiempo de 240 horas, siendo el mismo tiempo en que el hongo llega a la fase estacionaria de crecimiento (figura 20).

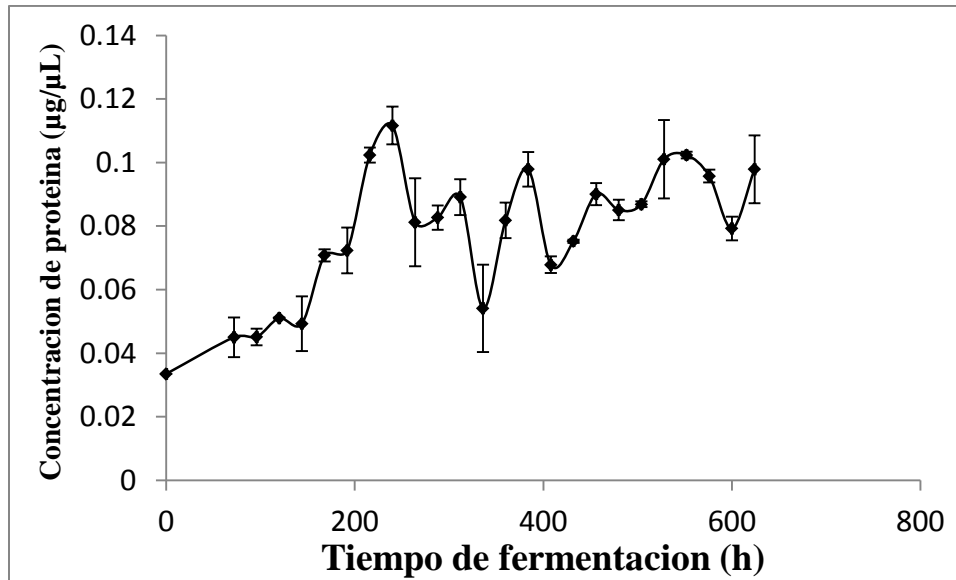


Figura 20. Concentración de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de *P. ostreatus* en fermentación solida a 20°C .

7.2.5 Azúcares residuales

El consumo de azúcares en el medio (figura 21) en la fermentación a 20°C , muestra que el hongo *P.ostreatus* fue consumiendo la fuente de carbono al paso del tiempo, consumiéndola en su totalidad en un tiempo de 312 horas, el consumo total de azúcares se presentó en la fase estacionaria del hongo.

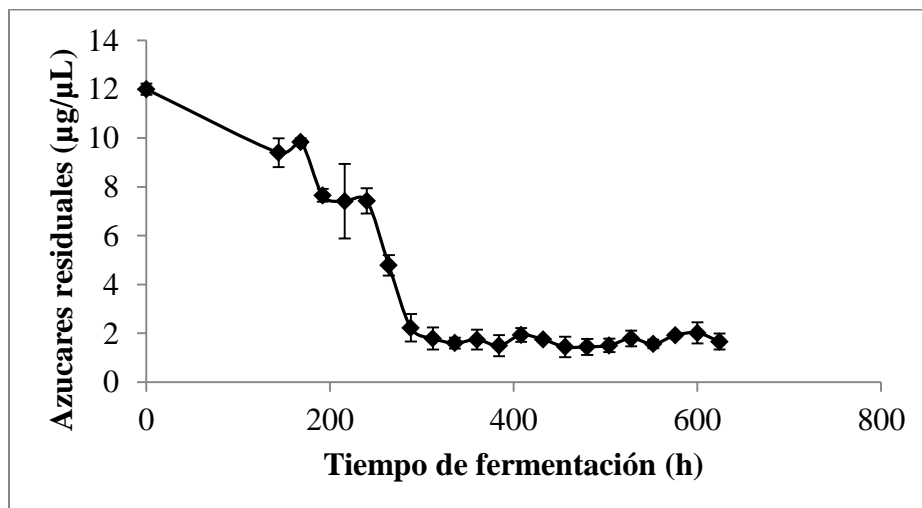


Figura 21. Gráfico de consumo de azúcares de *P. ostreatus* en fermentación solida a 20°C .

7.2.6 Isoformas de lacasas

Los geles de electroforesis de lacasas en la fermentación realizada a 20 °C muestran que *P. ostreatus* produjo dos isoenzimas de lacasas en la fase adaptativa del hongo, tres isoformas en la fase de crecimiento logarítmica y hasta cuatro isoformas en la fase estacionaria (figura 22).

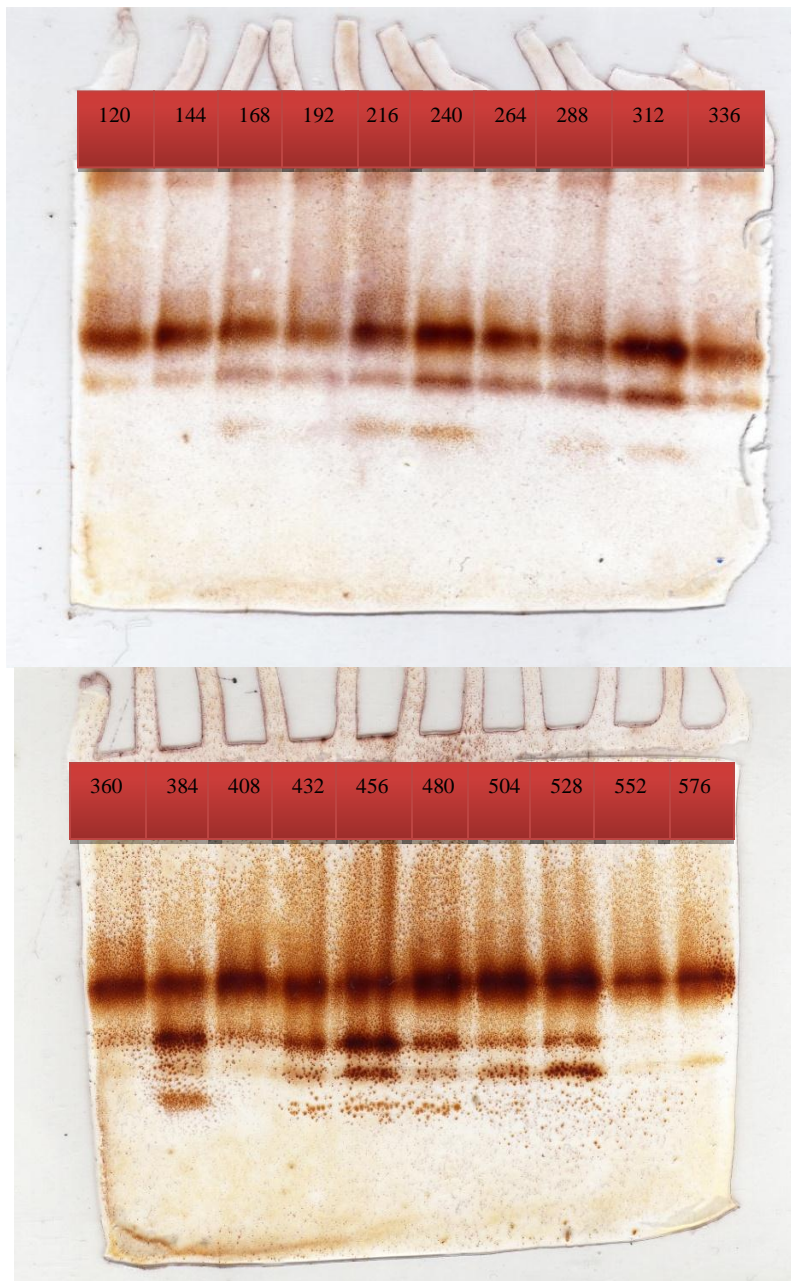


Figura 22. Geles de isoformas de lacasas (números en recuadros son las horas de fermentación)

7.3 Fermentación 25 °C

7.3.1 Actividad enzimática

En esta fermentación, se puede observar actividad enzimática a partir de las 200 horas de desarrollo del hongo, teniendo un máximo de actividad de 20000 U/L a las 432 horas. Estos valores son similares a los ya reportados por Téllez-Téllez y cols. 2008 donde desarrollaron a este mismo microorganismo en las mismas condiciones(figura23).

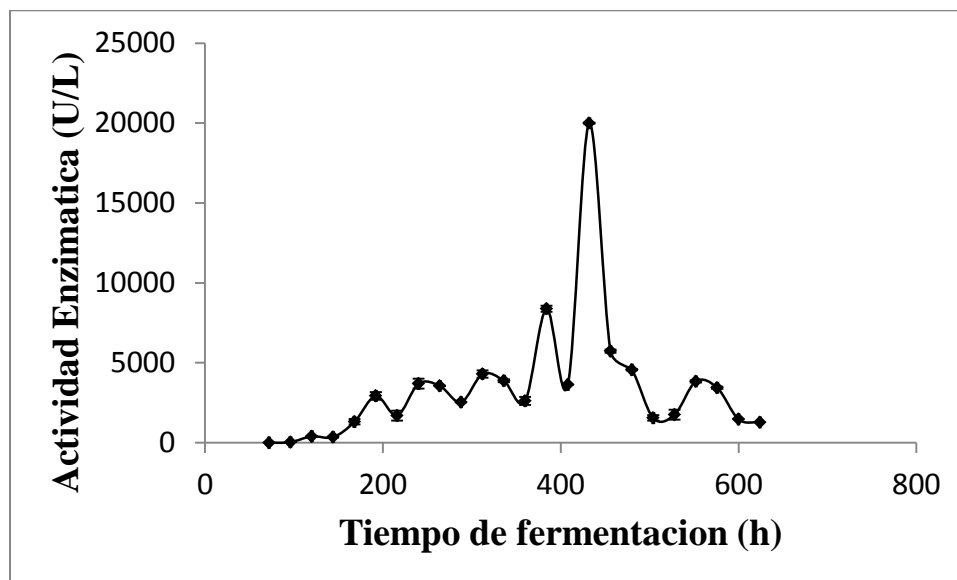


Figura 23. Actividad de lacasas de *P. ostreatus* obtenidas por fermentación solida a 25°C.

7.3.2 Biomasa

En estas condiciones de desarrollo, el organismo tuvo una biomasa máxima de 5.13 g/L (figura24), similar a lo ya reportado por Díaz y cols. 2011, Téllez-Téllez y cols. 2008. La fase estacionaria la alcanzo a las 216 horas, mostrando una fase estacionaria más prolongada que la presentada en la fermentación a 15 °C.

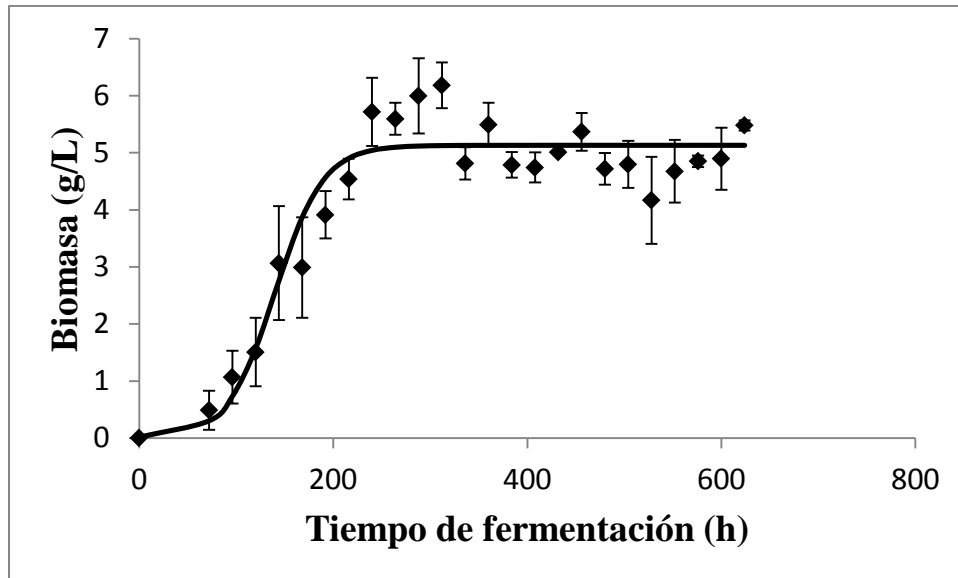


Figura 24. Curva de crecimiento a 25°C de *P. ostreatus* en fermentación sólida.

7.3.3 pH de la fermentación

El pH del medio, descendió a valores de 5 en las primeras 72 horas, posteriormente el pH se elevó alcanzando valores alrededor de 6 después de la 92 horas manteniendo estos valores por el resto del tiempo que duro la fermentación (figura25).

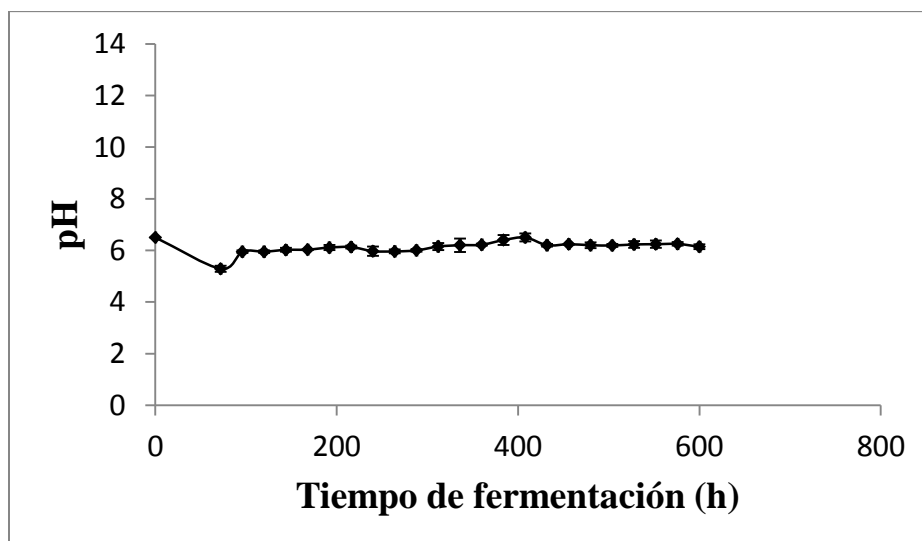


Figura 25. Grafica de pH de la fermentación.

7.3.4 Concentración de Proteína

Se observa que la concentración de proteína aumenta conforme avanza el tiempo de la fermentación, presentando una concentración de proteína máxima de $0.11 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ a las 552 horas (figura 26).

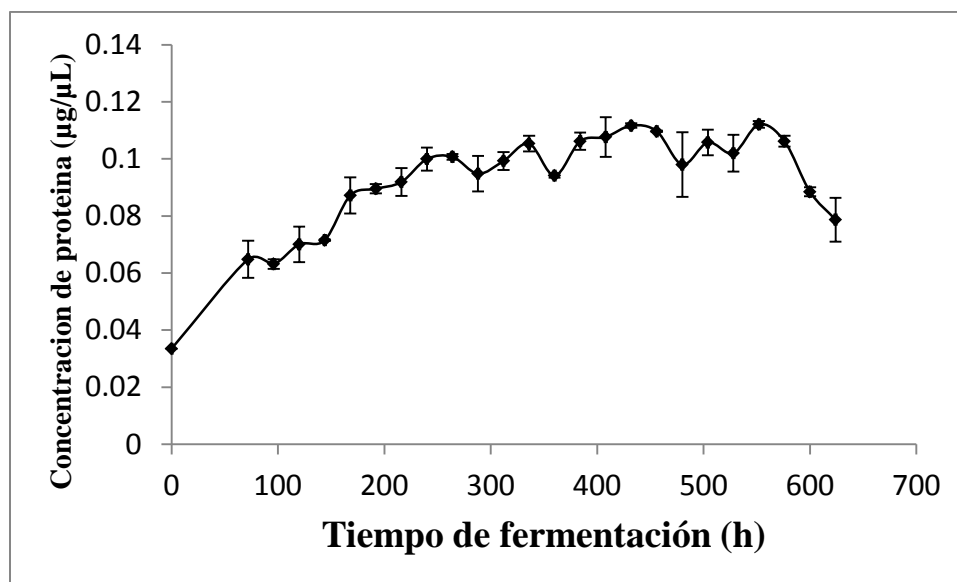


Figura 26. Concentración de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de *P. ostreatus* en fermentación solida a 25°C .

7.3.5 Azúcares residuales

La cantidad de azúcares en el medio (figura 27) durante la fermentación desarrollada a 25°C se muestra de manera descendiente conforme pasa el tiempo de la fermentación. Se puede observar el que el consumo total de azúcares fue a las 336 horas de la fermentación, presentándose cuando el hongo había alcanzado la fase estacionaria de crecimiento.

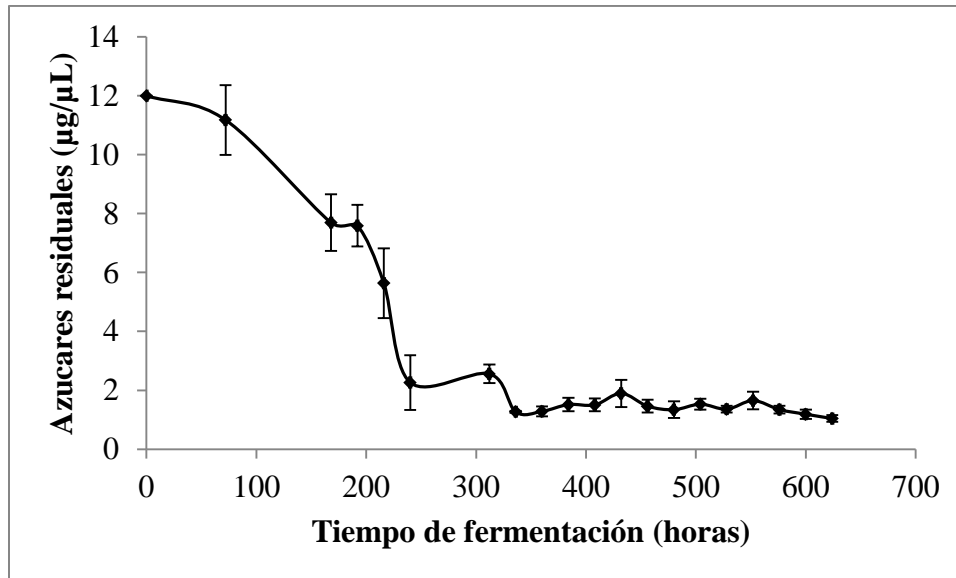


Figura 27. Gráfico de consumo de azúcares de *P. ostreatus* en fermentación sólida a 25 °C.

7.3.6 Isoformas de lacasas

Los geles de electroforesis muestran que *P. ostreatus* desarrollado a 25 °C presenta una isoforma de lacasa en la fase de adaptativa de crecimiento, posteriormente, en la fase de crecimiento exponencial, presenta dos isoformas de lacasa y en la fase estacionaria presenta hasta tres isoformas de lacasas (figura 28).

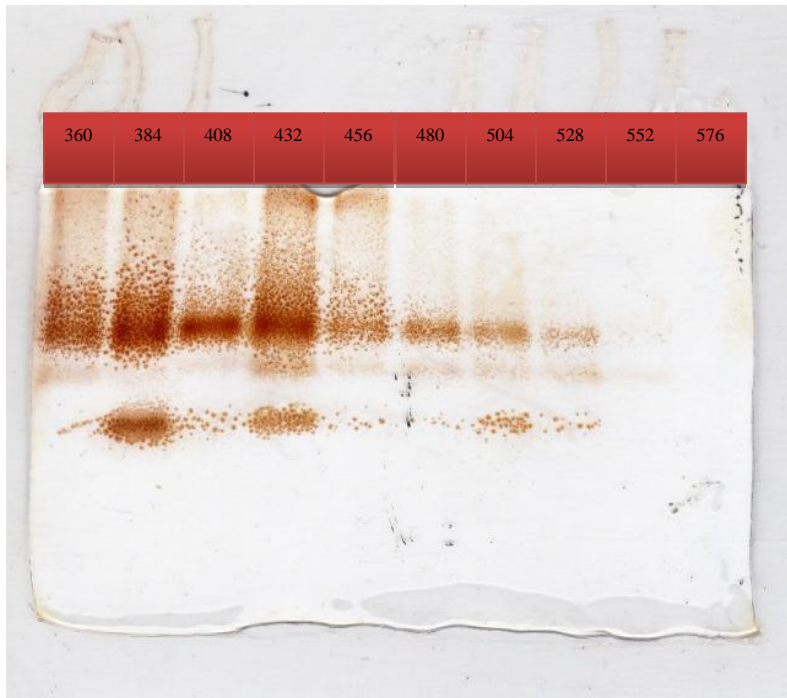


Figura 28. Geles de isoformas de lacasa (números en recuadros son las horas de fermentación).

7.4 Fermentación 30°C

7.4.1 Actividad enzimática

La cepa del hongo *P.ostreatus*, secreta enzimas lacasas con altas actividades enzimáticas en la fermentación que se desarrolló a 30°C (figura 29), La actividad presentó cuatro picos de actividad, el primero se muestra a las 216 horas con un valor de 4154 U/L, el cual coincide con el inicio de la fase estacionaria de crecimiento del hongo, el segundo se presentó a las 288 horas con un valor de 22900 U/L, el tercero se presentó a las 384 horas con una actividad enzimática de 62500 U/L, siendo aproximadamente 70% mayor de lo que ha sido reportado hasta este momento (Díaz y cols. 2011) y siendo hasta 5 veces mayor de lo que se ha observado en trabajos anteriores de laboratorio (Téllez-Téllez y cols. 2008). Y el cuarto y último a las 504 horas de crecimiento con una actividad enzimática de 2932U/L.

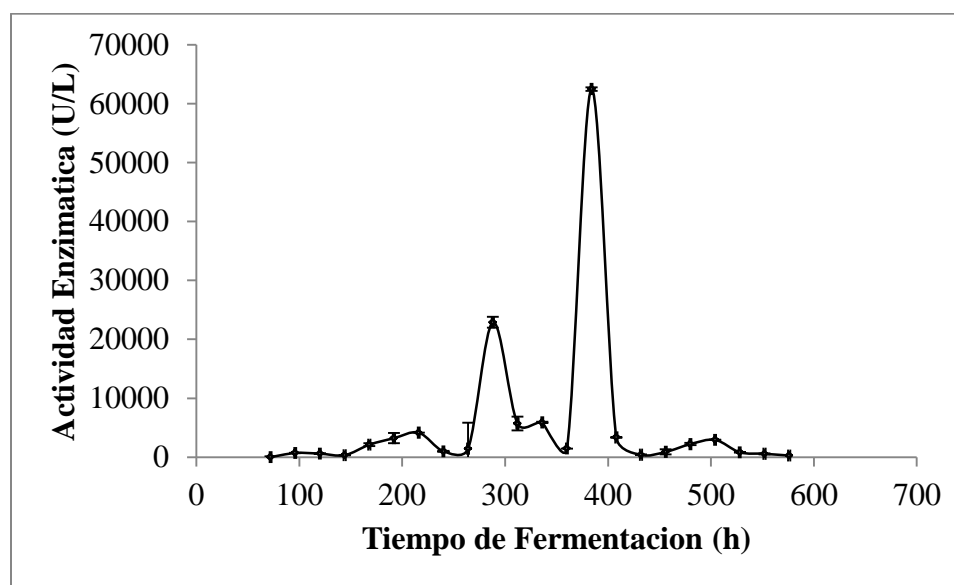


Figura 29. Actividad de lacasas de *P. ostreatus* obtenidas por fermentación sólida a 30 °C.

7.4.2 Biomasa

La biomasa máxima generada por *P. ostreatus* a una temperatura de crecimiento de 30 °C fue de 4 g/L (figura. 30), la cual fue mucho menor a la ya reportada en trabajos anteriores (Díaz y cols. 2011, Téllez-Téllez y cols. 2008). Se observa que el hongo alcanzó la fase

estacionaria a las 200 horas, al mismo tiempo en el que se presenta el primer pico de actividad enzimática.

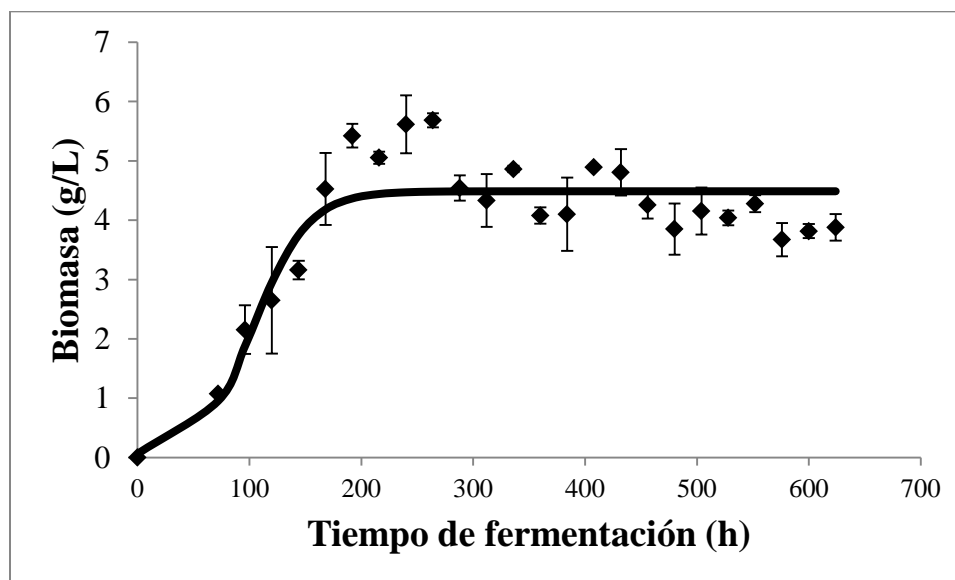


Figura 30. Curva de crecimiento a 30 °C de *P. ostreatus* en fermentación sólida.

7.4.3 pH de la fermentación

El pH tuvo variaciones entre los valores 5 y 7 durante las primeras 400 horas, después de este tiempo, el pH fue más estable presentando valores cercanos a 6 (Figura31).

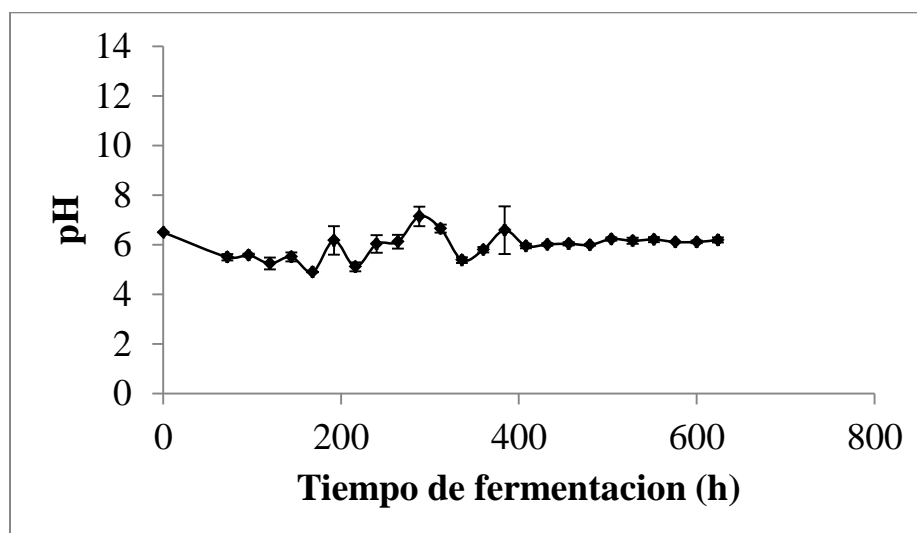


Figura 31. Grafica de pH de la fermentación.

7.4.4 Concentración de proteína

La mayor cantidad de proteína que presentó *P. ostreatus* en la fermentación de 30°C fue de 0.11 µg/µL mostrada dentro del periodo de fermentación a las 456 h (figura 32), en la fase estacionaria de crecimiento. Se puede observar que la mayor producción de proteína en esta fermentación, se presenta en las últimas horas del crecimiento de *P. ostreatus*.

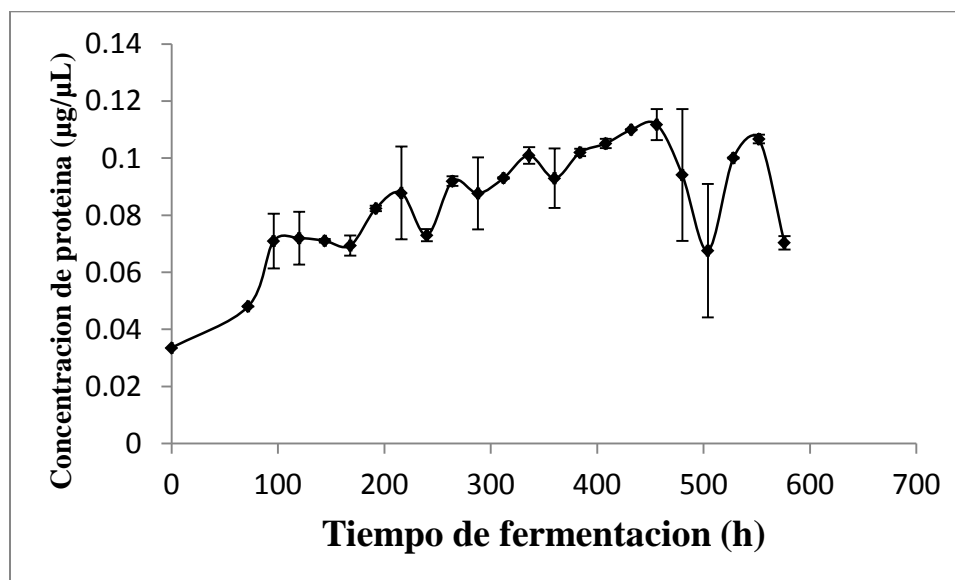


Figura 32. Concentración de proteína de *P. ostreatus* obtenida a 30°C

7.4.5 Azúcares residuales

En la figura 33 se muestra el consumo de azúcares por *P. ostreatus* durante el periodo de fermentación, se puede observar que al tiempo de fermentación de 168 h la fuente de carbono ha sido completamente consumida, coincidiendo con el tiempo en que *P. ostreatus* alcanza su fase estacionaria de crecimiento.

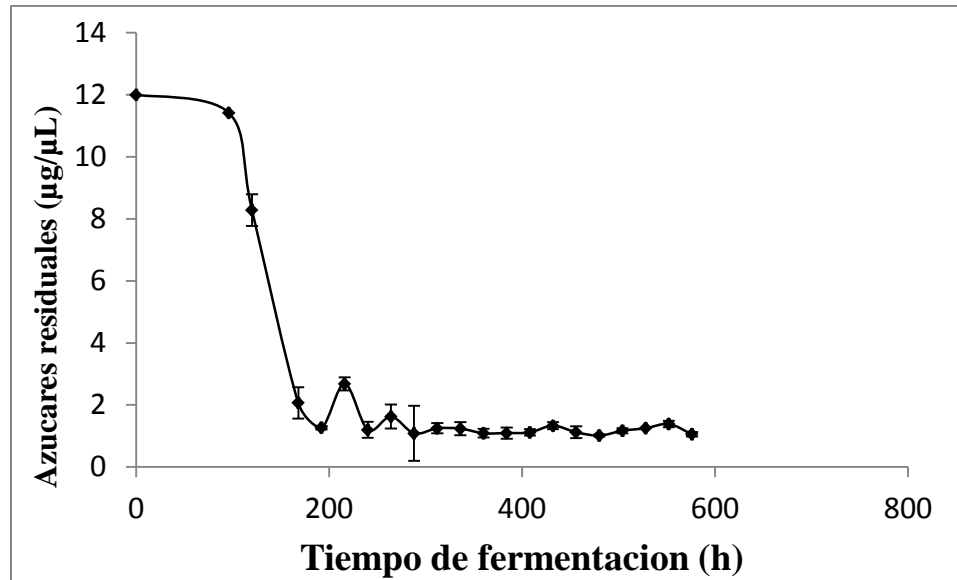


Figura 33. Gráfico de consumo de azúcares de *P. ostreatus* en fermentación solida a 30°C.

7.4.6 Isoformas de lacasas

En la fermentación a 30 °C, el hongo presento una isoforma de lacasa en las primeras horas de la fermentación, dos isoformas de lacasa en la fase logarítmica y dos isoformas en la fase adaptativa (figura 34). La primera isoforma, no se puede observar claramente, por lo cual, nos hace pensar que en las primeras horas de la fermentación, el hongo no presenta una alta producción de enzimas, en la fase logarítmica, las bandas de las isoformas se pueden observar muy remarcadas, aunque solo son dos isoformas, y las isoformas que se presentan en la fase estacionaria, son menos visibles que las dos anteriores.

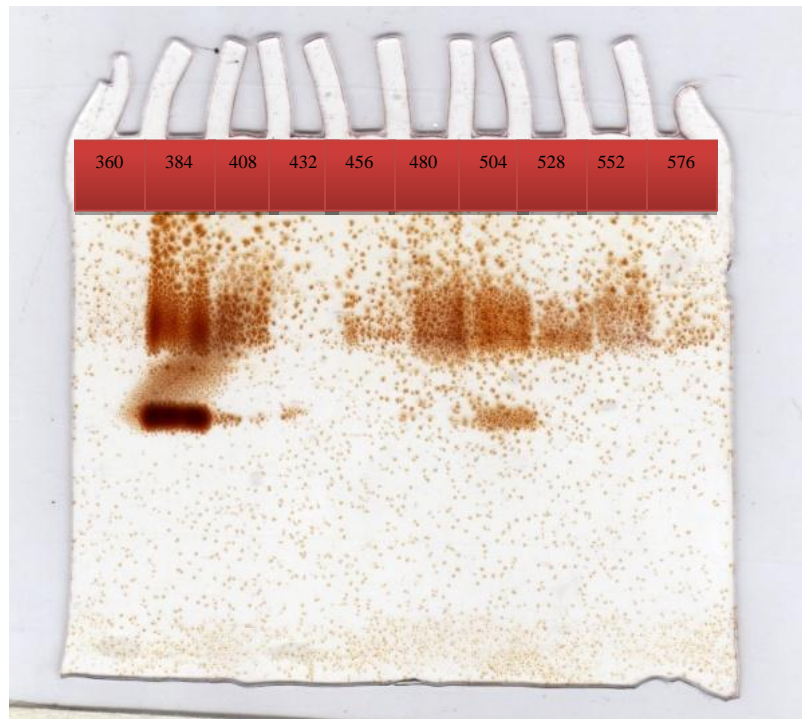
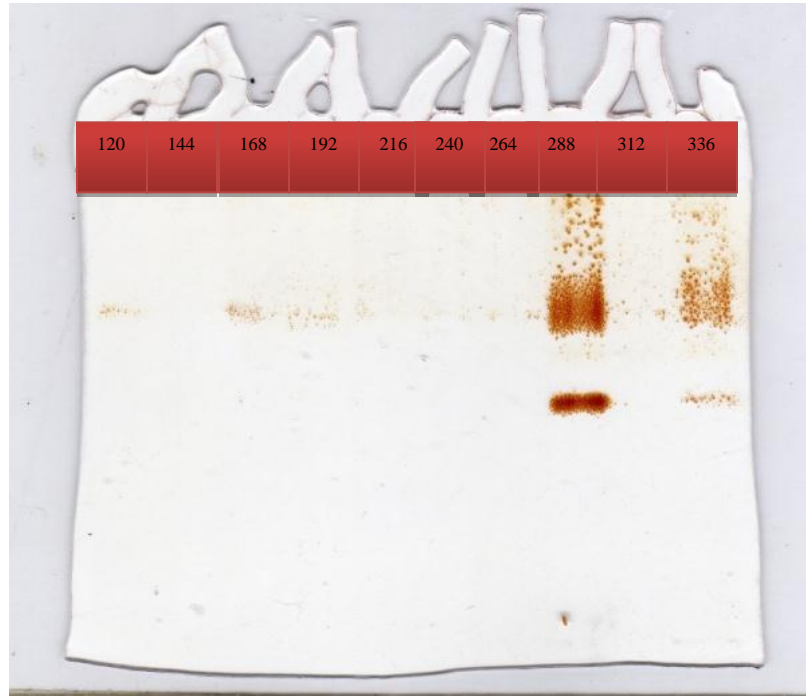


Figura 34. Geles de isoformas de lacasa (números en recuadros son las horas de fermentación).

En esta investigación, también se llevaron a cabo fermentaciones a temperaturas de desarrollo de 10 °C y de 35°C, demostrando que a 10 °C, si bien, el hongo no sufría muerte celular, presentaba un desarrollo muy lento, siendo hasta 80 % más lento que en las otras condiciones de desarrollo. Mientras que en las condiciones de desarrollo de 30 °C, *P. ostreatus* sufrió muerte celular, además de que era un temperatura demasiado elevada y el medio de cultivo se evaporo en los primeros días de la fermentación.

7.5 Parámetros cinéticos

En la tabla 2, se muestran los parámetros cinéticos de las diferentes condiciones de crecimiento de *P. ostreatus*. Podemos observar que la mayor actividad enzimática se presenta en la temperatura de desarrollo de 30 °C (62500 UI⁻¹), este valor es superior a los obtenidos en diversos estudios (Téllez-Téllez y cols. 2005, Téllez-Téllez y cols. 2008, Díaz y cols. 2011, Dritsa y Rigas 2006), además de que supero a las demás fermentaciones realizadas en este trabajo.

La tasa específica de crecimiento (μ) y la biomasa máxima (X_{max}), fue mayor a 25 °C con valores de 0.040 h⁻¹ y 5.13 g l⁻¹, mientras que en las demás fermentaciones estos valores fueron menores.

Tabla 2. Parámetros cinéticos

	E_{max} (UI ⁻¹)	$Y_{E/X}$ (U g ⁻¹ X)	P (UI ⁻¹ h ⁻¹)	qP (U h ⁻¹ g ⁻¹ X)	μ	X_{max}
15 °C	12048	2613	21.8	47	0.018	4.61
20 °C	4560	1060	8.6	37.1	0.035	4.3
25 °C	20000	3898	46.2	155.92	0.040	5.13
30 °C	62500	15943	162.7	542	0.034	3.92

8. DISCUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que *P. ostreatus* si puede crecer a temperaturas diferentes a la óptima, ya sea por debajo de esta (20 °C y 15 °C), y por arriba de la misma (30 °C).

Los resultados que se presentan en la fermentación a 15 °C rebelan que *P. ostreatus* tuvo una buena generación de biomasa, además, con lo que respecta a la actividad enzimática, se puede observar que es mayor a lo que hasta ahora se ha reportado, mientras que la producción de proteína se mostró buena, estando dentro de los estándares de producción ya reportados anteriormente. Todos estos resultados comparados con trabajos realizados en el laboratorio de biotecnología del CICB (Téllez-Téllez y cols. 2008, Díaz y cols. 2011).

Los zimogramas de lacasas para determinar la presencia de isoformas, revelan que en esta fermentación la actividad de lacasas fue alta, pero presento 4 diferentes isoformas, que son buenos resultados, pero esto no es satisfactorio, debido a que al presentar la mayor cantidad de isoformas la actividad se esperaba que fuera la más elevada y con mejores resultados.

Ahora bien, los resultados de la fermentación a una temperatura de incubación de 20 °C, muestran que la generación de biomasa es buena y que la producción de proteína es alta, estos resultados sugerirían que la actividad enzimática fuera elevada, sin embargo, la actividad enzimática para este caso es muy baja, demostrando que a pesar de que *P. ostreatus* produce una alta cantidad de proteína y una buena generación de biomasa, no está ligada a la actividad enzimática.

Mientras que para el caso de los zimogramas, bajo estas condiciones, muestra una producción de hasta cuatro isoformas, y se esperaba que la actividad fuera de las mejores, pero es demasiado baja para los resultados obtenidos.

La biomasa producida en la fermentación a 25 °C, que es la temperatura reportada como la óptima de crecimiento de *P. ostreatus*, es similar a la ya reportada en trabajos anteriores (Téllez-Téllez y cols. 2008, Díaz y cols. 2011), en donde reportan una buena generación de la misma, ahora bien, la cantidad de proteína que se reporta en este trabajo, se puede considerar como buena y la actividad enzimática es alta, coincidiendo con lo ya reportado

por Téllez-Téllez y cols. 2008, Díaz y cols. 2011, además es mucho mayor que lo que reporta Dritsa y Rigas 2006. Estos resultados pueden sugerir que a una temperatura de desarrollo en la que el hongo crece de manera favorable, la producción de biomasa y de proteína, se ve mejorada, además, la actividad enzimática se incrementa.

Sin embargo, al revelar los geles de electroforesis, se puede observar que disminuye la cantidad de isoformas, pero siguen siendo similares a las reportadas por Téllez-Téllez y cols. 2008. Mostrando que hay una mejor actividad enzimática con menor cantidad de isoformas.

Continuando con las discusiones, en la última fermentación, en donde el hongo *P. ostreatus* fue sometido a condiciones de temperatura superior a la óptima (30 °C), la cantidad de proteína se muestra buena, sin embargo, la generación de biomasa es mucho menor a lo reportado en diversos trabajos (Téllez-Téllez y cols. 2005, Téllez-Téllez y cols. 2008, Díaz y cols. 2011). Sin embargo, la actividad enzimática es mucho mayor, de hasta más del 60% en comparación con lo reportado hasta este momento (Téllez-Téllez y cols. 2005, Téllez-Téllez y cols. 2008, Díaz y cols. 2011, Dritsa y Rigas 2006).

Mientras que en la cantidad de isoformas producidas, solo mostro dos bandas de la misma, demostrando que al aumentar la temperatura de incubación, la cantidad de isoformas disminuye, pero la actividad de las enzimas lacasa, se ve incrementada.

En la determinación de biomasa, la mejor temperatura de incubación en donde el hongo presento la mayor biomasa, fue en la de 25 °C, pero como ya se sabe, esta es la temperatura reportada como la óptima en la que este microorganismo tiene su mejor desarrollo y la temperatura en la cual el hongo genero menor biomasa fue en la de 30 °C. Pero, en las demás fermentaciones, el hongo tuvo un buen desarrollo. Esto demuestra que a mayor temperatura la biomasa se ve disminuida, posiblemente porque el hongo debe de mantener una temperatura adecuada en el medio para que este pueda crecer y por lo cual genera un menor número de células. Lo anterior nos muestra que este hongo si crece y genera biomasa bajo diferentes temperaturas y que la generación de biomasa es similar a lo ya reportado hasta este momento (Gricelda y cols. 1998, Karina y cols. 2006).

Además, el crecimiento fue más rápido bajo las condiciones óptimas de desarrollo (25 °C) que en las otras tres pruebas. Observamos que el crecimiento fue mucho más lento en la fermentación a 15 °C, esto se debe a que las bajas temperaturas, retardan el proceso metabólico de *P. ostreatus* afectando dicho crecimiento.

Ahora bien, los datos de pH de las fermentaciones, no se notan diferentes en cada fermentación, esto debido a que el microorganismo modifica el pH del medio según lo necesite para su crecimiento, estabilizándolo en valores de seis para los cuatro casos de esta investigación, esto concuerda con los datos obtenidos por Muhammad y Muhammad en el 2011 y Nora y cols. 2003, donde encontraron que el pH del medio se ajusta de acuerdo a las necesidades del organismo.

La cantidad de proteína producida en cada una de las condiciones a las que fue sometido *P. ostreatus*, fueron diferentes entre sí. La mayor concentración de proteína obtenida fue a 25 °C, la siguiente en presentar los valores más elevados fue la fermentación desarrollada a 30 °C. En donde se encontró la mayor actividad enzimática. Esto demuestra que al variar la temperatura de crecimiento cinco grados por debajo o por encima de la óptima, la cantidad de proteína producida disminuye, pero no de manera significativa. Esto no ocurre al bajar la temperatura diez grados, porque para este caso la producción de proteína disminuye de manera significativa, esto se puede deber a que las variaciones de temperatura pueden retardar la generación de metabolitos y que el hongo consume más energía en mantenerse activo y producir biomasa.

La cantidad de azúcares totales presentes en el medio de cultivo, van disminuyendo con el paso del tiempo, esto se debe a que el hongo va consumiendo la fuente de carbono presente en dicho medio con el paso del tiempo de fermentación y de cómo el hongo va invadiendo el medio y el soporte. Se puede observar que la cantidad de nutrientes se agotan en la fase estacionaria del microorganismo, esto es similar en todas las fermentaciones de este estudio, también, los resultados nos muestran un comportamiento similar entre las cuatro condiciones a las que este fue sometido.

En cuanto a la determinación de isoformas de lacasas, tenemos que, la mayor cantidad de estas las encontramos en la fermentación realizada a 20 °C, con una producción de hasta

cuatro isoformas, tres durante la fase adaptativa y exponencial y cuatro en la fase estacionaria, estos resultados son similares a los obtenidos en trabajos realizados en este mismo laboratorio por Téllez-Téllez y cols. 2008. Pero, aquí encontramos que en esta condición, la actividad enzimática fue la menor. Sin embargo, en donde se obtuvieron la menor cantidad de isoformas, fue en la fermentación realizada a 30 °C, con una producción de solo dos isoformas, pero, bajo estas condiciones fue donde se presentó la mayor actividad enzimática de este trabajo, muy superior a lo obtenido por Snajdr y Baldrian 2007, que también desarrollaron *Pleurotus* en diferentes temperaturas obteniendo muy poca actividad enzimática y por Karina y cols. 2006 que igual desarrollaron cepas de *Pleurotus* a diferentes temperaturas. Con base a esto, podemos decir que al generar una mayor cantidad de isoformas, no determina una mayor actividad enzimática, posiblemente sea porque estas enzimas no tienen una buena actividad catalítica, o que no pueden llevar a cabo el proceso de transferencia de radicales libres lo suficientemente rápido para oxidar el sustrato, de manera contraria, al tener una enzima con una alta eficiencia en la transferencia de radicales libres, se puede llevar a cabo la oxidación del sustrato mucho más rápido y eficiente, aunque solo sea una sola isoforma presente en este ambiente.

La producción de enzimas lacasa, bajo las condiciones descritas en este trabajo, no ha sido reportada, sin embargo, hay estudios en los cuales han desarrollado especies de *Pleurotus* a diferentes temperaturas (Dritsa y Rigas 2006, Karina y cols. 2006, Gricelda y cols. 1998), la diferencia con este trabajo, se basa en el medio de cultivo utilizado y el soporte en el cual se desarrollaron estos organismos, además los resultados obtenidos son muy diferentes (Dritsa y Rigas 2006; 27.81 U/L) a los reportados en este trabajo 62500 U/L, estos resultados son muy superiores a los reportados anteriormente por otros investigadores.

Por otra parte, también se han llevado a cabo diversos estudios en la producción de enzimas lacasa de *P. ostreatus* 83 con la misma constitución del medio de cultivo (Tellez-Tellez y cols. 2008, Díaz y cols. 2011), reportando una actividad enzimática de 2430 U/L, 3200 U/L respectivamente. Además una producción de biomasa máxima (X_{max}) de 4.5 g/L y un crecimiento específico (μ) de 0.033 h⁻¹ y de 5.16 g/L y una μ de 0.025h⁻¹. Se puede observar que los valores en actividad enzimática son mucho mayores en este trabajo (62500 U/L) que en los ya reportados y descritos anteriormente. Los valores de X_{max} y de μ no son muy

diferentes con respecto a este trabajo que fueron de 5.13 g/L y una μ 0.040, demostrando que a diferentes temperaturas de desarrollo, *P. ostreatus* 83 muestra un incremento de actividad de lacasa, específicamente, cuando las temperaturas de desarrollo son mayores a las reportadas como óptimas, no obstante, la biomasa producida y el crecimiento específico del organismo se ve disminuido.

También se han realizado estudios con diferentes inductores de enzimas lacasa, principalmente el CuSO_4 , utilizándolo con diferentes concentraciones, adicionado en diferentes etapas de la fermentación (Gómez-Dorado y cols. 2005, Mei y cols. 2005, Gnanamani y cols. 2006). Encontrando que este es el mejor inductor posible para estas enzimas. De manera similar, en este trabajo se utilizó un medio de cultivo estandarizado para el crecimiento de *Pleurotus* y para la producción de enzimas lacasa, donde ya está incluido CuSO_4 como inductor.

De manera general, podemos decir que para obtener un rápido crecimiento con una generación de biomasa mucho más elevada, el proceso de fermentación que se debería de utilizar sería incubar el hongo a una temperatura de 25 °C. Pero, si lo que se quiere es obtener un mayor número de isoformas, se puede someter este microorganismo a una condición de temperatura de 20 °C. Ahora bien, si lo que se busca es optimizar la actividad enzimática, la temperatura a la que se debe de crecer es a 30 °C.

9. CONCLUSIONES

Por lo anterior podemos concluir, que para la cepa estudiada en este trabajo, las diferentes temperaturas de desarrollo tienen un efecto sobre la producción de enzimas lacasa y que la mejor temperatura es a 30 °C. Asimismo, la mejor producción de isoformas, la presento la fermentación a 20 °C donde se obtuvieron hasta 4 diferentes isoformas. Por lo cual, podemos decir que se podría realizar una producción a nivel industrial de enzimas lacasa con las mejores características catalíticas, tomando en cuenta estos resultados.

10.BIBLIOGRAFÍA

- Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. 1996. Introductory Micology 4^a edicion. Editorial John Wiley and sons. New York. 869 pp.
- Ander P yPettersson B. 1992. Reactions of hemoglobin and peroxidases with lignin-related phenols in the presence of chlorine compounds. In: Kuwahara, M. & Shimada, M. (eds.): Proceedings of the 5th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Kyoto, Japan, May 27-30, 1992, Uni Publishers Co, Tokyo, pp. 345-350.
- Archer DB, Peberdy JF. 1997. The molecular biology of secreted enzyme production by fungi. *Critical Reviews in Biotechnology*. 17(4):273-306.
- Arias ME, Arenas M, Rodríguez J, Soliveri J, Ball AS, Hernández M. 2003. Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Appl Environ Microbiol* (69):1953-1958.
- Azin M, Moravej R, Zareh D. 2007. Production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on a mixture of wheat bran and wheat straw: Optimization of culture condition by Taguchi method. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 801–805.
- Baldrian P. 2006. Fungal laccases–Occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev* (30):215-242.
- Barrios-González J y Mejía A. 1996. Production of secondary metabolites by solid-state fermentation. *Biotechnology Annual Review*. (2), 85-121.
- Battistuzzi GM, Bellei A, Leonardi R, Pierattelli A, De Candia A, Vila M, Sola. 2005. Reduction thermodynamics of the T1 Cu site in plant and fungal laccases. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 10:867-873.
- Baysal E, Peker H, Yalinkilic MK, Temiz A. 2003. Cultivation of oyster mushroom on waste paper with some added supplementary materials. *Bioresource Tech*. 89: 95-97.
- Bermúdez R, Morris H, Donoso C, Fernández Martínez C, Ramos E. 2003. Influencia de la luz en la calidad proteica de *Pleurotus ostreatus* var. Florida. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Disponible en Formato PDF.
- Bertrand G. 1895. Sur la laccase et sur le pouvoir oxydant de cette diastase. *CR Acad. Sci. Paris* 120: 266-269.
- Bonatti M, Karnopp P, Soares HM, Furlan SA. 2004. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. *Food chemistry*. 88: 425-428.
- Brock DT, Madigan TM, 1993. Microbiología. Sexta Edición. Prentice Hall. México: 342-343.
- Chang ST. 1999. World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* (Berk). Sing in China . *International Journal of Medicinal Mushrooms* 1:291-300.
- Chang ST y Miles PG. 2004. Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact. CRC Press. USA.
- Claus H. 2003. Laccases and their ocurrence in prokaryotes. *Archives Microbiology* (179): 145-150.

- Clyde M. 1964. Los hongos y el hombre. Introducción al estudio de los hongos. Editorial Interamericana, S. A. Segunda Edición. México.
- Cohen R, Persky L y Hadar Y. 2002. Biotechnological applications and potential of Wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiol and Biotech.* 8: 37-45.
- Daniel Riglenn y Neal K Van Alfen. 1993. Extra- and Intracellular Laccases of the Chestnut Blight Fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Applied and Environmental Microbiology.* p. 3634-3639.
- Dantán-González E, Vite-Vallejo O y Martínez-Anaya C. 2008. Production of two novel laccase isoforms by a thermotolerant strain of *Pycnoporus sanguineus* isolated from an oil-polluted tropical habitat. *Int Microbiol* (11):163-169.
- Deacon JW. 1993. Introducción a la micología moderna. Editorial Limusa pp. 350 pp.
- Declan M, Soden y Alan D y Dobson W. 2001. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology.* 147, 1755–1763.
- Díaz R, Alonso S, Sánchez C, Tomasini A, Bibbins-Martínez M y Díaz-Godínez G. 2011. Characterization of the growth and laccase activity of strains of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation, *BioRes.* 6(1), 282-290.
- Díaz-Godínez G, Soriano J, Augur C y Viniegra-González G. 2001. Exopectinases Produced by *Aspergillus niger* in Solid-State and Submerged Fermentation: A Comparative Study. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* (26): 271-275.
- Dittmer NT, Suderman RJ, Jiang H, Zhu YC, Gorman MJ, Kramer KJ, Kanost MR. 2004. Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem Mol Biol* (34):29-41.
- Doelle HW, Mitchell DA y Rolz CE. 1992. Solid Substrate Cultivation. Elsevier Sci. Publ. Ltd; London & New York; p 466.
- Dritsa V y Rigas F. 2006 Influence of cultivation temperature on the ligninolytic activity of selected fungal strains. Proceedings of the 5th WSEAS International Conference on Environment, Ecosystems and Development, Venice, Italy, November 20-22, 2006.
- Edens W, Goins T, Dooley D y Henson J. 1999. Purification and characterization of secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (7): 3071-3074.
- Eggert C, LaFayette PR, Temp U, Eriksson K-E y Dean J. 1998. Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied and Microbial Technology* 64 (5): 1766-1772.
- Endo K, Hosono K, Beppu T y Ueda K. 2002. A novel extracytoplasmic phenol oxidase of *Streptomyces*: its possible involvement in the onset of morphogenesis. *Microbiology* 148:1767-1776.
- Eriksson, K.-E, Blanchette RA y Ander P. 1990. Microbial and enzymatic degradation of Wood and wood components. Springer Series in Wood Sciences, Berlin, Springer-Verlag. 407p.

- Escobedo R. (s/f). producción del hongo seta (*Pleurotus ostreatus*). Secretaria de Agricultura, Ganadería Desarrollo rural pesca y Alimentación. México. Disponible en PDF.
- Flinckinger MC y Drew SW. 1999. Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation vol. 1-5. *John Wiley and Sons, inc.* U.S.A. pp. 1545-1551.
- Fujishima F, Uchida K y Yoshino H. 1972. Enzyme production by molds in sponge culture. *Journal of Fermentation Technology*. 50, 724-730.
- Futoshi S, Ichijo N, Yamaguchi H, Nakatsumi H, Ando A, Iijima N, Oguri S, Uehara K y Nagata Y. 2004. Molecular properties of mycelial aggregate specific lectin of *Pleurotus cornucopiae*. *Journal Bioscience and Bioengineering*. 98 (4): 257-262.
- Gaitán R, Salmones D, Pérez R y Mata G. 2006. Manual práctico del cultivo de setas. Aislamiento, siembra y producción. Instituto de Ecología, A.C. Veracruz México. Disponible en PDF.
- Galhaup C, Wagner H, Hinterstoisser B y Haltrech D. 2002. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 529-536.
- García M. 1986. Manual para buscar setas. Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. Tercera Edición. Madrid.
- Gerd Hublik y Franz Schinner. 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.
- Glenn JK, Akileswaran L y Gold MH. 1986. Mn(II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys* 251, 688-696.
- Gnanamania A, Jayaprakashvel M, Arulmani M y Sadulla S. 2006. Effect of inducers and culturing processes on laccase synthesis in *Phanerochaete chrysosporium* NCIM 1197 and the constitutive expression of laccase isozymes. *Enzyme and Microbial Technology* 38: 1017–1021.
- Grönqvist S, Buchert J, Rantanen K, Viikari L y Suurnäkki A. 2003. Activity of laccase on unbleached and bleached thermomechanical pulp. *Enzyme and Microbial Technology* 32: 439–445.
- Guzmán G. 1997. Los nombres de los hongos y lo relacionado con ellos en América Latina. Instituto de Ecología. México, 111,117 p.
- Guzman G, Mata G, Salmones D, Soto-Velazco C y Guzmán-Dávalos L. 1993. El cultivo de los hongos comestibles. Instituto Politecnico Nacional. México. 245 pp.
- Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton BC y Pegler DN. 1995. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. 8th ed. Wallingford, UK: CAB International. 616 p.
- Herrera T y Ulloa M. 1998. El reino de los hongos: Micología básica y aplicada. Fondo de cultura económica-UNAM. Mexico. 552 pp.
- Herrera T y Ulloa M. 1990. El reino de los hongos Micología básica y aplicada. 1 a Ed. , Fondo de Cultura Económica. México.
- Higuchi T. 1989. Mechanisms of lignin degradation by lignin peroxidase and laccase of white-rot fungi. In: Lewis, N.G. & Paice, M.G. (eds.): Plant cell wall

polymers. ACS Symp Ser vol 399, Washington, American Chemical Society, pp. 482-502.

- Höfer C y Schlosser D. 1999. Novel enzymatic oxidation of Mn²⁺ to Mn³⁺ catalyzed by a fungal laccase. *FEBS Lett* 451:186-190.
- Hölker U, Höfer M y Lenz J. 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiol Biotechnol.* (64): 175-186.
- Iimura Y, Katayama Y, Kawai S y Morohoshi N. 1995. Degradation and solubilization of ¹³C-, ¹⁴C-side chain labelled synthetic lignin (dehydrogenative polymerizate) by laccase III of *Coriolus versicolor*. *Biosci Biotech Biochem* 59, 903-905.
- Jecu L. 2000. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. *Industrial crops and Products* 11: 1-5.
- Kirk TK y Farrell RL. 1987. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Ann Rev Microbiol* 41, 465-505.
- Koltin Y, Stamberg J y Lemke PA. 1972. Genetic structure and evolution of the incompatibility factors in higher fungi. *Bacteriological reviews* . 36 (2): 156-171.
- Krishna Prasad K, Venkata Mohan S, Vijaya Bhaskar Y, Ramanaih SV, Lalit Babu V, Pati BR y Sarma PN. 2005. Laccase Production Using *Pleurotus ostreatus* 1804 Immobilized on PUF Cubes in Batch and Packed Bed Reactors: Influence of Culture Conditions. *The Journal of Microbiology.* P.301-307.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*227: 680-685.
- Larraya LM, Peñas MM, Perez G, Santos C, Ritter E, Pisabarro AG y Ramirez L. 1999a. Identification of incompatibility alleles and Characterisation of molecular markers ganatically linked to the A incompatibility locus in the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Curr. Genet.* 34: 486-493.
- Larraya LM, Perez G, Peñas MM, Baars JJP, Mikosch TSP, Pisabarro AG y Ramirez L. 1999b. Molecular karyotype of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and environmental microbiology.* 65 (8): 3413-3417.
- Larroche C y Gros JB. 1989. Strategies for spore production by *Penicillium roquefortii* using solid-state fermentation techniques. *Process Biochemistry.* (24): 97-103.
- Larrondo LF, Salas L, Melo F, Vicuña R y Cullen D. 2003. A novel extracellular multicopper oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* with ferroxidase activity. *Appl Environ Microbiol* 69:6257-6263.
- Leonowicz A, Cho NS, Luterek J y cols. 2001. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J Basic Microbiol* 41:185-227.
- Leonowicz A, Matuszewska A, Luterek J, Ziegenhagen D, Wojtas´-Wasilewska M, Nam-Seok C y Hofrichter M. 1999 Review: Biodegradation of Lignin by White Rot Fungi. *Fungal Genetics and Biology,* 27: 175–185.
- López E. 2002. Hongos comestibles. Orellanas: deliciosa medicina. Visión Chamánica Bogota –Colombia. Disponible en: http://www.visionchamanica.com/alimentacion_sana/Orellanas.htm.
- Lutzoni F y cols. 2004. Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany* 91(10): 1446-1480. 2004.

- Maheshwari R, Bharadwaj G y Bhat KM. 2000. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64(3): 461-488.
- Martínez-Carrera D, Larque A, Aliphath M, Aguilar A, Bonilla M y Martínez W. 2000. La biotecnología de hongos comestibles en la seguridad y soberanía alimentaria de México. II Foro Nacional sobre Seguridad y Soberanía Alimentaria. Academia Mexicana de Ciencias CONACYT, México, D.F. pp. 193-207. ISBN 968-7428-11-2.
- Martins LO, Soares CM, Pereira MM, Teixeira M, Costa T, Jones GH y Henriques AO. 2002. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *J Biol Chem* 277:18849-18859.
- Mayer AM. 1987. Polyphenol oxidases in plants—Recent progress. *Phytochemistry* 26:11-20.
- Mazutti M, Ceni G, Di Luccio M y Treichel H. 2007. Production of inulinase by solid-state fermentation: effect of process parameters on production and preliminary characterization of enzyme preparations. *Bioprocess of Biosystems Engineering* 30: 297–304.
- Mei Guo, Fuping Lu, Lianxiang Du, Jun Pu, Dongqing Bai 2005. Optimization of the expression of a laccase gene from *Trametes versicolor* in *Pichia methanolica*. *Appl Microbiol Biotechnol*. DOI 10.1007/s00253-005-0210-8.
- Mirjana Stajic, Limor Persky, Dana Friesem, Yitzhak Hadar, Solomon P. Wasser, Eviatar Nevo, Jelena Vukojevic. 2006. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme and Microbial Technology*. 38, 65-73.
- Mitchell DA, Berovic M y Krieger N. 2000. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. (68): 65-135.
- Mitchell DA, Berovic M y Krieger N. 2000. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*. (68): 65-135.
- Moda ME, Horii J, Fillet SME. 2005. Edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* production on washed and supplemented sugarcane bagasse. *Sci. Agric.* 62 (2): 127-132.
- Moore-Landecker E. 1996. Fundamentals of the fungi. 4a edicion. Editorial Prentice Hall. USA. 574 pp.
- Morozova OV, Shumakovich GP, Gorbacheva MA, Shleev SV y Yaropolov AI. 2007. "Blue" laccases. *Biochemistry* 72: 1136-1150.
- Muñoz C, Guillén F, Martínez AT y Martínez MJ. 1997. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mg²⁺ oxidation. *Applied and Environmental Microbiology* 63(6): 2166-2174.
- Muñoz C, Guillen F, Martínez AT y Martínez MJ. 1997. Laccase Isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: Characterization, Catalytic Properties, and Participation in Activation of Molecular Oxygen and Mn²⁺ Oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*. p. 2166–2174.

- Muñoz C, Guillen F, Martínez A T y Martínez MJ. 1997. Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Current Microbiology*. 34. pp. 1-5.
- Nora Mouso, Leandro Papinutti y Flavia Forchiassin. 2003. Efecto combinado del cobre y pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de lacasa y manganeso peroxidasa por *Stereum hirsutum* (Willd) Pers. *Rev Iberoam Micol*. 20: 176-178.
- Ooijkaas LP, Weber FJ, Buitelaar RM, Tramper J y Rinzema A. 2000. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Elsevier Science*. (18), pp. 356-360.
- Oriol E, Raimbault M, Roussos S y Viniestra-Gonzales G. 1988. Water and water activity in solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. (27): 498-503.
- Oriol E, Schettino B, Viniestra-Gonzales G y Raimbault M. 1988. Solid state culture of *Aspergillus niger* on support. *Journal of Fermentation Technology*. (66): 57-62.
- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Scaloni A, Capasso A y Sannia G. 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biological Chemistry* 272: 31301-31307.
- Pandey A. 1992. Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. (27): 109-117.
- Pandey A. 1994. Solid-state fermentation: an overview. Wiley, New Delhi India: 3-10.
- Pandey A. 1996. Special Issue on Solid State Fermentation. *Journal of Scientific & Industrial Research*. (55): 311-312.
- Pandey A, Soccol CR, Leo JAR y Nigam P. 2001. Solid-state fermentation in Biotechnology. *Asiatech Publishers, Inc.*, New Delhi. 221.
- Pandey A, Soccol CR y Mitchell DA. 2000. New developments in solid-state fermentation. I. *Bioprocesses and products*. *Process Biochemistry*. (35): 1153-1169.
- Paszczyński A, Huynh, VBy Crawford R. 1986. Comparison of ligninase-1 and peroxidase-M2 from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys* 244: 750-765.
- Pérez MR y Mata G. 2005. Cultivo y selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* y *P. pulmonarius* en viruta de pino: obtención de nuevas cepas y evaluación de su producción. *Revista Mexicana de Micología*. 20: 53-59.
- Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67(5): 577-591.
- Raimbault M. 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronical Journal of Biotechnology*. (1), No. 3.
- Ramírez L, Larraya LM y Pisabarro AG. 2000. Molecular tools for Breeding basidiomycetes. *International microbiology*. 3: 147-152.
- Rodríguez- Couto S y Sanromán A. 2005. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal* 22: 211-219.
- Rodríguez G. 2007. Cultivo de hongos comestibles. *Fruticultura y Diversificación*. N° 52. Disponible en Formato PDF.

- Romero-Gómez SJ, Augur C y Viniegra-González G. 2000. Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnology Letters*. (22): 1255-1258.
- Salmones D, Mata G y Waliszewski KN. 2005. Comparative culturing of *Pleurotus* spp. on coffee pulp and wheat Straw: biomass production and substrate biodegradation. *Bioresource technology*. 96: 537-544.
- Sánchez-Sutil MC, Gómez-Santos N, Moraleda-Muñoz A, Martins LO, Pérez J y Muñoz-Dorado J. 2007. Differential expression of the three multicopper oxidases from *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* 189: 4887-4898.
- Saucedo-Castañeda G, Lonsane BK, Navarro JM, Roussos S y Raimbault M. 1992. Potential of using a simple fermenter for biomass built up, starch hydrolysis and ethanol production: Solid state fermentation system involving *Schwanniomyces castellii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* (36):47-61.
- Shah RA y Madamwar D. 2005. Xylanase production under solid-state fermentation and its characterization by an isolated strain of *Aspergillus foetidus* in India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21(3): 233-243.
- Shashirekha MN, Rajarathnam S y Bano Z. 2002. Enhancement of bioconversión efficiency and chemistry of the mushroom, *Pleurotus sajor-caju* (Berk and Br.) Sacc. Produced on spent rice straw substrate, supplemented with oil seed cakes. *Food Chemistry*. 76: 27-31.
- Snajdr J y Baldrian P. 2007. Temperature Affects the Production, Activity and Stability of Ligninolytic Enzymes in *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor*. *Folia Microbiol*. 52 (5), 498-502.
- Srinivasan C, D'Souza TM, Boominathan K y Reddy CA. 1995. Demonstration of laccase in the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. *Appl Env Microbiol* 61: 4274-4277.
- Tao S, Beihui L, Deming L y Zuohu L. 1997. Effect of elevated temperature on *Trichoderma viride* SL-1 in solid state fermentations. *Biotechnology Letters* 19: 171-174.
- Téllez-Téllez M, Fernández JF, Montiel-González AM, Sánchez C, Díaz-Godínez G. 2008. Growth and lacase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *App Microbiol Biotech*. 81:675-679.
- Thurston CF. 1994. The structure and function of fungal laccase. *Microbiology*. 140. pp. 19-26.
- Tlecuitl-Beristain S. 2005. Purificación y caracterización parcial de una enzima lacasa extracelular de *Pleurotus ostreatus*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala. México.
- Trejo-Hernández MR, Raimbault M, Roussos S y Lonsane BK. 1992. Potential of solid state fermentation for production of ergot alkaloids. *Letters in Applied Microbiology*. (15): 156-159.
- Valencia-del Toro G. 2002. Estudios sobre la expresión del color de los esporóforos de *Pleurotus* spp. por apareamiento de neohaplontes compatibles y progenies monospóricas. Tesis de doctorado. UNAM. México, D. F.
- Valencia-del Toro G, Garín-Aguilar ME, Jiménez-Hernández J y Leal-Lara H. 2003. Producción de cepas coloridas de *Pleurotus* spp. en sustrato estéril y pasteurizado. *Reista Mexicana de Micología*. 17: 1-5.

- Viniegra-González G, Favela-Torres E, Aguilar CN, Romero-Gómez SJ, Díaz-Godínez G y Augur C. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*. 13:157-167.
- Vite-Vallejo O, Palomares LA, Dantán-González E, Ayala-Castro HG, Martínez-Anaya C, Valderrama B y Folch-Mallol J. 2009. The role of N-glycosylation on the enzymatic activity of a *Pycnoporus sanguineus* laccase. *Enzyme and Microbial Technology* 45: 233-239.
- Vogel F y Salmones D. 2000. Análisis comparativo de la productividad de cepas de *Pleurotus* spp. cultivadas en una planta comercial. *Rev. Iberoamericana de Micología*. 17: 138-141.
- William A, Edens Tresa Q, Goins David Dooley y Joan M Henson. 1999. Purification and Characterization of a Secreted Laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Applied and Environmental Microbiology*: p. 3071–3074.
- Yang SQ, Yan QJ, Jiang ZQ, Li LT, Tian HM y Wang YZ. 2006. High-level of xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces thermophila* J18 on wheat straw in solid-state fermentation. *Bioresource Technology* 97 (15): 1794-1800.
- Yoshida H. 1883. Chemistry of Lacquer (Urushi), part 1. *J. Chem. Soc.* 43: 472-486.
- Youn HD, Hah YC y Kang SO. 1995. Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi. *FEMS Microbiol Lett* 132: 183-188.
- Zhang FM, Knapp JS y Tapley KN. 1999, 'Decolourisation of cotton bleaching effluent with wood rotting fungus', *Water Research*, 33(4): pp. 919-928.
- Zhu Y. 1994. A novel solid-state fermentation system using polyurethane foam as carrier. *Biotechnology Letters*. (16): 643-648.
- Zhu Y, Smits JP, Knot W y Bol J. 1994. A novel solid-state fermentation system using polyurethane foam as inert carrier. *Biotechnology Letters*. 16(6): 643-648.



XVII Reunión de Bioenergética y Biomembranas
Huatusco, Veracruz, Noviembre 13-18, 2011



Otorga la presente constancia a:

Gustavo Montalvo Galicia

Por su exposición oral del trabajo titulado:

**Crecimiento de *Pleurotus ostreatus* a temperatura mayor a la óptima
y su producción de lacasas**

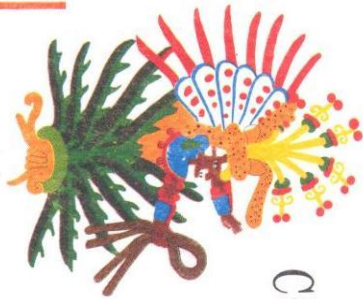
Por:

Gustavo Montalvo Galicia, Rubén Díaz Godínez, Octavio Loera Corral,
Ma. del Carmen Sánchez Hernández, Gerardo Díaz Godínez

Atentamente
El Comité Organizador

Dr. Diego González Halphen

Dr. Salvador Uribe Carvajal



COLEGIO MEXICANO DE INGENIEROS BIOQUÍMICOS, A.C.

EXTIENDE LA PRESENTE

PER53AF/20111228

Constancia

A:

*Gustavo Montalvo Galicial, Arashi Alvarez-Canales, Maura Téllez-Téllez, Carmen Sánchez, Octavio, Coera-Corral,
Rubén Díaz, Gerardo Díaz-Godínez.*

POR SU VALIOSA PARTICIPACIÓN EN LA PRESENTACIÓN ORAL DEL TRABAJO LIBRE

Producción de lacasas de Pleurotus ostreatus desarrollado a temperatura mayor a la óptima.

VII CONGRESO INTERNACIONAL
INTERNATIONAL CONGRESS

XVIII CONGRESO NACIONAL DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA
NATIONAL CONGRESS OF BIOCHEMICAL ENGINEERING

X JORNADAS CIENTÍFICAS DE BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR
BIOMEDICINE AND MOLECULAR BIOTECHNOLOGY SCIENTIFIC MEETING

IXTAPA ZIHUATANEJO,
GUERRERO, MEXICO
28. 29 Y 30 de MARZO 2012

IBQ. R. Alejandro Romero Méxica Guíñérrez

Presidente del C.M.I.B.Q., A.C.

Dra. Elisa Arma Quiñones Ramírez

Presidenta del Comité Científico del Congreso

Men C. Ricardo Monterrubio López

Organizador General del Congreso



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado
Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta



Otorga la presente

CONSTANCIA

A Gustavo Montalvo Galicia
Estudiante Maestría en Ciencias Biológicas, UAT

Por impartir el seminario

"Efecto de la temperatura del crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sólida sobre su actividad de lacasas"

Tlaxcala, Tlax., junio 8 de 2012

Dr. Jorge Rodríguez Antolín
Coordinador General Posgrado en Ciencias Biológicas