



# Universidad Autónoma de Tlaxcala

---

---

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta  
Posgrado en Ciencias Biológicas

**Efecto del Di (2-etilhexil) ftalato sobre el crecimiento  
de *Pleurotus ostreatus* y su producción de enzimas  
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

Biol. José Luis Torres García

**Codirectores:**

Dra. Ma. del Carmen Sánchez Hernández

Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera

**Tutores:**

Dr. Gerardo Díaz Godínez

Dr. Rubén Díaz Godínez





# Universidad Autónoma de Tlaxcala

---

---

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta  
Posgrado en Ciencias Biológicas

**Efecto del Di (2-etilhexil) ftalato sobre el crecimiento  
de *Pleurotus ostreatus* y su producción de enzimas  
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

José Luis Torres García

**Codirectores:**

Dra. Ma. del Carmen Sánchez Hernández

Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera

**Tutores:**

Dr. Gerardo Díaz Godínez

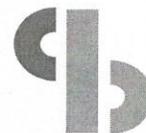
Dr. Rubén Díaz Godínez

## **FINANCIAMIENTO**

El presente estudio fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, mediante la beca No. **343161** otorgada a JLTG por parte de Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, considerando que la Maestría en Ciencias Biológicas pertenece al Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC).



Universidad Autónoma de Tlaxcala  
Secretaría Investigación Científica y de Posgrado



POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

Maestría en Ciencias Biológicas

COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
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 José Luis Torres García 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 Cuyo proyecto se titula “Efecto del di(2-etilhexil) ftalato sobre el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* y su producción de lacasa”.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
TLAXCALA, TLAX., AGOSTO 13 DE 2015

DR. ANGEL ISMAEL MELO SALZAR

DR. GERARDO DÍAZ GODÍNEZ

DR. FRANCISCO CASTELÁN

DRA. LETICIA NICOLAS TOLEDO

DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO



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



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070 Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: [posgradoctbcuat@gmail.com](mailto:posgradoctbcuat@gmail.com)  
Tlaxcala, Tlax.

## **Agradecimientos**

Al Posgrado del **Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta**, de la UATx, por ser mi casa durante algunos años, por ser esa estrategia de conocimiento, y sobre todo, por brindarme siempre su apoyo, por eso y más GRACIAS.

Al **CONACyT**, por brindarme la oportunidad de obtener la beca No. **343161** y así poder concluir mis estudios de posgrado.

## *José Luis Torres García*

Cuando estas sólo y crees que nadie te ve o escucha, considera que existen cientos de personas que no pueden ver ni escuchar, Si tu luz de repente falla y el aire parece faltar, recuerda que existen personas que nunca ha visto un atardecer y los rayos del sol ocultarse en una tarde maravillosa, Si te detienen y no te abren una puerta, recuerda que tus pies conocen la salida como supieron por dónde entrar, Si tus pasos encuentran su ritmo tus pensamientos podrán volar más alto. Son los pies en el suelo firme los que comienzan todo salto, así como existe sólo el 1 % del conocimiento de los microorganismos que viven en el suelo, o que es el soporte que da vida, o mejor aún, de donde surge ese olor cuando caen las primeras gotas de lluvia sobre él. Oye! Considera que a veces tropezaras, y la noche llegara por anticipado, Levántate y quédate en pie, la voluntad tiene piernas más largas que el miedo, Deja que los demás te critiquen, que formulen sus hipótesis ante tu persona, teoríen, difundan tus fracasos, y se horroricen con tu persona, al final de cuentas, Ya eres importante por eso de que hablen, Todo lo que necesitas hacer es: Ser tú, como seas, simplemente créelo.

Y después de dar una vuelta en mi cabeza!

*¿Quién soy yo?  
Yo soy las manos de mi abuelo.  
Soy las lágrimas de mi madre.  
La fuerza de mi padre.  
Las bromas de mis hermanas.  
Soy el amor de quien me ha amado  
Y la disciplina de mis maestros.  
Soy la inspiración de muchos para seguir caminando  
Y la gente que aplaudió mis éxitos.  
Soy los consejos de cien hombres.  
No soy sólo yo.  
Soy la suma de todos.  
El orgulloso resultado del trabajo de otros.  
Aquéllos que han tocado mi vida, de tantas maneras.  
Llegó el momento. Es tiempo de dar.  
(Buchanan's Share your self)*

## Agradecimientos

Al Posgrado del **Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta**, de la UATx, por ser mí casa durante algunos años, por ser esa estrategia de conocimiento, y sobre todo, por brindarme siempre su apoyo, por eso y más GRACIAS.

Al **CONACyT**, por brindarme la oportunidad de obtener la beca No. **343161** y así poder concluir mis estudios de posgrado.

A la **Dra. Ma. del Carmen Sánchez Hernández**, por aceptarme en su grupo de investigación y sobre todo por generarme esa forma de vida como investigador. Por esas tardes de ciencia, por esas noches de escritura, por las carcajadas mientras comíamos capulines, por TODO y TODO, desde el fondo de mi corazón mil Gracias.

Al **Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera**, por ser parte de mi formación, por la paciencia y aportes tan atinados en este trabajo, por su siempre tan dispuesto apoyo, una verdadera forma de ser en la investigación, Gracias!

Al **Dr. Gerardo Díaz Godínez**, por inspirarme a hacer investigación, por todos sus comentarios tan oportunos y sobre todo por ser un maravilloso profesor.

Al **Dr. Rubén Díaz Godínez**, por enseñarme la disciplina en el trabajo de la investigación, la constancia en el trabajo y por esos sabios consejos que me servirán en toda mi vida.

A la **Dra. Maura Téllez Téllez**, por ser pieza inicial en este trabajo, por sus consejos y tan atinadas observaciones.

A mis sinodales, El **Dr. Francisco Castelan**, la **Dra. Estela Cuevas**, la **Dra. Leticia Nicolás**, el **Dr. Ángel Melo**, por apoyarme en esta etapa final de mi formación, por sus tan atinados comentarios y sus tan acertadas correcciones, gracias!

## Dedicatoria

**ADIOS** por brindarme la oportunidad de seguir viviendo,  
Por darme la extraordinaria familia que tengo,  
Y por darme esa paz en mi corazón cuando más la necesito.

A mi Ángel, que donde quiera que este,  
siempre me está cuidando,  
el motor de mi vida y la ilusión de volver a estar juntos,  
a ti mí siempre tan querido **Derek Yael Torres García**. †

A mis padres, el **Sr. Toribio Torres Hernández** y la **Sra. Ma. del Carmen García Ramírez**, la persona quien me dio la vida, mi conciencia, mi razón de ser y vivir, a la mujer más noble que haya conocido, a ti madre, mi corazón que siempre late aún lado de mí. A los dos que tan atinadamente son mis padres.

A mis hermanas **Beatriz e Isabel Torres García**,  
mi fuerza y mi motor de vida, el ejemplo más honesto de mi vida y las mujeres más esenciales de ella,  
a mi sobrino **Emir Ramírez Torres**,  
la nueva luz en mi vida,  
la alegría desinteresada  
y la parte de mi corazón que late con fuerza.

En Memoria de mi amiga **Yajahira Erzeleid Alvarado Aguilar**, por ser mi compañera de la licenciatura e indirectamente involucrada en este proceso de mi formación, a ti mi querida amiga, donde quiera que estés te dedico este triunfo.

## Agradecimientos a Título personal

A mi segunda familia, mi amiga **Miriam Ahuactzin Pérez**, por ser parte de mi vida, por llegarme siempre al corazón y enseñarme un estilo de vida diferente, por estar siempre en los momentos más difíciles de mi vida, por ser mi ejemplo a seguir, el orgullo más grande de mi formación, por dejar de ser mi amiga y convertirte en mi hermana. A tí mi querido amigo **Carlos Eliud Guerrero Carro**, por ser el hermano que siempre hubiese querido tener, por toda tu confianza y porque siempre crees en mí. A mi sobrino **Carlitos**, la alegría de mis momentos de vida, por tu cariño tan desinteresado y por hacerme sentir parte de tu vida. A la **Mtra Pilar Carro Abdala**, por convertirse en mi segunda madre y siempre cuidar de mí. Por todo y todo mil gracias.

A mis padrinos el **Sr. Jaime Ahuactzin** y la **Sra. Miriam Pérez**, por apoyarme siempre y permitirme ser parte de su familia, y enseñarme que la vida es tan maravillosa de mil maneras.

A mis profesores el **QI. Alberto de Jesús Ortíz Zamora** y la **QI. Georgina Pérez Montiel**, por permitirme ser parte de su vida personal y profesional, por apoyarme cuando más lo he necesitado y por brindarme la confianza de ser parte de sus vidas.

A mis fieles y sinceros amigos, Diana Paola García Villegas, Itzel Ortíz Pérez, Adriana Madrid, Rubí Aguilar, Angel González Márquez, Gabriela Córdoba Sosa, Binicio Ramírez Mendoza y a mi profesor de danza Lic. Fernando Palma Morales, a mis amigos Juan Carlos Esquino, Jarim Saavedra, Ramiro Lima, Geomar Báez, Daniela Munoz y a mi amigo Daniel Montiel, porque de alguna manera han influido en mi formación como persona y como profesionista, por permitirme estar siempre ahí en ese lugar de su corazón, Mil Gracias.

A mis profesores, el Dr. Arturo Estrada Torres, la Dra. Alba Mónica Montiel, la Dra. Dora Luz, y al Dr. Martín Serrano, por todos sus conocimientos y consejos que me permitieron llegar al día de hoy.

## RESUMEN

Los ftalatos son diésteres aromáticos derivados del ácido *o*-ftálico o del ácido *t*-ftálico, ampliamente utilizados como plastificantes. El di (2-etilhexil) ftalato (DEHF) se ha utilizado durante más de 70 años como aditivo en muchos productos, como plásticos, pinturas y tintas, o como disolvente en formulaciones industriales, sin embargo, estos compuestos pueden ser eliminados del ambiente gracias al sistema metabólico de algunos microorganismos como bacterias y hongos, capaces de utilizarlos como fuente de carbono y energía. El hongo ligninocelulolítico *Pleurotus ostreatus*, presenta un sistema enzimático único y no específico extracelular siendo las enzimas lacasas las principales enzimas encargadas de la degradación de la lignina y otros compuestos orgánicos estructuralmente relacionados con los ester de ftalato. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del DEHF sobre el crecimiento de *P. ostreatus* y su producción de enzimas lacasas crecido en medio líquido. Se utilizó la cepa *P. ostreatus* 50 (del cepario del COLPOS, Puebla). Se prepararon tres medios de cultivo, 1) Medio sin adición de ftalato (MSAF), 2) MSAF + 500 mg de DEHF/L y 3) MSAF + 1000 mg de DEHF/L. El pH se ajustó a 6.5 usando NaOH 1M. Para las fermentaciones líquidas se emplearon matraces de 125 ml conteniendo 50 ml de cada medio de cultivo y se inocularon con 3 fragmentos de micelio de 10 mm de diámetro, se incubaron a 28 °C durante 23 d a 120 rpm. La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y la biomasa máxima obtenida ( $X_{\max}$ ) fueron calculadas empleando la ecuación logística. La actividad enzimática de lacasas fue evaluada utilizando 2,6 dimetoxifenol (DMP) como sustrato y se leyó a una absorbancia de 460 nm. 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). De igual manera se calculó el rendimiento de la biomasa con respecto al sustrato ( $Y_{X/S}$ ) empleando la  $X_{\max}$  y la concentración de la fuente de C<sub>2</sub>. Se calculó la productividad en el pico máximo de actividad (PRO=  $E_{\max}$ / tiempo de fermentación), además de la tasa específica de formación de la enzima ( $qp=\mu Y_{E/X}$ ). El perfil zimográfico fue determinado empleando la técnica de electroforesis con agar de poliacrilamida, incubando los geles a 25 °C con DMP 2mM como sustrato. La  $X_{\max}$  obtenida en el medio conteniendo 1000 mg de DEHF/L fue de 7.6 g/L y una  $\mu$  de 0.019 h<sup>-1</sup> significativamente mayores en comparación con los otros medios de cultivo, al igual que el ( $Y_{X/S}$ ) el mayor valor fue obtenido en el medio de 1000 mg de DEHF/L. El consumo de glucosa se dio en un 100 % en todos los medios de cultivo, sin embargo, en el medio de 1000 mg de DEHF/L, el consumo

fue a menor velocidad que en los otros medios. Con respecto al perfil de pH, se observa en los medios conteniendo DEHF que disminuye consecuentemente obteniendo pH cerca de 4.5 y 4. El Con respecto a la producción de lacasas, la máxima obtenida, fue de 8973 U/L y 7962 U/L en el medio conteniendo 1000 y 500 mg de DEHF/L respectivamente. Con respecto a la  $E_{max}$ ,  $Y_{E/X}$ ,  $P_{RO}$  y la  $q_p$  se mostrarón los mayores valores en el medio conteniendo 1000 mg de DEHF/L, siendo significativamente diferente a los medios conteniendo 500 mg de DEHF/L y al MSAF. Se mostró un efecto del DEHF sobre la los perfiles zimográficos de lacasas, observándose por lo menos 3 isoformas distintas de lacasas al aumentar la concentración de este compuesto. Estos resultados sugieren que la presencia del DEHF muestra un efecto directo sobre la producción de la biomasa y que los anillos aromáticos en su estructura son un inductor de la enzima por lo cual se obtienen valores de actividad enzimática y producción de isoformas de lacassa mediado por la inducción que se da en estas debido a la presencia de los anillos aromáticos del DEHF.

# Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1. Ftalatos.....	7
1.2. Biodegradación de ftalatos.....	8
1.2.3. Biodegradación de esteres de ftalato por hongos .....	12
1.3. Di (2-etilhexil) ftalato .....	14
1.4. Hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	15
1.4.1. Ciclo de vida de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	17
1.4.2 Sistema enzimático de <i>P. ostreatus</i> .....	18
1.5. Enzimas lacasas .....	20
1.5.1. Mecanismo de reacción de lacasas .....	21
1.5.3. Papel fisiológico de las enzimas lacasas.....	26
1.6. Electroforesis en agar de poliacrilamida.....	28
2. ANTECEDENTES .....	29
3. JUSTIFICACIÓN.....	33
4. HIPÓTESIS .....	34
5. OBJETIVO GENERAL .....	34
Objetivos particulares .....	34
6. METODOLOGÍA.....	34
6.1. Preparación de inóculo y condiciones de cultivo .....	34
6.2. Preparación de medios de cultivo.....	35
6.3. Condiciones del cultivo de <i>P. ostreatus</i> en medio líquido .....	35
6.4. Obtención del extracto enzimático y evaluación de la biomasa .....	35
6.4. Perfiles de pH.....	36
6.5. Actividad enzimática de lacasas .....	36
6.6. Patrón zimográfico de lacasas.....	36
6.7. Determinación del consumo de glucosa .....	37
7. RESULTADOS .....	37
7.1. Velocidad específica de crecimiento de <i>P. ostreatus</i> crecido sobre DEHF en medio líquido.....	37
7.2. Perfiles de pH de <i>P. ostreatus</i> crecido sobre DEHF en medio líquido.....	38

7.3. Actividad enzimática de lacasas de <i>P. ostreatus</i> crecido sobre DEHF en medio líquido.....	39
7.4. Perfil zimográfico de lacasas de <i>P. ostreatus</i> crecido sobre DEHF en medio líquido.....	42
7.5. Consumo de glucosa por <i>P. ostreatus</i> crecido sobre DEHF en medio líquido.....	44
7.6. Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>P. ostreatus</i> crecido sobre DEHF en medio líquido.....	44
7.7. Parámetros cinéticos de producción de lacasas de <i>P. ostreatus</i> crecidos sobre DEHF en medio líquido.....	45
8. DISCUSIÓN.....	46
9. CONCLUSIÓN.....	49
10. PERSPECTIVAS.....	50
11. REFERENCIAS.....	51

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los ftalatos de acuerdo a la magnitud de su uso.....	7
Tabla. 2. Principales enzimas producidas por <i>P. ostreatus</i> crecido en diferente sistema de fermentación y utilizando diversos sustratos.....	19
Tabla 3. Usos industriales de las enzimas lacasas.....	26
Tabla 4. Principales microorganismos productores de lacasas y su función fisiológica.....	27
Tabla 5. Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>P. ostreatus</i> crecidos sobre DEHF en medio líquido.....	46
Tabla 6. Parámetros cinéticos de producción de lacasas de <i>P. ostreatus</i> crecido sobre DEHF en medio líquido.....	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Biodegradación aeróbica y anaeróbica de ésteres de ftalato de cadena larga.....	11
Fig. 2. Fases de crecimiento de un hongo basidiomiceto y proceso de invasión y degradación del sustrato.....	17
Fig. 3. Ciclo de vida heterotálico de <i>P. ostreatus</i> .....	18
Fig. 4. Estructura terciaria de la enzima lacasa.....	21
Fig. 5. Ciclo catalítico de lacasas mostrando el mecanismo de reducción y oxidación de los sitios de cobre.....	23
Fig. 6. Ciclo redox de una lacasa catalizada mediante el sistema.....	24
Fig. 7. Curva de crecimiento de <i>P. ostreatus</i> crecido en medio sin adición de ftalato (MSAF) ( $\diamond$ ), 500 ( $\square$ ) y 1000 (x) mg de DEHF/L en fermentación líquida.....	38
Fig. 8. Perfil de pH de <i>P. ostreatus</i> crecido en (MSAF) ( $\diamond$ ), 500 ( $\square$ ) y 1000 (x) mg de DEHF/L en medio líquido.....	39
Fig. 9. Actividad enzimática de lacasas de <i>P. ostreatus</i> crecido en MSAF en medio líquido...40	
Fig. 10 Actividad enzimática de lacasas de <i>P. ostreatus</i> crecido en 500 mg de DEHF/L en medio líquido.....	41

Fig. 11. Actividad enzimática de lacasas de <i>P. ostreatus</i> crecido en 1000 mg de DEHF/L en medio líquido.....	41
Fig. 12. Perfil zimográfico de lacasas de <i>P. ostreatus</i> crecido en MSAF en medio líquido.....	42
Fig. 13. Perfil zimográfico de lacasas de <i>P. ostreatus</i> crecido en 500 mg de DEHF/L en medio líquido.....	43
Fig. 14. Perfil zimográfico de lacasas de <i>P. ostreatus</i> crecido en 500 mg de DEHF/L en medio líquido.....	43
Fig. 15. Azúcares reductores de los cultivos de <i>P. ostreatus</i> crecido en (MSAF) (◇), 500 (□) y 1000 (x) mg de DEHF/L en medio líquido.....	44

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Ftalatos

Los ftalatos son diésteres aromáticos derivados del ácido *orto*-ftálico o del ácido *tere*-ftálico, ampliamente utilizados como plastificantes (Liang y cols. 2008). Presentan dos cadenas laterales, generalmente alifáticas lineales; aunque también pueden presentar grupos alifáticos ramificados, cicloalifáticos o aromáticos. Estos compuestos fueron sintetizados por primera vez en la década de 1920; no obstante, su venta a gran escala se dio hasta 1950 con la aparición de la industria del cloruro de polivinilo (PVC) por sus siglas en inglés (Keml 2000). De acuerdo al uso, los ftalatos se han clasificado en diferentes grupos (Tabla 1). Entre ellos, el di (2-etilhexil) ftalato (DEHF) es el más usado, ya que su producción oscila alrededor de cerca de 18 millones de toneladas cada año a nivel mundial (Koch y cols. 2003). Además, es el compuesto ampliamente más utilizado en Europa y USA, por ser el más económico y por la fácil adaptabilidad al producto final, seguido por el Di-isononil ftalato (DINF) y Di-isodecil ftalato (DIDF) y posteriormente por los ftalatos especiales que tienen un mercado más restringido ([www.ecpi.org/upload/documents](http://www.ecpi.org/upload/documents)).

Tabla 1. Clasificación de los ftalatos de acuerdo a la magnitud de su uso ([www.ecpi.org/upload/documents](http://www.ecpi.org/upload/documents))

Grupo	Compuesto
DEHF	Di (2-etilhexil) ftalato, conocido como Di-octil ftalato
DINF y DIDF	Di (isononil) ftalato Di (isodecil) ftalato
Ftalatos especiales de menor pesos molecular	Di butil ftalato (DBF) Di isobutil ftalato (DIBF) Di isopentil ftalato (DIPF) Di isooctil ftalato (DIOF) Di isoundecil ftalato (DIUF) Di isotridecil ftalato (DITDF) Butilbenzil ftalato (BBzF) Otros ftalatos lineales y similares

Los ftalatos entran al ambiente principalmente a través de la disposición en rellenos sanitarios de residuos municipales e industriales de donde son liberados; sin embargo, también pueden liberarse durante la quema de productos plásticos ([www.epa.gov/air/noise.html](http://www.epa.gov/air/noise.html)). Una pequeña fracción de estos compuestos se volatiliza a la atmósfera, donde pueden sufrir reacciones fotoquímicas con radicales hidroxilo (Hazardous Substance Data Bank 1994), o dispersarse a sitios lejanos, tanto en la fracción gaseosa como en forma de partículas y posteriormente reingresar a la tierra por deposición seca o húmeda (Eisenreich y cols. 1981). Asimismo, estos compuestos pueden llegar a los cuerpos de agua y al océano a través de las descargas de aguas residuales de la industria que manufactura y procesa plásticos, así como de los efluentes de las plantas de tratamiento de agua.

## **1.2. Biodegradación de ftalatos**

Diferentes estudios han demostrado que los ftalatos de cadenas cortas como dimetil ftalato (DMF), dietil ftalato (DEF), DBF, difenil ftalato (DFF), dipropil ftalato (DPrF) y BBzF pueden ser rápidamente biodegradados y mineralizados (Chang y cols. 2004). Por otro lado, los ftalatos con una cadena carbonada extensa como el dioctil ftalato (DOF) o DEHF son menos susceptibles a la biodegradación (Liang y cols. 2008; Wang y cols. 2000; Chang y cols. 2004). La diferencia en la biodegradación se debe tanto al efecto estérico de las cadenas laterales de los ftalatos, lo que dificulta que la unión de las enzimas hidrolíticas a las cadenas esté inhibiendo la hidrólisis de estos compuestos. En contraste, las ramificaciones de las cadenas carbonadas no son un factor limitante en la degradación de ftalatos. Diferentes isómeros de ftalatos muestran diferentes tasas de biodegradación, y las enzimas hidrolíticas de ftalatos son estructuralmente específicas. La enzima dimetil isoftalato deshidrogenasa purificada de *Rhodococcus erythropolis* hidroliza rápidamente dimetil isoftalato (DMI) y DMF mientras que apenas hidroliza el dimetil tereftalato (DMTF) (Gu y cols. 2005; Liang y cols. 2008). Las rutas metabólicas de los ésteres de ftalatos por microorganismos son consideradas importantes en la biodegradación de estos contaminantes. Diversos estudios en degradación de ftalatos mencionan algunas características importantes para que dicha biotransformación se lleve a cabo. Staples y cols. (1997) mencionan que la biodegradación de los esteres de ftalato se lleva a cabo a mayor velocidad en condiciones aerobias contrario a condiciones anaerobias

o anoxigénicas en el ambiente. Esta degradación se da eficientemente al 100% en los ésteres de ftalato de cadenas cortas y menos en los de cadena larga (Staples y cols. 1997; Yuan y cols. 2002).

La biodegradación primaria de ftalatos se expresa en parámetros cinéticos de primer orden (Gavala y cols. 2003) y a mayor concentración de compuesto o en alguno de sus metabolitos como resultado de la biodegradación inhiben dicha acción. En primer orden la ruta de biodegradación consiste en la biodegradación de ftalatos de cadena larga (diésteres de ftalato (DsF) en monoésteres de ftalato (MsF) por la enzima dialkil esterasa (Fig. 1a), después a ácido tereftálico (AT) por la enzima ácido tereftalato deshidrogenasa, finalizando en CO<sub>2</sub> y/o CH<sub>4</sub> (Staples y cols. 1997). Este proceso consiste en diferentes etapas de transformación química; (1) Desterificación o dealquilación, (2)  $\beta$ -oxidación, removiendo un grupo etilo en condiciones anaerobias y (3) *trans*-esterificación o demetilación en condiciones aerobias. El DEF puede ser degradado añadiendo un grupo etilo y un metilo a la cadena carbonada, produciendo etilmetil ftalato y DMF, este proceso es una *trans*-esterificación (Cartwright y cols. 2000) donde el monoéster de ftalato DMF puede ser metabolizado en ácido ftálico (AF) o continuar siendo degradado en monometil ftalato (MMF) terminando en 2-hidroxi-3-[oxi(metoxicarbonil)] y ácido benzoico 4-hidroxi-3[oxi(metoxicarbonilo)]. Debido a la transformación de los DsF a MsF prosigue la transformación de MsF en AF por la enzima monoalquil esterasa (Fig. 1b). Una vez transformados los MsF a AF (unidad química estructural) e intermediario central en la biodegradación de ftalatos e hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) prosigue la segunda etapa, donde se forma una escisión en el anillo del AF y esta condición se presenta bajo un sistema aerobio o anaerobio (Fig. 1c) (Cartwright y cols. 2000). Bajo condiciones aerobias el AF se degrada siguiendo dos rutas de catálisis por enzimas deshidrogenasas, formando el intermediario más común, el protocatehuato (Fig. 1d) (Eaton y Ribbons 1982; Nomura y cols. 1992). Por bacterias Gram (-) el AF se convierte en *cis*-4,5-dihidro-4,5-dihidroxi ftalato por acción de la enzima AF-4,5-dioxigenasa (Fig. 1e) el cual es oxidado por un NAD dependiente de deshidrogenasa a 4,5-dihidroxi ftalato por la enzima *cis*-4,5-dihidro-4,5-dihidroxi ftalato deshidrogenasa (Fig. 1f) (Eaton y Ribbons 1982; Nomura y cols. 1992). Mientras que por bacterias Gram (+) el AF se convierte en *cis*-3,4-dihidro-3,4-dihidroxi ftalato actuando esta ocasión la enzima AF-3,4-dioxigenasa (Fig. 1g) y de igual manera a la oxidación inmediatamente anterior del *cis*-3,4-dihidro-3,4-dihidroxi ftalato es oxidado en 3,4-

dihidroxi ftalato en esta ocasión por la enzima *cis*-3,4-dihidro-3,4-dihidroxitfalato deshidrogenasa (Fig. 1h) (Eaton y Ribbons 1982; Nomura y cols. 1992). Continuando con la ruta de degradación el 4,5-dihidroxi ftalato y el 3,4-dihidroxi ftalato son degradados a protocatehuato (3,4-Dihidroxi benzoato) por las enzimas 4,5-dihidroxitfalato descarboxilasa y 3,4-dihidroxitfalato descarboxilasa (Fig. 1i,j) respectivamente (Eaton y Ribbons 1982). El protocatehuato es metabolizado a través de la escisión *ortho* o *meta* del anillo por acción enzimática, cuando ocurre la escisión *meta*, el protocatehuato se reduce por acción de la enzima 3,4-protocatehuato dioxigenasa a 4-carboxy-2-hidroxi- $\mu$ -ciclohexano semialdehído (Fig. 1k). Cuando la escisión es de tipo *orto*, el protocatehuato se convierte en 3-ketoadipato por acción de la enzima 4,5-protocatehuato dioxigenasa, terminando en oxalacetato que mediante a la unión de ácido pirúvico condensado participan en el ciclo de los ácidos tricarbónicos (Ciclo de Krebs) (Fig. 1l) (Dennis y cols. 1973). El AT es utilizado por algunas bacterias aeróbicas como fuente de carbono (Keyser y cols. 1976), la degradación de este isómero de ftalato es diferente a la del AF bajo condiciones aeróbicas, el AT es transformado en dihidroxi-3,5-ciclohexano-1,4-ácido dicarbónico por la enzima tereftalato 1,2-dioxigenasa (Fig. 1m) y bajo condiciones anaerobias es convertido vía ácido benzoico a 4-hidroxi-3,5-ciclohexano-1,4-ácido dicarbónico para ser convertido en cetociclohexano y así posteriormente pueda introducirse en la  $\beta$ -oxidación como etapa final (Fig. 1n) o si bien el ácido benzoico puede ser oxidado en acetato, H<sub>2</sub>O y CO<sub>2</sub> finalizando con la estructura ftálica (Benjamin y cols. 2015).

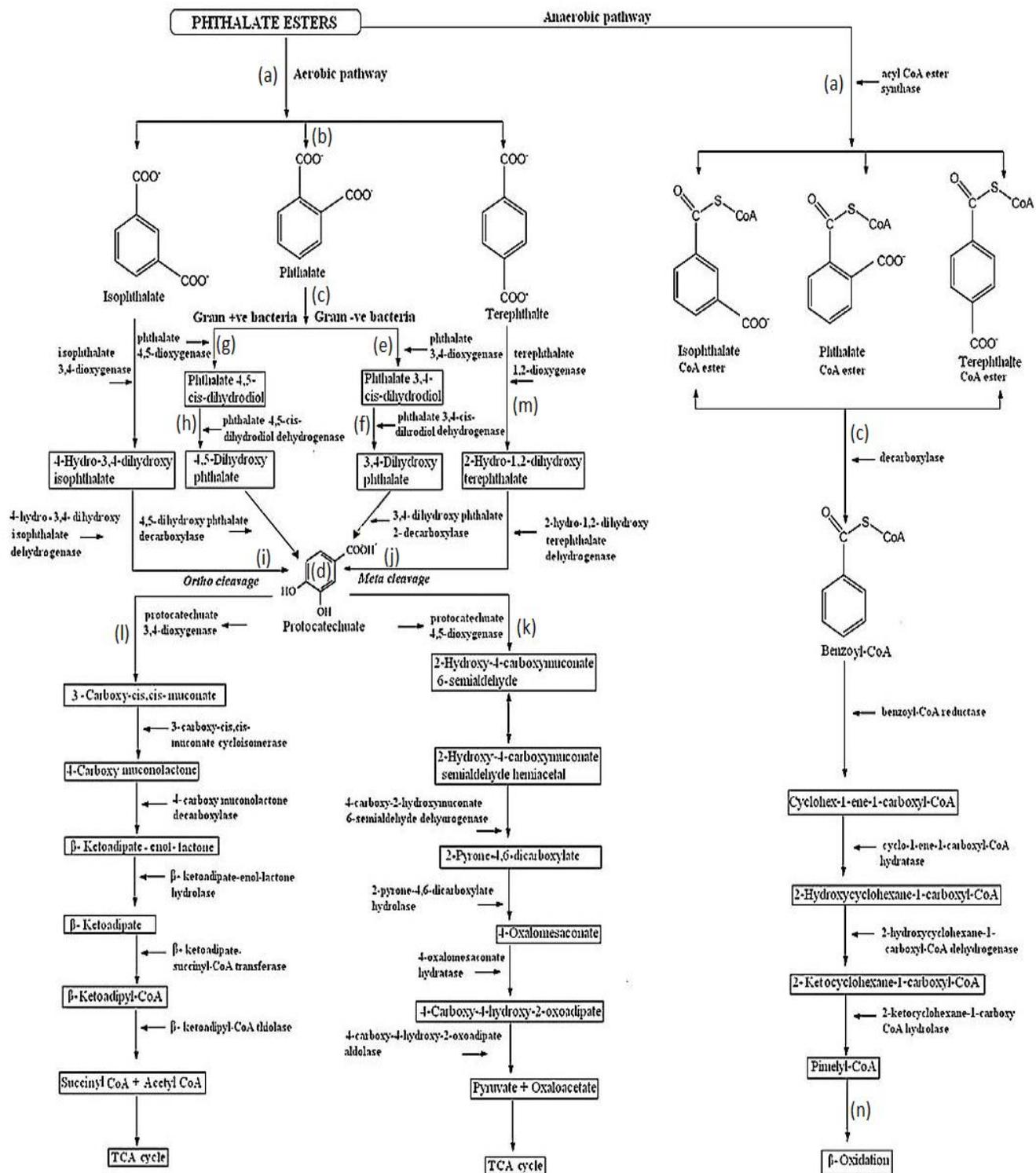


Fig. 1 Biodegradación aeróbica y anaeróbica de ésteres de ftalato de cadena larga (modificada de Benjamin y cols. 2015).

### 1.2.3. Biodegradación de ésteres de ftalato por hongos

Otra forma de observar la biodegradación de ftalatos es utilizando hongos filamentosos. Se ha estudiado el crecimiento de hongos filamentosos en medio de cultivo extracto de malta-glucosa (YMG) adicionado con 100 mg/L de diferentes ftalatos (DEF, DMF y BBF). En este medio de cultivo, el DMF fue removido completamente por el hongo *Pleurotus ostreatus* en 8 días. Los hongos *Irpex lacteus* y *Trametes versicolor* MrP13 también removieron el 100% de DMF en 10 días. En la biodegradación de DEF, la mayoría de los hongos presentan una tasa baja de degradación comparándola con la de DMF. Sin embargo, *P. ostreatus* remueve completamente el DEF dentro de los 8 días como el DMF. BBF fue degradado más rápidamente que DMF y DEF. *P. ostreatus* mostró la mayor tasa de degradación para los tres ftalatos antes mencionados entre los diferentes hongos estudiados (Zeng y cols. 2004; Hwang y cols. 2008). También se ha observado que el hongo *P. ostreatus* es capaz de degradar completamente los 100 mg/L de BBF en el medio enriquecido YMG dentro de las primeras 24 horas de incubación en comparación con un medio mínimo en el cual solo llega a degradar el 35% de este ftalato. De manera similar, se han observado bajos niveles de degradación de BBF (30%) por otro hongo de pudrición blanca, *Phlebia tremellosa*, en un medio mínimo sin adición extra de fuente de carbono. Además, el pH del medio de cultivo tiene un efecto significativo en el crecimiento fúngico y en la actividad de las enzimas degradadoras de BBF. El pH del medio después de la adición de este ftalato se puede deber a la formación subsecuente de los metabolitos intermediarios de la degradación de BBF. En la biodegradación de este ftalato, el ácido ftálico se produce como el principal metabolito por lo que el pH del medio cambia. También se ha observado que la biomasa producida en el medio YMG conteniendo BBF es mayor que en aquel que no contiene ftalato, sugiriendo que *P. ostreatus* utiliza el ftalato como fuente de carbono (Xu y cols. 2005; Yeo y cols. 2008; Chang y cols. 2007; Chatterje y cols. 2008; Hwang y cols. 2012). El hongo *P. ostreatus* es capaz de formar pellets densos esféricos comparados con las otras cepas de hongos, y esto se puede deber a las hidrofobinas. Éstas son proteínas de bajo peso molecular, producidas por hongos filamentosos que le confieren la hidrofobicidad a la estructura fúngica. Estas proteínas hacen más densos los pellets en un medio de cultivo acuoso y adsorber lo ftalatos hidrofóbicos más fácilmente, lo cual ayuda en la degradación de los ftalatos por *P. ostreatus*. Éste hongo tiene la

factibilidad de aplicarlo en el tratamiento de residuos contaminados con ftalatos y en la bioremediación de sitios contaminados con los mismos (Kim y Song 2000; Linder y cols. 2005; Hwang y cols. 2012). Existen enzimas que están implicadas en la biodegradación de ftalatos. Comparando con la enzima esterasa purificada de *Candida cylindracea*, la enzima cutinasa de *Fusarium oxysporum* mostró una actividad mayor en la hidrólisis de DEHF. La tasa de degradación de este ftalato muy notablemente mayor con la cutinasa fúngica. También se ha reportado que esta enzima es capaz de degradar también BBF (Kim y cols. 2002), DBF (Kim y Lee 2005), DFF (Kim y cols. 2005), DPF (dipentil ftalato) (Ahn y cols. 2006) y dihexil ftalato (DHF) (Kim y cols. 2005) de una manera eficiente (Kim y cols. 2002) y la enzima cutinasa parece ser una excelente degradadora de ftalatos. En la degradación de DEHF y BBF por esta enzima, produce el metabolito no tóxicos 1,3-isobencenofurandiona (IBF) como producto mayoritario. En estudios de toxicidad, utilizando la bacteria, se ha observado que el IBF no resultó tóxico para la bacteria a diferencia de los productos obtenidos con la enzima esterasa de levadura. Estos metabolitos provocan en la bacteria estrés celular por compuestos oxidativos como especies reactivas de oxígeno las cuales pueden dañar moléculas como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y membranas (Kim y cols. 2002). El efecto de DBF fue observado en el crecimiento micelial de del hongo *Polyporus brumalis* a tres diferentes concentraciones (250, 750 y 1250  $\mu\text{M}$ ). En general, el crecimiento del hongo disminuyó conforme aumentaba la concentración de DBF. En el medio de cultivo de 250  $\mu\text{M}$ /DBF no se observó una inhibición significativa en el crecimiento micelial. Sin embargo, la inhibición se observó a niveles significativos en los medios de cultivo de 750 y 1250  $\mu\text{M}$ /DBF. Particularmente, la tasa de inhibición del crecimiento micelial a 1250  $\mu\text{M}$ /DBF fue alta durante los primeros seis días de incubación, pero la eficacia de la inhibición disminuyó a un nivel similar al del medio sin adición de ftalato. Esto indica que existen limitaciones en los efectos inhibitorios de DBF incluso a 1250  $\mu\text{M}$ /DBF (Soo-Min y cols. 2006). Este hongo muestra mayor resistencia a DBF comparados con otras degradaciones bacterianas (Cartwright y cols. 2003; Kim y cols. 2002; Koo y cols. 2003). Se ha reportado que la cepa de *F. oxysporum* es capaz de degradar el BBF a una concentración de 5000 mg/L en un tiempo de 7.5 h en medio líquido. Asimismo, es capaz de degradar DPF a una concentración de 5000 mg/L en 10 h en medio líquido comparándola con otros hongos.

### **1.3. Di (2-etilhexil) ftalato**

El DEHF o DOF se ha utilizado durante más de 70 años (Helm 2007) como aditivo en muchos productos, como plásticos, pinturas y tintas, o como disolvente en formulaciones industriales (Horn y cols. 2004). Sin embargo, es utilizado sobre todo por su capacidad de plastificar PVC, en el que se añade con frecuencia a concentraciones superiores de 40% en masa (Mersiowsky y cols. 2001). La ingestión y exposición dérmica se consideran importantes rutas de exposición a éste compuesto. La exposición vía oral es por el consumo de productos alimenticios, que se encuentran en contacto con empaques de PVC conteniendo DEHF, y la exposición vía dérmica es consecuencia de utilizar cosméticos que contienen DEHF, otra vía se da al inhalar partículas de polvo adheridas al DEHF (Hauser y Calafat 2005).

El DEHF posee una elevada tendencia a separarse de la matriz plástica debido a que no se une químicamente al PVC y dado, a su elevada lipofilia, puede liberarse del plástico de forma relativamente sencilla y rápida cuando se pone en contacto con soluciones acuosas ácidas o lipídicas, o por acción del calor (Xu y cols. 2010). Es por ello, que el uso indiscriminado del DEHF en la industria del plástico ha provocado su gran dispersión en el medio ambiente, de modo tal que se encuentra en suelo, en agua, en aire y en los alimentos, razón por la cuál se ha considerado un contaminante ambiental ubicuo (Martinell 2006).

Cuando el DEHF entra en el organismo del ser humano, se metaboliza en varias sustancias que se eliminan fácilmente. Se ha identificado a uno de sus metabolitos más importantes, el mono etil-hexil ftalato (MEHF), como responsable de la toxicidad del DEHF. Las enzimas que rompen este aditivo químico en su metabolito MEHF se han encontrado fundamentalmente en el intestino, aunque también están presentes en el hígado, riñones, pulmones, páncreas y en el plasma de algunos organismos. El hecho de que la metabolización del DEHF ocurra en el tracto intestinal implica que la exposición vía ingestión podría ser más peligrosa que la intravenosa. El DEHF produce un amplio espectro de efectos tóxicos en animales de experimentación (incluidos roedores y primates) que van a afectar a diversos órganos y sistemas, como al hígado, sistema reproductor (testículos, ovarios, órganos sexuales secundarios), riñones, pulmones y corazón (Liu y Lin 2002; Okubo y cols. 2003).

#### 1.4. Hongo *Pleurotus ostreatus*

La palabra *Pleurotus* deriva del griego “pleuro” que significa formado lateralmente o en posición lateral, refiriéndose a la posición del estípite respecto al píleo. Por su parte, *ostreatus* en latín *significa* en forma de ostra, y se refiere a la apariencia y al color del cuerpo fructífero (Stamets y Chilton 1983). *Pleurotus* es un hongo saprofita o parásito débil, que degrada la madera y crece abundantemente sobre árboles de los géneros *Alnus*, *Ochroma* y *Acer*. La conexión evolutiva de las especies de este género no está del todo clara y ha generado controversia con respecto a su taxonomía. Sin embargo varias especies de *Pleurotus* se han identificado erróneamente, a pesar de su importancia económica. El principal problema en la identificación se ha atribuido a la gran variación y su amplia distribución del género. Actualmente se ha encontrado que varias cepas comerciales de *Pleurotus* reportadas como *P. ostreatus* se habían confundido con otras especies, tales como *Pleurotus columbinus*, *Pleurotus pulmonarius*, *Pleurotus sajor caju*, *P. ostreatus* var. *florida*, *Pleurotus floridanus*, *Pleurotus flabellatus* y *Pleurotus djamor* (Mata y Salmenes 2003).

La producción del hongo *P. ostreatus* o económicamente mejor conocido como “seta” es considerada como la segunda tecnología microbiana de mayor importancia comercial después de la producción de levaduras. A nivel mundial, *P. ostreatus* ocupa el segundo lugar en producción después del champiñón científicamente conocido como *Agaricus bisporus* (Sánchez 2010). Las setas se han consumido desde hace varios años y son importantes por su sabor y propiedades nutrimentales. En general, los hongos contienen un 90% de agua y 10% de materia seca. Estos organismos tienen características nutricionales importantes ya que su valor nutricional se puede comparar con la leche, huevos y carne. Los hongos también contienen vitaminas y una gran cantidad de aminoácidos esenciales (Sánchez 2010; Sánchez y cols. 2012). Desde el punto de vista ecológico, el cultivo de *P. ostreatus* es importante debido a su capacidad para degradar compuestos lignocelulósicos como la lignina, presentes en los residuos agrícolas reciclándose así estos compuestos en la naturaleza (Martínez-Carrera y cols. 1993).

En la Figura 2 se muestran las dos fases de crecimiento de un hongo basidiomiceto, igual al de *P. ostreatus*: la vegetativa y la reproductiva (Sánchez y cols. 2012). La fase vegetativa está compuesta por el micelio aéreo y el manto micelial que penetra la superficie del sustrato en el que se lleva la degradación primaria del mismo, utilizando la materia orgánica en descomposición como fuente de carbono y energía (2012). El micelio tiene una apariencia de masa algodonosa, generalmente blanca, y crece sobre el sustrato elegido para su desarrollo. Cabe mencionar, que el micelio es el que se cultiva sobre medios sintéticos en cajas Petri para obtener una colonia de la cepa (Sánchez y cols. 2012). Ésta crece en forma radial y por ello se forman masas discoidales sobre la superficie donde crecen. Sin embargo, las colonias tienden a incrementar su tamaño para aprovechar los recursos más cercanos hasta que se hayan agotado. En el proceso de biodegradación, el microorganismo secreta enzimas extracelulares que tienen la capacidad de utilizar O<sub>2</sub> molecular para reducir los polímeros del sustrato en monómeros y de esta manera, ser utilizados por el mismo como fuente de carbono y energía en las rutas metabólicas de la glucólisis, ciclo de Krebs y cadena transportadora de electrones, produciendo moléculas de ATP y CO<sub>2</sub> como productos finales de la degradación (Sánchez 2009).

La fase reproductiva o cuerpo fructífero, está constituida por el pie o estípite, las laminillas o himenio y el píleo o sombrero, para que esta fase de crecimiento pueda concluirse, el hongo tiene que sufrir diversos cambios conocidos como morfogénesis, desde el aglomeramiento micelial en la zona madura del crecimiento vegetativo para poder formar los primordios, cuerpos fructíferos microscópicos que se convertirán en los cuerpos fructíferos como tal. En la fase reproductiva se llevan a cabo todos los procesos de plasmogamia y cariogamia para formar las basidiosporas y así poder germinar en algún sustrato para formar nuevo micelio monocariótico y cumplir con el ciclo de vida de este hongo (Sánchez y cols. 2012).

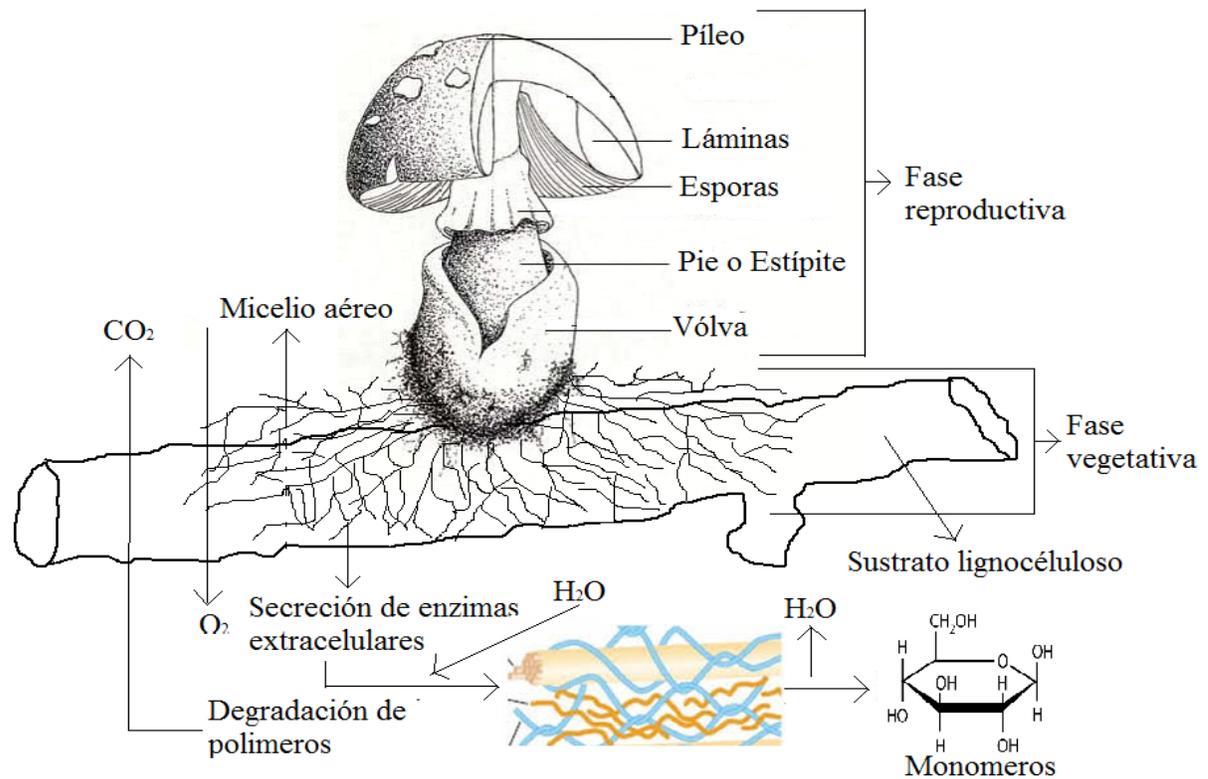


Fig. 2. Fases de crecimiento de un hongo basidiomiceto y proceso de invasión y degradación del sustrato (Modificada de González-Márquez y cols. 2015).

#### 1.4.1. Ciclo de vida de *Pleurotus ostreatus*

El ciclo de vida de *Pleurotus*, implica una sucesión de etapas que van desde la germinación de las esporas hasta la formación de cuerpos fructíferos. En condiciones adecuadas las esporas germinan y dan lugar al micelio (Moore-Landecker 1996; Herrera y Ulloa 1998; Valencia-del Toro 2002).

En los basidiomicetes existen dos modelos sexuales: 1) el homotalismo: los que pertenecen a este grupo son auto compatibles, es decir la unión sexual puede efectuarse entre elementos de un mismo micelio y 2) el heterotalismo: Son necesarios dos micelios para llevar a cabo la reproducción. El género *Pleurotus* está dentro de este modelo. En este las basidiosporas con un núcleo germinan (micelio primario monocariótico) (A) y se fusionan dos micelios primarios compatibles, en los cuales hay un intercambio nucleico recíproco (plasmogamia)

(B), formando el micelio secundario dicariótico con la presencia de fíbulas (C), la fusión nuclear (cariogamia) ocurre en los basidios, que se encuentran en las laminillas del cuerpo fructífero (D), posteriormente ocurre la meiosis, dando origen a células haploides (basidiosporas), que son expulsadas hacia el ambiente (E) (el número de cromosomas está representado con la letra n) (Olivier-Laborde 1991) (Fig. 3).

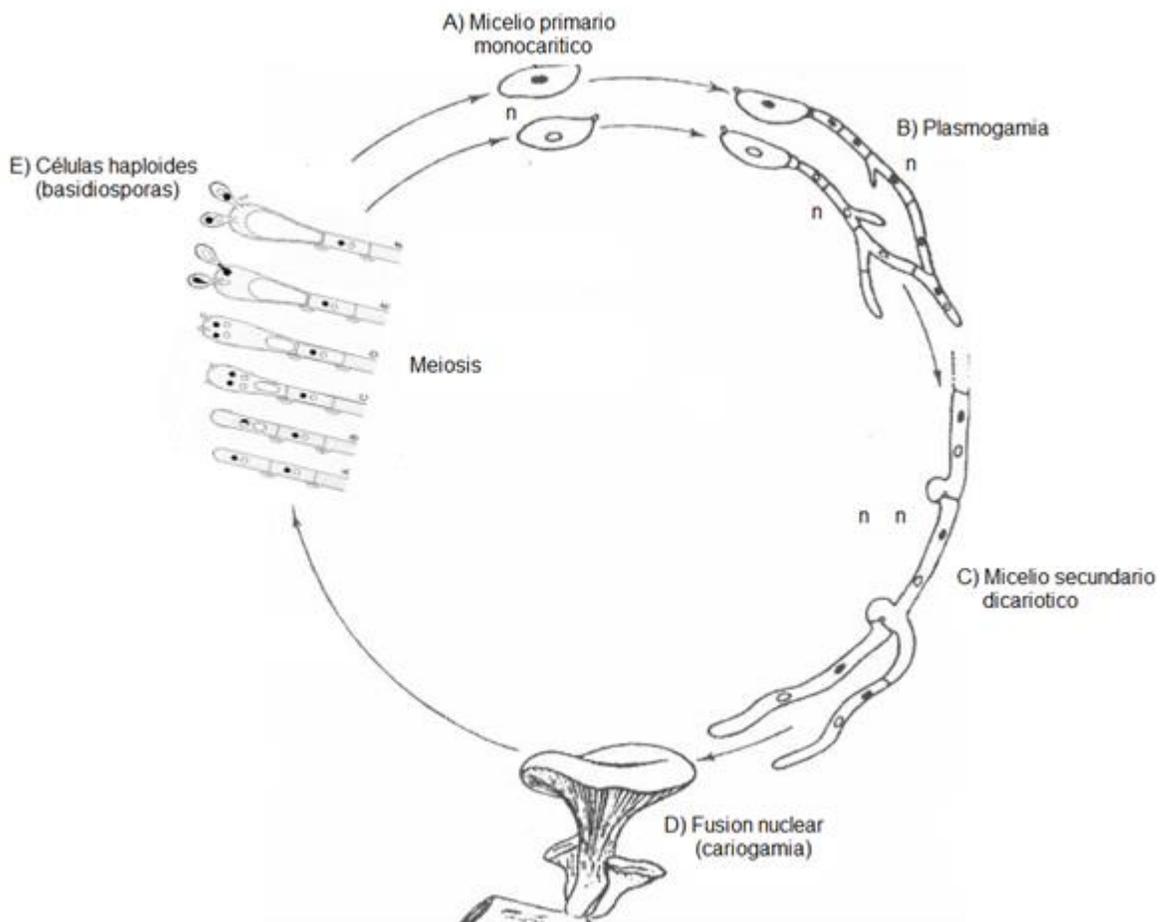


Fig. 3. Ciclo de vida heterotálico de *P. ostreatus* (Modificada de Olivier-Laborde 1991)

#### 1.4.2 Sistema enzimático de *P. ostreatus*

Los hongos ligninolíticos como *P. ostreatus*, han desarrollado un sistema enzimático único y no específico que funciona en el ambiente extracelular (Tabla 2). El mecanismo del sistema degradador de lignina está basado en la producción de radicales libres (Sánchez 2009). Este mecanismo permite que estas enzimas sean catalíticamente activas sobre una gran diversidad de sustratos orgánicos. La enorme diversidad estructural de los contaminantes que son degradados por estos hongos, les confiere un uso potencial en bioremediación (Christian y cols. 2005).

Tabla. 2. Principales enzimas producidas por *P. ostreatus* crecido en diferente sistema de fermentación y utilizando diversos sustratos.

Enzima	Función	Sustrato	Sistema de fermentación	Referencia
Proteasas dependientes de metal	Coagulante de leche	Cuerpos fructíferos crecidos sobre rastrojo de paja	Fermentación sumergida	Lebedeva y Proskuryakov 2008
Serin proteasas	Coagulate de leche	Cuerpos fructíferos crecidos sobre rastrojo de paja	Fermentación solida	Lebedeva y Proskuryakov 2008
Celulasas	Biodegradación de celulosa	Aserrín, bagazo de caña de azúcar y paja de arroz	Fermentación solida	Khalil y cols. 2011
Lacasas y Mn-peroxidasas	Biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs)	PAHs	Fermentación sumergida	Patel y cols. 2009
Lacasas	Biodegradación de lignina	Glucosa y extracto de levadura	Fermentación sumergida	Díaz y cols. 2013
Lacasas	Biodegradación de lignina	Glucosa y extracto de levadura	Fermentación solida	Velázquez y cols. 2014
Esterasas	Biodegradación de ftalatos	Butilbezil ftalato	Fermentación sumergida	Hwang y cols. 2012
Esterasas	Biodegradación de ftalatos	Di octil ftalato	Fermentación sumergida	Cordoba-Sosa y cols. 2014

Estos hongos ligninolíticos, por ser activos degradadores de lignina, pueden degradar parcial o totalmente compuestos orgánicos persistentes de estructura análoga a la lignina. Por ello, la gran importancia en aplicaciones industriales y en procesos de bioremediación de contaminantes recalcitrantes como plaguicidas, tintes, explosivos aromáticos (Sheremata y Hawari 2000; Axtell y cols. 2000), hidrocarburos policíclicos aromáticos (PCBs)(Asgher y cols. 2008, Fernández-Sánchez y cols. 2001) así como, nonifenoles, bisfenoles A y ftalatos (Hwang y cols. 2008) La biodegradación de estos compuestos se considera un proceso no

específico, oxidativo, llevado a cabo por un sistema enzimático extracelular donde los compuestos son mineralizados a CO<sub>2</sub> (García y Torres 2003).

### 1.5. Enzimas lacasas

Las lacasas (p-difenol: dioxígeno oxidoreductasas; E.C. 1.10.3.2) son glucoproteínas y pertenecen al grupo más numeroso de las multicobre azul oxidasas (MCO), su peso molecular oscila entre los 25 y 80 kDa y su pH óptimo de actividad es de 4.5 (Díaz y cols. 2013). Utilizan oxígeno como un aceptor de electrones, para remover radicales de hidrógeno de grupos hidroxifenólicos (Gianfreda y cols. 1999). Catalizan la eliminación de un átomo de hidrógeno en los grupo hidroxilo de las posiciones *orto* y *para*, sustituyendo sustratos monofenólicos, polifenólicos y aminas aromáticas por eliminación de un electrón para formar radicales libres capaces de despolimerizarse, repolimerizarse, metilarse o formar quinonas (Abadulla y cols. 2000). El producto inicial típicamente es inestable y puede sufrir una segunda oxidación catalizada enzimáticamente (conversión de fenol a quinonas) o una reacción no enzimática (como la hidratación o desprotonización) y/o puede participar en una reacción de polimerización, originando un producto amorfo insoluble como la melanina. Metaloglicoproteínas que contienen como cofactor iones de cobre de ahí su clasificación como MCO y requieren para su actividad catalítica un mínimo de cuatro átomos de cobre por cada proteína activa. De los cuatro átomos de cobre presentes en cada proteína se pueden distinguir tres tipos de átomos de cobre según sus propiedades espectroscópicas y paramagnéticas (Claus 2004), del tipo 1 (Cu1) paramagnético, del tipo 2 (Cu2) paramagnético y dos de tipo 3 (Cu3) que son diamagnético. En la figura 4 se muestra la representación tridimensional de una lacasa en su estructura terciaria apreciando sus átomos de cobre.

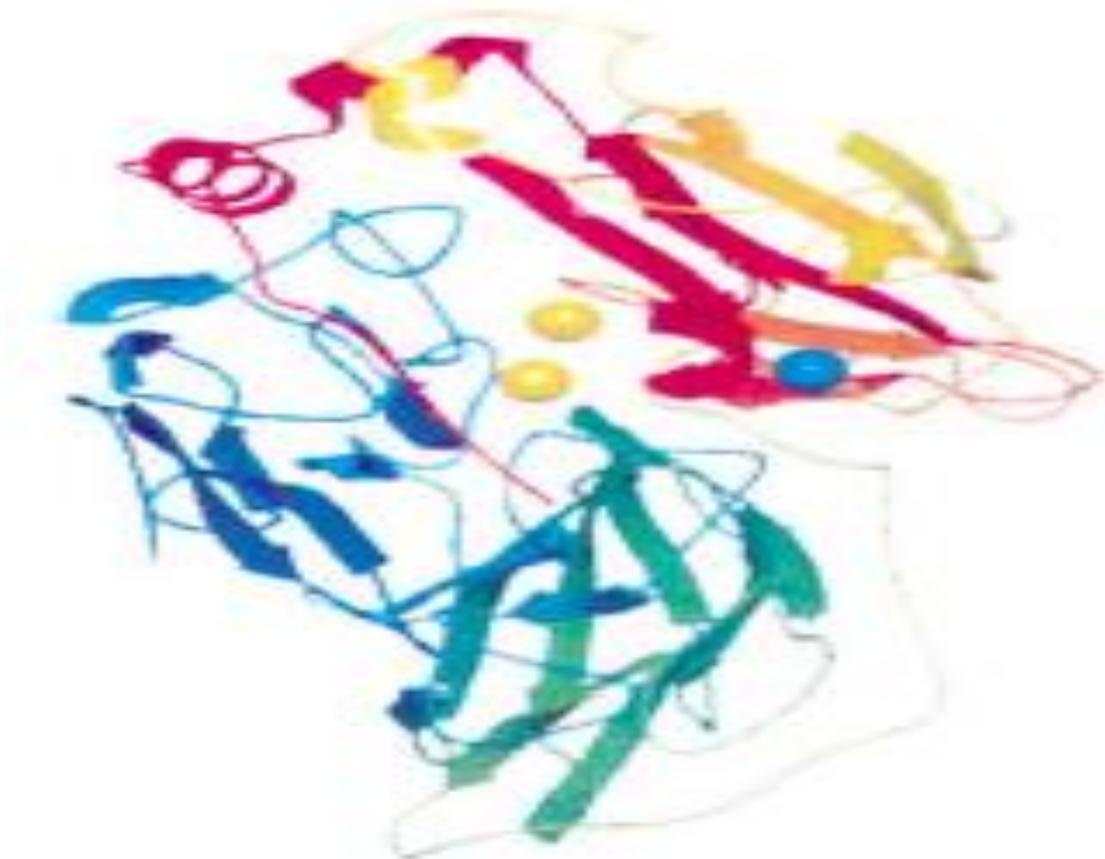


Fig. 4. Estructura terciaria de la enzima lacasa (Ducros y cols. 2001)

Estas enzimas están ampliamente distribuidas en la naturaleza, se encuentran en plantas, hongos, bacterias y en algunos insectos (Palonen y cols. 2003). La mayoría de las lacasas caracterizadas son de origen fúngico, principalmente de hongos de pudrición blanca, los cuales son eficientes degradadores de lignina. Los hongos productores de lacasas pertenecen a los basidiomicetos y hongos celulolíticos.

#### **1.5.1. Mecanismo de reacción de lacasas**

Las lacasas están divididas como de “potencial redox bajo” y “potencial redox elevado”. Esto depende de su estructura y las propiedades del cobre central. El potencial redox elevado ocurre mayormente en basidiomicetos, especialmente en hongos de producción blanca (Mikolasch y Schauer 2009). Sin embargo, el potencial redox bajo de lacasas (450-800 mV, en comparación

con los de peroxidasas ligninolíticas,  $>1$  V) sólo permite la degradación directa de los compuestos con potencial redox bajo y no la oxidación de compuestos aromáticos más recalcitrantes, entre ellos algunos colorantes sintéticos o hidrocarburos aromáticos policíclicos (Baldrian 2005). Las lacasas oxidan sustratos mediante la remoción de un electrón, generando a su vez radicales libres. Las enzimas retienen un total de cuatro electrones en su estado totalmente reducido, de esta manera la enzima puede transferir estos electrones a una molécula de oxígeno para formar dos moléculas de agua (Loera y cols. 2006).

En el ciclo catalítico, el sustrato es reducido en el sitio T1, y es transferido el electrón al sitio trinuclear. Se han propuestos dos mecanismos de reducción del sitio trinuclear. El T1 y T2 reducen el sitio T3 (inciso A en la Fig. 5) o cada cobre en el sitio trinuclear se reduce secuencialmente por transferencia de electrones desde el sitio T1 (inciso B en la Fig. 5), en el caso de que el sitio T3 no actuara como aceptor de dos electrones. La disminución lenta del intermediario nativo conduce a la forma totalmente oxidada. En esta forma, el sitio T1 puede ser reducido por el sustrato, pero la transferencia de electrones hacia el sitio trinuclear es demasiado lenta como para que la enzima sea catalíticamente activa (Díaz-Godínez y cols. 2012).

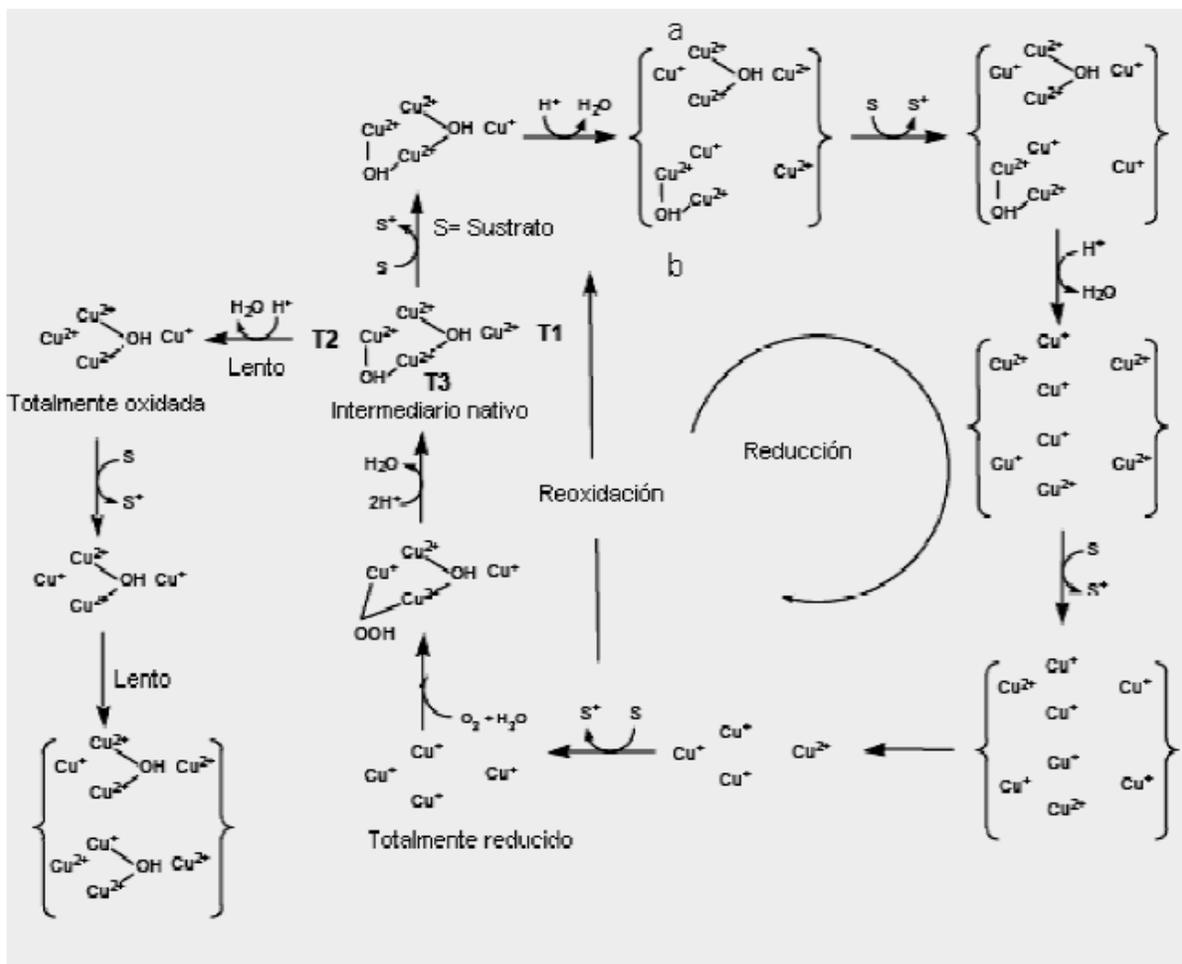


Fig. 5. Ciclo catalítico de lacasas mostrando el mecanismo de reducción y oxidación de los sitios de cobre (Solomon y cols. 1996).

Las lacasas son inespecíficas con respecto a la oxidación de sustratos, catalizan la oxidación de varios sustratos orgánicos, incluidos *o*- y *p*-difenoles, aminofenoles, polifenoles, poliaminas, metoxifenoles, ligninas y algunos iones inorgánicos, con la reducción simultánea directa de oxígeno a agua y sin la producción del intermediario peróxido de hidrógeno (Mayer y Staples 2002). La oxidación de sustratos crea radicales libres activos que pueden continuar reacciones no enzimáticas, como por ejemplo:

- El entrecruzamiento de monómeros: La oxidación enzimática de compuestos fenólicos y anilinas por lacasas genera radicales que reaccionan entre sí para formar dímeros.
- Degradación de polímeros: Las lacasas están involucradas en la degradación de polímeros complejos naturales, como lignina o ácidos húmicos. La generación de radicales reactivos

puede conducir a la ruptura de enlaces covalentes y la liberación de monómeros. A causa de un impedimento estérico, las enzimas no pueden entrar directamente en contacto con los polímeros. En lugar de esto, hay compuestos orgánicos pequeños o metales que se pueden oxidar y ser activados por las lacasas, utilizándose como mediadores redox no fisiológicos en procesos biotecnológicos para aumentar el potencial de oxidación de las lacasas (Fig. 6). La presencia de un mediador adecuado puede expandir el espectro de sustratos, compuestos no fenólicos y polímeros orgánicos incluidos, oxidables por las lacasas (Widsten y Kandelbauer 2008).

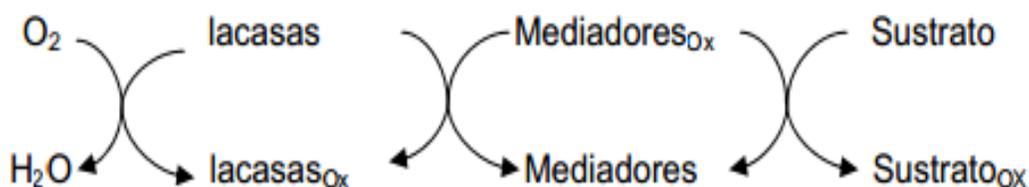


Fig. 6 Ciclo redox de una lacasa catalizada mediante el sistema

- La división de anillos aromáticos: Se ha reportado que las lacasas catalizan la división de un anillo aromático en diferentes compuestos (Harald 2004).

### 1.5.2. Aplicaciones de las lacasas

Algunas aplicaciones de las lacasas han sido en deslignificación, producción de etanol, análisis de drogas, clarificación de vino, biorremediación de triclorofenoles, alcanos, desechos industriales, tratamiento de colorantes, herbicidas, etc. Las 16 lacasas son las enzimas ligninolíticas más abundantes en el suelo, lo que atrajo la atención de los ecólogos para estudiar su papel en el ciclo del carbono, especialmente con respecto a diferentes concentraciones de nitrógeno. Básicamente, todos estos usos de las lacasas, y muchos más, pueden deberse a la capacidad que tiene la enzima de producir radicales libres a partir de diferentes sustratos. Las reacciones secundarias son responsables de la versatilidad de productos de oxidación encontrados (Kunamneni y cols. 2008).

El descubrimiento de una enzima con un incremento en su estabilidad es importante para aplicaciones industriales. Los microorganismos que producen lacasas en medio sólido y líquido suelen analizarse con ayuda de compuestos indicadores de color, que permiten la detección visual de producción de lacasas. El uso de indicador de color es generalmente muy sencillo ya que no implica la manipulación de las muestras; varios compuestos cambian de color al oxidarse, como el ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), sirviendo como indicadores de la producción de lacasas (Kiiskinen y cols. 2004)

Las lacasas pueden ser utilizadas en la industria papelera para llevar a cabo el biopulpeo que es un proceso fundamental para separar y eliminar la lignina de la celulosa. Así mismo, durante el bioblanqueo las lacasas eliminan los residuos de la lignina que causan el amarillamiento del papel (Deleé y cols. 1988). Una razón importante para sustituir el blanqueo químico por cloro, por el bioblanqueo, es la eliminación de compuestos organoclorinados del medio ambiente porque son altamente carcinogénicos.

Para mejorar la producción del combustible etanol, a partir de materias primas renovables, la lacasa del hongo de la pudrición blanca *T. versicolor*, fue expresada bajo el control del promotor PGK1 en *Saccharomyces cerevisiae*, para incrementar la resistencia a inhibidores fenólicos, de la proteína heteróloga en hidrolizados lignicelulósicos (Larsson y cols. 2001).

Por otra parte, la eliminación de color de efluentes generados por la industria textil es un problema de especial importancia en el tratamiento de aguas, debido a que contienen colorantes tipo azo que son carcinogénicos (Zheng y cols. 1999; Rodríguez y cols. 1999; Reyes y cols. 1999); una alternativa para la eliminación de estos colorantes sería el uso de reactores de flujo continuo con lacasas inmovilizadas. En la Tabla 3 se presentan otras aplicaciones de estas enzimas.

Tabla 3. Usos industriales de las enzimas lacasas

Industria	Uso	Referencia
Química	Biotransformación	Agemato y cols. 1993
Textil	Tratamiento de efluentes	Deelé y cols. 1988
Papelera	Bioblanqueo	Call, 1994
Juguera	Remoción de compuestos fenólicos	Cliffe y cols. 1990
Vinícola	Remoción de compuestos fenólicos	Brena y Bianchi, 1990

### 1.5.3. Papel fisiológico de las enzimas lacasas

La función fisiológica reportada de las lacasas se ha descrito en diversos organismos, desde plantas, bacterias y hongos. En plantas se ha encontrado principalmente en el xilema, donde probablemente oxidan monolignoles en la primera etapa de la lignificación para la síntesis de lignina (Gavnholt y Laesen 2002). Sin embargo en otras plantas participa también en la recuperación de hojas dañadas (De Marco y Roubelakis-Angelakis 1997). La determinación y purificación de las lacasas en las plantas es a menudo difícil, porque el extracto crudo contiene un gran número de enzimas de tipo oxidativo, con amplia especificidad de sustrato (Ranocha y cols. 1999). En la Tabla 4 se muestran algunos microorganismos productores de estas enzimas así como el papel fisiológico que tienen y que son beneficiosas para el organismo que las produce. En bacterias el papel fisiológico se encuentra involucrado en la pigmentación de la célula, producción de pigmentos que recubren esporas protegiéndolas de factores de estrés tales como la radiación UV o el peróxido de hidrogeno. En bacterias se encuentran como proteínas intracelulares o periplásmicas (Claus 2003), como es el caso de la lacasa caracterizada en *Sinorhizobium meliloti*, una proteína periplásmicas que presenta una masa molecular de 45 kDa (Rosconi y cols. 2005). En plantas y hongos, la localización extracelular de las enzimas ayuda a evitar problemas generados por las especies reactivas, tales como semi-quinonas y quinonas, que se forman mientras se oxidan sustratos aromáticos por acción de las lacasas. Sin embargo el papel fisiológico de las lacasas en hongos se ha descrito en diversas especies de hongos, principalmente de hongos de pudrición blanca, los cuales son eficientes degradadores de lignina. Los hongos productores de lacasas pertenecen a los ascomicetos, deuteromicetos, basidiomicetos y hongos celulolíticos. Se han reportado

funciones de las lacasas en distintos procesos celulares fúngicos, como morfogénesis, producción de pigmentos, patogénesis y virulencia (Eggert y cols. 1998), en la degradación (lignina o eliminación de fenoles tóxicos). La eliminación de compuestos tóxicos se puede hacer promoviendo la polimerización, antes de que estos compuestos entren a la hifa. Las principales enzimas lacasas de origen fúngico se han caracterizado en *Neurospora crassa* (Froehner y Eriksson 1974), *Phlebia radiata* (Niku-Paavola y cols. 1988), *T. versicolor* y *Coriolus polyporus* (Rogalski y cols. 1991), *Phanerochaete chrysosporium* (Gold y Alic 1993), *Pycnosporus cinnabarinus* (Eggert y cols. 1996), *Chaetomium thermophilum* (Chefetz y cols. 1998) y *Coprinus cinereus* (Schneider y cols. 1999). Los diferentes niveles de degradación de la lignina, con respecto a otros compuestos de la madera, dependen de las condiciones ambientales y de la especie del hongo involucrado, ya que se ha demostrado que la maquinaria enzimática de cada uno de ellos es diferente (Palmieri y cols. 1997).

Tabla 4. Principales microorganismos productores de lacasas y su función fisiológica

Tipo de microorganismo	Especie	Función fisiológica	Referencia
Bacteria	<i>Azospirillum lipoferum</i> (bacteria nitrificante)	Involucrada en la pigmentación de la célula utilizando los compuestos fenólicos y/o el transporte de electrones.	(Alexandre y cols. 1999)
	<i>B. subtilis</i>	Participa en la producción de pigmentos de la cubierta de la espora.	(Martins y cols. 2002).
	<i>A. lipoferum</i>	Como estrategia para hacer frente a subproductos tóxicos originados durante el metabolismo.	(Diamantidis y cols. 2000),
	<i>Marinomonas mediterranea</i>	Como estrategia para hacer frente a subproductos tóxicos originados durante el metabolismo.	(Solano y cols. 1997)
	<i>B. subtilis</i>	Como estrategia para hacer frente a subproductos tóxicos originados durante el metabolismo.	(Martins y cols. 2002)
	<i>A. lipoferum</i>	La pérdida de actividad del citocromo-C oxidasa y la adquisición de la resistencia a las quinonas análogas.	(Alexandre y cols. 1999)
Hongo	<i>Aspergillus nidulans</i>	Se reportaron dos isoformas de lacasas, y ambas al parecer están involucradas en la síntesis de los pigmentos de color verde de los conidios.	(Alexandre y cols. 1999)
	<i>Daldinia concentrica</i>	Participan en la formación del cuerpo fructífero, así como en la formación de pigmentos extracelulares acoplados a la polimerización oxidativa de los componentes de la pared celular, fortaleciendo la unión entre célula y célula.	(Leatham y Stahmann 1981)
	<i>Lentinula edodes</i>	Participan en la formación del cuerpo fructífero, así como en la formación de pigmentos extracelulares acoplados a la polimerización oxidativa de los componentes de la pared celular, fortaleciendo la unión entre célula y célula.	(Leatham y Stahmann 1981)
	<i>Agaricus bisporus</i>	Involucradas con el crecimiento invasivo del hongo para la hidrólisis de la lignina, y así dejar disponible a la celulosa y hemicelulosa.	(Ainsworth y Rayner 1991)
	<i>T. versicolor</i>	Participan en la degradación de la lignina, donde las lacasas oxidan las subunidades fenólicas de la misma.	(Thurston 1994)
	<i>P. cinnabarinus</i>	Participan en la degradación de la lignina, donde las lacasas oxidan las subunidades fenólicas de la misma.	(Thurston 1994)

<i>Armillaria mellea</i>	Se ha asociado con la formación de los rizomorfos (cadenas de micelio formadas por un gran número de hifas), ya que se propuso que las lacasas forman una cola de polifenoles que permite mantener juntas las hifas.	(Rehman y Thurston 1992).
<i>Botrytis cinerea</i>	Relacionado con la defensa contra metabolitos tóxicos producidos por la planta.	(Rigling y Van Alfen 1993)
<i>Cryphonectria parasítica</i>	Importantes para la patogénesis	(Rigling y Van Alfen 1993)

## 1.6. Electroforesis en agar de poliacrilamida

La electroforesis es un método de laboratorio en el que se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa.

Fue empleado por primera vez en 1937, pero su importancia vino a incrementarse cuando en los años cincuenta E. L.Durrum y Arne W.K. Tiselius , impulsaron la electroforesis de zona, nombre que se asignó a la separación de materiales en un campo eléctrico en presencia de algún tipo de soporte; aunque este término se limitó originalmente al análisis de coloides y partículas submicroscópicas , se ha convertido en estos últimos años en una metodología aplicada a sustancias de bajo peso molecular. Cuando una mezcla de moléculas ionizadas y con carga neta son colocadas en un campo eléctrico, estas experimentan una fuerza de atracción hacia el polo que posee carga opuesta, dejando transcurrir cierto tiempo las moléculas cargadas positivamente se desplazarán hacia el cátodo (el polo negativo) y aquellas cargadas negativamente se desplazarán hacia el ánodo (el polo positivo). El movimiento de las moléculas está gobernado también por dos fuerzas adicionales; inicialmente la fricción con el solvente dificultará este movimiento originando una fuerza que se opone , por otro lado las moléculas tienen que moverse en forma aleatoria o movimiento browniano debido a que poseen energía cinética propia denominado difusión. La energía cinética de las moléculas aumenta con la temperatura, por ello a mayor temperatura mayor difusión.

La suma de todas estas fuerzas provoca que las moléculas no migren de una manera homogénea, de tal manera que, si las moléculas son colocadas en un cierto lugar de solución, los iones comenzarán a moverse formando un frente cuya anchura aumentará con el tiempo.

Para reducir la anchura de este frente podemos reducir el movimiento de las moléculas empleando un medio que oponga más resistencia a dicho movimiento. Una forma común de hacer esto es formar un gel. El gel consiste de un polímero soluble de muy alto peso molecular que atrapa moléculas de agua y forma un tamiz que dificulta el movimiento de los solutos, consecuentemente, la migración electroforética de las moléculas será más lenta, pero el ensanchamiento del frente se verá reducido también.

Los geles de poliacrilamida se forman mediante la polimerización de la acrilamida por acción de un agente reductor, químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible. Forma, además, geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permiten buena visualización de las bandas durante un tiempo prolongado. Además tiene la ventaja de que variando la concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada en el tamaño del poro, lamentablemente cada vez se emplea menos en diagnóstico debido a su neurotoxicidad.

## 2. ANTECEDENTES

Hwang y cols. (2008) investigaron la biodegradación de los ftalatos DEF, DMF y BBF en dos diferentes medios por 10 hongos de pudrición blanca (*P. ostreatus*, *I. lacteus*, *P. brumalis*, *Schizophyllum commune*, *Fomitella fraxinea*, *Merulius tremellosus*, *T. versicolor* y *T. versicolor* MrP1, MrP13 y MnP2-6) aislados en Korea. Encontraron que a una concentración de 100 mg/L de cada ftalato la degradación ocurre dentro de los primeros 12 días de incubación, y que el sobrenadante del cultivo de *P. ostreatus* obtenido del crecimiento del hongo en medio de extracto de levadura durante 4 día a 30°C degradó el 14.9% de los 100 mg/L de BBF. Cuando los ftalatos son agregados después de 5 días de incubación de los hongos, la mayoría de los hongos, excepto *I. lacteus* mostraron un incremento en la remoción de los ftalatos. En ambos cultivos *P. ostreatus* mostró la mayor degradación para los 3 ftalatos, lo que atribuye a las enzimas que se encuentran asociadas al micelio y no a las enzimas extracelulares.

Lee y cols. (2007) utilizaron el hongo de pudrición blanca *P. brumalis* para degradar 3 diferentes concentraciones (250, 750 y 1250  $\mu\text{M}$ ) de DBF, observando la inhibición del micelio conforme incrementaba la concentración del plastificante. El DBF fue casi eliminado del medio de cultivo dentro de los primeros 12 días de incubación siendo el 50% del DBF adsorbido por el micelio del hongo. Se detectaron al DEF y al MBF como productos intermediarios de la degradación; y de acuerdo con sus resultados, la degradación de DBP por este hongo puede ser completada a través de 2 rutas –transesterificación y desesterificación– las cuales sucesivamente se combinan en una vía de degradación intracelular.

Hwang y cols. (2012) estudiaron de degradación de BBF y la actividad de las enzimas que participan en ésta, empleando el hongo *P. ostreatus* en dos diferentes medios de cultivo; extracto de levadura (EL) y medio mineral. Encontrando que la degradación de 100 mg/L de BBF fue completa en el medio EL en comparación con el medio mineral, en el cual a penas y se degradaron 35 mg/L del ftalato. La actividad enzimática presentó una relación diferente para cada enzima con el medio de cultivo y la concentración de los ftalatos, ya que la actividad de esterasa fue mucho mayor en medio EL que en medio mineral, además de que incrementó con la adición de BBF; situación contraria a las lacasas, que presentaron mayor actividad en medio mineral pero no se incrementó dicha actividad con la adición de BBF; y para el caso general de las peroxidasas su actividad aumento pocos días después de la adición del ftalato en ambos medios. De esta manera concluyeron que la degradación de BBF por *P. ostreatus* y sus metabolitos puede ser atribuida principalmente a las esteraras en lugar de las lacasas degradadoras de lignina.

Las enzimas lacasas son producidas por una gran variedad de hongos de pudrición blanca, en *P. ostreatus* son enzimas constitutivas, sin embargo pueden ser inducidas por cobre (Tellez-Tellez y cols. 2005), o en medios ricos en nitrógeno (D'Souza y cols. 1999), estas se presentan en diversas isoenzimas con diferentes propiedades fisicoquímicas como; peso molecular, puntos isoeléctricos y contenido de carbohidratos. En algunas especies la adición de inductores al medio de cultivo, resulta en la biosíntesis de nuevas isoenzimas extracelulares (Duran y cols. 2002).

Palmieri y cols. (1997) realizaron el aislamiento y la purificación de una isoforma de lacasa de *P. ostreatus*, encontrando que la masa molecular de POXA2 fue de 67 kDa; esta isoforma mostró baja estabilidad a la temperatura (25-35 °C) presentando cuatro átomos de cobre por molécula.

En otro estudio posterior, se realizó la purificación de otra isoforma de lacasa en un cultivo suplementado con sulfato de cobre, denominada POXA1b, con una masa molecular de 62 kDa, y cuatro átomos de cobre por molécula; además mostró un alta estabilidad al pH alcalino (Giardina y cols. 1999). Posteriormente, Palmieri y cols. (2003), encontraron otras dos isoformas de lacasa en un cultivo suplementado con cobre, denominadas POXA3a y POXA3b. Ambas isoenzimas están constituidas por una subunidad grande de 67 kDa y una subunidad pequeña de 18 ó 16 kDa (esta heterogeneidad es debida la presencia o ausencia de una parte glicosídica).

En *A. bisporus* y *L. edodes* incubados sobre medio sólido, la expresión de lacasas se encontró principalmente durante el estado de colonización y disminuyó durante la fructificación (Ohga y Royse 2001). Este perfil de expresión concuerda con la participación de la actividad de lacasas en la bioconversión de la lignina, que es necesaria en las primeras etapas para la colonización del sustrato.

Tlecuitl-Beristain y cols. (2008) purificaron una isoforma de lacasa de la cepa ATCC-32783 con una masa molecular de aproximadamente 43.7 kDa, con un rango amplio de actividad a diferentes valores de pH (2 a 8) y temperatura (20-60 °C). Se ha reportado que este hongo carece de lignina peroxidasa, indicando que probablemente se debe a la presencia de varias isoformas de lacasas.

Tellez-Tellez y cols. (2012) describieron un gen que codifica una isoenzima de lacasa expresado bajo condiciones de fermentación sumergida del hongo *P. ostreatus* (lacP83). Se utilizó una secuencia de 2.887 pb obtenida de la biblioteca genómica de *P. ostreatus* utilizando una estrategia de PCR inversa. La secuencia que codifica a lo largo 1.527 pb, mostró 17

exones y que son codificables a una proteína de 509 amino ácidos, con una señal péptidica y conservando los dominios de unión del cobre. La región promotora del gen lacP83 (466bp arriba de ATG) contiene los factores de transcripción supuestos tales como uniones MER, XRE un elemento de respuesta a la defensa, y un elemento de respuesta al estrés. Las secuencias de la proteína y el gen de lacP83 muestran, entre el 90 y 96% y 78 y el 92% de similitud con lacasas de *P. ostreatus* anteriormente informadas. Sin embargo, mostraron diferencias en su peso molecular aparente y la secuencia promotora.

Yeo y cols. (2008) evaluaron el incremento en la expresión de la enzima lacasa de *P. tremelosa* crecido sobre diferentes disruptores endocrinos: DEF, BBF y bisfenol A (BFA). Observaron que *P. tremelosa* degrado hasta un 30 % al BBF y un 80 % al DEF bajo condiciones de cultivo líquido durante 9 días. Estos esteres de ftalato, incrementan hasta 10 veces más la actividad de lacasas con respecto al medio control y al medio que contiene BFA. También muestran que al amplificarse el ADNc de la enzima lacasa de *P. tremellosa* mostro una similitud del 80.7 % cuando se compara con una lacasa de *P. radiata* y un 64.8% de identidad en comparación con la *T. versicolor*. Al ser cultivado este hongo en condiciones adecuadas para la degradación de ésteres del ácido ftálico, la actividad de lacasas y su nivel de transcripción fueron superiores.

Recientemente se determinó el patrón de actividad intra y extracelular así como la expresión de las isoformas extracelulares (lacc 1, lacc 4, lacc 6, lacc 9 y lacc 10) de lacasas de *P. ostreatus* crecido bajo diferentes pH de crecimiento y mediante diferentes pH de actividad (3.5, 4.5, 6.5 y 8.5). Obteniendo 77550 U/L a pH de 4.5 como actividad máxima de lacasas extracelulares. También se muestra la actividad intracelular con valores máximos en las fermentaciones de pH de 4.5 y 6.5 (4800 y 1741 U/g de biomasa seca, respectivamente). Al llevar a cabo el patrón de expresión empleando la técnica de RT-PCR, se observaron diferencias en el tiempo y nivel de expresión de los 5 genes. Los autores muestran que Lacc 9 no se expresó en ninguna condición de desarrollo y actividad. Sin embargo en la fermentación de pH de 3.5 de crecimiento, se expresaron con una mayor intensidad los genes de las isoformas: lacc 4, lacc 6 y lacc 10. Mientras que en la fermentación a pH de 6.5 de crecimiento, todos los genes mostraron el mismo nivel de expresión. Los autores mencionan

que el pH de desarrollo del hongo es un factor que modifica el patrón de producción y expresión de las lacasas (Díaz y cols. 2013).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El desarrollo de *P. ostreatus* en un medio de cultivo conteniendo ftalatos, permitirá conocer el efecto que tiene el DEHF sobre el crecimiento, actividad enzimática y perfil zimográfico de lacasas de *P. ostreatus* posibles enzimas involucradas en la degradación de este compuesto, crecido en medio líquido. No se han realizado estudios similares hasta el momento, por lo que esta investigación sería un estudio original básico ya que se generara nueva información y conocimiento acerca de la producción de lacasas para investigaciones futuras que contribuyan a la biorremediación de ftalatos y otros xenobióticos del medio ambiente.

#### **4. HIPÓTESIS**

El DEHF tiene un efecto sobre el crecimiento de *P. ostreatus* y su producción de enzimas lacasas crecido en medio líquido.

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto del DEHF sobre el crecimiento de *P. ostreatus* y su producción de enzimas lacasas crecido en medio líquido.

##### **Objetivos particulares**

- Determinar el crecimiento de *P. ostreatus* 50 crecido sobre 500 mg de DEHF/L y 1000 mg de DEHF/L en medio líquido.
- Caracterizar la producción y actividad de enzimas lacasas de *P. ostreatus* 50 crecido sobre 500 mg de DEHF/L y 1000 mg de DEHF/L en medio líquido.
- Identifica el número de isoformas producidas por *P. ostreatus* 50 crecido sobre 500 mg de DEHF/L y 1000 mg de DEHF/L en medio líquido.

#### **6. METODOLOGÍA**

##### **6.1. Preparación de inóculo y condiciones de cultivo**

Se utilizó la cepa *Pleurotus ostreatus* 50 del cepario del COLPUS-Puebla (Colegio de Posgraduados campus Puebla, Méx.) Se creció la cepa en agar extracto de paja. Los tiempos de desarrollo de las colonias fueron según su velocidad de crecimiento (Sánchez, 1998). Para las fermentaciones, el inóculo se tomó de la periferia de estas colonias (3 fragmentos de 10 mm de diámetro). Los cultivos se incubaron a 28 °C por 23 días a 120 RPM.

## 6.2. Preparación de medios de cultivo

Se prepararon tres medios de cultivo, 1) Medio sin adición de ftalato (MSAF) conteniendo en (g/L); extracto de levadura, 5; glucosa, 10;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.6;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 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;  $\text{MnSO}_4$ , 0.05;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.001 y Tween 80, 400  $\mu\text{l}$  (Téllez-Téllez y cols. 2008), 2) MSAF + 500 mg de DEHF/L y 3) MSAF + 1000 mg de DEHF/L. El pH se ajustó a 6.5 usando NaOH 0.1 y 1M.

## 6.3. Condiciones del cultivo de *P. ostreatus* en medio líquido

Se emplearon matraces de 125 ml conteniendo 50 ml de medio de cultivo, se esterilizaron por 15 min a 120 °C y se enfriaron. En todos los casos, el medio de cultivo MSAF se utilizó como testigo.

## 6.4. Obtención del extracto enzimático y evaluación de la biomasa

Se obtuvo el extracto crudo enzimático (ECE) correspondiente al sobrenadante de los cultivos por filtrado y retención de la biomasa a través de papel de filtro Whatman No. 4. La biomasa retenida sobre el papel Whatman se secó hasta peso constante para su cuantificación por diferencia de peso seco (Díaz-Godínez y cols. 2001).

Las curvas de crecimiento fueron establecidas por la ecuación logística:

$$dx/dt = \mu(1-X/X_{\max})X$$

(1) donde,  $\mu$  es la máxima velocidad específica de crecimiento y  $X_{\max}$  fue la biomasa máxima (o equilibrio) producida cuando  $dX/dt = 0$  para  $X > 0$ .

La solución de la ecuación (1) es la siguiente

$$X = X_{\max}/(1 + C \cdot \exp(-\mu \cdot t))$$

(2) donde,  $C = (X_{\max} - X_0)/X_0$ ; cuando  $X = X_0$  siendo el valor inicial de la biomasa.

El rendimiento teórico de la enzima con respecto a la biomasa ( $Y_{E/X}$ ) se estima como la relación entre la  $E_{\max}$  (U/L) y  $X_{\max}$  (g/L). De igual manera se calculó el rendimiento de la biomasa con respecto al sustrato ( $Y_{X/S}$ ) empleando la  $X_{\max}$  y la concentración de la fuente de  $C_2$ . Se calcula 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 ( $q_p = \mu * Y_{E/X}$ ).

#### **6.4. Perfiles de pH**

Los perfiles del pH durante el crecimiento de *P. ostreatus* en medio líquido se obtuvieron el método de potenciometría.

#### **6.5. Actividad enzimática de lacasas**

La actividad de lacasas se cuantifico utilizando como sustrato el 2,6-dimetoxifenol (DMP) (SIGMA) 2mM en buffer de fosfatos 0.1 M y pH de 6.0. La mezcla de reacción (475  $\mu$ l de sustrato, 50  $\mu$ l de ECE) fue incubado a 39°C por 15 min. La reacción se detuvo al añadir 475  $\mu$ l de dimetilsulfóxido (SIGMA). Se leyó la absorbancia a 468 nm. Una unidad de actividad de lacasas fue la cantidad de enzima que provoco incrementos de 1.0 unidad en la absorbancia por min de incubación (Ardon y cols. 1998).

#### **6.6. Patrón zimográfico de lacasas**

Ésta se realizó utilizando la técnica modificada de Leammli (1970), usando dodecil sulfato de sodio en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). El gel de separación y de empaquetamiento contenia 10 y 4% de acrilamida, respectivamente. La concentración de SDS fue de 0.1% en el gel. Las muestras del ECE 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 1-1.25 h.

Después de la corrida, los geles se lavarón con agua destilada y desionizada con ayuda de un agitador orbital (20-30 rpm) durante 1 h. Posteriormente, los geles se incubaron en solución buffer a un pH de 4.5 a temperatura ambiente en DMP 2mM (Díaz y cols. 2013).

### **6.7. Determinación del consumo de glucosa**

Se cuantificó la cantidad azúcares reductores por medio del reactivo DNS (ácido dinitrosalicílico), a 100  $\mu$ l de ECE y 900  $\mu$ l de agua destilada se le agregaron 2 ml del reactivo DNS. Se calentó a temperatura de ebullición por 5 min y después de enfriarse se leyó la absorbancia a 575 nm. Se preparó una curva de calibración con glucosa.

## **7. RESULTADOS**

### **7.1. Velocidad específica de crecimiento de *P. ostreatus* crecido sobre DEHF en medio líquido**

A continuación se muestra la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y la biomasa máxima obtenida ( $X_{max}$ ) de *P. ostreatus* crecido sobre MSAF, 500 mg de DEHF/L y 1000 mg de DEHF/L en medio líquido, mediante la producción de biomasa durante 480 h de crecimiento (Fig. 7).

*P. ostreatus* mostró una fase de adaptación muy corta en los tres medios de cultivo terminando a las 72 h del crecimiento, e inicio la fase estacionaria aproximadamente a las 336 h de incubación, tanto en el medio MSAF como en los medio conteniendo 500 y 1000 mg/L de DEHF, posteriormente termino a las 528 h de crecimiento. La  $X_{max}$  obtenida en el MSAF fue de 5.2 g/L menor con respecto a las obtenidas en los medios de cultivo conteniendo DEHF y obtuvo una  $\mu$  de 0.020 h<sup>-1</sup>. *P. ostreatus* presentó una  $X_{max}$  de 6.5 g/L en el medio conteniendo 500 mg de DEHF/L y una  $\mu$  de 0.022 h<sup>-1</sup> y en el medio conteniendo 1000 mg de DEHF/L presento una  $X_{max}$  y una  $\mu$  de 7.6 g/L y 0.019 h<sup>-1</sup> respectivamente.

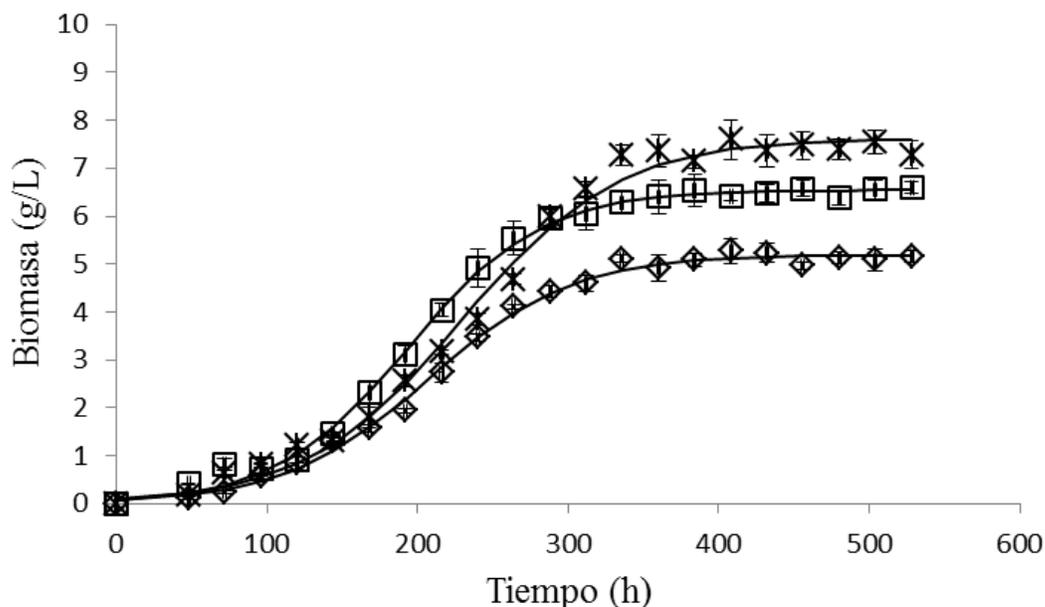


Fig. 7. Curva de crecimiento de *P. ostreatus* crecido en medio sin adición de ftalato (MSAF) (◇), 500 (□) y 1000 (x) mg de DEHF/L en fermentación líquida.

## 7.2. Perfiles de pH de *P. ostreatus* crecido sobre DEHF en medio líquido

Con respecto al pH, para esta cepa en el medio de 1000 mg de DEHF/L, el pH inicial fue de 6.5 y el pH final fue de 5.6 a las 480 h. Para el medio de 500 mg de DEHF/L, el pH inicial fue de 6.5 y el pH final fue de 5.8 a los 20 días de fermentación. Asimismo, para el medio sin adición de ftalato el pH inicial fue de 6.5 y el pH final fue de 6.7 (Fig. 8). Sin embargo en el medio MSAF no se observan cambios bruscos del pH usante todo el crecimiento oscilando entre un pH de 7 y un pH de 6, contrario a lo observado en los medios que contienen DEHF, los cambios de pH en el medio conteniendo 500 mg de DEHF/L presentan cambios bastante notables del pH entre las 200 h y las 288 h del crecimiento disminuyendo el pH hasta niveles de 4.5 y regularizándose entre el rango del pH inicial a las 360 h, para finalizar nuevamente con un cambio brusco a las 480 h. El cambio del pH en el medio conteniendo 1000 mg de

DEHF/L fue uniforme durante las 480 h del crecimiento disminuyendo paulatinamente hasta alcanzar niveles entre un rango de 4.5 y 5 de pH.

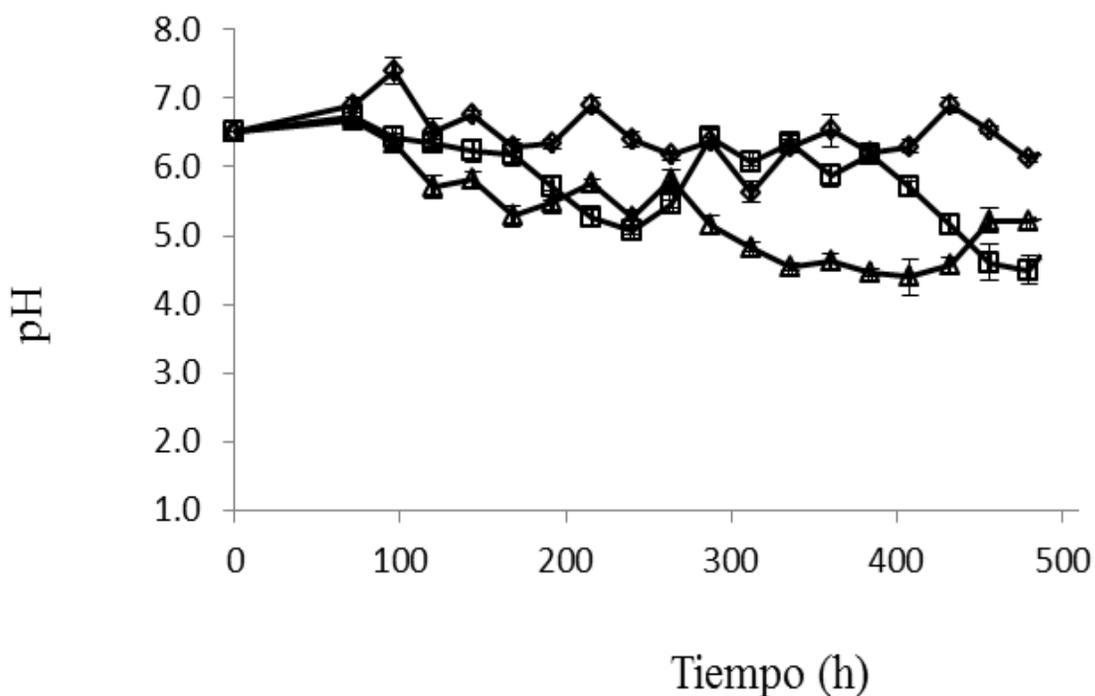


Fig. 8. Perfil de pH de *P. ostreatus* crecido en (MSAF) ( $\diamond$ ), 500 ( $\square$ ) y 1000 ( $\times$ ) mg de DEHF/L en medio líquido.

### 7.3. Actividad enzimática de lacasas de *P. ostreatus* crecido sobre DEHF en medio líquido

En la figura 9 se muestran la producción de lacasas en el MSAF, 500 mg de DHEF/L y 1000 mg de DHEF/L obtenidos durante el crecimiento de *P. ostreatus* a un pH inicial de desarrollo de 6.5 y utilizando un buffer de acetatos a un pH de 4.5 de actividad.

Se observa la actividad de lacasas obtenida en el medio MSAF siendo menor comparada con los medios que contienen DEHF, iniciando un incremento significativo de actividad a las 240 h del crecimiento con una actividad 150 U/L, observando que durante las horas anteriores se obtienen actividades menores a 100 U/L, y obteniendo una actividad máxima a las 336 h y 480 h del crecimiento con una actividad de 6748 U/L y 5553 U/L respectivamente.

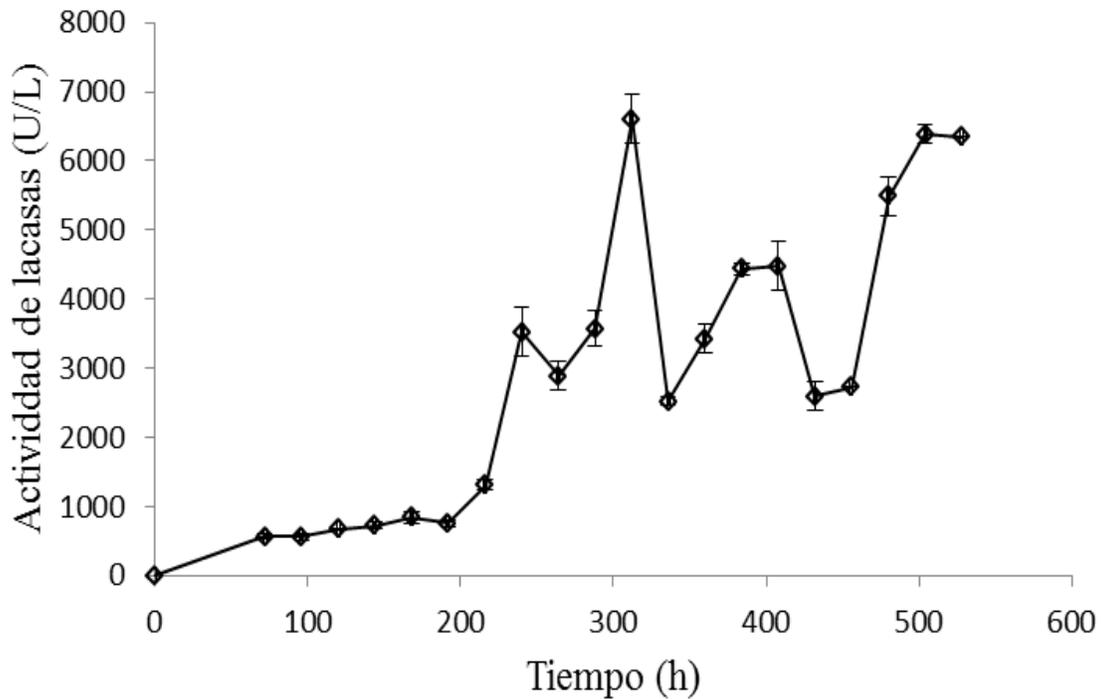


Fig. 9. Actividad enzimática de lacasas de *P. ostreatus* crecido en MSAF en medio líquido.

Las actividades máximas en el medio conteniendo 500 mg de DHEF/L fueron de 7892 U/L y 7809 U/L a las 480 h y 336 h de crecimiento, iniciando a las 78 h un incremento en la actividad por arriba de las 1000 U/L (Fig. 10). Para el medio conteniendo 1000 mg de DEHF/L se observa que el incremento en la actividad enzimática de lacasas inicia a las 144 h con una actividad de 600 U/L sin embargo se obtuvieron actividades máximas de lacasas de 8973 U/L y 7962 U/L a las 480 h y 456 h respectivamente, siendo en este medio de cultivo las actividades máximas obtenidas con respecto de los otros medios de cultivo (Fig. 11).

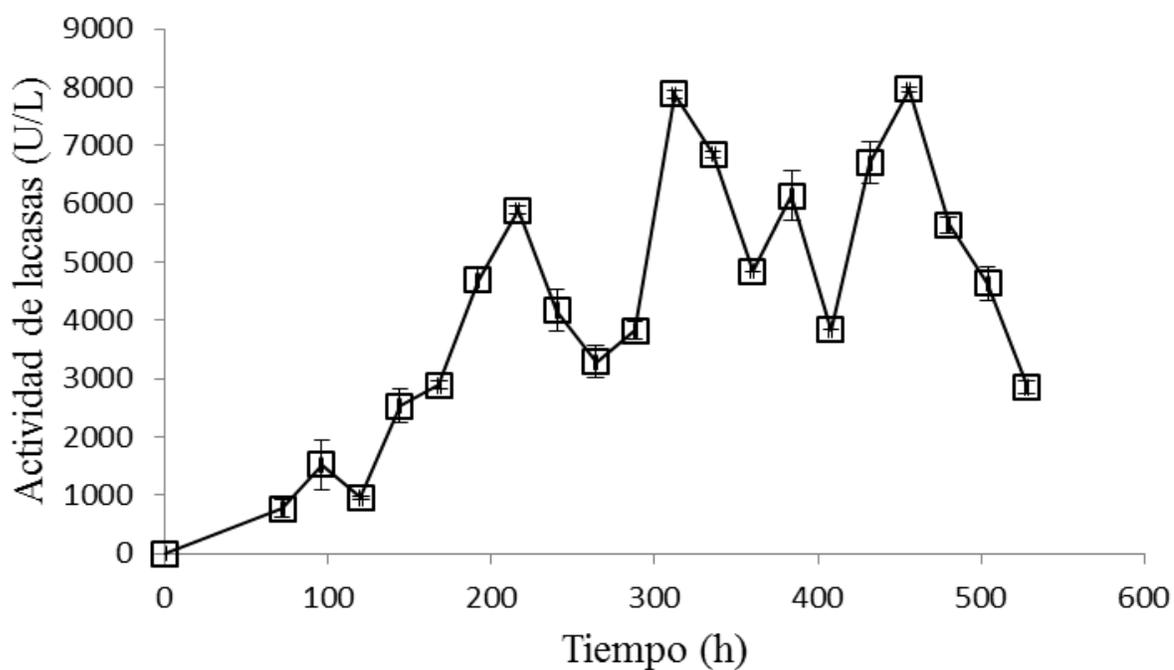


Fig. 10 Actividad enzimática de lacasas de *P. ostreatus* crecido en 500 mg de DEHF/L en medio líquido.

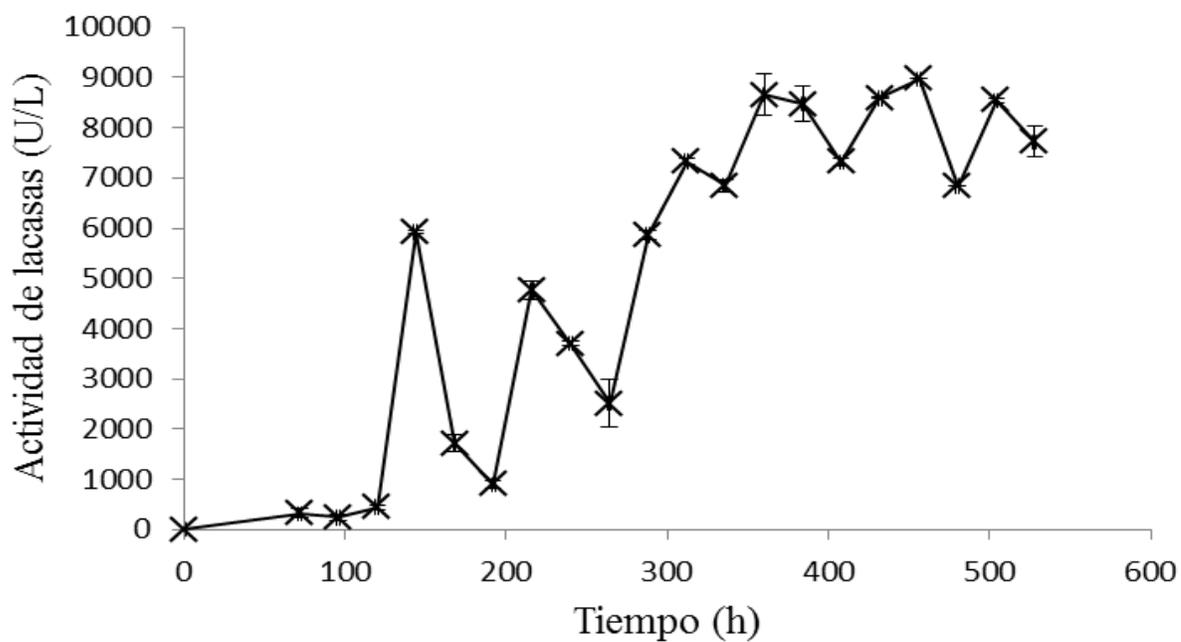


Fig. 11. Actividad enzimática de lacasas de *P. ostreatus* crecido en 1000 mg de DEHF/L en medio líquido.

#### 7.4. Perfil zimográfico de lacasas de *P. ostreatus* crecido sobre DEHF en medio líquido

En la figura 12 se muestra el perfil zimográfico de lacasas a partir del inicio de la fase exponencial del crecimiento de *P. ostreatus* crecido en MSAF, mostrando durante toda la fermentación la misma isoforma de lacasa con un peso molecular aproximadamente de 55 y 60 KDa, la mayor intensidad de las bandas en los zimogramas se observa a las 120, 216, 360, 408, 456 y 480 h de crecimiento.

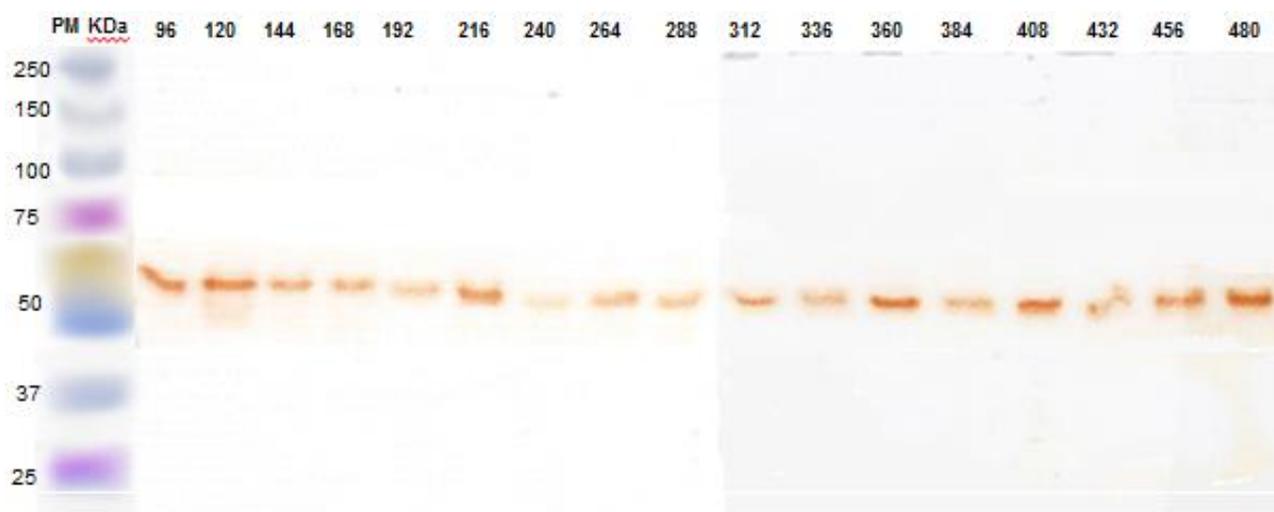


Fig. 12. Perfil zimográfico de lacasas de *P. ostreatus* crecido en MSAF en medio líquido.

En la siguiente figura se puede observar el perfil zimográfico de lacasas de *P. ostreatus* crecido en 500 mg de DEHF/L. Se puede observar durante toda la fermentación una isoforma de lacasa que se produce de manera constitutiva al igual que en el MSAF, sin embargo a las 168, 192, y 288 se puede observar una isoforma con baja intensidad, pero con un peso molecular mayor al que se observa durante todo el crecimiento, de la misma manera se muestra a las 336, 408, y 480 hrs la misma isoforma pero con mayor intensidad, en estas isoformas el peso molecular oscila entre los 65 y 70 KDa.

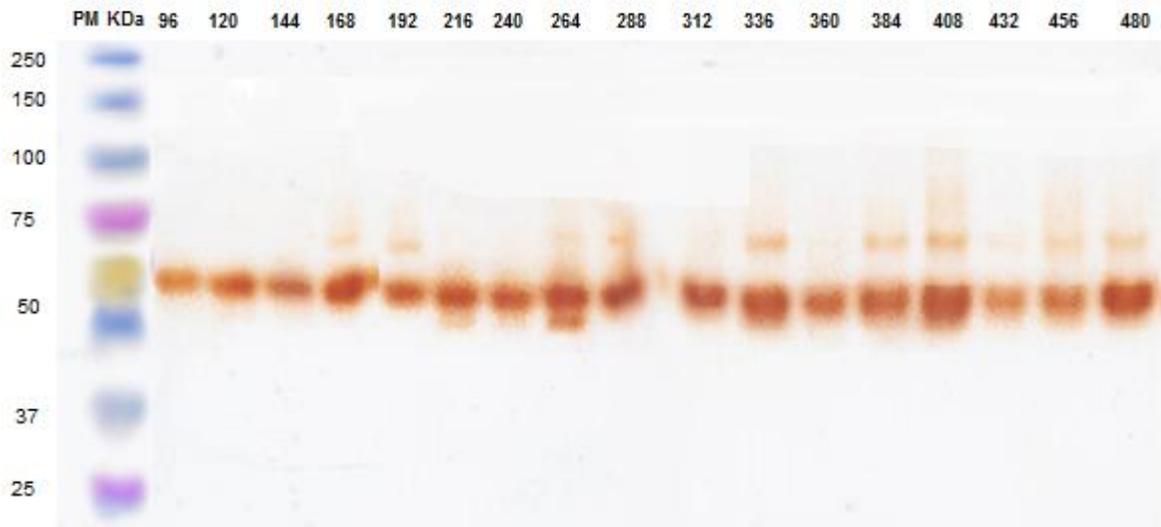


Fig. 13. Perfil zimográfico de lacasas de *P. ostreatus* crecido en 500 mg de DEHF/L en medio líquido.

Con respecto al perfil zimográfico de enzimas lacasas de *P. ostreatus* crecido en 1000 mg de DEHF/L, muestra un incremento en el número de isoformas, produciendo a las 216, 312 y 432 una nueva isoforma con un peso molecular entre los 85 y 95 KDa. Así como algunas isoformas que se presentaron en el perfil de producción del medio conteniendo 500 mg de DEHF/L, sin embargo a diferentes horas, a las 96, 168, 192, 264 y 432 h. El perfil zimográfico muestra también la misma banda correspondiente al MSAF, isoformas constitutivas.

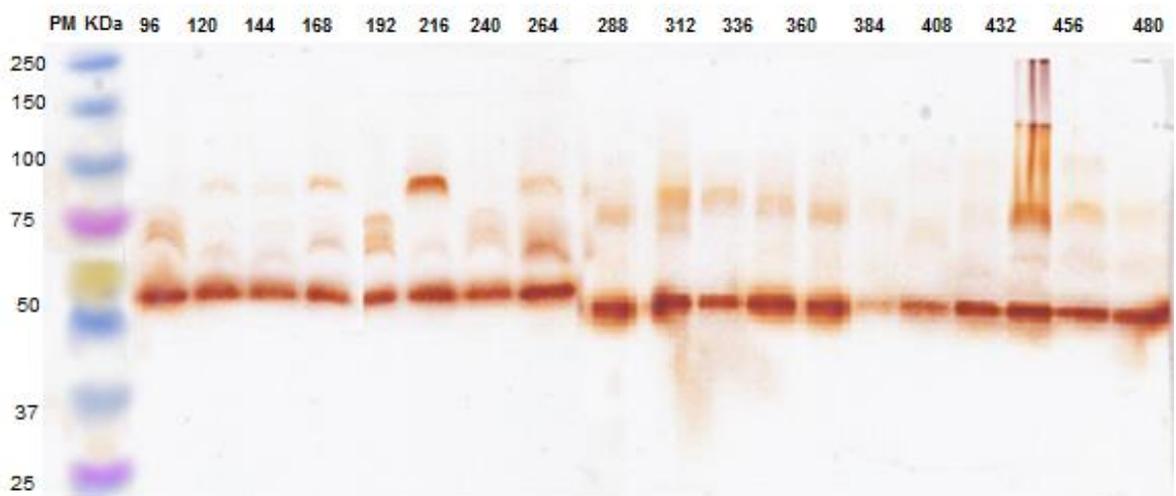


Fig. 14. Perfil zimográfico de lacasas de *P. ostreatus* crecido en 500 mg de DEHF/L en medio líquido.

### 7.5. Consumo de glucosa por *P. ostreatus* crecido sobre DEHF en medio líquido

En la siguiente figura se muestra el consumo de glucosa inicial para el crecimiento en los tres medios de cultivo. En el MSAF el consumo de glucosa se da a mayor velocidad y se consume en su totalidad a las 290 h tiempo que corresponde al inicio de la fase estacionaria del crecimiento de *P. ostreatus*. Con respecto al medio conteniendo 500 mg de DEHF/L el consumo se total se da a las 350 h de fermentación y el medio de 1000 mg de DEHF/L pierde en su totalidad la glucosa inicial de crecimiento a las 380 h de crecimiento (Fig. 15).

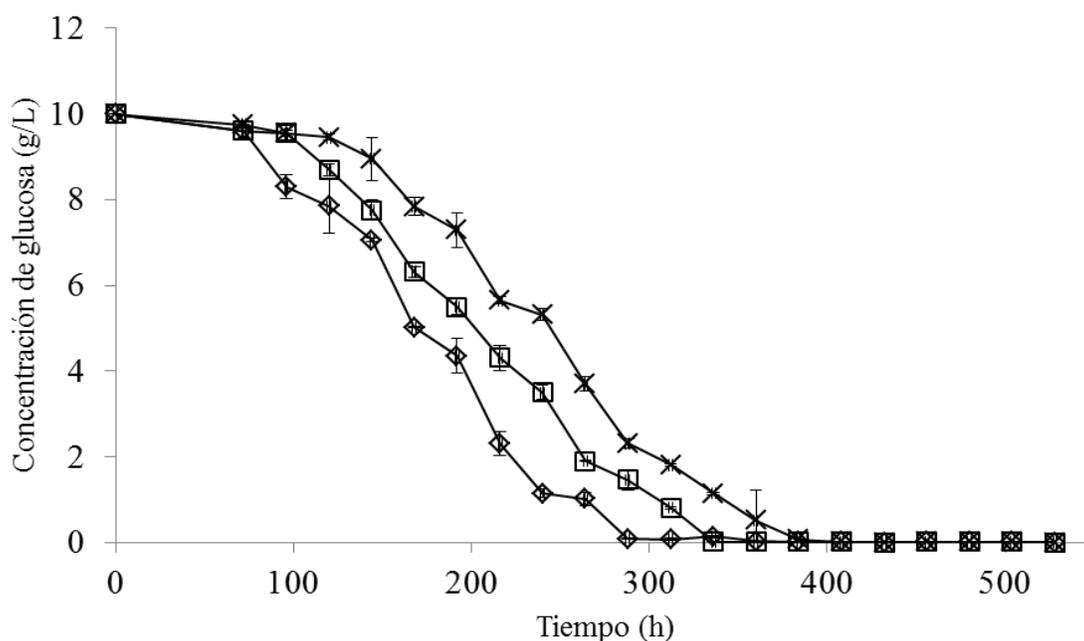


Fig. 15. Azúcares reductores de los cultivos de *P. ostreatus* crecido en (MSAF) (◇), 500 (□) y 1000 (x) mg de DEHF/L en medio líquido.

### 7.6. Parámetros cinéticos de crecimiento de *P. ostreatus* crecido sobre DEHF en medio líquido.

En la Tabla 5 se muestran los parámetros cinéticos de crecimiento de *P. ostreatus* crecido en el MSAF, 500 mg de DEHF/L y 1000 mg de DEHF/L. La  $\mu$  que se obtuvo en todos los medios de cultivo no es significativamente diferente ( $P < 0.05$ ). La mayor  $X_{max}$  se mostró en el medio de cultivo conteniendo 1000 mg de DEHF/L seguido por el medio de 500 mg de DEHF/L,

para los tres medios de cultivo se mostró diferencia significativa entre sus medias ( $P<0.05$ ). El  $Y_{X/S}$  fue significativamente mayor en el medio conteniendo 1000 mg de DEHF/L ( $P<0.05$ ). Para ambos parámetros el valor menor fue mostrado en el MSAF.

Tabla 5. Parámetros cinéticos de crecimiento de *P. ostreatus* crecidos sobre DEHF en medio líquido.

Parámetro	Medio de cultivo		
	MSAF	500 mg de DEHF/L	1000 mg de DEHF/L
$X_{max}$ (g/L)	5.1 <sup>c</sup> (0.01)	6.5 <sup>b</sup> (0.001)	7.6 <sup>a</sup> (0.002)
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.020 <sup>a</sup> (0.001)	0.022 <sup>a</sup> (0.001)	0.019 <sup>a</sup> (0.002)
$Y_{X/S}$ (gX/gS)	0.51 <sup>c</sup> (0.02)	0.65 <sup>b</sup> (0.004)	0.76 <sup>a</sup> (0.001)

Se reporta la media y entre paréntesis la desviación estándar. Las medias del mismo renglón con diferentes letras son significativamente diferentes ( $p<0.05$ ).

### 7.7. Parámetros cinéticos de producción de lacasas de *P. ostreatus* crecidos sobre DEHF en medio líquido

En la siguiente tabla se muestran los parámetros cinéticos de producción de lacasas de *P. ostreatus* en los medios MSAF, 500 mg de DEHF/L y 1000 mg de DEHF/L. Con respecto a la  $E_{max}$ ,  $Y_{E/X}$ ,  $P_{RO}$  y la  $q_p$  se muestra el mayor valor en el medio conteniendo 1000 mg de DEHF/L, siendo significativamente diferente a los medios conteniendo 500 mg de DEHF/L y al MSAF ( $P< 0.05$ ). No se mostró diferencia significativa ( $P>0.001$ ) en los medios MSAF y 500 mg de DEHF/L para el  $Y_{E/X}$ . Con respecto a la  $E_{max}$  y la  $P_{RO}$  se mostró diferencia

significativa ( $P < 0.05$ ) para los medios MSAF, 500 mg de DEHF/L y 1000 mg de DEHF/L. La  $q_p$  no mostró diferencia significativa en los medios MSAF y 500 mg de DEHF/L (Tabla 6).

Tabla 6. Parámetros cinéticos de producción de lacasas de *P. ostreatus* crecido sobre DEHF en medio líquido.

Parámetro	Medio de cultivo		
	MSAF	500 mg de DEHF/L	1000 mg de DEHF/L
$E_{max}$ (U/L)	6,605.9 <sup>c</sup> (355)	7,962.2 <sup>b</sup> (49.3)	8,973.8 <sup>a</sup> (89)
$Y_{E/X}$ (U/gX)	1,270.3 <sup>a</sup> (72)	1,224.9 <sup>b</sup> (86)	1,180.7 <sup>c</sup> (54)
$P_{RO}$ (UL/h)	21.1 <sup>a</sup> (0.04)	17.4 <sup>c</sup> (0.9)	19.6 <sup>b</sup> (1.4)
$q_p$ (Uh/hX)	25.4 <sup>a</sup> (0.02)	26.9 <sup>a</sup> (0.08)	22.4 <sup>b</sup> (0.04)

Se reporta la media y entre paréntesis la desviación estándar. Las medias del mismo renglón con diferentes letras son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

## 8. DISCUSIÓN

Un gran número de funciones matemáticas han sido diseñadas para describir el crecimiento microbiano, entre ellas el modelo de Gompertz y el de la ecuación logística (Turner y cols. 1976; Frace y Thornley, 1984). Winsor (1932) utilizó el modelo de Gompertz para la descripción de fenómenos biológicos y económicos asociados al crecimiento. Este modelo asume que la tasa de crecimiento postnatal se incrementa monótonicamente hasta cuando alcanza un máximo y después decrece en forma monótona asintóticamente. La correspondiente curva de crecimiento es una sigmoideal, con un punto de inflexión (el cual corresponde a la máxima tasa de crecimiento con la edad) y una asíntota (Lawrence y Flower, 2002). En la fase inicial de la curva se observa un periodo donde la tasa de crecimiento es cercana a 0, también denominada fase lag (Devlieghere y cols. 2008), y se describe como el tiempo en el cual se presenta la maduración del sistema y se estructura el requerimiento de mantenimiento, su duración está limitada por el valor delta. Este valor corresponde a la edad, a la cual la línea tangente al punto de inflexión, corta el eje X. Sin embargo, Bacaër (2011)

menciona que el modelo de la ecuación logística es un modelo apropiado para el modelamiento matemático del crecimiento microbiano, prioritariamente cuando una de las constantes es el incremento en la biomasa con respecto al tiempo y al consumo de la fuente de carbono, siempre y cuando se controlen factores intrínsecos y extrínsecos de crecimiento. En relación a lo propuesto por los dos modelos matemáticos, Cayré y cols. (1995) menciona que existe en ambos modelos un buen ajuste entre los datos experimentales y los valores predichos por los modelos. El coeficiente de determinación  $R^2$  para los dos modelos es superior al 97% lo que demuestra que ambos explican un alto porcentaje de la variabilidad de los datos. En esta investigación se utilizó el modelo logístico para explicar el crecimiento de *P. ostreatus* crecido en fermentación líquida, debido a que muestra un ajuste perfecto en las cinéticas del crecimiento lo cual indica que es un buen modelo para describir el comportamiento de este hongo bajo las condiciones de fermentación evaluadas. Tlecuítl-Beristain y cols. (2008) Con la misma especie de hongo, pero diferente cepa y medio de cultivo suplementado con sulfato de amonio a un pH inicial de crecimiento de 6.0, obtuvieron valores de  $\mu$  de 0.02 h<sup>-1</sup> y una  $X_{\max}$  de 7.8 g/L, en otro estudio realizado en fermentación líquida y sólida con un medio de cultivo suplementado con extracto de levadura a pH 6.5 y la misma especie de hongo, observaron valores de  $\mu$  de 0.022 y 0.033 h<sup>-1</sup>, la  $X_{\max}$  fue de 5.5 y 4.5 g/L para la fermentación líquida y sólida respectivamente (Téllez-Téllez y cols. 2008). Similar a lo anterior, en este estudio se utilizó el mismo medio de cultivo al mismo pH inicial de crecimiento como testigo positivo, sin embargo contradictorio a los autores antes mencionados, se obtuvo una  $\mu$  de 0.019 h<sup>-1</sup> y 0.020 h<sup>-1</sup> en los medios conteniendo 1000 mg de DEHF/L y el MSAF respectivamente, además una  $X_{\max}$  de 7.6 g/L como la mayor biomasa, y disminuye conforme disminuye la concentración del ftalato, resultados mayores a los obtenidos por Téllez-Téllez y cols. (2008). Con respecto la producción de enzimas lacasa y los parámetros cinéticos de producción, Díaz y cols. (2010) evaluó diferentes parámetros cinéticos de producción ( $E_{\max}$ ,  $Y_{E/X}$ ,  $P_{RO}$  y la  $q_p$ ) en diversas cepas del género *Pleurotus* crecido en dos diferentes medios de cultivo; uno con la adicción de Cu y otro sin la adicción de éste, encontrando que en el medio de cultivo suplementado con la adicción de Cu la cepa de *P. ostreatus* 83 mostró los mayores valores en los parámetros cinéticos de producción de la enzima lacasa, crecido en el medio suplementado con la adicción de Cu. Comparando los resultados obtenidos en esta investigación con base en el estudio anterior, la cepa de *P. ostreatus* 50 obtuvo el doble de la producción de lacasas, así

como de los parámetros cinéticos de producción de la enzima. Algo similar a lo encontrado en esta investigación, es lo que concuerda con los resultados obtenidos por Córdoba-Sosa y cols. (2014) en el cual emplean una cepa de *P. ostreatus* crecido sobre diferentes concentraciones de DEHF, mayores a las empleadas en esta investigación, sin embargo tanto los parámetros cinéticos de crecimiento, como los parámetros cinéticos de producción son mayores en el medio que contiene la mayor concentración de DEHF.

Auactizin y cols. (2014) sugieren que los perfiles del pH de los medios de cultivo conteniendo sales minerales más la adición de ftalatos disminuyen conforme transcurre la fermentación líquida, debido a la formación de ácidos hexadecanoicos y octadecanoicos, mientras que Díaz y cols. (2013) mencionan que los perfiles de pH de los cultivos de hongos en medios conteniendo un medio de glucosa, extracto de levadura y sales minerales, se mantienen al mismo pH con respecto al pH inicial de crecimiento o se incrementan mientras transcurren los días de fermentación debido a la formación de compuestos aminados con carga negativa permitiendo la formación de grupos OH en los medios. Con respecto a los perfiles del pH, en esta investigación se muestra que en los cultivos de *P. ostreatus* conteniendo ftalatos el pH disminuye conforme transcurren los días de fermentación obteniendo valores de 5.6 como mínimo en el medio conteniendo 500 mg de DEHF/L y de 4.1 en el medio conteniendo 1000 mg de DEHF/L. Existen enzimas implicadas en la degradación de ftalatos, estas enzimas actúan en diferentes niveles de la degradación. Hwang y cols. (2012) reportan la presencia de esterasas y lacasas como principales enzimas involucradas en la degradación de BBF por *P. ostreatus*, mostrando valores de actividad de esterasas superiores a los de las lacasas. Mientras que Tanaka y cols. (2000) mencionan que la presencia de lacasas en la degradación de esteres de ftalato es indispensable para la ruptura del anillo aromático, liberado una vez roto el enlace éster por acción de las esterasas. De igual manera a lo mencionado anteriormente Córdoba-Sosa y cols. (2014) obtuvieron valores de esterasas que se mantuvieron constantes con respecto a los obtenidos en lacasas, sin embargo la actividad de lacasas fue bastante mayor en comparación con las esterasas de *P. ostreatus*. Los resultados obtenidos en esta investigación muestran de igual manera a lo mencionado por Córdoba-Sosa y cols. (2014) *P. ostreatus* produce mayor cantidad de lacasas conforme aumenta la concentración del éster de ftalato. Otro estudio que concuerda con lo encontrado en esta investigación, fue lo descrito por Yeo y cols. (2008) donde evaluaron el incremento en la producción de la enzima lacasa de *P.*

*tremelosa* crecido sobre diferentes disruptores endocrinos: DEF, BBF y bisfenol A (BFA). Observaron incrementos hasta de 10 veces más la actividad de lacasas con respecto al medio control y al medio que contiene BFA. Con respecto al consumo de glucosa, Téllez-Téllez (2011) evaluaron el consumo de glucosa por *P. ostreatus* crecido en medio líquido, utilizando el MSAF que empleamos en esta investigación, encontrando que la cepa de *P. ostreatus* consume en su totalidad la glucosa a las 300 h de fermentación. Resultados similares a lo que reporta Téllez-Téllez (2011) fue lo que se encontró en esta investigación, donde el consumo de glucosa en el MSAF se da a la misma hora con respecto a lo reportado por el autor antes mencionado, sin embargo, en los medios que contiene el DEHF, el consumo de la glucosa se ve de manera más lento conforme aumenta la concentración del ftalato. Los estudios más recientes en relación a la producción de isoformas de lacasas muestran que, el pH inicial de crecimiento así como el pH de actividad es un factor delimitante para la producción de isoformas de lacasas, y que el pH óptimo de producción de isoformas de lacasas es de 6.5, sin embargo los perfiles zimográficos de lacasas revelados sobre un buffer de 4.5 de pH muestran un mayor número de isoformas de esta enzima (Díaz y cols. 2013). Xu y cols. (1996) fueron los primeros en realizar estudios en relación al incremento de las isoformas de lacasas utilizando un medio de cultivo con la adición de hidrocarburos policíclicos aromáticos encontrando que ciertos xenobióticos tienen un efecto directo en la producción de isoformas de lacasas debido a la presencia de anillos aromáticos en su estructura y que el peso molecular de estas oscila entre los 95 y 65 KDa. Algo similar a lo reportado por estos autores fue lo encontrado en esta investigación, donde la presencia del DEHF tiene un efecto directo sobre la producción del número de isoformas ya que conforme aumenta la concentración de este compuesto aumenta el número de isoformas de lacasas, esto podría ser debido a que el DEHF presenta un anillo bencénico en su estructura primaria, que después de la ruptura del enlace éster por las enzimas esterases este queda libre en el medio de cultivo y así induce la presencia de isoformas que actúan directamente en la degradación secundaria de este compuesto, que es la eliminación del anillo aromático que presenta, para así convertirlo en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O.

## 9. CONCLUSIÓN

- Se obtuvo una  $\mu$ , una  $X_{\max}$  y una  $E_{\max}$  mayor en el medio de 1000 mg de DEHF/L en comparación con el medio conteniendo 500 mg de DEHF/L y del medio sin adición de ftalato, lo que nos permite sugerir que el DHEF es utilizado como fuente de carbono para el incremento de la biomasa y la producción de lacasas ya que el 50 % de la fuente de carbono es empleada por el hongo para el incremento de sus estructuras celulares y el otro 50 % para la producción de sus metabolitos, esta sugerencia se emite con base al consumo de la glucosa que se da en un 100 % en todos los medios de cultivo.
- *P. ostreatus* mostró valores de pH ácidos en el medio que contenía 1000 mg de DEHF/L, lo que nos permite sugerir que la disminución de este parámetro es una medida indirecta de la degradación de este compuesto ya que se producen ácidos orgánicos como productos de la degradación.
- Se mostró un efecto del DEHF sobre la actividad y perfiles zimográficos de lacasas, observándose por lo menos 3 isoformas distintas de lacasas al aumentar la concentración de este compuesto, sugiriendo así que el DEHF podría ser un inductor de alguna isoforma de lacasas.
- Estos resultados sugiere que la presencia de largas cadenas hidrocarbonadas son utilizadas para la producción de la biomasa y que los anillos aromáticos en su estructura son un inductor de la enzima por lo cual se obtienen valores de actividad enzimática y producción de isoformas de lacassa mediado por la inducción que se da en estas debido a la presencia de los anillos aromáticos del DEHF.

## 10. PERSPECTIVAS

- Realizar la cuantificación de la expresión de los genes que codifican a las izoenzimas de lacasas utilizando la técnica de RT-PCR, mediante la extracción del ARN del micelio para la posterior síntesis del cDNA utilizando los primer diseñados por (Díaz y cols. 2013).

- Evaluar la degradación del DEHF empleando la técnica de GC-MS para obtener los productos de la degradación así como el % de la misma.

## 11. REFERENCIAS

- Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K.H., Covaco-Paulo, A., Gübitz. 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsute*. *Applied and Environment Microbiology* 66: 3357-3362.
- Agemato, H., Komimato, M., Shibamoto, T., Yoshika, H., Nishida, R., Kamoto, O., Shin, T., Murao. 1993. Transformation of 7-(4-hidroxiphenylacetamido) cephalosporonic acid into a new cephalosporonic acid by laccase. *Biosciencias, Biotechnology and Biochemistry* 57: 1387-1388.
- Ahn, J., Kim, Y., Min, J., Lee, J. 2006. Accelerated degradation of dipentyl phthalate by *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* cutinase and toxicity evaluation of its degradation products using bioluminiscent bacteria. *Current Microbiology* 52: 340-344.
- Ainsworth, A.M., Rayner, A.D.M. 1991. Ontogenic stages from coenocyte to basidiome and their relation to phenoxidase activity and colonisation processes in *Phanerochaete magnoliae*. *Mycology Research* 95: 1414-1422.
- Alexandre, G., Bally, R., Taylor, B.L., Zhulin, I.B. 1999. Loss of cytochrome oxidase activity and acquisition of resistance to quinone analogs in a laccase-positive variant of *Azospirillum lipoferum*. *Journal Bacteriology* 181: 6730-6738.
- Ardon, O., Kerem, Z. Hadar, Y. 1998. Enhancement of lignin degradation and laccasa activity in *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract. *Journal Microbiology* 44: 676-680.

- Asgher, M., Bhatti, H., Ashraf, M., Legge, R. 2008. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation* 19: 771-783.
- Axtell, C., Johnston, C.G. Bumpus, J.A. 2000. Bioremediation of soil contaminated with explosives at the naval weapons station yorktown. *Soil Sediment Contamination* 9: 537-548.
- Bacaër, N. 2011. Verhulst and the logistic equation (1838). *A Short History of Mathematical Population Dynamics*. 35-39.
- Baldrian, P. 2005 Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiology Review* 30: 215-242
- Benjamin, S., Pradeep, S., Josh, M.S., Kumar, S., Masai, E. 2015. A monograph on the remediation of hazardous phthalates. *Journal of Hazardous Material*. 298:58-72.
- Brena, O., Bianchi, E. 1990. Immobilized laccase for phenolic removal must and wine. *Biotechnology* 16: 34-40.
- Call, H.P. 1994. Process for modifyng, breaking down or beaching lignin, material containing lignin or like substance. *World Patent Application* W094/29510.
- Catwright, D.C., Owen, S.A., Thompson, I.P., Burns, R.G. 2000. Biodegradation of diethyl phthalate in soil by a novel pathway. *Microbiology Letters* 186: 27-34.
- Cayré, M.E., Vignolo G., Garro O.A. 1995. Validación y comparación de modelos de crecimiento microbiano. <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2001/8-Exactas/E-005.pdf>
- Chang, B., Wang, T., Yuan, S. 2007. Biodegradation of four phthalate esters in sludge. *Chemosphere* 69: 1116-1123.

- Chang, B.V., Yang, C.M., Cheng, C.H., Yuan, S.Y. 2004. Biodegradation of phthalate esters by two bacteria strains. *Chemosphere* 55: 533-538.
- Chatterje, S., Dutta, T. 2008. Complete degradation of butyl benzyl phthalate by a defined bacterial consortium: Role of individual isolates in the assimilation pathway. *Chemosphere* 70: 933-941.
- Chefetz, B., Chen, Y., Hadar, Y. 1998. Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3175-3179.
- Christian, V., Shrivastava, R., Shukla, D., Modi, H.A., Vyas, B.R. 2005. Degradation of xenobiotic compounds by lignin-degrading white-rot fungi: enzymology and mechanisms involved. *Indian Journal of Experimental Biology* 43: 301-312.
- Claus, H. 2003. Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives Microbiology* 179: 145-150.
- Claus, H. 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* 35: 93-96.
- Cliffe, S., Famer, M.S., Maier, G., Takata, K., Ritter, G. 1990. Enzyme assay for the phenolic content of natural juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 1824-1828.
- Córdoba-Sosa, G., González-Márquez, A., Torres, J.L., Ahuactzin-Perez, M., Díaz-Godínez, G., Díaz, R., Cuamatzi-Muñoz, M., Sánchez, C. 2014. Growth of *Pleurotus ostreatus* on different concentrations of di (2-ethyl hexyl) phthalate in solid and in liquid media. *Mycoscience*. (In press).
- D' Souza, T.M., Merritt, S.C., Readdy, A. 1999. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied and environmental Microbiology*, 65 (12) 5307-5313.

- De Marco, A., Roubelakis-Angelakis, K.A. 1997. Laccase activity could contribute to cell-wall reconstitution in regenerating protoplasts. *Phytochemistry* 46: 421-425.
- Deleé, W., Oneil, C., Hawkes, F.R., Pinheiro, H.M. 1988. Anaerobic treatment of textile effluents: a review. *Journal Chemical Technology Biotechnology* 73: 323-335.
- Dennis, D.A., Chapman, P.J., Dagley, S. 1973. Degradation of protocatechuate in *Pseudomonas testosteroni* by a pathway involving oxidation of product of metafission. *Journal Bacteriology* 113: 521-523.
- Devlierghe, F., Francois, K., Vermeulen, A. and Debevere, J. 2008. Predictive microbiology, Chapter 3. In: Costa R and Kristbergsson K editors. Predictive modeling and Risk assessment. 29-60.
- Diamantidis, G., Effosse, A., Potier, P., Bally, R. 2000. Purification and characterization of the first bacterial laccases in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum*. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 919-927.
- Díaz, R., Téllez-Téllez M., Sánchez, C., Bibbins-Martínez, MD., Díaz-Godínez, G., Soriano-Santos, J. 2013. Influence of initial pH of the growing medium on the activity, production and genes expression profiles of laccase of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology* 16 (4).
- Díaz-Godínez, G., Soriano, J., Augur, C., Viniegra-González, G. 2001. Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26: 271-275.
- Díaz-Godínez, G., Téllez-Téllez, M., Sánchez, C. Aplicaciones biotecnológicas de hongos del género *Pleurotus*. España. 2012. Ed., Lambert Española.

- Ducros, V., Brzozowski, A.M., Wilson, K.S., Brown, S.H., Ostergaard, P., Schneider, P., Yaver, D.S., Pedersen, A.H., Davies G.J. 1998. Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. *Nature Structural and Molecular Biology* 5: 310-316.
- Dúran, N., Rosa, A.M., D'Ammnibale, A., Gianfreda, L. 2002. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology*. 31: 907-9031.
- Eaton, R.W., Ribbons, D.W. 1982. Metabolism of dibutyl phthalate and phthalate by *Micrococcus* sp strain 12b. *Journal Bacteriology* 151:48-57.
- Eggert, C., LaFayette, P.R., Temp, U., Eriksson, K.E., Dean, J. 1998. Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarius*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1766-1772.
- Eggert, C., Temp, U., Eriksson, K.E. 1996. The ligninolytic system of the write rot fungus *Pycnoporus cinnsbarinus*: purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1151-1158.
- Eisenreich, S.J., Looney, B.B., Thornton, J.D. 1981. Airborne organic contaminants in the Great Lakes ecosystem. *Environmental Science Technology* 15: 30-38.
- European Council for Plasticisers and Intermediates (ECPI). 2001. Eco-profile of high volume commodity phthalate esters (DEHP/DINP/DIDP). ECOBILAN. Price Waterhouse Coopers. La Défense, France, ([www.ecpi.org/upload/documents](http://www.ecpi.org/upload/documents)).
- F. Xu, W. S. Shin, S. H. Brown, J. A. Wahleithner, U. M. Sundaram, and E. I. Solomon, "A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit

- significant differences in redox potential, substrate specificity and stability,” *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1292, pp. 303–311, 1996.
- Fernández-Sánchez, J.M., Rodríguez, R., Ruiz-Aguilar, G., Álvarez, P.J.J. 2001. PCB Biodegradation in aged contaminated: Interactions between exogenous *Phanerochaete chrysosporium* and indigenous microorganisms. *Journal Environmental Science Health* 36: 1145-1162.
- Frace, J., Thornley, J.M.H. 1984. *Mathematical Models in Agriculture*. London Butterworths.
- Froehner, S.C., Eriksson, K.E. 1974. Purification and properties of *Neurospora crassa* laccases. *Journal of Bacteriology* 120: 458-465.
- Gavala, H.N., Alatríste-Mondragón, F., Iranpour, R., Ahring, B.K. 2003. Biodegradation of phthalate esters during the mesophilic anaerobic digestion of sludge. *Chemosphere* 52: 673-682.
- Gavnholt, B., Larsen, K. 2002. Molecular biology of plant laccases in relation to lignin formation. *Physiology Plant* 116: 273-280.
- Gianfreda, L., Xu, F., Bollag, J.M. 1999. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal* 3: 1-25.
- Giardina, P., Palmieri, G., Scaloni, A., Fontanella, B., Faraco, V., Cennamo, G., Sannia, G. 1999. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Journal* 34: 655-663.
- Gold, M., Alic, M. 1993. Molecular biology of the lignin-Degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiological Reviews* 57: 605-622.
- Gu, J.D., Li, J., Wang, Y. 2005. Biochemical pathway and degradation of phthalate ester isomers by bacteria. *Water Science Technology* 52: 241-248.

- Harald, C. 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*. 35: 93-96.
- Hauser, R., Calafat, A.M. 2005. Phthalates And Human Health. *Occup Environ Med*. 62: 806–818.
- Hazardous Substance Data Bank (HSDB). 1994. National Library of Medicine. National Toxicology Information Program. Bethesda, MD, USA.
- Helm D. 2007. Correlation between production amounts of DEHP and daily intake. *Science of The Total Environment*. 388: 389-391.
- Herrera, T., Ulloa. 1998. El reino de los hongos: Micología básica y aplicada. Fondo de cultura económica-UNAM. México. Pp 552.
- Horn, O., Nalli, S., Cooper, D., Nicell, J. 2004. Plasticizer metabolites in the environment. *Water Resercher*. 38: 3,693-3698.
- Hwang, S., Soon-Seok, K., Hyoung, T., Hong-Gyu, S. 2008. Biodegradation of endocrine-disrupting phthalates by *Pleurotus ostreatus*. *Journal microbiology biotechnology* 18(4): 767-772.
- Hwang, S.S., Kim, H.Y., Ja, K.O., Song, H.G. 2012. Changes in the activities of enzymes involved in the degradation of butylbenzyl phthalate by *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22 (2): 239 – 243.
- Keyser, P., Pujar, B.G., Eaton, R.W., Ribbons, D.W. 1976. Biodegradation of phthalates and their esters by bacteria. *Environmental Health Perspective* 18: 159-166.
- Khalil, M.I., Hoque , M.M., Basunia, M.A., Alam, N., Khan, M.A. 2011. Production of cellulase by *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* in solid state fermentation of lignocellulosic biomass. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 35: 333–341.

- Kiiskinen, L., Kristiina, K., Michael, B., Erkkö, Y., Matti, S., Markku, S. 2004. Expression of *Melanospora albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme. *Microbiology* 150: 3065-3074.
- Kim, H.Y., Song, H.G. 2000. Comparison of 2, 4,6-trinitrotoluene degradation by seven strains of white rot fungi. *Current Microbiology* 41: 317-320.
- Kim, Y.H., Lee, J. 2005. Enzymatic degradation of dibutyl phthalate and toxicity of its degradation products. *Biotechnology Letters* 27: 635-639.
- Kim, Y.H., Lee, J., Ahn, J.Y., Gu, M.B., Moon, S.H. 2002. Enhanced degradation of an endocrine-disrupting chemical, butyl benzyl phthalate, by *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisii* cutinase. *Applied Environmental Microbiology* 68: 4684-4688.
- Koch, H.M., Rossbach, B., Drexler, H., Angerer, J. 2003. Internal exposure of the general population to DEHP and other phthalates-determination of secondary and primary phthalates monoester metabolites in urine. *Environmental Research* 93: 177-185.
- Koo, J.W., Lee, K.S., Park, C.Y., Koo, H.J., Lee, B.M. 2003. Biomarker-based exposure to phthalate and related factors with demographics. *Journal Toxicology Public Health* 19(4): 297-301.
- Kunamneni, A., Camarero, S., Garcia-Burgos, C., Plou, F., Ballesteros, A., Alcalde, M. 2008. Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microbial Cell Factories* 7:32.
- Larsson, S., Cassland, P., Jönson, L.J. 2001. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1163-1170.

- Lawrence, T.L.J. and Fowler, V.R. 2002. Prenatal and postnatal growth Lawrence TLJ and Fowler VR editors. Growth of farm animals, 2nd editions, CAB International. 347.
- Leammler, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*.227: 680-685.
- Leatham, G.F., Stahmann, M.A. 1981. Studies on the laccase of *Lentinus edodes*: specificity, localization and association with the development of fruiting bodies. *Journal of General Microbiology* 125: 147-157.
- Lebedeva, G.V., Proskuryakov, M.T. 2009. Purification and characterization of milk-clotting enzymes from oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm). *Applied Biochemistry and Microbiology* 45: 623–625.
- Lee, S., Lee, J., Koo, B., Kim, M., Choi, D., Choi, I. 2007. Dibutyl phthalate biodegradation by the white rot fungus *Polyporus brumalis*. *Biotechnology bioengineering* 97: 1516-1522.
- Liang, D., Zhang, T., Herbert, H., He, J. 2008. Phthalates biodegradation in the environment. *Applied Microbiology Biotechnology* 80: 183-198.
- Linder, M.B., Szilvay, G.R., Nakari-Setälä., Penttilä, M.E. 2005. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microbiology Review* 29: 877-896.
- Liu, P.S., Lin, C.M. 2002. Phthalates suppress the calcium signaling of nicotinic acetylcholine receptors in bovine adrenal chromaffin cells. *Toxicology Applied Pharmacology* 111: 139-145.
- Loera, O., Pérez, C., Barbosa, J., Villaseñor, F. 2006. Laccases. *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*. Ed. Guevara-González R., Torres-Pacheco I. pag. 323-340. ISSN: 81: 7736-269-0.

- Martinell, M.I. 2006. Impacto de la exposición crónica al contaminante alimentario di (2-etil hexil) ftalato (DEHF) sobre aspectos metabólico nutricionales en animales de experimentación. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas Universidad Nacional del Litoral. 9-30.
- Martínez-Carrera, D., Larque-Saavedra, A., Morales, P., Sobal, M., Martínez, W., Aguilar, A. 1993. Los hongos comestibles en México: Biotecnología de su reproducción. Ciencia y Desarrollo 18 (108): 41-49.
- Martins, L.O., Soares, C.M., Pereira, M.M., Teixeira, M., Costa, T., Joanes, G.H., Henriques, A.O. 2002. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. Journal Biology Chemistry 277: 18849-18859.
- Mayer, A.M., Staples, R.C. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. Phytochemistry 60: 551-565.
- Mayer, M., Staples, C. 2002. Laccase: new fuctions for an old enzyme. Phytochemistry 60: 551-565. 49
- Mersiowsky, I., Weller, M., Ejlertsson, J. 2001. Fate of plasticized PVC products under landfill conditions: a laboratory-scale landfill simulation reactor study. Water Reserch 35: 3063-3070.
- Mikolasch, A., Schauer, F. 2009. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. Applied Microbiology and Biotechnology 82: 605-624
- Moore-Landecker, E. 1996. Fundamentals of fungi. 4Ed. Editorial Prentice Hall. USA. pp 574.
- Niku-Paavola, K.E., Salola, P., Raunio, V. 1988. Lignolytic enzymes of the write rot White rot fungus *Phlebia radiata*. Journal of Biochemistry 254: 877-884.

- Nomura, Y., Nakagawa, M., Ogawa, N., Harashima, S., Oshima, Y. 1992. Genes in *pht* plasmid encoding the initial degradation pathway of phthalate in *Pseudomonas putida*. *Journal Fermentation Bioengenergy* 74: 333-344.
- Ohga, S., Royse, D.J. 2001. Transcriptional regulation of laccase and cellulose genes during growth and fruiting of *Lentinula edode* son supplemented sawdust. *FEMS Microbiology Letters* 201: 111-115.
- Okubo, T., Suzuki, T., Yokoyama, Y., Kano, K., Kano, I. 2003. Estimation of estrogenic and anti-estrogenic activities of some phthalate diester and monoester by MCF-7 cell proliferation assay in vitro *Biological Pharmaceutical Bull* 26: 1219-1224.
- Olivier-Laborde. (1991) <http://setascultivadas.com/articulojunio2003.html>.
- Palmieri, G., Cennamo, G., Faraco, V., Amoresano, A., Sannia, G., Giardina, P. 2003. A typical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 220-230.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Scaloni, A., Capasso, A., Sannia, G. 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biological Chemistry* 272: 31301-31307.
- Palonen, H., Saloheimo, M., Viikari, L., Kruus, K. 2003. Purification, characterization and sequence analysis of a laccase from the ascomycete *Mauginiella* sp. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 854-862.
- Patel, H, Gupte, A., Gupte, S. 2009. Biodegradation of fluoranthene by basidiomycetes fungal isolate *Pleurotus ostreatus* HP-1. *Application of Biochemical Technology* 157: 367-376.

- Ranocha, P., McDougall, G., Hawkins, S., Sterjiades, R., Borderies, G., Stewart, D., Cabanes-Macheteau, M., Boudet, A.M., Goffner, D. 1999. Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases –a divergent gene family- in poplar. *European Journal of Biochemistry* 259: 485-495.
- Rehman, A.U., Thurston, C.F. 1992. Purification of laccase I from *Armillaria mellea*. *Journal of General Microbiology* 138: 1251-1257.
- Reyes, P., Pickard, M.A., Vazquez-Duhalt, R. 1999. Hydroxybenzotriazole increases the range of textile dyes decolorized by immobilised laccase. *Biotechnology Letters* 21: 875-880.
- Rigling, D., Van Alfen, N. 1993. Extra-intracellular laccase of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 3634-3639.
- Rodríguez, E., Pickard, M.A., Vazquez-Duhalt, R. 1999. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi 38: 27-32.
- Rosconi, F., Fraguas, L.F., Martínez-Drets, G., Castro-Sowinski, S. 2005. Purification and characterization of a periplasmic laccase produced by *Sinorhizobium meliloti*. *Enzyme Microbiology Technology* 36: 800-807.
- Saloheimo, M., Niku-Paavola, M.L., Knowlws, J.K.C. 1991. Isolation and structural analysis of the laccase gene lignin-degrading fungus *Phlebia radiate*. *Journal of General Microbiology* 137: 1537-1544.
- Sánchez, C. 1998 Morphogenesis of mushroom fungi: ultrastructural, physiological and histological study of *Pleurotus* species. Tesis de Ph D. Victoria University of Manchester.
- Sánchez, C. 2009. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* 27(2): 85-194.

- Sánchez, C. 2010. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85(5): 1321-1337.
- Sánchez, C., Díaz-Godínez, G., Téllez-Téllez, M. 2012. *Gastronomía y cultivo de setas*. Ed. Lambert Española. España.
- Schneider, P., Caspersen, M.B., Mondorf, K., Halkier, T., Skov, L.K., Ostergaard, P.R., Browns, S.H., Xu, F. 1999. Characterization of a *Coprinus cinereus* laccases. *Enzyme Microbiology Technology* 25: 502-508.
- Sheremata, T.W., Hawari, J. 2000. Mineralization of RDX by the white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* to carbon dioxide and nitrous oxide. *Environmental Science Technology* 34: 3384-3388.
- Soo-Min, L., Jae-Wong, L., Bon-Wook, K., Myung-Kil, K., Don-Ha, C., In-Gyu, C. 2006. Dibutyl phthalate biodegradation by the White rot fungus, *Polyporus brumalis*. *Biotechnology and Bioengineering* 97(6): 1516-1522.
- Stamets, P., Chilton, J.S. 1983 *The Mushroom Cultivation*. Washington. Ed Agarikon conditions. *BioResources* 7(2): 2038-2050.
- Staples, C.A., Peterson, D.R., Parkerton, T.F., Adams, W.J. 1997. The environmental fate of phthalate esters: a literature review. *Chemosphere* 35: 667-749.
- Téllez Téllez, M. (2011). Identificación de una lacasa de *Pleurotus ostreatus* predominante en condiciones de fermentación líquida y caracterización molecular del gen que la codifica. *Ciencias Biológicas y de la Salud*, Doctorado en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana.

- Télez-Télez, M., Díaz-Godínez, G., Aguilar, M.A., Sánchez, C., Fernández F.J. 2012. Description of a laccase gene from *Pleurotus ostreatus* expressed under submerged fermentation. *BioResources* 7(2): 2038-2050.
- Télez-Télez, M., Fernández, J.F., Montiel-González, A.M., Sánchez, C., Díaz-Godínez, G. 2008 Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81: 675-679.
- Télez-Télez, M., Sánchez, C., Loera, O., Díaz-Godínez, G. 2005. Differential patterns of constitutive intracellular laccases of the vegetative phase for *Pleurotus* species. *Biotechnology Letters* 27: 1391-1394.
- Thurston, C.F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140: 19-26.
- Tlecuitl-Beristain, S., Sánchez, C., Loera, O., Robson, G.D., Díaz-Godínez, G. 2008. Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: Production of a novel laccase isoform. *Mycological Research* 112: 1080-1084.
- Turner, M.E.J.R., Bradley, E.L.J.R., Kirk, K.A., Pruitt, K.M.A. 1976. Theory of growth. *Mathematics Bioscience*. 29:367-373.
- United States Environmental Protection Agency (US EPA). 1981. An exposure and risk assessment for phthalate esters: di (2-ethylhexyl) phthalate, di-n-butyl phthalate, dimethyl phthalate, diethyl phthalate, di-n-octyl phthalate, butylbenzyl phthalate. EPA-440/4-81-020. PB85-211236. Office of Water Regulations and Standards. Washington, DC, USA, [www.epa.gov/air/noise.html](http://www.epa.gov/air/noise.html).

- Valencia del Toro, G. 2002. Estudios sobre la expresión de color de los esporóforos de *Pleurotus* spp. Por apareamiento de neohaplontes compatibles y progenies monospóricas. Tesis de doctorado UNAM. México, D.F.
- Velázquez, L., Téllez-Téllez, M., Díaz, R., Bibbins-Martínez, M. D., Loera, O., Sánchez, C., Tlecuítl-Beristain, S., Díaz-Godínez, G. 2014. Laccase isoenzymes of *Pleurotus ostreatus* grown at different pH in solid-state fermentation using polyurethane foam as support. *Annual Research and Review in Biology*. 4(16): 2566-2578.
- Wang, J.L., Chen, L.J., Shi, H.C., Qian, Y. 2000. Microbial deradation of phthalic acid esters under anaerobic digestión of sludge. *Chemosphere* 41: 1245-1248.
- Widsten, P., Kandelbauer. 2008. Laccase applications in the forest products industry: A review. *Enzyme and Microbial Technology*. 42: 293-307.
- Winsor, C.P. 1932. The Gompertz curve as a growth curve. *Proc Natl Acad Sci*. 18:1-7.
- Xu, X.R., Li, H.B., Gu, J.D. 2005. Biodegradation of an endocrine-disrupting chemical di-*n*-butyl phthalate ester by *Pseudomonas fluorescens* B-1. *Int Biodeter Biodegrad* 55: 9-15.
- Xu, Y., Humbal, E.A.C., Little, J.C. 2010 Predicting residential exposure to phthalate plasticizer emitted from vinyl flooring: sensitivity, uncertainty, and implications for biomonitoring. *Environmental Health Perspective* 118(2): 253-558.
- Yeo, S., Kim, M.K., Choi, H.T. 2008. Increased expression of laccase by the addition of phthalates in *Phlebia tremellosa*. *FEMS Microbiology Letters* 278: 72-77.
- Yuan, S.Y., Liu, C., Liao, C.S., Chang, B.V. 2002. Occurrence and microbial degradation of phthalate esters in Taiwan river sediments. *Chemosphere* 49:1295-1299.

Zeng, F., Cui, K., Li, X., Fu, J., Sheng, G. 2004. Biodegradation kinetics of phthalate esters by *Pseudomonas fluorescences* FS1. *Process Biochemistry* 39: 1125-1129.

Zheng, Z., Levin, R.E., Pinkham, J.L., Shetty, K. 1999. Decolorization of polymeric dyes by a novel *Penicillium* isolate. *Process Biochemistry*. 34: 31-37.