



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Evaluación de la actividad enzimática de oxidasas de *Pleurotus ostreatus* (ARS 3526), crecido en fermentación sólida y líquida

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Maribel González Palma

Director
Dr. Rubén Díaz Godínez

Tlaxcala, Tlax

enero, 2018



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Evaluación de la actividad enzimática de oxidasas de *Pleurotus ostreatus* (ARS 3526), crecido en fermentación sólida y líquida

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Maribel González Palma

Director

Dr. Rubén Díaz Godínez

Asesores

Dra. María del Carmen Sánchez Hernández

Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera

Tlaxcala, Tlax

enero, 2018

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala bajo la dirección del Dr. Rubén Díaz Godínez.

La alumna Maribel González Palma recibió la beca de maestría No. 290789 en la convocatoria No. 291047 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

La Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala está registrada en el programa para el fortalecimiento del posgrado nacional, Padrón Nacional de Posgrado (PNP) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Agradecimientos

Agradezco al posgrado “Maestría en Ciencias Biológicas” del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (CTBC) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, por brindarme todo el apoyo requerido en la realización de esta investigación y permitirme continuar con mi formación académica.

Le agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo para realizar esta investigación a través de la beca No. 290789 durante el periodo enero 2016 – julio 2017.

Le agradezco al laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas (CICB) de la universidad Autónoma de Tlaxcala por abrirme sus puertas y brindarme el apoyo necesario con el uso de equipos e instalaciones para la realización de este proyecto.

Resumen

Durante la realización de esta investigación se evaluó la actividad enzimática de oxidasas del hongo *Pleurotus ostreatus* ARS 3526 desarrollado en fermentación sólida y líquida. En las fermentaciones se utilizó un medio de cultivo que contenía glucosa y levadura como fuente de carbono y nitrógeno, respectivamente. Las fermentaciones se caracterizaron, asimismo, se reportaron los parámetros cinéticos de desarrollo del hongo (μ , X_{\max}) y la producción de lacasa, manganeso peroxidasa, alcohol veratríil oxidasa, versátil peroxidasa y decolorante peroxidasa (productividad $Y_{E/X}$, q_p y E_{\max}).

La fermentación sólida se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 0.5 g de espuma de poliuretano como soporte inerte con 15 mL de medio de cultivo. La fermentación líquida se realizó en matraces de 125 mL con 50 mL de medio de cultivo. Se adicionaron tres fragmentos de micelio del hongo *Pleurotus ostreatus*, de 4 mm de diámetro, como inóculo en ambas fermentaciones. La biomasa se obtuvo por filtración cada 24 h por 15 días para la fermentación sólida y 22 días para la fermentación líquida. Asimismo, se obtuvo un sobrenadante de los dos sistemas fermentativos y se evaluó por espectrofotometría la actividad de lacasa, manganeso peroxidasa, alcohol veratríil oxidasa, versátil peroxidasa y decolorante peroxidasa utilizando como sustrato 2,6-Dimetoxifenol (DMP) a una concentración de 2 mM, sulfato manganeso a 0.5 mM, alcohol veratríilico al 70 mM, sulfato de manganeso a 0.1 mM y 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) a 2.5 mM, respectivamente.

Los resultados obtenidos en esta investigación mostraron que en la fermentación sólida se obtuvo una biomasa máxima de 6.7 g/L a las 552 h con un μ de 0.05 h⁻¹. Con respecto a la actividad enzimática de lacasa, manganeso peroxidasa, alcohol veratríil oxidasa, versátil peroxidasa y decolorante peroxidasa se obtuvo una actividad máxima de 879.660, 10.123, 20.465, 129.128 y 59.840 UI/L a las 144, 72, 288, 192 y 168 h, respectivamente. Para el caso de la fermentación líquida se obtuvo una biomasa máxima de 7.31 g/L a las 552 h con una μ de 0.02 h⁻¹. La actividad enzimática máxima de lacasa, manganeso peroxidasa, alcohol veratríil oxidasa, versátil peroxidasa y decolorante peroxidasa fue de 41.867, 36.238, 20.143, 32.769 y 4.266 UI/L a las 312, 120, 360, 168 y 480 h, respectivamente.

Finalmente, la mayor producción de biomasa y la actividad enzimática de manganeso peroxidasa y versátil peroxidasa de *Pleurotus ostreatus* se registró en la fermentación líquida. Los mejores rendimientos teóricos y la mayor productividad de enzimas oxidasas (lacasa y decolorante peroxidasa) se presentaron en la fermentación sólida. En el caso de la enzima veratríl oxidasa no hay diferencia significativa en los sistemas de fermentación sólida y líquida, con respecto a la productividad. Por lo que se sugiere que *Pleurotus ostreatus* ARS 3526 es un hongo potencial para producir enzimas oxidasas en fermentación sólida y líquida.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES GENERALES	2
2.1. Hongos	2
2.2. Hongos de pudrición de la madera	3
2.2.1. Hongos de pudrición oscura	3
2.2.2. Hongos de pudrición blanda	3
2.2.3. Hongos de pudrición blanca	3
2.3. Basidiomicetes	4
2.4. Género Pleurotus	5
2.5. Fases de crecimiento de Pleurotus ostreatus	6
2.6. Ciclo de vida de Pleurotus	7
2.7. Producción de metabolitos	10
2.8. Enzimas	10
2.8.1. Enzimas ligninolíticas	10
2.8.2. Lacasas	11
2.8.3. Manganese peroxidasa	13
2.8.4. Alcohol veratríil oxidasa	15
2.8.5. Versátil peroxidasa	17
2.8.6. Decolorante peroxidasa	19
2.9. Lignina	21
2.10. Fermentación	22
2.10.1. Fermentación sólida	24
2.10.2. Fermentación líquida	25
2.10.3. Principales diferencias entre la fermentación sólida y líquida	26
3. ANTECEDENTES PARTICULARES	28
4. HIPÓTESIS	33
La producción de enzimas oxidasas de <i>Pleurotus ostreatus</i>, cepa ARS 3526, será distinto en el sistema fermentativo en estado líquido con respecto del medio sólido. ..	33
5. JUSTIFICACIÓN	33
6. OBJETIVOS	34
6.1. General	34
6.2. Particulares	34

7. MATERIALES Y MÉTODOS	35
7.1. Microorganismo de estudio e inóculo	36
7.2. Condiciones del medio de cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i> ARS 3526	36
7.3. Sobrenadante	37
7.4. Biomasa	38
7.5. Parámetros cinéticos de crecimiento del hongo	38
7.6. Análisis estadístico	39
7.7. Determinación del pH	39
7.8. Determinación de la concentración de proteína soluble.....	39
7.9. Determinación del contenido de azúcares.....	39
7.10. Determinación de actividad enzimática.....	40
7.10.1. Actividad de Manganese Peroxidasa	40
7.10.2. Actividad de Alcohol Veratríl Oxidasa.....	40
7.10.3. Actividad de Versátil Peroxidasa.....	40
7.10.4. Actividad de Lacasa.....	40
7.10.5. Actividad de Decolorante Peroxidasa	41
8. RESULTADOS	42
8.1. Fermentación líquida	42
8.1.1. Biomasa de <i>Pleurotus ostreatus</i>	42
8.1.2. Azúcares residuales de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación líquida	43
8.1.3. Perfil de pH.....	44
8.1.4. Proteína soluble de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación líquida	45
8.1.5. Actividad enzimática de lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación líquida	46
8.1.6. Actividad enzimática de alcohol veratríl oxidasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación líquida.....	47
8.1.7. Actividad enzimática de versátil peroxidasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación líquida	48
8.1.8. Actividad enzimática de manganeso peroxidasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación líquida.....	49
8.1.9. Actividad enzimática de decolorante peroxidasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación líquida.....	50
8.2. Fermentación sólida.....	51
8.2.1. Biomasa de <i>Pleurotus ostreatus</i>	51
8.2.2. Azúcares residuales de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación Solida	52
8.2.3. Perfil de pH.....	53
8.2.4. Proteína soluble de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación sólida.....	54
8.2.5. Actividad enzimática de lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación sólida	55
8.2.6. Actividad enzimática de alcohol veratríl oxidasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación sólida.....	56
8.2.7. Actividad enzimática de versátil peroxidasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación sólida.....	57

8.2.8. Actividad enzimática de manganeso peroxidasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación sólida	58
8.2.9. Actividad enzimática de decolorante peroxidasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación sólida.....	59
8.3. Parámetros cinéticos	60
8.3.1. Parámetros cinéticos de lacasas	60
8.3.2. Parámetros cinéticos de alcohol veratríl oxidasa	61
8.3.3. Parámetro cinético de versátil peroxidasa.....	62
8.3.4. Parámetro cinético de manganeso peroxidasa	63
8.3.5. Parámetro cinético de decolorante peroxidasa.....	64
9. DISCUSIÓN	65
10. CONCLUSIONES	70
11. PERSPECTIVAS.....	70
12. REFERENCIAS	71
13. GLOSARIO DE TERMINOS	89
14. PUBLICACIONES.....	91
14.1. Laccase activity and specific growth rate of <i>Pleurotus ostreatus</i> NRRL 3526 grown on solid-sate fermentation and submerged fermentation	91
14.2. Evaluación de enzimas oxidasas y crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> ARS 3526 crecido en fermentación sólida.....	93
14.3. Evaluación de enzimas oxidasas y crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> ARS 3526 desarrollado en fermentación líquida	95
14.4. Evaluación de enzimas oxidasas y crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> ARS 3526 desarrollado en fermentación sólida	99
14.5. Evaluación de enzimas oxidasas y crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> ARS 3526 desarrollado en fermentación sólida y líquida	103

Índice de figuras

FIGURA 25. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE VERSÁTIL PEROXIDASA EN FERMENTACIÓN LÍQUIDA	62
FIGURA 26. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE MANGANESO PEROXIDASA EN FERMENTACIÓN LÍQUIDA (♦) Y SÓLIDA (■). LAS BARRAS QUE SE MUESTRAN EN LOS PUNTOS () ES LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR.....	63
FIGURA 27. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE DECOLORANTE PEROXIDASA EN FERMENTACIÓN LÍQUIDA (♦) Y SÓLIDA (■). LAS BARRAS QUE SE MUESTRAN EN LOS PUNTOS () ES LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR.....	64

Índice de tablas

TABLA 1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL GÉNERO <i>PLEUROTUS</i>	5
TABLA 2. PRESENCIA DE LACASA EN DIVERSOS ORGANISMOS (CASTRO 2005, SHRADDHA Y COLS. 2011).....	11
TABLA 3. COMPARACIÓN ENTRE LOS SISTEMAS DE FERMENTACIÓN LÍQUIDA Y SÓLIDA (SÁNCHEZ HERNÁNDEZ Y COLS. 2015).....	27
TABLA 4. MEDIO DE CULTIVO.....	37
TABLA 5. PARÁMETROS CINÉTICOS DE LACASA PRODUCIDAS POR <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i>	60
TABLA 6. PARÁMETROS CINÉTICOS DE ALCOHOL VERATRÍL OXIDASA PRODUCIDAS POR <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i>	61
TABLA 7. PARÁMETROS CINÉTICOS DE VERSÁTIL PEROXIDASA PRODUCIDAS POR <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i>	62
TABLA 8. PARÁMETROS CINÉTICOS DE MANGANESO PEROXIDASA PRODUCIDAS POR <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i>	63
TABLA 9. PARÁMETROS CINÉTICOS DE DECOLORANTE PEROXIDASA PRODUCIDAS POR <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i>	64

1. INTRODUCCIÓN

Los xenobióticos son sustancias químicas dañinas para el ambiente. En el último siglo se han desarrollado gran variedad de productos con estas sustancias, que terminan en causas de ríos y lagos por equivocación o intencionadamente. Un ejemplo de este tipo de sustancias son los plaguicidas, colorantes y desechos de procesos industriales, como los efluentes de la industria productora de papel y la industria textilera.

La biotecnología propone la biorremediación como alternativa para ayudar a disminuir el problema de contaminación ambiental. Actualmente, la biorremediación de efluentes es mediada por hongos. Como una opción para transformar los plaguicidas en compuestos más simples y poco contaminantes mediante el uso del potencial metabólico de los microorganismos. (Knapp y cols. 1995, Hernández-Ruiz y cols. 2017).

Los hongos del género *Pleurotus* son basidiomicetes de pudrición blanca con un excelente contenido nutricional y terapéutico. La especie *ostreatus* cuenta con elevadas capacidades de producción de enzimas fenoloxidasas y variadas aplicaciones biotecnológicas (Cohen y cols. 2002). Este hongo se encuentra entre las mejores especies productoras de enzimas lignocelulolíticas, por su gran capacidad de degradación de celulosa, hemicelulosa y lignina (Montoya y cols. 2014).

La mayoría de los procesos biotecnológicos están basados en organismos como bacterias, levaduras y hongos, estos se utilizan para la producción de metabolitos primarios y secundarios. En general, la producción de enzimas fenoloxidasas, por ejemplo la lacasa (Lac), manganeso peroxidasas (MnP), versátil peroxidasas (VP), alcohol veratril oxidasas (AVO) y decolorante peroxidasas (DyP), puede llevarse a cabo mediante dos técnicas: fermentación líquida y fermentación sólida (Gómez-Bolívar 2017).

2. ANTECEDENTES GENERALES

2.1. Hongos

Los organismos incluidos en la categoría de hongos son tan diversos que es difícil dar un diagnóstico conciso. La mayoría de los hongos son filamentosos (con crecimiento apical), eucarióticos, aclorófilos, heterótrofos (por absorción), con reproducción asexual y sexual (por medio de esporas) y con pared celular (constituída por quitina o celulosa) (Hawksworth 2001). Se estima que existen alrededor de 712 000 especies de hongos en el mundo, de los cuales el 80 % son hongos microscópicos (Schmit y Mueller 2007). Para el caso de los macro-hongos, a nivel mundial, Aguirre y cols. (2014) mencionaron que se han descrito 21 679 especies.

En México, muchas especies de hongos han sido reportadas como comestibles y algunas de ellas se consumen desde tiempos prehispánicos (Gaitán-Hernández y cols. 2002). Estos hongos a nivel alimentario poseen el doble del contenido de proteínas que los vegetales y presentan nueve aminoácidos esenciales, como leucina y lisina (ausente en la mayoría de los cereales), alta cantidad de minerales, bajo contenido de calorías y carbohidratos. También, se caracterizan por tener propiedades medicinales, por ejemplo retardo en el crecimiento de tumores, disminución de los niveles de colesterol en la sangre, poseen sustancias antioxidantes e inmunomoduladoras (Romero y cols. 2000, Sánchez Escudero 2016).

El conocimiento de los hongos se ha incrementado de tal forma que actualmente es motivo de investigación por numerosos especialistas. Han surgido nuevos conocimientos que incluyen aspectos taxonómicos, ecológicos (productores de biocombustible), nutricionales, productores de alimento (mejorando su textura, digestibilidad, valor nutricional, sabor o apariencia de las materias primas usadas), farmacológicos y bioquímicos (Bermúdez y cols. 2003, Sánchez 2016). Estos, están ligados a la vida del hombre en diversas formas, de ahí la gran importancia de realizar estudios para conocer mejor su biología (Gayosso 2001, Sánchez 2016).

2.2. Hongos de pudrición de la madera

Los hongos presentan gran variedad de formas de vida, distintas características y maneras de degradar la madera. Entre las múltiples clasificaciones que existen en los hongos se menciona la clasificación conforme a la pudrición. En esta se encuentran tres tipos de pudrición, la oscura, blanda y blanca. En donde las enzimas del hongo debilita la madera degradando la celulosa y la lignina de las paredes celulares y sustrayendo la lignina entre las células (Schwarze y cols. 2000, Revueltas 2013).

2.2.1. Hongos de pudrición oscura

Solo el 6 % de los hongos de pudrición conocidos, actualmente, ocasionan la pudrición oscura. Esta pudrición es causada por hongos basidiomicetes principalmente. Este nombre se le atribuye porque al degradar los carbohidratos y polímeros (celulosa y hemicelulosa) presentes en la madera, por ejemplo árboles muertos, restos de hojas y ramas, adquieren un color oscuro y una consistencia quebradiza (Schwarze y cols. 2000, Quiñones 2012).

2.2.2. Hongos de pudrición blanda

La pudrición blanda la causan, generalmente, los hongos descomponedores de la familia de los ascomicetes. También algunos basidiomicetes pueden causar una pudrición similar a la pudrición blanca. Los hongos causantes de pudrición blanda usan un tipo de ataque similar al utilizado por los causantes de pudrición marrón (se degrada preferentemente la celulosa).

Los hongos de pudrición blanda actúan directamente sobre la celulosa y forman a menudo cavidades microscópicas en la pared celular secundaria (Schwarze y cols. 2000). La pudrición blanda adquiere una coloración igual al de la paja en fases avanzadas de la degradación y puede ser difícil distinguirla de la pudrición blanca.

2.2.3. Hongos de pudrición blanca

En este grupo se encuentran principalmente basidiomicetes y ascomicetes. El nombre de pudrición blanca se deriva de la apariencia blanquecina de la madera al remover la lignina, celulosa y hemicelulosa (Schwarze y cols. 2000).

Son organismos aerobios obligados, usan el oxígeno molecular como aceptor terminal de electrones. Su nutrición es por medio de la combustión biológica de la madera y materiales asociados. La vía metabólica de producción de energía interna es a partir de la glucólisis en el citoplasma y ciclo de Krebs en la mitocondria que es la misma que la

mayoría de los organismos aeróbicos (Kirk y Cullen 1998). Las hifas invaden rápidamente las células de la madera y permanecen en la pared del lumen, secretan enzimas y metabolitos que provocan la despolimerización de la hemicelulosa, celulosa y la fragmentación de la lignina (Schwarze y cols. 2000).

Los hongos de pudrición blanca presentan dos patrones de descomposición. La primera, la pudrición simultánea donde la celulosa, hemicelulosa y lignina son removidas simultáneamente, La segunda es la deslignificación, en la cual la lignina es removida antes de la hemicelulosa y celulosa (Schwarze y cols. 2000). Los hongos de pudrición blanca rompen la lignina por un proceso oxidativo por medio de fenol-oxidasas que son formadas y liberadas por la hifa, tales como las enzimas lacasa, manganeso peroxidasa, ligninoperoxidasa, tirosinasas y peroxidases (Herrera-Gamboa y cols. 2015). Los hongos basidiomicetes de pudrición blanca como *Pleurotus ostreatus* producen enzimas involucradas en la degradación de la lignina en su hábitat natural (lacasas, manganeso peroxidasa y no ligninoperoxidasa) (Cohen y cols. 2002, Stajic y cols. 2006). Estos hongos tienen la capacidad de degradar sustancias como dioxinas, bifenilos policlorinados (PCBs), hidrocarburos policíclicos aromáticos, plaguicidas clorados y organofosfatados (Robinson y cols. 2001, Marín 2011). La acción de estos hongos se basa en la no especificidad del sistema enzimático para despolimerizar y mineralizar la lignina (Moeller y Garzón 2003).

2.3. Basidiomicetes

Los basidiomicetes es el grupo más diverso de hongos. Se conocen cerca de 20 000 especies entre las cuales se encuentran las setas, los bejines, falos, hongos de la madera, las royas, carbonos y, también, los hongos gelatinosos; entre todos forman aproximadamente el 30 % de los hongos conocidos. Su característica principal es la formación de basidios, meiosporangios que producen basidiosporas exógenas, uninucleadas y haploides, en cuerpos fructíferos que se les conoce como carpóforos (figura 1) (Menéndez y Oliveros 2004). Entre los basidiomicetes, la especie *Schizophyllum commune* es el modelo más usado para estudiar la morfogénesis del cuerpo fructífero, porque crece en medios sólidos simples y tienen un ciclo de vida corto (Horton y cols. 1999). En los últimos años, *Pleurotus ostreatus* ha adquirido gran importancia como organismo modelo para estudiar el proceso de la morfogénesis, gracias a la facilidad de degradar eficientemente

ligninocelulosa lo que permite cultivarlo en una variedad de sustratos ricos de este polímero (Hadar y cols. 1992, Peñas y cols. 1998, Leonowicz 1999 y Gayosso-Canales 2001).

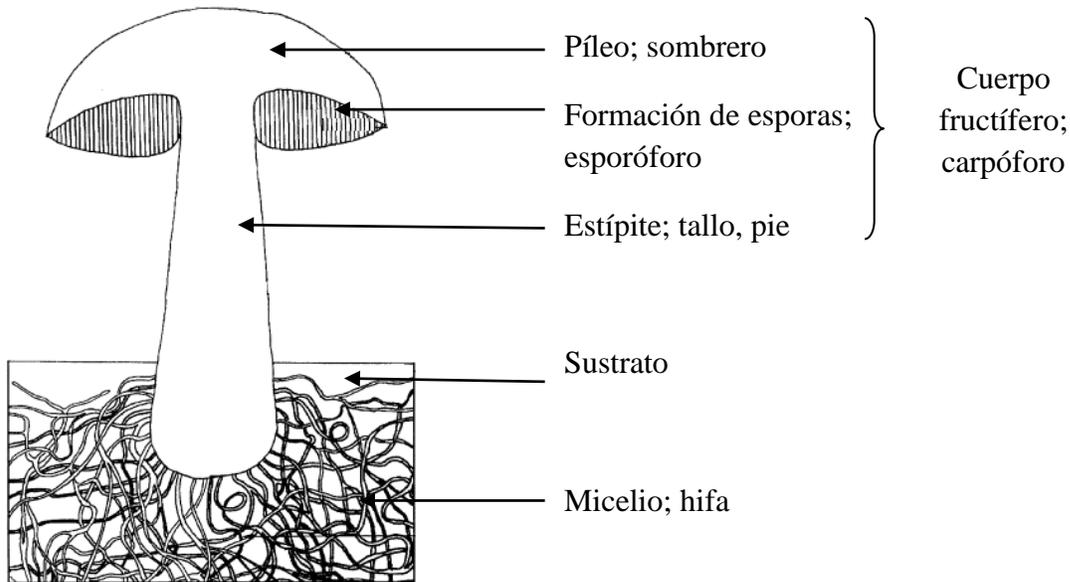


Figura 1. Esquema y estructura principal de un basidiomicete (Kalac y Svodoba 2000).

2.4. Género *Pleurotus*

Pleurotus pertenece a la clase Basidiomicetes, cuya principal característica es la presencia de basidios sobre los cuales se producen las basidiosporas. *Pleurotus* es hongo saprófito o parásito débil, descomponedor de madera (Stamets y Chilton 1983). En la tabla 1 se muestra la clasificación taxonómica del género *Pleurotus* (Simbaña 2016).

Tabla 1. Clasificación taxonómica del género *Pleurotus*

Reino	Fungi
Filo	Basidomycota
Clase	Homobasidiomicete
Orden	Agaricales
Familia	Pleurotaceae
Género	<i>Pleurotus</i>
Especie	<i>ostreatus</i>

Generalmente, los Basidiomicetes son conocidos por su forma de paraguas, con un píleo más o menos circular y un eje o estípite que lo sostiene. Para el caso de las setas este estípite es más lateral que céntrico, por lo que su desarrollo se da en forma de una ostra u oreja. El nombre científico de las setas es *Pleurotus*, término que deriva del griego pleurá o pleurón, costado o lado y del latín *otus*, que significa oreja. Las setas se alimentan de la materia orgánica en la que están creciendo, degradando las sustancias con enzimas que liberan al medio que les rodea, por ello es importante suministrar un sustrato adecuado al hongo cuando se le intente cultivar para que los nutrientes puedan ser aprovechados por las hifas (Gaitán-Hernández 2006, Martínez Restrepo 2014). Asimismo, se han empleado distintos sustratos y suplementos con el propósito de mejorar los rendimientos en distintas especies de *Pleurotus*. Esto es debido a que generalmente los residuos vegetales lignocelulósicos son materiales de bajo contenido de nitrógeno y algunos metales como el magnesio (Pineda-Insuasti y cols. 2014).

2.5. Fases de crecimiento de *Pleurotus ostreatus*

Los hongos macroscópicos como *Pleurotus ostreatus* presentan dos fases de crecimiento, La fase vegetativa y reproductiva. La primera, es filamentosa porque está constituida por un conjunto de hifas denominado micelio (Herrera y Ulloa 1998). El crecimiento del micelio se realiza sólo en las puntas y es un sistema de biomasa ramificada que se origina de la germinación de esporas o a partir de fragmentos de hifas. Su crecimiento se atribuye a un proceso complejo en el que participan vesículas, que son agregados de enzimas hidrolíticas y sintéticas que degradan y restauran fragmentos de la pared celular. Las vesículas se producen a lo largo del segmento sub-apical y se transportan por medio de un mecanismo hasta llegar al centro distribuidor de vesículas conocido como Spitzenkörper. Desde ahí son distribuidas en forma radial y aleatoria hacia la pared apical dando lugar al crecimiento de las hifas (figura 2) (Viniegra-González y cols. 1993, Guerrero y cols. 2007).



Figura 2. Crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus*.

En la segunda, el micelio tiene por función adquirir y distribuir los nutrientes, así como el crecimiento y la formación de la estructura de soporte para el desarrollo de los cuerpos fructíferos (Stamets y Chilton 1983, Valencia del Toro 2002).

2.6. Ciclo de vida de *Pleurotus*

En los basidiomicetes existen dos modelos sexuales:

- 1) El homotalismo, término empleado para los hongos que son auto compatibles, es decir, en los que la unión sexual puede efectuarse entre elementos de un mismo micelio.
- 2) El heterotalismo en el que es necesario dos micelios del mismo individuo para llevar a cabo la reproducción (Guinberteau 1990) con lo que se asegura que las células diploides (basidios) produzcan progenie meiótica recombinante (basidiosporas).

El género *Pleurotus* está incluido dentro del último modelo, en el que las basidiosporas con un núcleo germinan y dan origen al micelio primario monocariótico (A). Posteriormente, dos micelios primarios compatibles se fusionan (plasmogamia) (B). Con la fusión de los dos micelios primarios, se forma el micelio secundario dicariótico y se hacen presentes las fíbulas (C). A partir del micelio secundario se forma el cuerpo fructífero y la fusión nuclear (cariogamia), ocurre en los basidios encontrados en las laminillas del cuerpo fructífero (D). Finalmente, durante la meiosis se da origen a cuatro basidiosporas

uninucleadas, estas son expulsadas al medio ambiente. Las basidiosporas son capaces de germinar y producir micelio monocariótico, esto reinicia el ciclo de vida del hongo (figura 3). La condición monocariótica y dicariótica del micelio se puede distinguir por la presencia de fíbulas (estructuras especializadas que permiten la distribución de los núcleos en las células hijas) en el dicarion y su ausencia en el monocarion (Koltin y cols. 1972; Ramírez y cols. 2000).

En el ciclo de vida del hongo, el cuerpo fructífero aparece brevemente. Durante el poco tiempo de fructificación, el micelio se encuentra en un estado de crecimiento rápido, obtiene nutrientes y forma densas masas similares a las esferas (primordio), que eventualmente agrandan la estructura del hongo (Stamets y Chilton 1983).

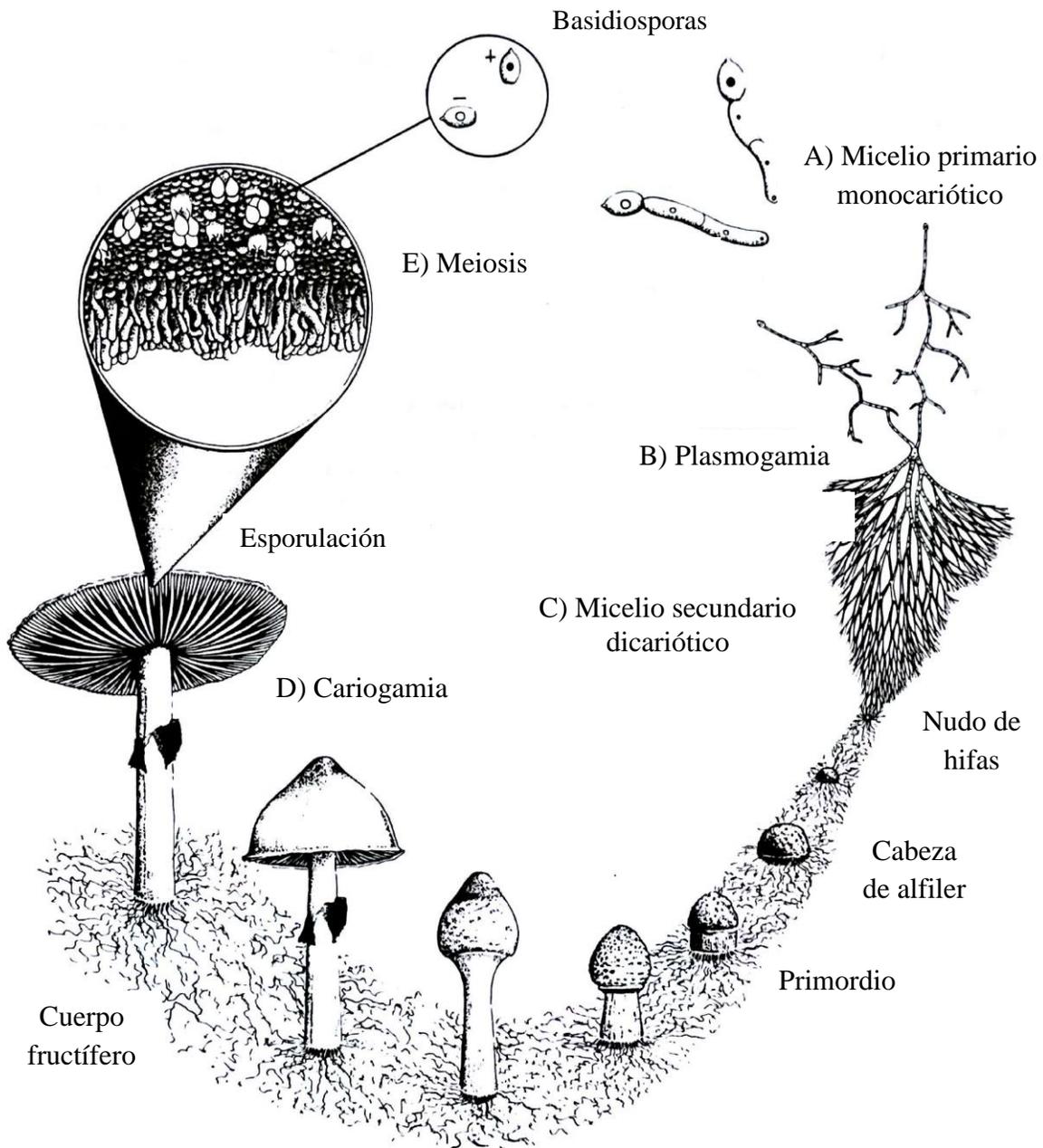


Figura 3. Ciclo biológico de *Pleurotus* (Stamets y Chilton 1983).

2.7. Producción de metabolitos

Durante el crecimiento de los microorganismos, su metabolismo genera productos que se caracterizan por ser moléculas pequeñas con diversas funciones, a los cuales se les denomina metabolitos. Los metabolitos se pueden clasificar en primarios y secundarios. Estos metabolitos son utilizados en microbiología industrial para obtener los aminoácidos, proteínas, enzimas, ácidos orgánicos, el desarrollo de vacunas y antibióticos. Los metabolitos primarios son requeridos por el hongo para su crecimiento y metabolismo. También, los hongos producen compuestos que no se consideran esenciales para su crecimiento (metabolitos secundarios). Los metabolitos secundarios se producen cuando el hongo ya no crece o se encuentra en una fase estacionaria. (Wainwright 1992, Díaz-Godínez y cols. 2013).

2.8. Enzimas

El metabolismo de los hongos está regulado en gran parte por enzimas, estas proteínas se producen tanto como metabolitos primarios o secundarios dependiendo de su función y momento en que son producidas. Se define como enzima a un catalizador biológico de naturaleza proteica que acelera la velocidad de las reacciones bioquímicas disminuyendo su energía de activación. Las enzimas son proteínas de diferentes pesos moleculares, cuentan con un sitio activo donde se lleva a cabo la catálisis, se considera que las enzimas presentan especificidad con respecto al sustrato (Díaz-Godínez 2013).

2.8.1. Enzimas ligninolíticas

Durante los años setenta, se descubrió la acción de diversas enzimas extracelulares capaces de realizar la ruptura oxidativa de anillos aromáticos en presencia de peróxido de hidrógeno. El sistema ligninolítico de los hongos de pudrición blanca como *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* ha sido ampliamente estudiado en la recuperación de efluentes provenientes de la industria papelera, textil y química (Rothschild y cols. 1999; Ullah y cols. 2000; Herrera Mora y cols. 2004, Martínez Restrepo 2014, Ruiz-Dueñas y cols. 2013). Estas enzimas ligninolíticas pueden actuar separadas o en cooperación, dependiendo si el hongo es capaz de producir una o más (Dávila y Vázquez 2006).

2.8.2. Lacasas

Los hongos ligninolíticos secretan enzimas, cuando son cultivados en condiciones apropiadas, como una oxidasa extracelular denominada lacasa (Rodríguez y cols. 2002), La enzima lacasas (Lac) fue descrita por Yoshida en 1883 y caracterizada por Bertrand en 1996 como una oxidasa que contiene un metal. Esto facilitó la descripción de la lacasa como una de las enzimas más antiguas, ha sido detectada en arboles de laca, mango, durazno, ciruela (Mayer y Staples 2002), coles, nabos, papas, manzanas y otros vegetales (Shraddha y cols. 2011). Asimismo, la lacasa se encuentra ampliamente distribuida en insectos y bacterias, pero la fuente más importante son los hongos (Chawachart y cols. 2004, Shraddha y cols. 2011). Estas enzimas son secretadas en múltiples isoformas dependiendo de la especie de hongo y de las condiciones de desarrollo (Gianfreda y cols. 1999). Organismos productores de la enzima lacasa se presentan en la tabla 2.

La lacasa (E.C.1.10.3.2, *p*-bencenodiol: oxígeno oxidoreductasa) es una oxidoreductasa capaz de catalizar la oxidación de varios compuestos aromáticos (particularmente fenoles), diaminas y aminas aromáticas, por la transferencia de un electrón por el uso del oxígeno molecular como el aceptor del electrón y la consecuente reducción del oxígeno a agua (Chawachart y cols. 2004, Zhang y cols. 2010). La lacasa tiene un peso molecular 20-120 KDa (Díaz y cols. 2013), su punto isoelectrico (pI) y su pH son ácidos (Kirk y Cullen 1998).

Tabla 2. Presencia de lacasa en diversos organismos (Castro 2005, Shraddha y cols. 2011).

Organismos	Especies
Bacterias	<i>Azospirillum lipoferum</i> , <i>Marinomonas mediterránea</i> , <i>Streptocarpus cyaneus</i> y <i>Streptomyces lavendulae</i>
Insectos	<i>Bómbix</i> , <i>Calliphora</i> , <i>Diploptera</i> , <i>Drosophila</i> , <i>Lucilia</i> , <i>Manduca</i> , <i>Musca</i> , <i>Oryctes</i> , <i>Papilio</i> , <i>Phormia</i> , <i>Rhodnius</i> , <i>Sarcophaga</i> , <i>Schistocerca</i> y <i>Tenebrio</i>
Hongos	<i>Agaricus</i> , <i>Antrodiella</i> , <i>Armillaria</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Ceriporiopsis</i> , <i>Cerrena</i> , <i>Chaetomium</i> , <i>Coprinus</i> , <i>Cryphonectria</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Halosarpheia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Fomes</i> , <i>Daedalea</i> , <i>Geotrichum</i> , <i>Monocillium</i> , <i>Neurospora</i> , <i>Myceliophthora</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Phellinus</i> , <i>Phlebia</i> , <i>Pholiota</i> , <i>Pleurotus</i> , <i>Podospora</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Rigidoporus</i> , <i>Schizophyllum</i> , <i>Sclerotium</i> , <i>Sporotrichum</i> , <i>Stagonospora</i> , <i>Trametes</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Phanerochaete</i> , <i>Lentinus</i> , <i>Pycnoporus</i> , <i>Lactarius</i> y <i>Scytalidium</i>

Se ha reportado que las lacasas contienen entre 15 y 30 % de carbohidratos (Galhaup y cols. 2002, Ramírez y cols. 2003, Shraddha y cols. 2011). Asimismo, se sabe que las lacasas son multinucleares, el sitio activo comprende 4 átomos de cobre en tres grupos, T1, T2 y T3 (figura 4). El cobre tipo I ó T1 (donde tienen lugar la oxidación del sustrato reductor) es el responsable de la coloración azul de las enzimas y se caracteriza por absorbancia cerca de 610 nm. Un “cluster” trinuclear formado por el cobre tipo II y los dos cobres tipo III, o bien T2/T3 (donde la reducción del oxígeno molecular tiene lugar por la aceptación de electrones del cobre tipo I). El cobre T2 carece de coloración y no puede ser detectado espectrofotométricamente. El cobre binuclear T3 tiene una absorbancia de 330 nm y tiene características de espectro fluorescencia (Cañas Portilla 2009, Rodríguez y Toca 2007, Shraddha y cols. 2011, Desai y Nityanand 2011).

Se ha sugerido que las lacasas amarillas resultan de la modificación de las lacasas azules, por los subproductos de la degradación de la lignina los cuales juegan un papel importante como mediadores naturales de transferencia de los electrones para la oxidación de sustancias no fenólicas. Casi todos los hongos producen más de una isoforma de lacasa. Generalmente, las lacasas son las primeras enzimas en ser secretadas al ambiente circundante del hongo y provocan la oxidación de compuestos semejantes a la lignina con un grupo fenólico libre (Krzywonos y Seruga 2012, Chable- Villacis 2015). Estas enzimas se han empleado para blanquear y deslignificar la pulpa del papel (Moreira y cols. 1999).

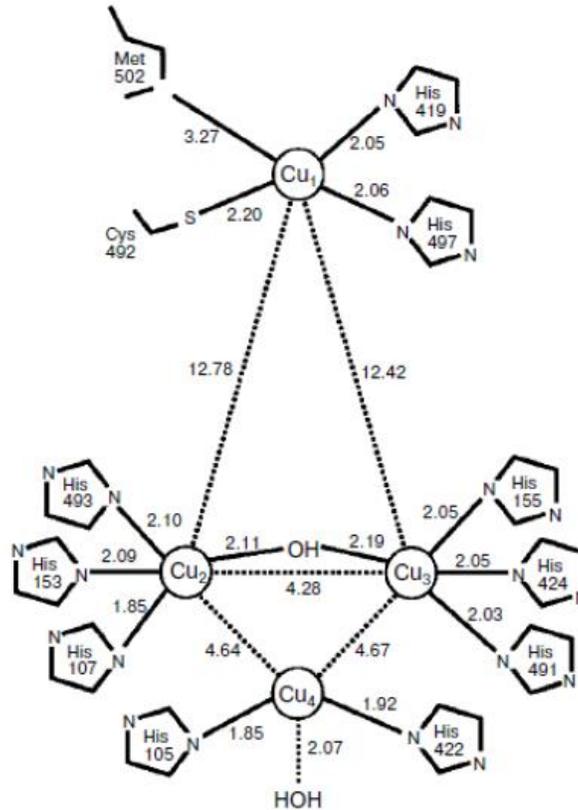


Figura 4. Esquema de los sitios de cobre T1 (Cu1) y T2/T3 (Cu4/Cu2-Cu3) de la lacasa de *Bacillus subtilis* (Krzywonos y Seruga 2012).

2.8.3. Manganeso peroxidasa

Específicamente, la enzima manganeso peroxidasa (MnP) (E.C. 1.11.1.13) puede oxidar la subestructura fenólica de la lignina (Fujii y cols. 2013). La enzima MnP se descubrió en el hongo, de podredumbre blanca, *Phanerochaete chrysosporium*. Las MnP son glicoproteínas extracelulares con un grupo prostético hemo (protoporfirina IX); Su peso molecular varía entre 32-62.5 kDa, un pH óptimo de actividad de 4-7 y una temperatura óptima de actividad 40-60 °C. Estas enzimas son secretadas en múltiples isoformas en medios limitados en carbono y nitrógeno suplementado con Mn^{2+} y alcohol veratrílico. El Mn^{2+} , peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y varios hidroperóxidos orgánicos actúan como mediadores de la manganeso peroxidasa (Asgher y cols. 2008). Además, la estructura de MnP se puede dividir en tres regiones: zona distal, región próxima y sitio activo. La región distal contiene una serie de residuos de aminoácidos (Histidina, Arginina, Ácido aspártico y Leucina) que intervienen en la reacción de la forma nativa de la enzima con H_2O_2 . La

región próxima es responsable de la reactividad frente a estabilidad del grupo hemo. El residuo encargado de conferir estabilidad al estado Fe^{4+} del grupo hemo es Histidina. El sitio activo de MnP con Mn^{2+} se considera que está formado por un propionato hemo y ácido glutámico 35, ácido glutámico 39 y ácido aspártico 179 (Mester y Tien 2000).

La actividad de la MnP es estimulada por la acción de lignina peroxidasas, presencia de CuSO_4 y por sustratos como el lactato, el cual ayuda a la oxidación de Mn^{+2} a Mn^{+3} . El pH es un factor indispensable debido a que la enzima es inestable a pHs mayores a 7.5, en los cuales la determinación de la actividad es nula (Gómez Dorado y cols. 2005). Muñoz y cols. (2014) mencionan que la acción catalítica se puede utilizar para la biodegradación de los contaminantes orgánicos, tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos. La enzima es oxidada por H_2O_2 para generar un intermediario deficiente de un par de electrones, conocido como componente I, que puede ser oxidado por Mn^{+2} o por sustratos fenólicos, generando el componente II. El ciclo se completa cuando el componente II gana un electrón, devolviendo así la enzima al estado basal (figura 5) (López y cols. 2006).

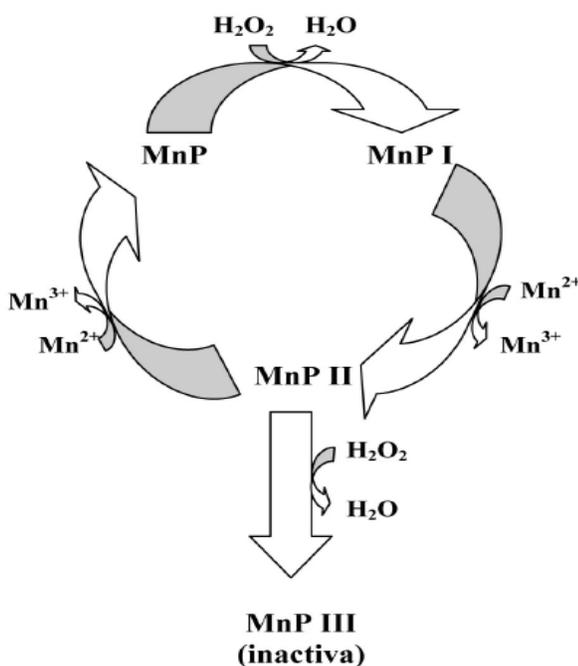


Figura 5. Ciclo catalítico de MnP (Kirk y Farrell 1987).

La manganeso peroxidasa está involucrada en la degradación de la lignina, sustancias húmicas, varios compuestos orgánicos contaminantes, así como en los procesos de bio-remediación. Estas características hacen que la enzima sea considerada atractiva en la participación biotecnológica, por ejemplo en el tratamiento de aguas residuales, blanqueamiento de pulpa, así como en la eliminación de compuestos químicos peligrosos y es por ello que durante los últimos años ha habido un gran interés en las aplicaciones potenciales de la MnP en el planteamiento de procesos de bio-remediación (Asgher y cols. 2013).

2.8.4. Alcohol veratríl oxidasa

La alcohol veratríl oxidasa (AVO) (EC 1.1.3.7) es una flavo proteína extracelular, su peso molecular se sitúa alrededor de 58 y 78 kDa, estas variaciones son debidas fundamentalmente a distintos grados de glicosilación (Ferreira 2004). Antes de describirse el papel de las peroxidases en la degradación de la lignina ya se había observado en *Phanerochaete chrysosporium* su capacidad para producir H₂O₂ y la probable implicación de este compuesto en la degradación de la lignina (Koenigs 1974, Faison y Kirk 1983). Inicialmente se pensó que el H₂O₂ requerido por las peroxidases para degradar la lignina era producido por oxidases intracelulares como la glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4) y metanol oxidasa (EC 1.1.3.13) (Kelley y Reddy 1986, Nishida y Eriksson 1987). Los estudios posteriores se centraron en oxidases extracelulares como la glioxal oxidasa (EC 1.1.3.) de *Phanerochaete chrysosporium* (Kersten y Kirk 1987), una metaloenzima que oxida aldehídos alifáticos como el glioxal. Esta enzima genera H₂O₂ dentro de un sistema cíclico de óxido-reducción de metabolitos aromáticos sintetizados por el hongo, incluyendo el p-anisaldehído (4-metoxibencílico) (Guillén y Evans 1994, Gutiérrez y cols. 1994). Además de ser el co-sustrato de las peroxidases ligninolíticas, el H₂O₂ podría participar en la degradación de la lignina a través de la generación de otras especies activas de oxígeno. Entre éstas se encuentra el grupo hidroxilo (OH), fuerte oxidante que podría estar implicado en el ataque inicial a la lignina cuando las enzimas ligninolíticas no pueden penetrar en la pared celular debido a su compleja estructura molecular (Backa y cols. 1993, Evans y cols. 1994 y Guillén y cols. 2000). También ha sido descrito que AVO evita la repolimerización de los productos liberados durante la biodegradación de la lignina (Marzullo y cols. 1995).

Estas proteínas pueden llevar como cofactores flavín-adenín mononucleótido (FMN) o flavín adenín dinucleótido (FAD). Estos grupos prostéticos son esenciales para su actividad enzimática, salvo algunas excepciones como la hidroxinitrilo liasa (EC 4.1.2.10), en la que no se sabe que el FAD esté implicado en reacciones redox sugiriéndose que desempeña un papel estructural (Ghisla y Massey 1989 y Dreveny y cols. 2001). El ciclo catalítico de las flavoenzimas lo presentan dos reacciones:

- La reacción de reducción, donde la flavina es reducida por un compuesto donador de electrones.
- La reacción de oxidación, donde la flavina reducida es reoxidada transfiriendo los electrones a un compuesto aceptor y completando así su ciclo.

La parte reactiva de la flavina (7,8-dimetilbenzo[g]pteridina-2,4 (3H, 10H)-diona) es el anillo de isoaloxazina. Esta es una molécula anfipática formada por la fusión de un dimetilbenzeno (parte hidrofóbica) con un anillo de pteridina (para hidrofílica). Su reducción es reversible e implica una serie de cambios químicos en el anillo de flavina que afectan a las posiciones N1, C4 y N5. La reducción puede ser en uno o dos pasos, dependiendo si se transfieren dos electrones o un electrón respectivamente. El potencial redox de la flavina libre es de unos -200 milivoltios (mV), pero en las flavoenzimas puede variar en un rango entre -400 mV y +60 mV dependiendo del entorno aminoacídico (Ghisla y Massey 1989).

La AVO es definida como *Deshidrogenasa/Oxidasa* este tipo de flavoenzima cataliza un amplio rango de reacciones de oxidación, tales como la oxidación de alcoholes o aminas, y otras más complejas como la oxidación selectiva de alcaloides en plantas (Kutchan y Dittrich 1995). Estas reacciones se caracterizan por tener dos sustratos: un dador de electrones (sustrato propiamente dicho) y el oxígeno molecular (aceptor de electrones). En la oxidación del sustrato se produce la ruptura de un enlace C-H, transfiriéndose los dos electrones al anillo de la flavina. La flavina reducida es reoxidada mediante la reducción del oxígeno (O_2) a H_2O_2 sin formación aparente de intermediarios estables (Massey y cols. 1994).

2.8.5. Versátil peroxidasa

La versátil peroxidasa (VP) (EC 1.11.1.16) pertenece a las hemo-peroxidasas extracelulares de la clase II, junto con la MnP y lignino peroxidasa (LiP). Las LiP y MnP fueron encontradas en el hongo *Phanerochaete chrysosporium* (Pérez y cols. 2005), mientras que la VP se reportó en *Pleurotus eryngii* (Tinoco y cols. 2007). Es capaz de oxidar Mn^{2+} a Mn^{3+} y catalizar reacciones sobre sustratos aromáticos en ausencia de Mn^{2+} (Dávila y Vázquez 2006). La MnP posee una alta afinidad hacia el Mn^{2+} , hidroquinonas y colorantes. También es capaz de oxidar al alcohol veratrílico (a veratríl aldehído), dimetoxibenceno y dímeros de lignina, aunque con menor afinidad que la LiP. Esta enzima posee una estructura híbrida entre una manganeso peroxidasa y lignino peroxidasa con un peso molecular de 45 kDa (Rodakiewicz-Nowak y cols. 2006). Esta posee el potencial de oxidar compuestos aromáticos de alto peso molecular incluyendo colorantes de origen químico e industriales tipo azo (negro reactivo 5, violeta reactivo 5, azul directo 2, negro directo 22), ftalocianinas (azul ácido 185, azul directo 199, azul reactivo 38 y azul reactivo 72), disruptores endocrinos (bisfenol A, nonilfenol, triclosan, estrona, 17α -etilenestradiol y 17β -estradiol), compuestos farmacéuticos activos (acetaminofén, naproxeno, diclofenaco y ácido mefenámico), compuestos fenólicos (2,6-dimetoxifenol, 2,4-diclorofenol, guayacol, diclorofeno, bromoxini y pentaclorofenol), compuestos no fenólicos (éter (veratrílglicerol- β guayacil), ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), alcohol veratrílico y *p*-dimetoxibenceno) (Dávila Vázquez y cols. 2005, Rodakiewicz-Nowak y cols. 2006, Tinoco y cols. 2007, Ruiz Dueñas y cols. 2009, Taboada-Puig y cols. 2011, Pozdnyakova y cols. 2013, Taboada-Puig y cols. 2015, Barratto y cols. 2015 y Cruz y cols. 2015). Sus características básicas son comunes a la mayoría de las peroxidasas (Alarcón 2017).

El ciclo catalítico de la VP se inicia con la activación de la enzima por el peróxido de hidrógeno (figura 6). En esta reacción, la peroxidasa en estado de reposo (con el hierro del hemo como Fe^{3+}) sufre una oxidación de dos electrones dando lugar al compuesto I. Este primer intermediario del ciclo catalítico se caracteriza por presentar dos equivalentes de oxidación en forma de complejo Fe^{4+} -oxo y radical catiónico π de la porfirina (compuesto IA). A través de la oxidación de una molécula de sustrato la enzima recupera un electrón en la porfirina y se transforma en el compuesto II, manteniendo el complejo

Fe⁴⁺-oxo (compuesto IIA). Finalmente, con la oxidación de una segunda molécula de sustrato, la enzima recupera el segundo electrón volviendo al estado de reposo. Además, los compuestos IA y IIA pueden desplazar un equivalente de oxidación desde el hemo al triptófano catalítico, que queda como radical (intermediarios denominados IB y IIB). Para la VP, se ha calculado que, en condiciones utilizadas para la Resonancia paramagnética electrónica (EPR) (a baja temperatura) el 25 % de las moléculas en forma de compuesto I lo están como compuesto IB y el 3 % de las moléculas en forma de compuesto II lo están como compuesto IIB. Los compuestos IB y IIB serían los responsables de la oxidación de compuestos de alto potencial redox a través del triptófano catalítico (Pérez-Boada y cols. 2005, Ruiz-Dueñas y cols. 2009, Ruiz-Dueñas y Martínez 2009, Torres y Ayala 2010, Sáez y cols. 2015).

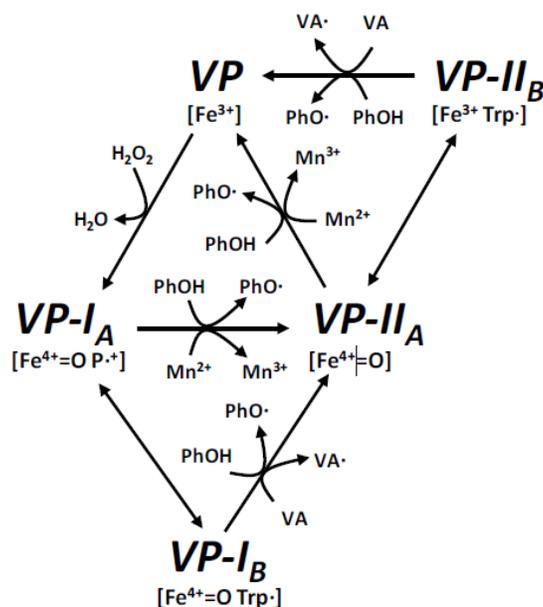


Figura 6. Ciclo catalítico de VP.

Para la enzima VP, el pH óptimos para la oxidación de Mn²⁺ y sustratos aromáticos son diferentes. Para la oxidación de Mn²⁺ el pH óptimo es de 5, mientras que para los compuestos aromáticos y colorantes es de 3. Estos parámetros son similares a los de MnP y LiP, respectivamente (Dávila y Vázquez 2006).

Son dos los sitios de unión al sustrato en la VP de *Pleurotus eryngii* y *Bjerkander adusta*. Uno exclusivo para el Mn²⁺ cerca del grupo hemo y otro para los sustratos aromáticos en donde tiene un papel fundamental un triptófano superficial. El flujo de

electrones desde el triptófano y el grupo hemo se ha demostrado en la VP de *P. eryngii* y se determinó para la VP de *B. adusta*. Estudios bioquímicos muestran la existencia de una inhibición no competitiva entre la oxidación de Mn^{2+} y los sustratos orgánicos, como colorantes de alto potencial redox e hidrocarburos aromáticos. Estos resultados apoyan la idea de la existencia de dos sitios de oxidación con afinidades distintas, que no se ven afectados por la presencia del sustrato alternativo que actúa como inhibidor (Dávila y Vázquez 2006). La acción de estas enzimas peroxidasas, requieren la presencia de H_2O_2 , como cofactor. Este es producido por enzimas generadoras de peróxido, como la alcohol veratrílica oxidasa (AVO) y la glioxal-oxidasa (Cohen y cols. 2002).

2.8.6. Decolorante peroxidasa

La enzima decolorante peroxidasa (DyP) (E.C. 1.11.1.19), constituye una nueva superfamilia de hemo peroxidasa ampliamente distribuida en hongos y bacterias (Sugano 2009). Este tipo de enzima es única en el basidiomicete *Thanatephorus cucumeris*. El peso molecular es 30-60 kDa, de los cuales el 17 % son sacáridos (Salvachúa y cols. 2013, Liers y cols. 2014)

Los análisis proteómicos han revelado una amplia distribución de estas proteínas. Los recientes análisis de las secuencias genómicas muestran que estas proteínas son prominentes en las bacterias, mientras que sólo un pequeño número se encuentra en hongos y su aparición en Arquea es aún menor. De acuerdo a la base de datos de Interpro database, la superfamilia DyP comprende actualmente 4000 miembros de los cuales 3707 fueron encontrados en bacterias mientras que en eucariotas corresponden a 117 y tan solo 11 en Arquea (Colpa y cols. 2014).

A pesar de que la función de la mayoría de las DyP continua siendo poco clara, existe evidencia acumulada de que en ciertas variantes de bacterias estarían involucradas en la degradación de la lignina (Fraaije y Van Bloois 2013, Colpa y cols. 2014). Rahmanpour y Bugg (2015) señalaron que los miembros de la familia DyP en bacterias gram-positivas han demostrado recientemente que tienen actividad en la oxidación de sustratos del fenol.

Las DyP son capaces de oxidar diversos colorantes incluidos los derivados de antraquinona recalcitrantes, por ejemplo el reactivo azul 5, así como sustratos típicos de las peroxidasas (ABTS, DMP) pero algunas DyP han demostrado oxidar compuestos aromáticos metoxilados con alto potencial redox (alcohol veratrílico y no dímeros

fenólicos). Büttner y cols. (2015) analizaron la estructura de la DyP y señalaron que la enzima no está relacionada con todas las familias del grupo hemo de las peroxidas descritas hasta ahora. Desde un punto de vista estructural las DyP son consideradas como miembros de una gran diversidad de enzimas que comparten un núcleo-ferredoxina.

El ciclo catalítico de la DyP inicia en donde el estado de reposo férrico alberga una molécula disolvente en el sexto sitio de coordinación del hierro hemo. El peróxido de hidrógeno desplaza una molécula disolvente posible, se une al átomo de hierro y pierde un protón en una reacción ácido-base; se forma el compuesto 0. El compuesto 0 se reprotona en el oxígeno de peróxido no coordinado y se libera agua. En esta etapa se forma el compuesto intermedio activo de la peroxidasa, la especie oxoferrílica compuesto I (un catión radical). Este intermedio se reduce en dos reacciones de transferencia de electrones posteriores al estado inicial férrico (figura 7) (Liers y cols. 2014).

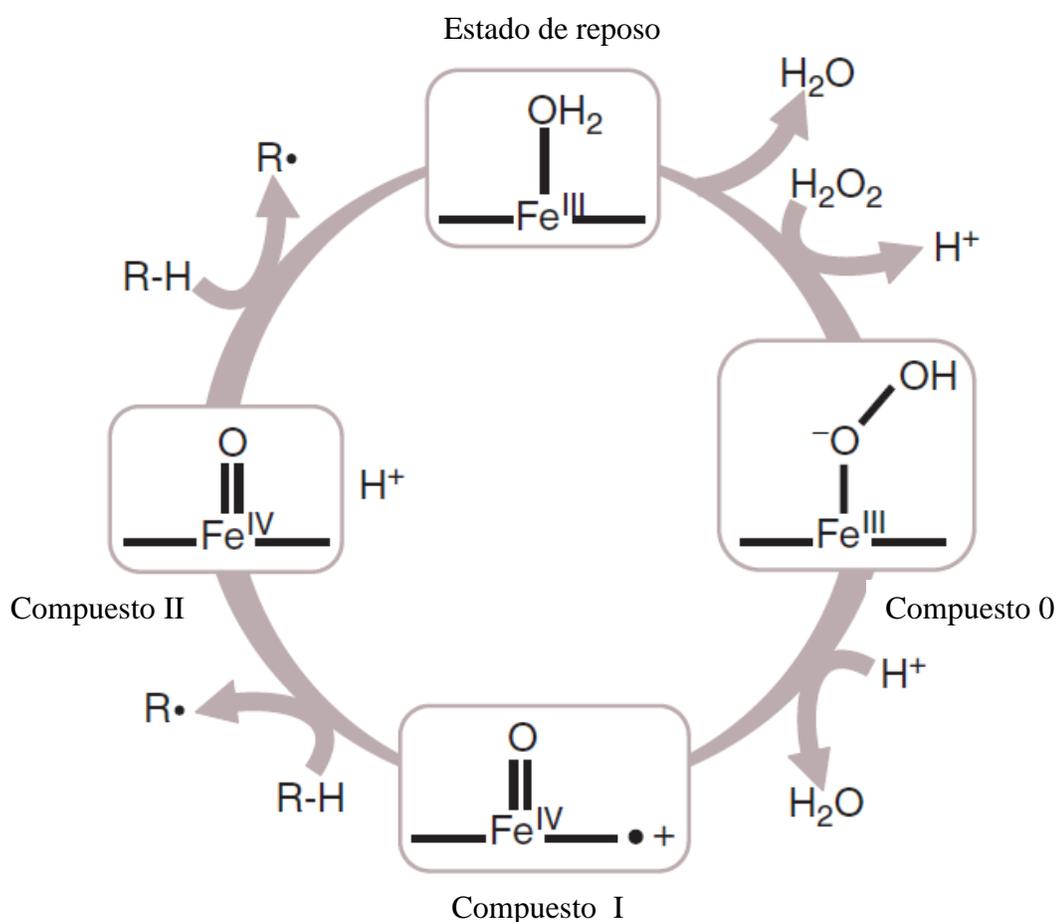


Figura 7. Ciclo catalítico de DyP.

2.9. Lignina

La lignina es el polímero aromático más abundante en la tierra y el segundo compuesto detrás de la celulosa, en contribuir a la biomasa terrestre. Se trata de un componente estructural de la pared celular de las plantas vasculares, un biopolímero polifenólico heterogéneo muy complejo constituido a partir de la polimerización de tres precursores (los alcoholes p-hidroxicinámicos: p-cumarílico, coniferílico y sinapílico) (figura 8). Mientras que en los tejidos leñosos de las plantas, las lacasas forman parte del sistema sintetizador de la lignina. La función de las lacasas de los hongos de podredumbre blanca es despolimerizar y mineralizar la lignina. La naturaleza recalcitrante y heterogénea de la lignina hace que el mecanismo de biodegradación de los hongos de podredumbre blanca sea el resultado de un sistema complejo extracelular de naturaleza oxidativa que implica efectos sinérgicos de varias enzimas y compuestos no enzimáticos (mediadores). Las enzimas ligninolíticas más importantes son la lignino peroxidasa, la manganeso peroxidasa y la lacasa, aunque enzimas como la celobiosa: quinona oxidoreductasa, la celobiosa deshidrogenasa, la glioxalato oxidasa, la glucosa oxidasa, la veratríl alcohol oxidasa y algunas esterases también actúan durante el proceso de despolimerización (Thurston 1994, Call y Mucke 1997, Gianfreda y cols. 1999, Cabezas 2014, Chávez 2017).

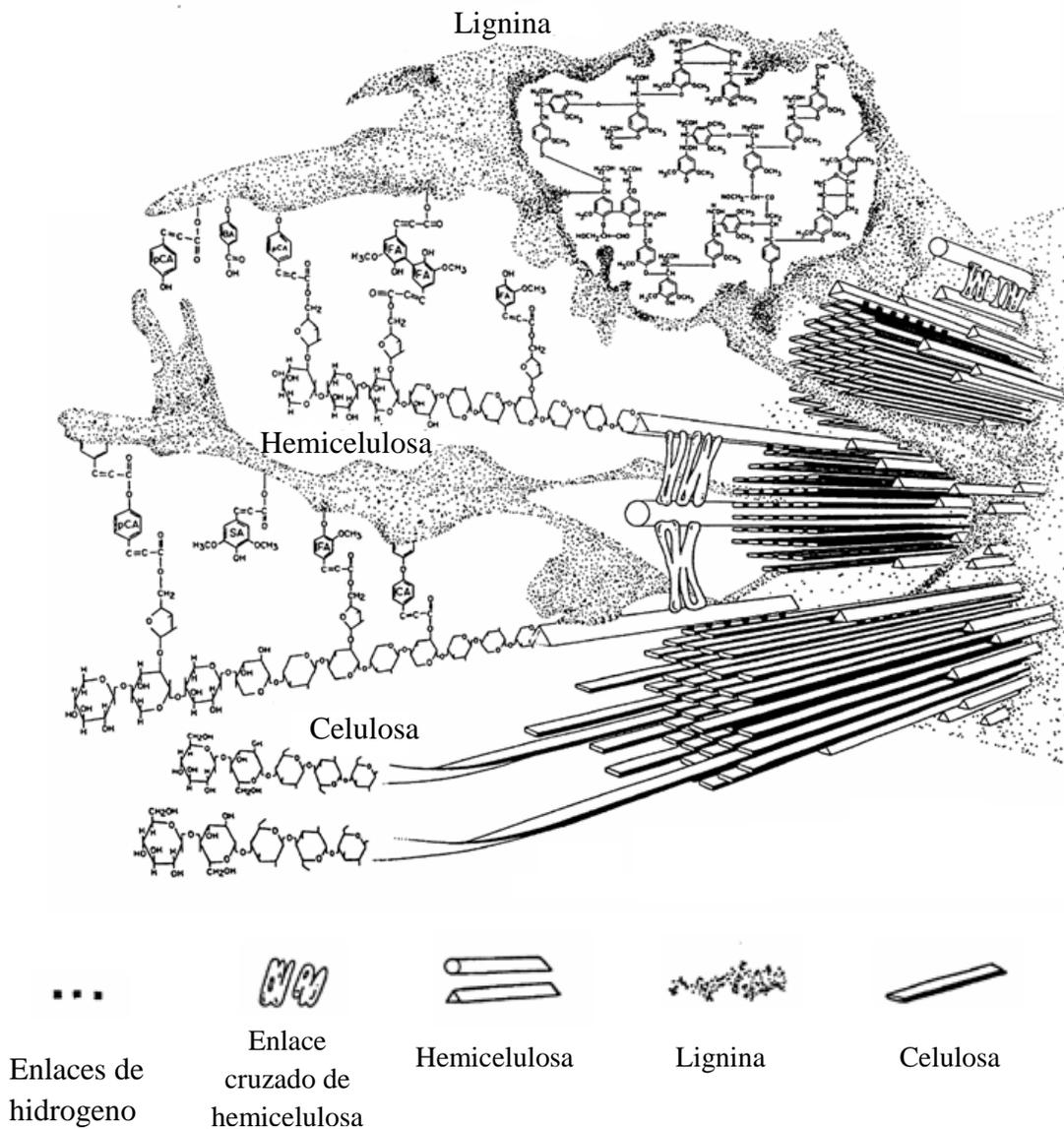


Figura 8. Estructura molecular de la lignina, hemicelulosa y celulosa en la pared celular de plantas vasculares (Bidlack y Benson 1992).

2.10. Fermentación

Para la producción de enzimas es conveniente contar con una fuente adecuada que pueden ser tejidos animales, vegetales o células de microorganismos como son bacterias, levaduras y hongos. En la actualidad los microorganismos son la fuente más importante para su producción ya sea en cultivos sólidos y líquidos (Díaz-Godínez y cols. 2013).

Se ha definido fermentación como el cambio químico sufrido por ciertas sustancias orgánicas a causa de enzimas microbianas, generalmente con desprendimiento de gases. El

término deriva del verbo latin *fervere*, ebullición. La apariencia de ebullición se debe a la producción de burbujas de dióxido de carbono, causado por el catabolismo anaeróbico de los azúcares presentes en el extracto. Desde el punto de vista bioquímico, la fermentación es el conjunto de reacciones catabólicas productoras de ATP en las cuales las moléculas orgánicas actúan como donadores primarios de electrones y como aceptores finales de los mismos (Lehninger 1979). El catabolismo de los azúcares es un proceso oxidativo del cual resulta la producción de nucleótidos reducidos de piridina, los cuales deben ser reoxidados para que el proceso continúe. Bajo condiciones aeróbicas, la reoxidación de los nucleótidos reducidos de pirimidina se lleva a cabo por transferencia de electrones, vía sistema citocromo, con el oxígeno como último aceptor de electrones. Sin embargo, bajo condiciones anaeróbicas, la oxidación del nucleótido de pirimidina reducido está acoplada con la reducción de un compuesto orgánico, el cual es a menudo el producto de la vía catabólica.

Existen diferencias entre los tipos de fermentación de las cuales no se puede argumentar que una sea mejor que la otra, ya que ambas tienen características que les permite obtener mayor cantidad de biomasa, proteínas, enzimas o metabolitos con propiedades bioactivas (Díaz-Godínez y cols. 2013).

Independiente mente del tipo de fermentación el proceso puede ser dividido en seis partes:

- a) Formulación del medio que se usará en el cultivo de microorganismos durante el desarrollo del inóculo y durante la producción en el fermentador.
- b) La esterilización del medio de cultivo, fermentadores y equipo auxiliar.
- c) La producción de un cultivo puro activo en suficiente cantidad para inocular el fermentador de producción.
- d) El crecimiento del microorganismo en el fermentador de producción, bajo condiciones óptimas para la formación del producto.
- e) La extracción del producto y su purificación.
- f) El manejo de los efluentes producidos por el proceso (Hesseltine 1972, Harvey y McNeil 1993).

Con respecto al crecimiento de los organismos en distintos sistemas de fermentación sólido y líquido, los hongos suelen presentar un desarrollo típico similar al de otros organismos y que consta de las siguientes fases: de adaptación o fase lag; exponencial o fase log; estacionaria y muerte (Figura 9) (Sánchez y Royse 2001).

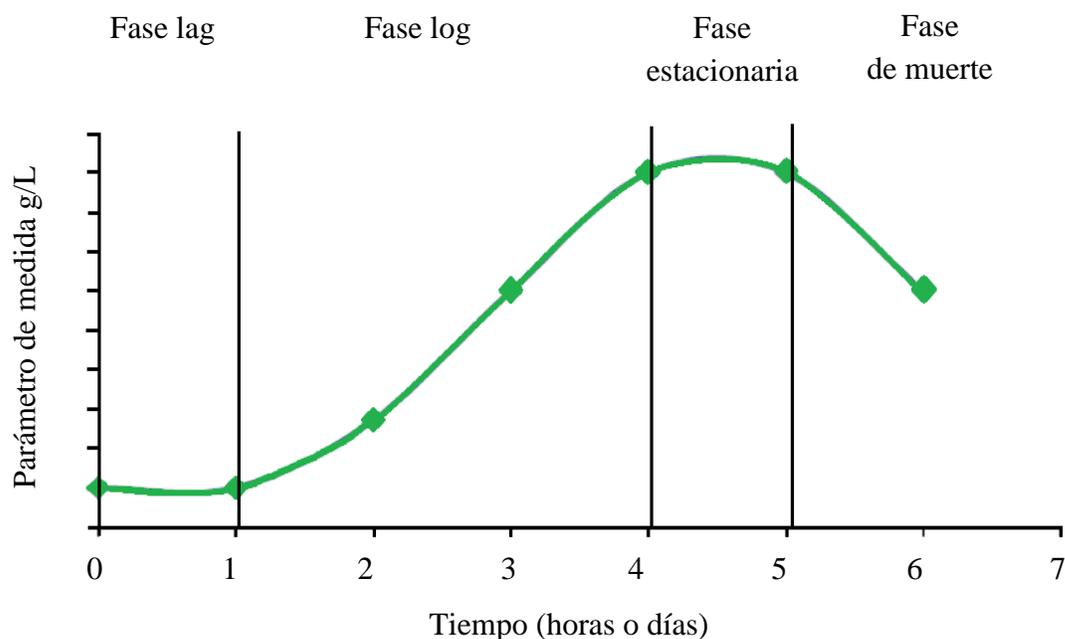


Figura 9. Curva de crecimiento (Sánchez y Royse 2001).

2.10.1. Fermentación sólida

Aproximadamente, el 90 % de todas las enzimas industriales son producidas por fermentación sólida (FS), se usan frecuentemente microorganismos manipulados genéticamente (Hölker y cols. 2004). Hesseltine (1972) empleó el término de fermentación en estado sólido a todas las fermentaciones donde el sustrato no es líquido. Posteriormente, Raimbault (1980) propuso un término más preciso en la que define a la fermentación sólida como un sustrato no disuelto, ni suspendido en un gran volumen de agua. Autores como Mudgett (1986) y Durand y cols. (1988) plantearon una definición más general: es un método de cultivo de microorganismos sobre y/o dentro de partículas sólidas. El líquido ligado a las partículas sólidas debe estar en una cantidad que asegure la actividad del agua adecuada para el crecimiento y el metabolismo de los microorganismos, pero sin exceder el máximo poder de retención de este líquido en la matriz sólida.

La definición más general y reciente fue formulada por Viniegra González (1993-1978), donde se plantea que es un proceso microbiológico que ocurre comúnmente en la

superficie de materiales sólidos que tienen la propiedad de absorber y contener agua con o sin nutrientes solubles. Esta definición abarca procesos donde el soporte sólido es inerte y los sustratos que utiliza el microorganismo pueden ser sustancias solubles en agua, por ejemplo el proceso de bioconversión de etanol y el crecimiento de *Candida utilis* sobre amberlita (Christen y cols. 1993).

Las bacterias, levaduras y hongos son los microorganismos que pueden crecer en fermentación sólida, pero la mayoría de las investigaciones se llevan a cabo con hongos filamentosos. El crecimiento en forma de micelio y su tolerancia a bajas actividades de agua y condiciones de alta osmolaridad hacen que los hongos sean la microbiota natural más adecuada para la fermentación sólida. La mayoría de los trabajos bajo este método es realizado con rastrojo o subproductos agroindustriales como son el gabazo de caña, zacate de maíz, pulpa de café y paja de trigo, todos estos materiales aunque son buenos para el desarrollo de los hongos causan variaciones. Dentro de la fermentación en estado sólido se ha desarrollado el uso de espuma de poliuretano (PUF) como soporte inerte impregnando de un medio de cultivo líquido sintético, donde se simula la composición nutricional y condiciones de cultivo que anteriormente se llevaba a cabo en un soporte natural. La PUF presenta elevada higroscopicidad, alta porosidad, no es biodegradable y baja conductividad térmica lo que permite la medición de la biomasa directamente (Krause y cols. 1983, Zhu y cols. 1994, Sánchez y cols. 2015). La espuma de poliuretano es uno de los polímeros que contiene el grupo uretano (figura 10).

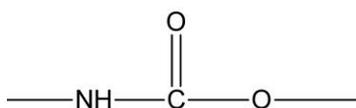


Figura 10. Grupo uretano, eslabón de las cadenas poliméricas en los poliuretanos.

2.10.2. Fermentación líquida

El cultivo sumergido, también llamado fermentación líquida (FL), es un sistema en el cual los sustratos están disueltos o suspendidos en un medio acuoso y son agitados para conservar la homogeneidad del sistema (Henzler y Schedel 1991). El desarrollo de la FL ha sido importante porque ha permitido el cultivo de organismos aeróbicos en condiciones homogéneas con una densidad moderada de la biomasa y ha simplificado el estudio de la fisiología de los organismos. Asimismo, la FL ha evolucionado a gran escala, realizándose

fermentaciones con volúmenes superiores a 10 mil L, en los cuales se producen todo tipo de compuestos derivados del metabolismo microbiano. En este sistema la agitación mecánica permite aumentar la transferencia del gas a la biomasa de tres formas básicas: la primera, dispersa el gas en burbujas pequeñas incrementando el área de interface gas-líquido. La segunda, incrementa el tiempo de contacto de líquido con las burbujas de gas. La tercera, disminuye el grueso de la capa estacionaria del líquido al aumentar la turbulencia del cultivo. Además, la agitación mezcla el cultivo manteniéndolo homogéneo. Esto particularmente es importante para la dispersión de la biomasa y la transferencia de calor (Henzler y Schedel 1991). Los productos metabólicos y el calor se dispersan fácilmente, por lo que no son un factor limitante para el crecimiento del microorganismo. La barrera principal de transferencia de oxígeno en la fermentación líquida es su baja solubilidad en el agua y al hacerse mayor la capa de agua que debe cruzar aumenta la dificultad para que llegue a la célula. Gran parte del gasto energético que se realiza en la fermentación líquida está relacionada con la necesidad de satisfacer la demanda de oxígeno en el crecimiento de los microorganismos, esto es muy claro en el caso de *Aspergillus niger* que es un organismo aeróbico estricto y necesita una alta tasa de transferencia de oxígeno para mantener su crecimiento y producir distintos de los metabolitos de interés (Righelato 1975, Raimbault 1998).

2.10.3. Principales diferencias entre la fermentación sólida y líquida

La fermentación sólida y líquida presenta distintas características que les permite obtener mayor cantidad de biomasa, proteínas, enzimas o metabolitos. Las diferencias se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Comparación entre los sistemas de fermentación líquida y sólida (Sánchez Hernández y cols. 2015)

Factor	Fermentación líquida	Fermentación sólida
Tipos de sustratos empleados	Sustratos solubles (azúcar)	Sustratos económicos de carácter industrial y polímeros insolubles (almidón, celulosa, pectina, lignina)
Agua	Elevado consumo de agua	Consumo limitado de agua y baja actividad de agua
Temperatura	Fácil control de la temperatura, alta transferencia de calor	Difícil control de la temperatura, baja capacidad de transferencia de calor en la matriz
Aireación	Se requiere de altos volúmenes de aire, el oxígeno soluble es limitado	Fácil aireación y alto intercambio de gases en la superficie de la matriz
Control de pH	Fácil control de pH por la homogeneidad del sistema	Difícil control de pH. Se deben emplear sustancias o sustratos con propiedades amortiguadoras
Agitación mecánica	Se requiere para lograr una buena homogenización	No es necesaria
Escalamiento	Disponibilidad de equipos a nivel industrial	Necesita el diseño de nuevos equipos
Inoculación	Fácil inoculación	Fácil inoculación, el peligro de contaminación es menor
Contaminación	Alto riesgo de contaminación bacteriana	El bajo contenido de humedad hace menos probable la contaminación por bacterias
Gasto energético	Genera un alto consumo energético	Los requerimientos de energía son bajos
Tamaño y volumen del equipo	Se manejan altos volúmenes y la inversión de equipos y tecnologías es elevada	Se manejan volúmenes más bajos y el costo de los equipos es mucho menor
Concentración del producto	Dependiendo el producto de interés	Fácil producción de propágulos y esporas fúngicas

3. ANTECEDENTES PARTICULARES

La biorremediación utiliza el potencial metabólico de los microorganismos (principalmente bacterias, pero también hongos y levaduras) para transformar contaminantes orgánicos en compuestos más simples o poco dañinos al ambiente y, por lo tanto, se puede utilizar para limpiar terrenos o aguas contaminadas (Glazer y Nikaido 2007).

En el 2007, Snajdr y Baldrian determinaron la actividad enzimática de lacasas y manganeso peroxidasas en fermentación líquida. Se utilizaron los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor* desarrollados sobre celulosa como única fuente de carbono y energía. Los hongos fueron capaces de crecer y producir enzimas lacasas y manganeso peroxidasas a diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 °C) la mayor producción enzimática reportada se encontró a 25 y 30 °C en *Pleurotus ostreatus* y a 35 °C en *Trametes versicolor*. En el caso de la determinación de la enzima lacasa utilizaron una temperatura óptima de 50 y 55 °C para *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor*, respectivamente. Asimismo, para la determinación de manganeso peroxidasa fue a una temperatura óptima de 60 °C para el hongo *Trametes versicolor*.

Por su parte Yang y cols. (2011) trabajaron con el microorganismo *Trametes sp.* 5930 el cual fue aislado del Parque Natural de Shennongjia en China. *Trametes sp.* demostró tener un alto rendimiento de la enzima lacasa y fue capaz de degradar diferentes tintes de manera eficiente.

Al ser la lacasa una enzima utilizada en la biorremediación se sabe que la producción está influenciada por un gran número de factores ambientales (Téllez-Téllez y cols. 2008). Se ha reportado de igual manera que existen inductores capaces de favorecer o incrementar la producción de dichas enzimas (Gómez Dorado y cols. 2005).

Téllez Téllez y cols. (2008) evaluaron el crecimiento del hongo en dos sistemas fermentativos y la producción de la enzima lacasa en el hongo *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783 en fermentación líquida y sólida. Los resultados mostraron que el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* fue mayor en la fermentación líquida con respecto de la sólida con una biomasa reportada de 5.6 g/L y 4.5 g/L, respectivamente. La actividad enzimática de lacasa reportada fue de 13 000 y 2 430 U/L en el sistema fermentativo líquido y sólido, respectivamente.

Distintas investigaciones describen que la producción de enzimas ligninolíticas depende fuertemente de la cepa, sustrato y las condiciones de cultivo (Stajic y cols. 2006). Degollado-Estrada (2008) reportaron que no es suficiente contar con un organismo de pudrición blanca para garantizar la producción de enzimas lacasas, sino que también es necesario encontrar la mejor cepa productora de enzimas. Por lo que realizaron una investigación en la que utilizaron los hongos *Pleurotus ostreatus* (ATCC-38537 y ATCC-58052) en el sistema fermentativo en estado líquido.

Arantes y cols. (2011) evaluaron diferentes variables (pH, temperatura y agitación) en la eficiencia de producción de la enzima manganeso peroxidasa obtenida por un sistema fermentativo en estado sólido, se empleó como soporte los residuos de eucalipto, utilizando el hongo *Lentinula edodes*. Los resultados señalaron que el pH fue el parámetro más significativo que afecta la actividad enzimática de manganeso peroxidasa mientras que la temperatura y la velocidad de agitación presentaron estadísticamente efectos significativos. El pH óptimo para la producción de manganeso peroxidasa fue entre 4.0 y 5.0, con 1500-1700 UI kg⁻¹ de actividad enzimática a temperatura ambiente.

Osorio Echavarría y cols. (2011) evaluaron la decoloración de aguas residuales de la industria textil empleando el hongo *Bjerkandera sp.* de pudrición blanca. Asimismo, analizaron el efecto de la presencia de las sales NaCl y Na₂CO₃, la concentración del agua residual y la esterilización, sobre el grado de decoloración. Los resultados demostraron que la presencia de sales incrementan la actividad de la enzima lignino peroxidasa de 5 a 20 U/L, sin afectar la actividad de la enzima manganeso peroxidasa (70 U/L). El tratamiento de decoloración de efluentes textiles en condiciones estériles alcanzó un 65 % en 8 días de forma contraria se alcanzó una decoloración del 40 % en condiciones no estériles de efluentes textiles.

En el 2016, un estudio realizado por Chan y cols. mostró el aislamiento y evaluación de la actividad enzimática ligninolítica de macromicetos nativos del estado de Veracruz en una fermentación sólida y líquida.

En la fermentación sólida emplearon como soporte natural paja de trigo y bagazo de caña. Los resultados mostraron 70 aislamientos de los cuales 41 presentaron actividad enzimática de lacasa y manganeso peroxidasa. Sin embargo, seleccionaron tres cepas con mayor producción de enzimas (*Trametes máxima* SM9, *Pycoporus sanguineus* ACT1 y

Daedalea elegans PM7) para la evaluación cuantitativa de la actividad de lacasa y manganeso peroxidasa. En los cultivos líquidos, detectaron valores altos de lacasas y manganeso peroxidasa para la cepa *Trametes máxima* con 9121.8 y 477.9 U/mg de proteína, respectivamente. Seguida por la cepa *Pycoporus sanguineus* con una actividad máxima de lacasas y manganeso peroxidasa de 5422.2 y 41.0 U/mg de proteína, respectivamente. Finalmente, con la cepa *Daedalea elegans* obtuvieron 1784.2 y 40.0 U/mg de lacasas y manganeso peroxidasa, respectivamente. Para el caso de la fermentación sólida, la cepa *Pycoporus sanguineus* obtuvo mayor actividad de lacasa en el residuos de paja de trigo y bagazo de caña con 1409.9 y 1404.8 U/mg de peso seco, respectivamente. Mientras que la actividad de manganeso peroxidasa fue mejor sobre bagazo de caña tanto para *Pycoporus sanguineus* y *Trametes máxima* con 619.6 y 519.6 U/mg de peso seco, respectivamente.

Retes Pruneda (2014) propuso una alternativa de tratamiento para vinanzas (residuos que se obtienen después de haber realizado la destilación de azúcares fermentados provenientes de la caña de azúcar) tequileras y mezcaleras para una aplicación a nivel industrial. Ellos evaluaron la actividad enzimática de lacasa, lignino peroxidasa y manganeso peroxidasa en fermentación líquida. Utilizaron 20 cepas de hongos ligninolíticos de podredumbre blanca de la madera, de las cuales se seleccionaron dos cepas con mayor producción que fueron *Pleurotus ostreatus* 7992 y *Trametes trogii* 8154 por su capacidad de crecer en un agar sólido con vinaza tequilerera. La máxima actividad de lacasa que se obtuvo fue de 120 y 390 UI/L, de lignino peroxidasa 190 y 95 UI/L y, finalmente, en manganeso peroxidasa fue de 710 y 720 UI/L en *Pleurotus ostreatus* y *Trametes trogii*, respectivamente.

Vladimir Elisashvili y cols. (2008) evaluaron el efecto del sustrato en la producción de enzimas degradantes de ligninocelulosa (manganeso peroxidasa y lacasas) en dos sistemas fermentativos (sólido y líquido) a un pH de 6 empleando los hongos *Cerrena máxima* IBB 681, *Funalia trogii* IBB 146, *Trametes pubescens* IBB 663, *Trametes versicolor* IBB 897, *Coloriopsis polizona* 38443, *Pycoporus coccineus* 38527 y *Pleurotus ostreatus* 2191 en diferentes sustratos como hojas de árbol, paja de trigo, cáscara de manzana y cáscara de plátano, en el caso de la fermentación sólida. Ellos mostraron que en la fermentación en estado sólido los hongos *C. máxima*, *C. polizona*, *F. trogii*, *P.*

ostreatus, *T. pubescens* y *T. versicolor* obtuvieron una actividad máxima de 253, 290, 988, 339, 208, y 662 U l⁻¹ de enzima lacasa, respectivamente. En el caso de la enzima manganeso peroxidasa fue con 152, 454, 685, 234, 690 y 690 U l⁻¹, respectivamente. Para el hongo *P. coccineus*, mostró una actividad de lacasas de 573 U l⁻¹, pero no presentó actividad de manganeso peroxidasa. Para el caso de la fermentación en estado líquido la actividad máxima de lacasas en los hongos *C. máxima*, *C. polizona*, *F. trogii*, *P. ostreatus*, *T. pubescens* y *T. versicolor* fue de 7620, 1780, 2832, 631, 1680, 3008 U l⁻¹, respectivamente. Para la enzima manganeso peroxidasa se mostró una máxima actividad de 367, 896, 1263, 55, 172 y 202 U l⁻¹, respectivamente. Nuevamente para el caso del hongo *P. coccineus* en la actividad de lacasas fue de 2619 U l⁻¹, sin embargo, no se presentó actividad enzimática para la enzima manganeso peroxidasa.

Grace Karp y cols. (2015) optimizaron la producción de la enzima lacasa y la delignificación del bagazo de caña de azúcar utilizando el hongo *Pleurotus ostreatus*, de la universidad federal de Paraná, en un sistema fermentativo en estado sólido con diferentes concentraciones de extracto de levadura y nitrógeno. Los resultados que obtuvieron de la mejor concentración de extracto de levadura con 7.5 g/L y un 7 % de nitrógeno total con una máxima actividad reportada de 151.6 U/g y se registró entre los días 4 y 5 de la fermentación.

Janja Babic y cols. (2012) optimizaron la actividad enzimática ligninolítica y la tasa de producción, además de probar la capacidad de las enzimas obtenidas para decolorar diversos colorantes sintéticos utilizando el hongo *Cerporiopsis subermispora*. Emplearon un medio de cultivo en estado líquido añadiéndole cubos de maderas diferentes (madera de haya y madera de pino) además de otra fermentación con cubos de poliuretano. Los mejores resultados se mostraron en la madera de haya y en la de pino con las actividades más altas de la enzima lacasa con 150 U/L y 135 U/L, respectivamente. En contraste, la enzima manganeso peroxidasa reportó una actividad máxima de 60 U/L en el medio de cultivo con cubos de madera de haya y 20 U/L con cubos de madera de pino. La producción de enzimas en la espuma de poliuretano no fue muy alta ya que reportaron 2 U/L para la enzima lacasa y 40 U/L para la enzima MnP.

Por otra parte, Cruz y cols. (2015) evaluaron el efecto del colorante textil amarillo azo en la actividad y perfil de expresión de los genes que codifica para la enzima versátil

peroxidasa del hongo *Pleurotus ostreatus* desarrollado en una fermentación sumergida. Realizaron una fermentación basal y otra con el colorante, En la fermentación con colorante reportaron una actividad máxima de 703.8 U/mL a las 187 h y en la fermentación basal obtuvieron 448 U/mL a las 175 h.

Ese mismo año, Cuamatzi Flores y cols. (2015) determinaron el efecto de un colorante sobre la cinética de crecimiento y la actividad de la enzima decolorante peroxidasa producida por *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida. Realizaron una fermentación basal y otra con el colorante, donde en la fermentación con colorante se obtuvo una ligera disminución en la biomasa (X_{max}) producida 7.217 g/L^{-1} y en la velocidad específica de crecimiento (μ) 0.034 h^{-1} esto a comparación con la fermentación basal sin colorante en donde la X_{max} fue de 8.4 g/L^{-1} y la μ de 0.055 h^{-1} . Respecto a la actividad enzimática, determinaron el pH y la temperatura óptima de actividad que fue de 3.0 y $45 \text{ }^\circ\text{C}$ respectivamente. Asimismo, observaron un claro efecto de inducción del colorante en la actividad enzimática obteniendo una actividad máxima de 1576 UI/L en comparación con la actividad máxima alcanzada en la fermentación basal la cual fue de 852 UI/L.

Finalmente, en el 2016 Ortellado y cols. formularon un medio de cultivo suplementado con compuestos aromáticos e iones metálicos, con el fin de aumentar los valores de actividad de lacasas por el hongo *Trametes* sp. Se utilizó como única variable el Mn^{+2} . Ellos reportaron la mayor actividad enzimática de lacasas con 272.46 U/L con una concentración de 4.5 mM de Mn^{+2} .

4. HIPÓTESIS

La producción de enzimas oxidasas de *Pleurotus ostreatus*, cepa ARS 3526, será distinto en el sistema fermentativo en estado líquido con respecto del medio sólido.

5. JUSTIFICACIÓN

Existe gran variedad de hongos que tienen la habilidad de degradar lignina, ya que producen distintos complejos enzimáticos lignocelulolíticos. Dentro de la gran variedad de hongos que producen enzimas está *Pleurotus ostreatus*, hongo que ha demostrado una excelente producción de distintas enzimas. La mayoría de las enzimas caracterizadas en los hongos son de tipo fenoloxidasas, enzimas que se han utilizado para el tratamiento de aguas residuales, productos xenobióticos y compuestos lignocelulolíticos.

El uso potencial del hongo *Pleurotus ostreatus* en la investigación científica, así como, la necesidad de buscar nuevos microorganismos productores de enzimas fenoloxidasas hacen que junto con la biotecnología participen unidamente en el desarrollo de nuevos procesos para la producción de las enzimas requeridas. La producción de enzimas a partir de hongos filamentosos ha sido desarrollada extensivamente a través del uso de la fermentación líquida y sólida, esto nos lleva a la determinación del tipo de sistema fermentativo para una mejor producción de estas enzimas.

La utilización de las enzimas fenoloxidasas constituye uno de los campos de la biotecnología de mayor actualidad y que podría representar un vector de gran importancia benéfica para los aspectos ambientales por la biodegradabilidad de compuestos lignocelulolíticos producidos por el hongo *Pleurotus ostreatus* (ARS 3526). La producción enzimática de este hongo puede representar una alternativa potencial, ecológica y económica, para la biorremediación de efluentes contaminados. Por lo que esta investigación pretende aportar conocimiento relevante sobre el tipo de fermentación que favorece la producción de fenoloxidasas por *Pleurotus ostreatus* de la cepa ARS 3526.

6. OBJETIVOS

6.1. General

Evaluar la actividad enzimática de oxidasas como la manganoso peroxidasa (MnP), alcohol veratríl oxidasa (AVO), versátil peroxidasa (VP), lacasa (LAC) y las decolorizantes peroxidadas (DyP) producidas por *Pleurotus ostreatus* ARS 3526 en fermentación sólida y líquida.

6.2. Particulares

- ✓ Caracterizar las fermentaciones sólida y líquida de *Pleurotus ostreatus* cepa ARS 3526
- ✓ Determinar la actividad enzimática extracelular de las enzimas manganoso peroxidasa, alcohol veratríl oxidasa, versátil peroxidasa, lacasa y las decolorantes peroxidadas de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sólida y líquida.
- ✓ Determinar los rendimientos teóricos de cada enzima en las fermentaciones sólida y líquida.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

En esta investigación el organismo de estudio fue el hongo *Pleurotus ostreatus* de Agricultural Research Service (ARS) 3526. Se evaluó la actividad enzimática de fenoloxidasas, el rendimiento teórico de cada enzima, proteína soluble y consumo de glucosa en sus distintas fases de crecimiento (adaptación, exponencial y estacionaria) (figura 11).

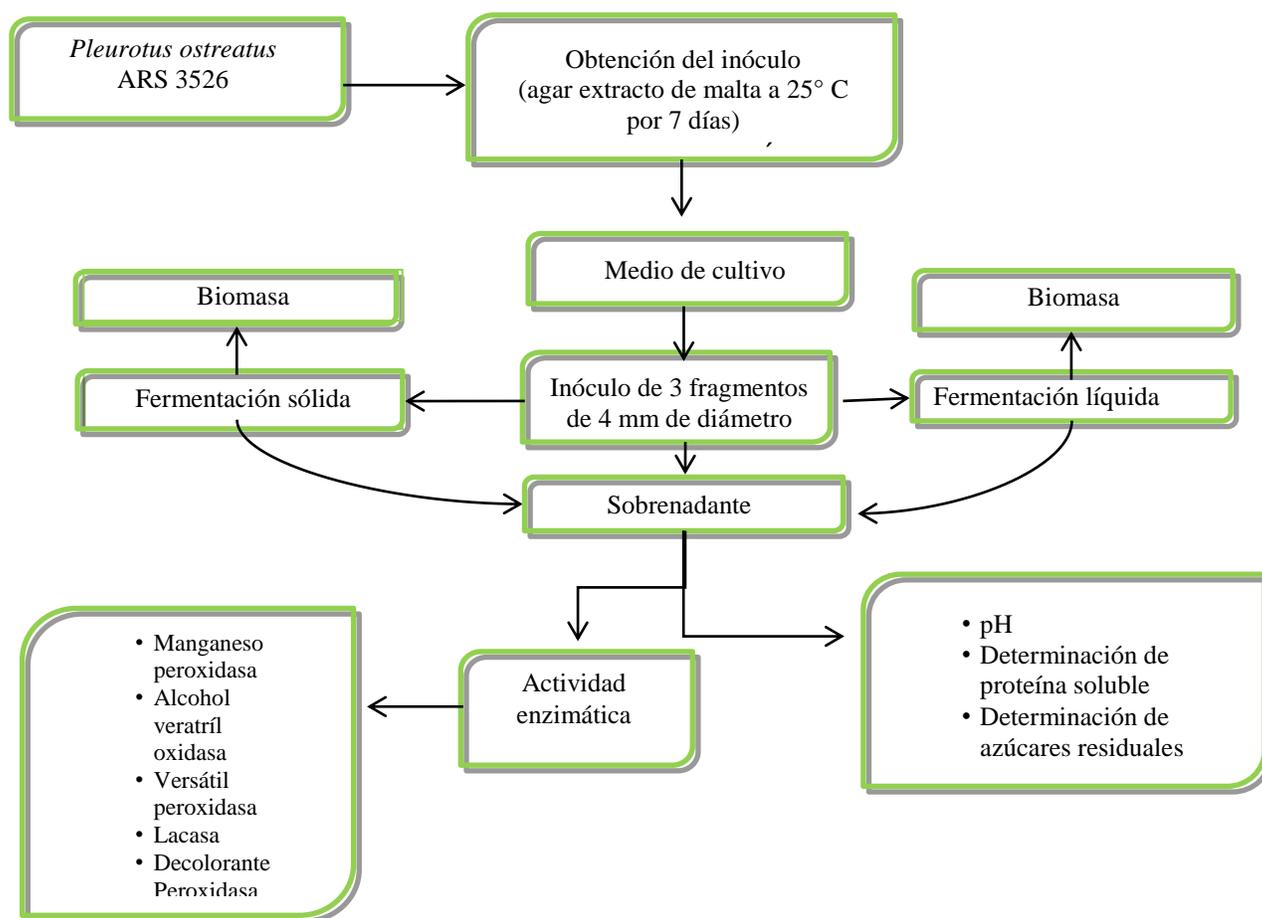


Figura 11. Esquema general de la estrategia experimental

7.1. Microorganismo de estudio e inóculo

Se utilizó la cepa de *Pleurotus ostreatus* perteneciente al laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas (figura 12). El hongo se desarrolló en agar extracto de malta a 25 °C por 7 días y después se conservó a una temperatura de 4 °C, misma que se resembró cada mes. El inóculo que se adicionó a cada matraz tanto en fermentación sólida como líquida fue de 3 fragmentos de micelio de 4 mm de diámetro los cuales fueron tomados de la periferia de la colonia.



Figura 12. Cepa de *Pleurotus ostreatus* ARS 3526

7.2. Condiciones del medio de cultivo de *Pleurotus ostreatus*

La composición del medio de cultivo para ambas fermentaciones se preparó como se indica en la tabla 4, con un pH inicial de 6.5 el cual se ajustó con NaOH (Téllez-Téllez y cols. 2008). Ambas fermentaciones se llevaron a cabo por triplicado, en la fermentación líquida se utilizaron matraces Erlenmeyer de 125 mL y 50 mL de medio de cultivo, a incubación se llevo a cabo con agitación orbital a 120 rpm a temperatura de 25 °C; para la fermentación en estado sólido se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL con 0.5 g de espuma de poliuretano, cortada en cubos de 0.5 cm por lado como soporte inerte, a los cuales se adicionaron 15 mL de medio de cultivo.

Tabla 4. Medio de cultivo

Reactivos	g/L
Extracto de levadura	5.0
Glucosa	10.0
K₂HPO₄ (Difosfato de potasio)	0.4
ZnSO₄.7H₂O (Sulfato de zinc)	0.001
KH₂PO₄ (Fosfato de potasio)	0.6
FeSO₄.7H₂O (Sulfato ferroso)	0.05
MnSO₄. H₂O (Sulfato de manganeso)	0.05
MgSO₄. 7H₂O (Sulfato de magnesio)	0.5
CuSO₄.5H₂O (Sulfato cúprico)	0.25

7.3. Sobrenadante

En ambas fermentaciones se obtuvo un sobrenadante. El primer muestreo se llevo acabo a las 48 h y posteriormente cada 24 h hasta terminar la fermentación en la fase estacionaria. Para la obtención del sobrenadante en fermentación líquida, el medio de cultivo se filtró en papel Whatman No.1 con un equipo de filtración al vacío. Para la obtención del sobrenadante en fermentación sólida se agregaron 25 mL de agua destilada, posteriormente el sobrenadante se filtro al vacío en papel Whatman No.1. Ambas fermentaciones el sobrenadante obtenido se conservó en tubos eppendorf, en congelación a -20 °C, hasta su posterior utilización.

7.4. Biomasa

En la fermentación líquida, la biomasa (X) producida fue separada del sobrenadante y deshidratada en horno a 60 °C por 24 h. El peso seco de la biomasa se reportó como gramos de biomasa seca (X) por litro de medio de cultivo (g/L) (Díaz y cols. 2013). Para el caso de la fermentación sólida, la determinación de biomasa se obtuvo por diferencia de peso. Es decir, después de la obtención del sobrenadante, la biomasa junto con la espuma de poliuretano se deshidrato a 60 °C por 24 h (Díaz y cols. 2013).

7.5. Parámetros cinéticos de crecimiento del hongo

Para llevar a cabo la determinación de los parámetros se consideró el crecimiento de la biomasa $X=X(t)$ según la ecuación logística (ecuación 1) por la minimización del error cuadrático y esto con ayuda de la herramienta solver de la hoja electrónica de Excel (Microsoft) (Díaz y cols. 2013).

$$dX / dt = \mu (1 - X / X_{\max}) X \quad (\text{Ecuación 1})$$

Es decir, la solución de la ecuación logística es:

$$X = X_{\max} / (1 + Ce^{-\mu t})$$

Donde:

μ = Máxima velocidad específica de crecimiento (h^{-1})

X_{\max} = Valor de biomasa máxima o de equilibrio (g/L) cuando $dX / dt = 0$ para $X > 0$

t = Tiempo transcurrido de la fermentación (h)

$$C = \frac{X_{\max} - X_o}{X_o}$$

Donde:

C = Valor que representa la relación entre la diferencia de X_{\max} y X_o (g/L)

X_o = Valor de la biomasa inicial (g/L).

Se calcularon además los siguientes parámetros:

- Rendimiento de biomasa con respecto al sustrato

- Rendimiento teórico de la actividad enzimática con respecto a la biomasa producida
- Productividad en la máxima actividad enzimática
- Tasa específica de la formación de la enzima

7.6. Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el software Sigma Stat PRISM, versión 5.01. Los valores de biomasa de los dos sistemas fermentativos se evaluaron con la prueba de t-Student. Los valores de *P* inferiores a 0.050 se consideran estadísticamente significativos.

7.7. Determinación del pH

El pH se determinó por potenciometría. El sobrenadante obtenido de ambas fermentaciones se monitoreó desde el tiempo 0, a las 48 h y posteriormente cada 24 h hasta el final de la fermentación (Díaz y cols. 2013).

7.8. Determinación de proteína soluble

La proteína total del sobrenadante se determinó por el método de Bradford (1976). La determinación se llevó a cabo cada 24 h posteriores a las 48 h del inicio de la fermentación. A 100 μL de sobrenadante se le adicionaron 40 μL del reactivo de Bradford, el volumen se ajustó a 1 mL con agua destilada y la absorbancia se leyó a 595 nm. Se usó albúmina sérica bovina como proteína estándar.

7.9. Determinación del contenido de azúcares residuales

Para determinar el contenido de azúcares se tomó como referencia la técnica de ácido 3,5-dinitrosalicílico DNS (Miller 1959). Se realizó una curva con concentraciones conocidas de glucosa y las muestras utilizadas para dicha técnica fueron tomadas del sobrenadante de las fermentaciones, por lo que a 50 μL de sobrenadante se le adicionaron 950 μL de agua desionizada y 2 mL de DNS. De esta manera, el volumen final fue de 3 mL de reacción y posteriormente las muestras se colocaron en baño María a temperatura de ebullición durante 5 minutos y la reacción se detuvo sumergiendo los tubos en agua fría. Para concluir, se leyó a una absorbancia de 575 nm.

7.10. Determinación de actividad enzimática

7.10.1. Actividad de Manganeso Peroxidasa

Para llevar a cabo la actividad enzimática de Manganeso Peroxidasa (MnP) se modificó la técnica de Giardina y cols. (2000) respecto a la temperatura de incubación. Se utilizó sulfato manganoso como sustrato a 0.5 mM en buffer de malonato de sodio a 50 mM a pH de 4.5. Se utilizaron 850 μ L de sustrato y se añadieron 100 μ L de sobrenadante, posteriormente se adicionaron 50 μ L de H₂O₂ a 0.05 mM y se incubaron a 30 °C por un minuto. Al término de la incubación la mezcla de reacción se leyó a una absorbancia de 270 nm.

7.10.2. Actividad de Alcohol Veratríl Oxidasa

La actividad enzimática de Alcohol Veratríl Oxidasa (AVO) se determinó agregando 375 μ L de buffer de tartrato de sodio 0.33 M a pH 3, 125 μ L de alcohol veratrílico 70 mM, 400 μ L de agua y 100 μ L de sobrenadante. Se leyó a una absorbancia de 310 nm después de 30 minutos de incubación a 40 °C (Díaz y cols. 2013).

7.10.3. Actividad de Versátil Peroxidasa

La actividad Versátil Peroxidasa (VP) se midió mediante la oxidación directa de Mn⁺² a través de la formación del complejo tartrato. Se utilizó la metodología llevada a cabo por Pérez-Boada y cols. (2005) en el cual se empleó como sustrato 850 μ L de sulfato de manganeso 20 mM en buffer de tartrato de sodio 0.1 M a pH 3 en presencia de 50 μ L de H₂O₂ a 0.1 mM y 20 μ L de sobrenadante. La mezcla de reacción se incubó por 1 min a 24 °C y se leyó a una absorbancia de 238 nm.

7.10.4. Actividad de Lacasa

La actividad enzimática de lacasa (LAC) se determinó utilizando 2,6-dimetoxifenol (DMP) como sustrato. La mezcla de reacción contenía 950 μ L de DMP al 2mM en buffer de acetatos 0.1 M a pH 4.5 y 50 μ L de sobrenadante. La absorbancia se determinó a 468 nm, con 1 min de incubación a 40 °C. Se considera que una unidad de actividad de lacasa (U), es la cantidad de enzima que provoca un incremento de una unidad de absorbancia por minuto (Díaz y cols. 2013).

7.10.5. Actividad de Decolorante Peroxidasa

La actividad enzimática de Decolorante Peroxidasa (DyP) se determinó utilizando y modificando la técnica de Salvachúa y cols. (2013) respecto al pH y temperatura de incubación. Se usó como sustrato 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) ABTS a 2.5 mM en buffer de tartrato de sodio a 0.1 M a pH 3 y H₂O₂ como activador de la reacción a 0.1 mM. Para llevar a cabo la actividad se colocaron 850 µL de sustrato, 100 µL de sobrenadante y 50 µL de H₂O₂. Posteriormente, se incubaron por 1 min a 45 °C y se leyó su absorbancia a 436 nm.

8. RESULTADOS

8.1. Fermentación líquida

8.1.1. Biomasa de *Pleurotus ostreatus*

La X_{\max} que presentó la curva de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* ARS 3526 fue de 7.31 g/L a las 330 h de fermentación. Se observó que la fase de adaptación duró aproximadamente 150 h. Después de ese tiempo, se inició la fase exponencial de crecimiento que terminó cerca de las 300 h. Posteriormente dar inicio a la fase estacionaria del crecimiento del hongo. La velocidad específica de crecimiento (μ) fue de 0.02 h^{-1} (figura 13).

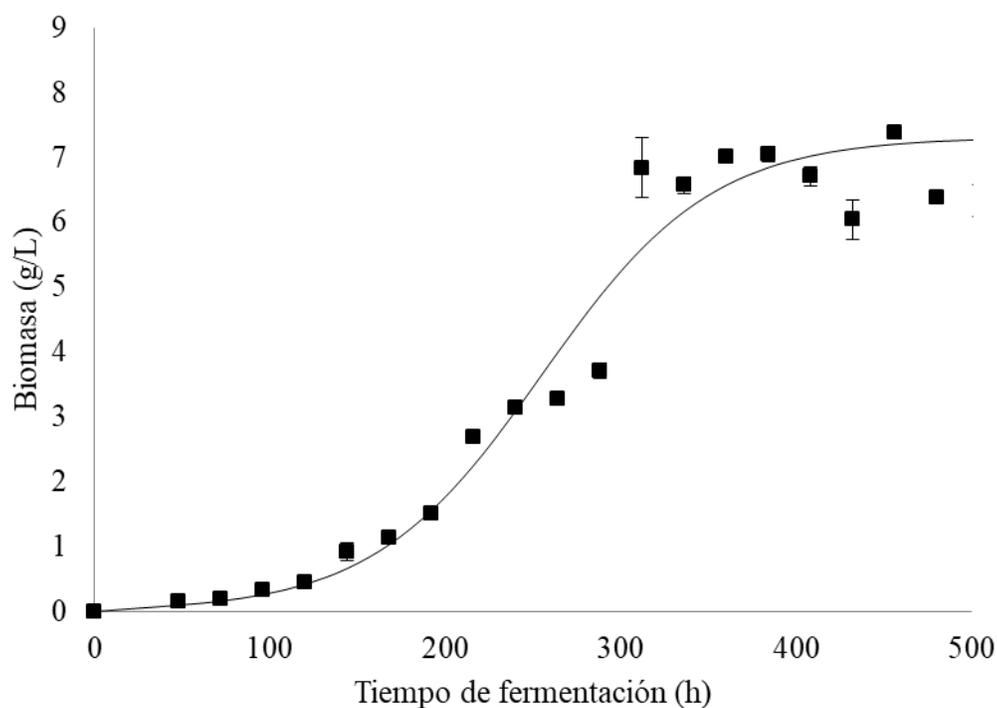


Figura 13. Biomasa de *Pleurotus ostreatus* en fermentación líquida. Las barras que se muestran en cada punto (\perp) corresponden a la desviación estándar.

8.1.2. Azúcares residuales en fermentación líquida

En la curva de consumo de azúcares residuales se observa que la concentración de glucosa disminuyó gradualmente hasta llegar a casi cero, a las 312 h, este tiempo coincide con el inicio de la fase estacionaria del crecimiento del hongo (figura 14).

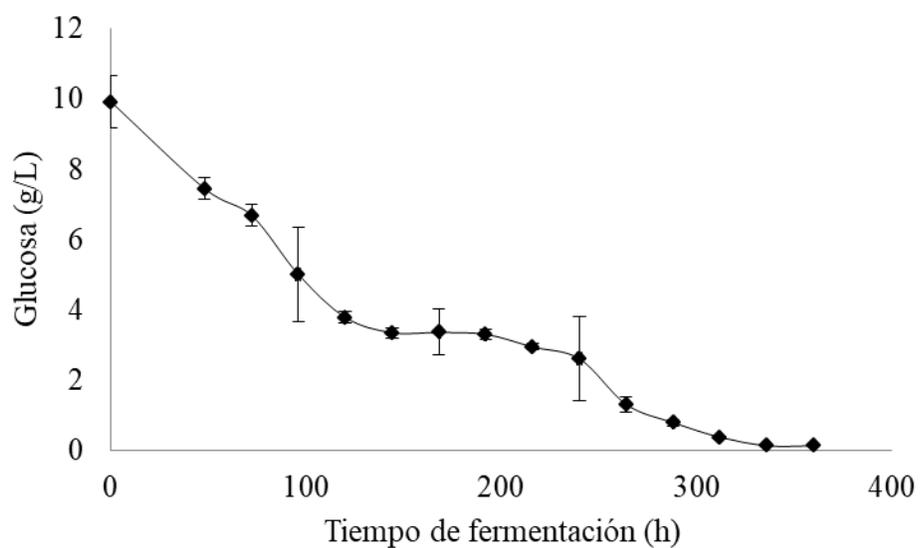


Figura 14. Azúcares residuales de *Pleurotus ostreatus* en fermentación líquida. Las barras que se muestran en cada punto (\perp) corresponden a la desviación estándar.

8.1.3. Perfil de pH en fermentación líquida

Durante la fermentación de *Pleurotus ostreatus* el pH inicial fue de 6.5. Se observó que se mantuvo constante en las fases de adaptación y exponencial hasta las 360 h. Posteriormente, en la fase estacionaria del crecimiento del hongo los valores de pH descienden de 6.03 a 5.80 debido a los ácidos orgánicos que se producen durante la fermentación (figura 15).

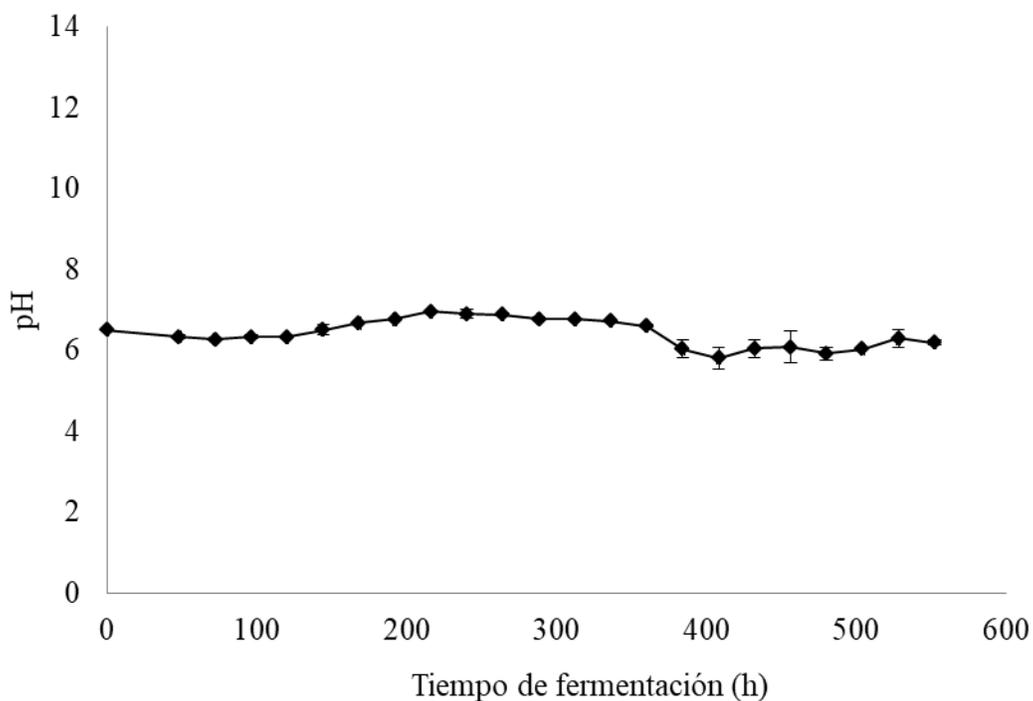


Figura 15. Perfil de pH de *Pleurotus ostreatus* en fermentación líquida. Las barras que se muestran en cada punto (\bar{I}) corresponden a la desviación estándar.

8.1.4. Determinación de proteína soluble en fermentación líquida

Durante la fermentación se observó una producción de proteína soluble. Al inicio la proteína soluble disminuye en la fase de adaptación para posteriormente incrementar hasta alcanzar una producción cercana a los 1000 $\mu\text{g/mL}$ de proteína, en la fase exponencial (figura 16).

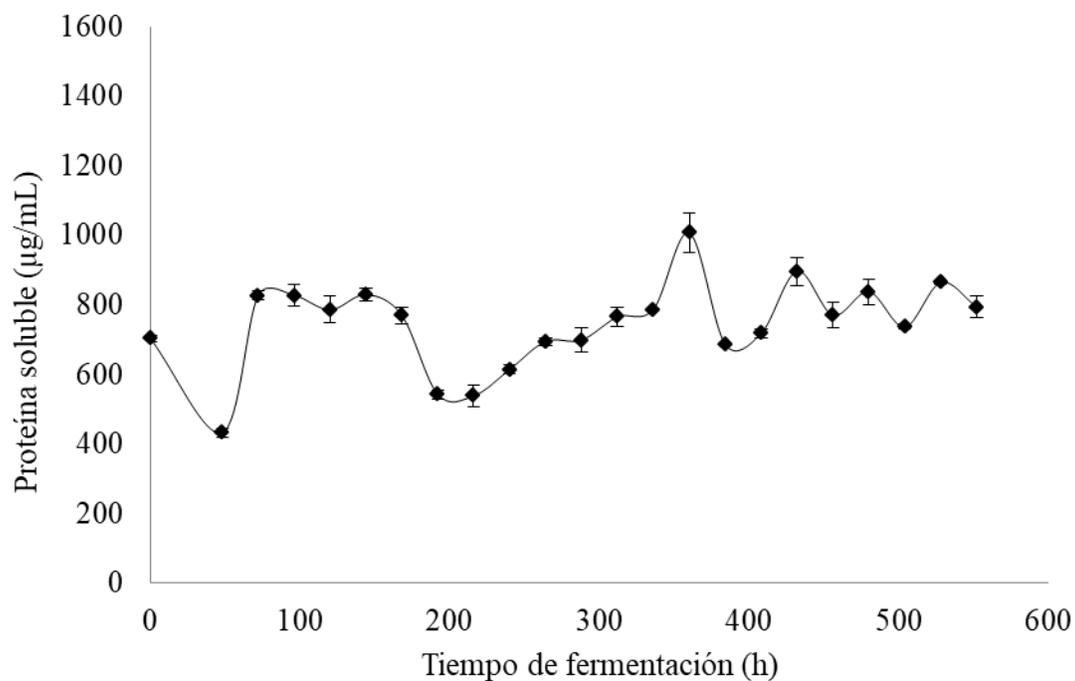


Figura 16. Determinación de proteína soluble de *Pleurotus ostreatus* en fermentación líquida. Las barras que se muestran en cada punto (\perp) corresponden a la desviación estándar.

8.1.5. Actividad enzimática de lacasas en fermentación líquida

Durante la fermentación se observó actividad enzimática de lacasas. Principalmente se observaron dos actividades de la enzima lacasa la primera fue a las 312 h y la segunda a las 480 h con 41.87 y 30.9 UI/L, respectivamente (figura 17).

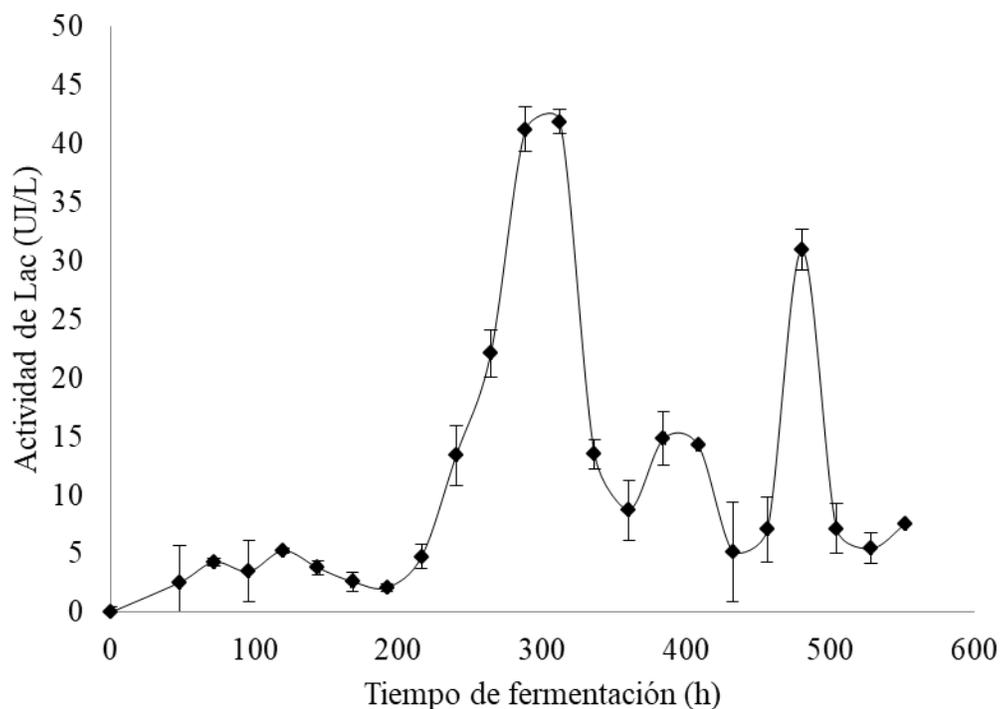


Figura 17. Actividad enzimática de lacasas de *Pleurotus ostreatus* en fermentación líquida. Las barras que se muestran en cada punto (\perp) corresponden a la desviación estándar.

8.1.6. Actividad enzimática de alcohol veratríl oxidasa en fermentación líquida

La actividad enzimática de AVO mostró una constante variación a lo largo del desarrollo del hongo. Se registraron dos actividades máximas, la primera actividad fue a las 360 h aproximadamente con 20.14 UI/L y la segunda actividad fue a las 408 h con 19.82 UI/L (figura 18).

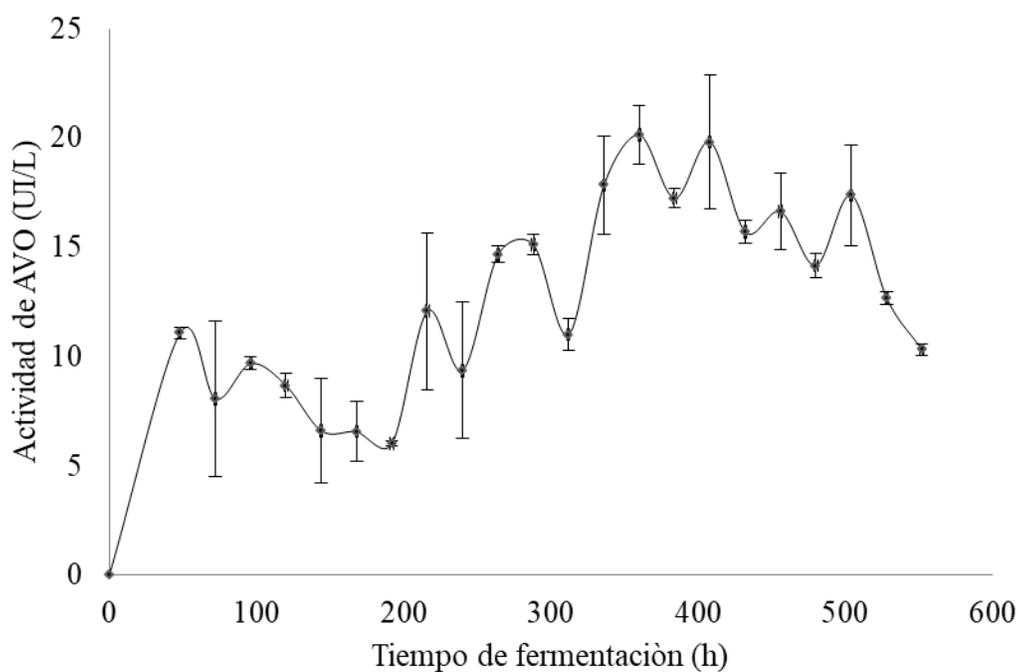


Figura 18. Actividad enzimática de alcohol veratríl oxidasa de *Pleurotus ostreatus* en fermentación líquida. Las barras que se muestran en cada punto (\perp) corresponden a la desviación estándar.

8.1.7. Actividad enzimática de versátil peroxidasa en fermentación líquida

A lo largo de la fermentación se registró actividad enzimática de VP. Se obtuvo una actividad máxima de esta enzima de 32.7 UI/L a las 168 h. Posteriormente, se registraron tres actividades más, la primera a las 216 h, la segunda a las 264 y la tercera a las 384 h con 30.35, 29.02 y 29.74 UI/L, respectivamente (figura 19).

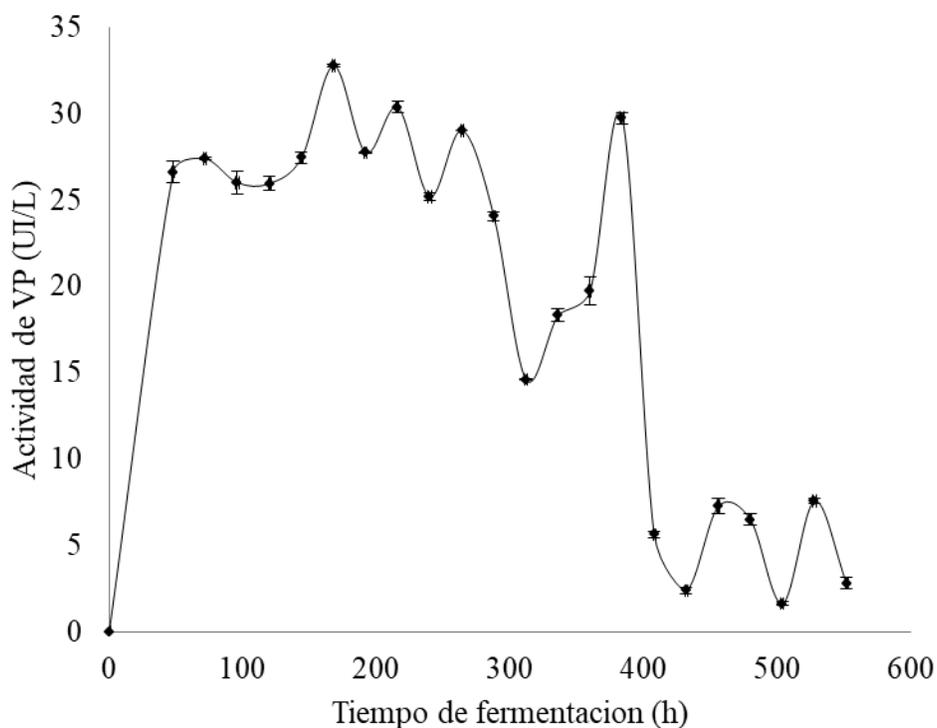


Figura 19. Actividad enzimática de versátil peroxidasa de *Pleurotus ostreatus* en fermentación líquida. Las barras que se muestran en cada punto (\perp) corresponden a la desviación estándar.

8.1.8. Actividad enzimática de manganeso peroxidasa en fermentación líquida

La actividad enzimática máxima registrada de MnP fue de 36.2 UI/L a las 120 h. Posteriormente, la actividad tiene un descenso gradual en la fase exponencial y finalmente en los últimos tiempos de la fermentación es baja (figura 20).

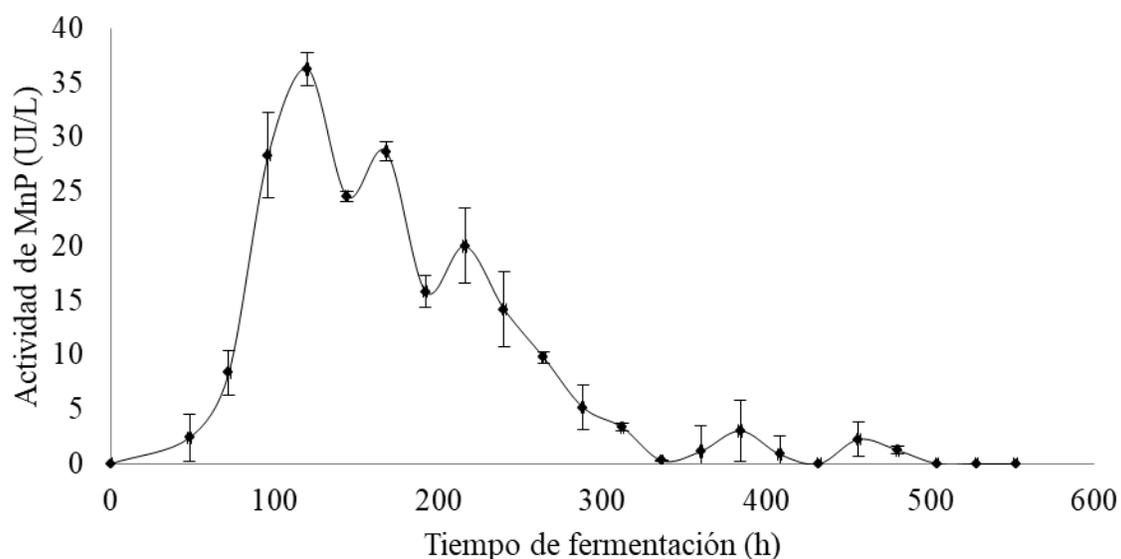


Figura 20. Actividad de manganeso peroxidasa de *Pleurotus ostreatus* en fermentación líquida. Las barras que se muestran en cada punto ($\bar{\Gamma}$) corresponden a la desviación estándar.

8.1.9. Actividad enzimática de decolorante peroxidasa en fermentación líquida

La actividad de DyP en la fase de adaptación presenta una actividad de 2.4 UI/L, en la misma fase se muestra una ligera disminución. Asimismo, en la fase estacionaria se presentan dos actividades, la primera de 3.5 UI/L a las 432 h y la segunda con 4.2 UI/L a las 480 h, esta última es la actividad máxima de la enzima DyP (figura 21).

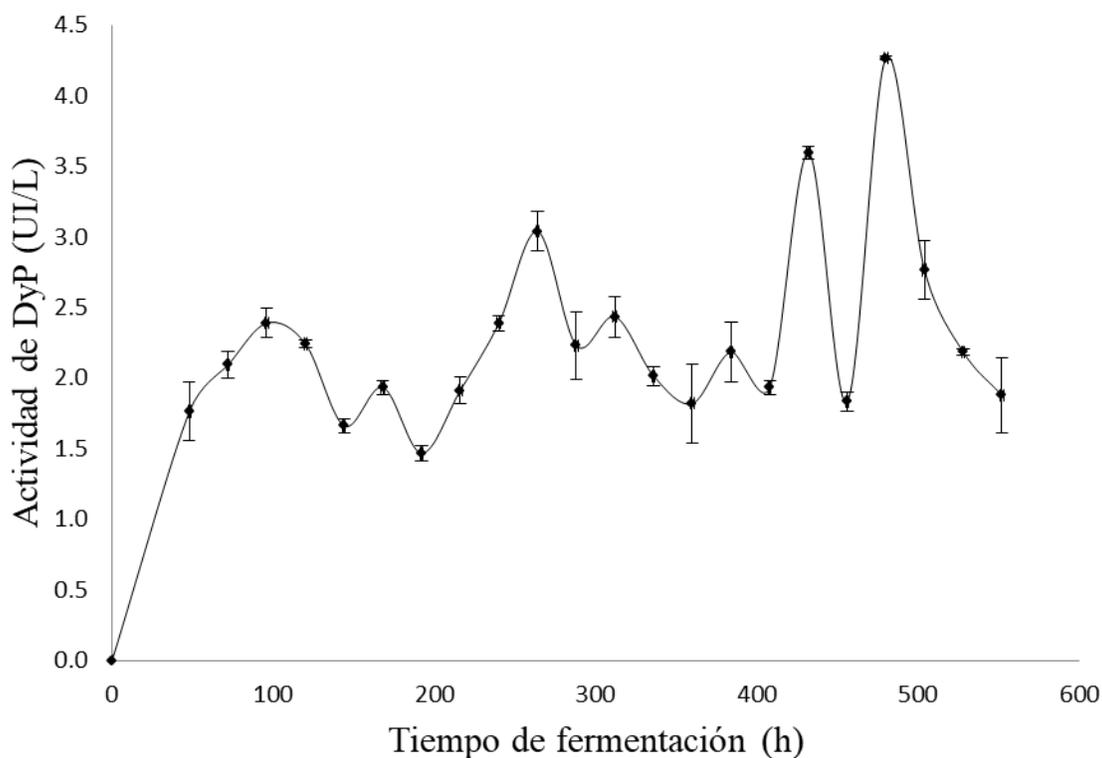


Figura 21. Actividad de decolorante peroxidasa de *Pleurotus ostreatus* en fermentación líquida. Las barras que se muestran en cada punto (\perp) corresponden a la desviación estándar.

8.2. Fermentación sólida

8.2.1. Biomasa de *Pleurotus ostreatus*

La X_{\max} que presentó la curva de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* ARS 3526 fue de 6.7 g/L a las 168 h de fermentación. En la curva de crecimiento, específicamente, la fase de adaptación fue aproximadamente de 75 h. Después de ese tiempo comenzó la fase exponencial y dió término cerca de las 150 h para posteriormente dar inicio a la fase estacionaria del crecimiento del hongo. La velocidad específica de crecimiento (μ) fue de 0.0555 h^{-1} (figura 22).

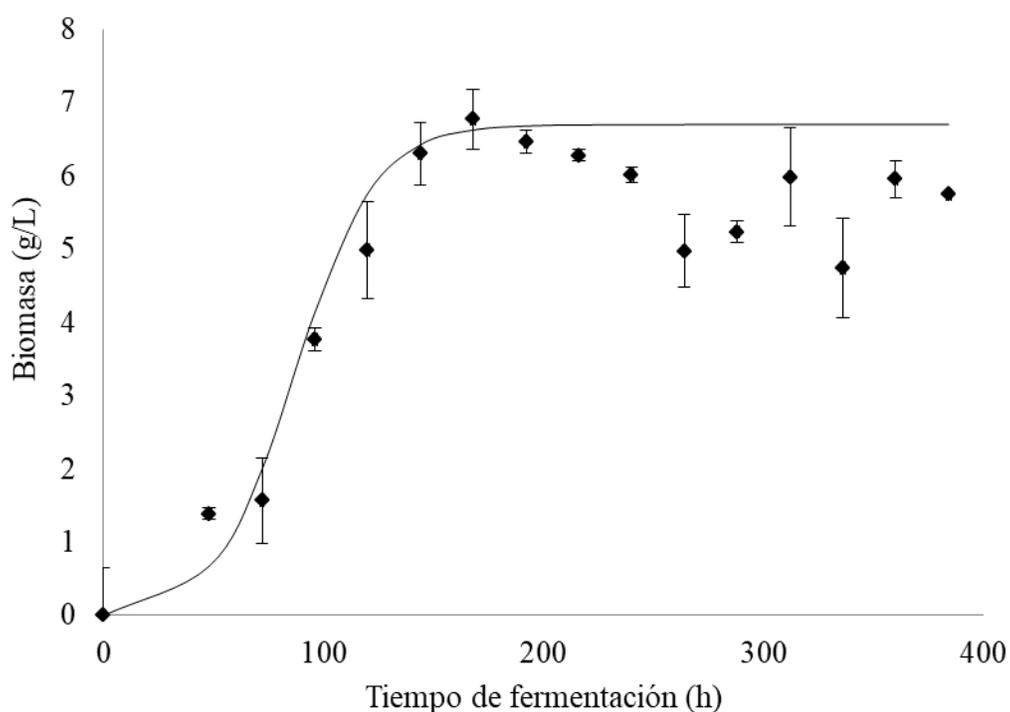


Figura 22. Biomasa de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sólida. Las barras que se muestran en cada punto ($\bar{\Gamma}$) corresponden a la desviación estándar.

8.2.2. Azúcares residuales en fermentación sólida

Durante el proceso de la fermentación, el agotamiento de la fuente de carbono se llevó a cabo durante la fase exponencial (aproximadamente a las 144 h), es decir en los primeros tiempos de la fermentación (figura 23).

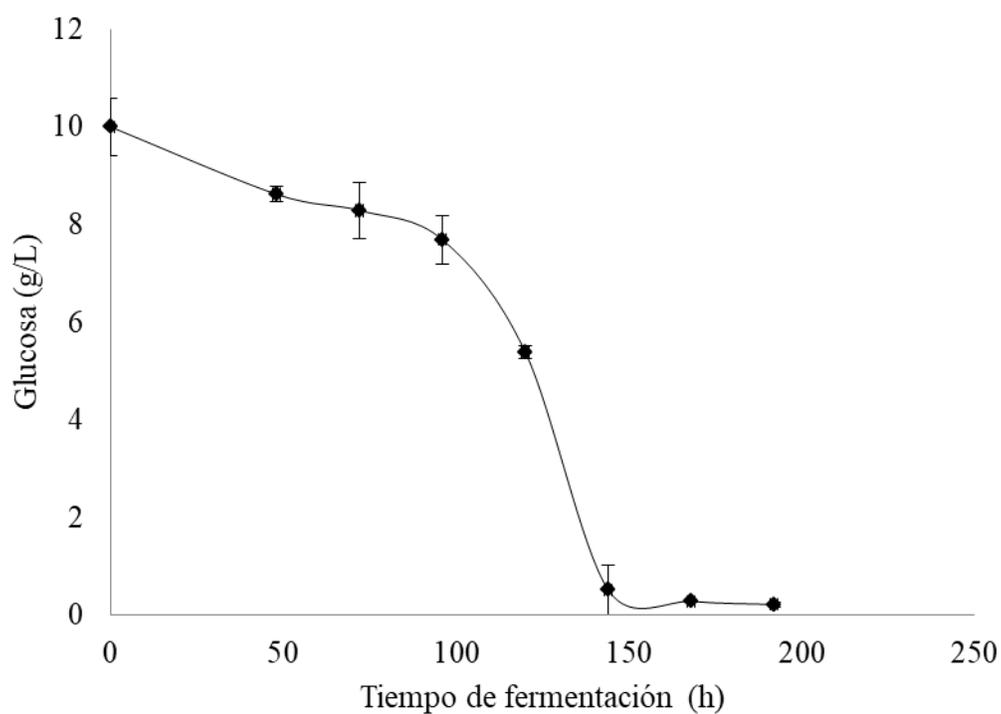


Figura 23. Azúcares residuales de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sólida. Las barras que se muestran en cada punto (\perp) corresponden a la desviación estándar.

8.2.3. Perfil de pH en fermentación sólida

Al inicio de la fermentación sólida el pH fue de 6.5. Durante la fase de adaptación el pH disminuyó a 5.8 debido a los ácidos orgánicos producidos por el hongo. En la fase exponencial el pH se mantuvo entre los valores 5.9 y 6.5 (figura 24).

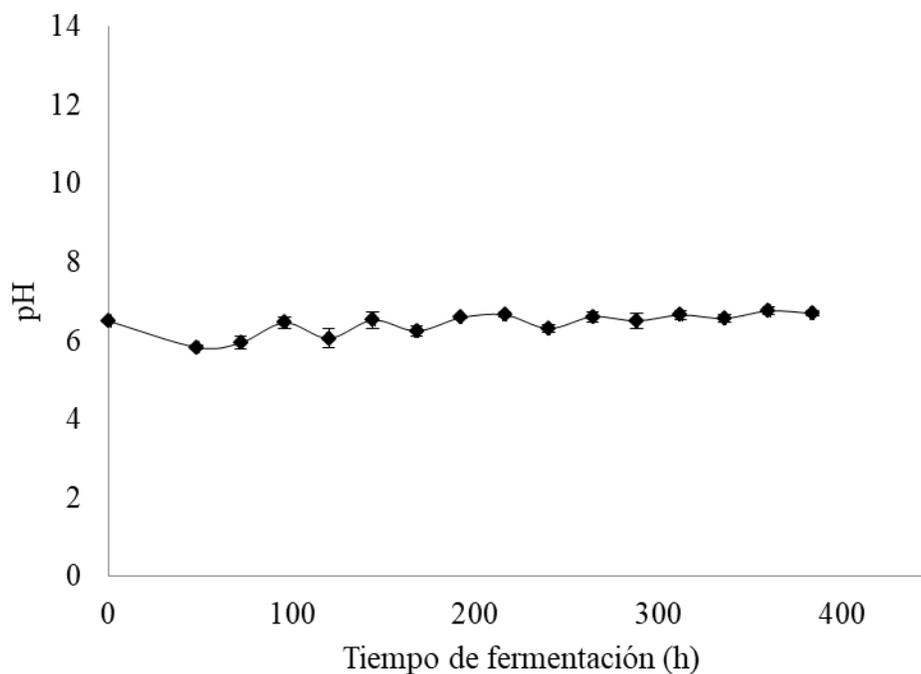


Figura 24. Perfil de pH de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sólida. Las barras que se muestran en cada punto ($\bar{\Gamma}$) corresponden a la desviación estándar.

8.2.4. Determinación de proteína soluble en fermentación sólida

Al inicio de la fermentación la concentración de proteína disminuye hasta 438 $\mu\text{g/mL}$. Durante la fase exponencial la proteína aumenta hasta alcanzar una producción de 1353.20 $\mu\text{g/mL}$, a las 360 h (figura 25).

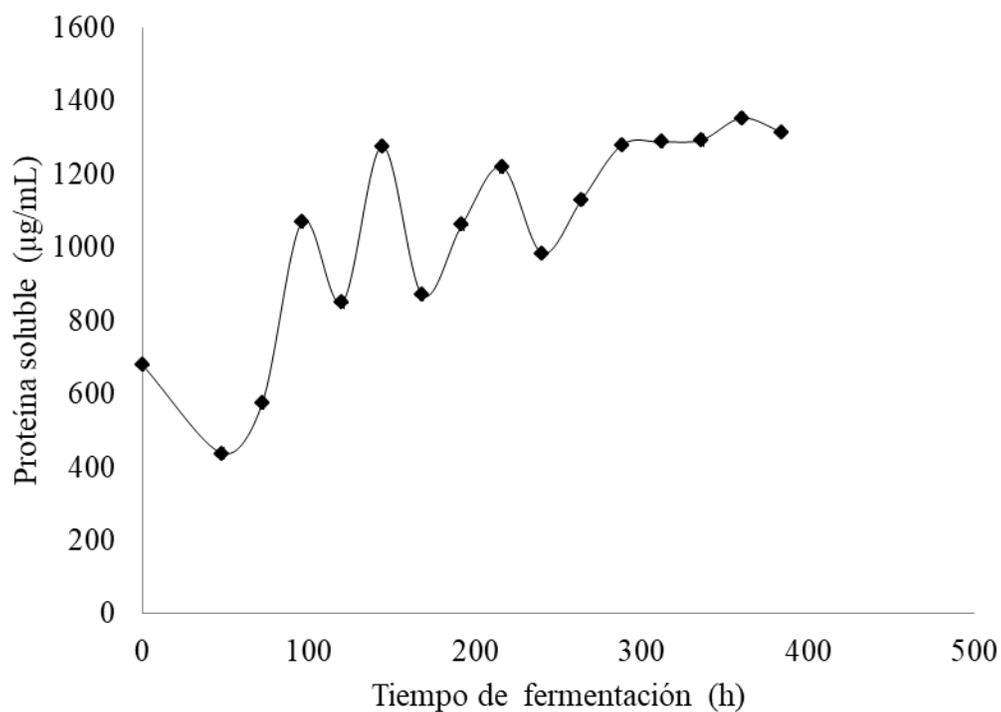


Figura 25. Proteína soluble de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sólida. Las barras que se muestran en cada punto (\perp) corresponden a la desviación estándar.

8.2.5. Actividad enzimática de lacasas en fermentación sólida

En las primeras horas del inicio de la fermentación la actividad enzimática de lacasas fue baja. La actividad máxima de esta enzima se registro a las 144 h, con 879.66 UI/L. Asimismo, se registraron dos actividades más, el primero a las 216 h con 439.66 UI/L y el segundo a las 288 h con 288 UI/L (figura 26).

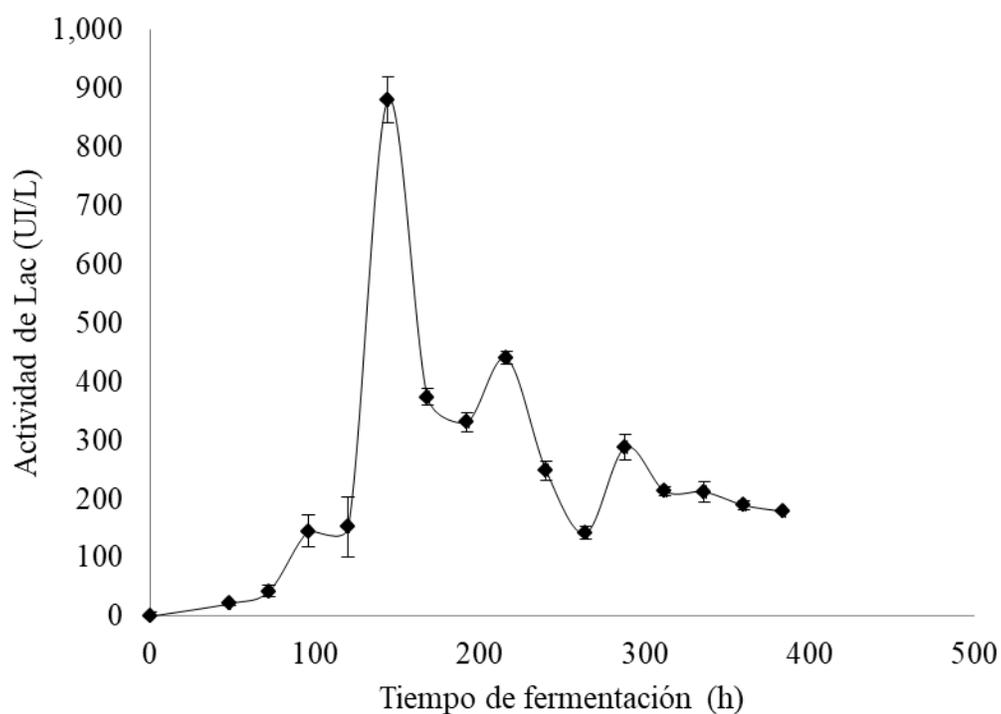


Figura 26. Actividad enzimática de lacasas de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sólida. Las barras que se muestran en cada punto ($\bar{\Gamma}$) corresponden a la desviación estándar.

8.2.6. Actividad enzimática de alcohol veratríl oxidasa en fermentación sólida

Durante la fermentación se presentó actividad enzimática de AVO. En la fase exponencial la actividad se mantuvo constante de 7.31 a 17.99 UI/L. A las 120 h se observó un incremento de la actividad enzimática con valores de 17.99 y 21.43 UI/L a las a las 216 y 312 h, respectivamente. Finalmente, la actividad máxima se reportó a las 336 h con 21.46 UI/L (figura 27).

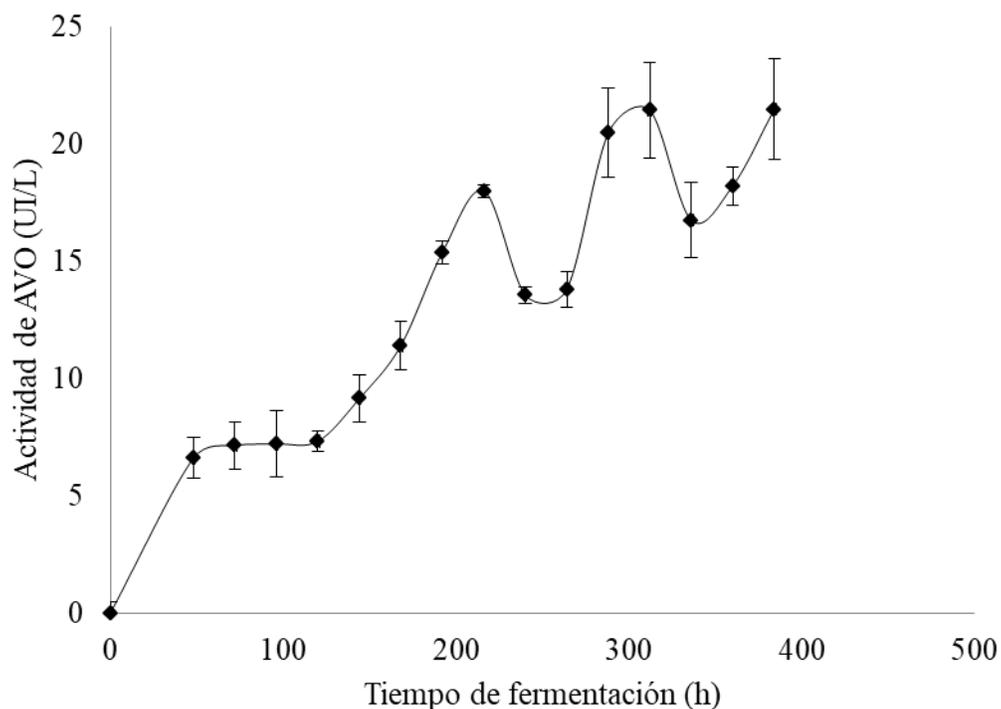


Figura 27. Actividad de alcohol veratríl oxidasa de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sólida. Las barras que se muestran en cada punto (\perp) corresponden a la desviación estándar.

8.2.7. Actividad enzimática de versátil peroxidasa en fermentación sólida

Durante la fermentación sólida se observaron tres registros máximos de actividad enzimática de VP. El primero se registró a las 96 h, con 120.4 UI/L, el segundo a las 192 h, con 129.1 UI/L y, finalmente, el tercero a las 288 h, con 121.8 UI/L (figura 28).

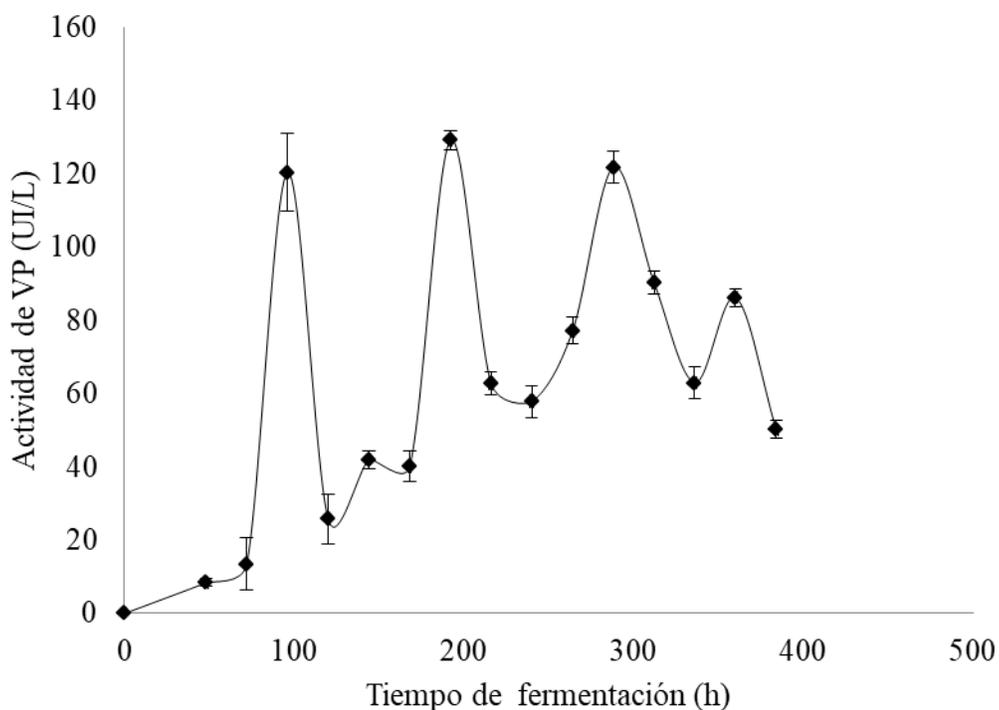


Figura 28. Actividad enzimática de versátil peroxidasa de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sólida. Las barras que se muestran en cada punto (\perp) corresponden a la desviación estándar.

8.2.8. Actividad enzimática de manganeso peroxidasa en fermentación sólida

En la fermentación sólida, la mayor actividad enzimática de MnP se presentó en la fase de adaptación con 10.12 UI/L a las 72 h. En la fase exponencial se registró una disminución gradual de actividad enzimática y, finalmente, en la fase estacionaria se registraron algunas variaciones de actividad de esta enzima (figura 29).

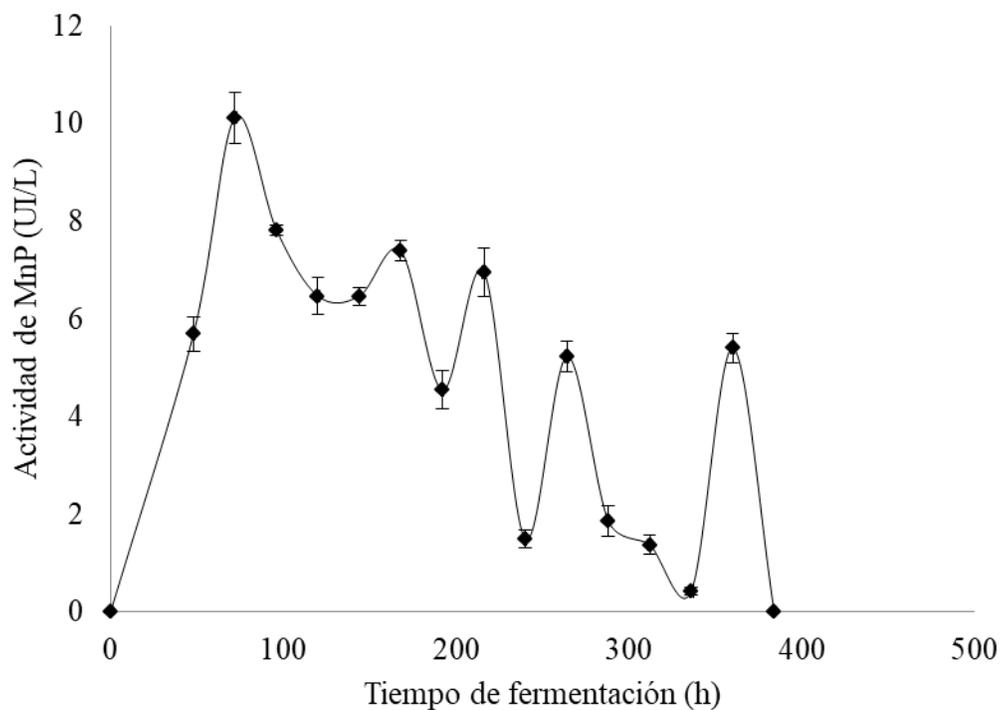


Figura 29. Actividad enzimática de manganeso peroxidasa de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sólida. Las barras que se muestran en cada punto (\perp) corresponden a la desviación estándar.

8.2.9. Actividad enzimática de decolorante peroxidasa en fermentación sólida

Durante la fermentación sólida se presentó actividad enzimática de la DyP. En la fase exponencial se registró una actividad enzimática máxima de 59.84 UI/L, a las 168 h. Posteriormente, se registraron variaciones de actividad enzimática en la fase estacionaria de, 58.58 hasta 48.46 UI/L (Figura 30).

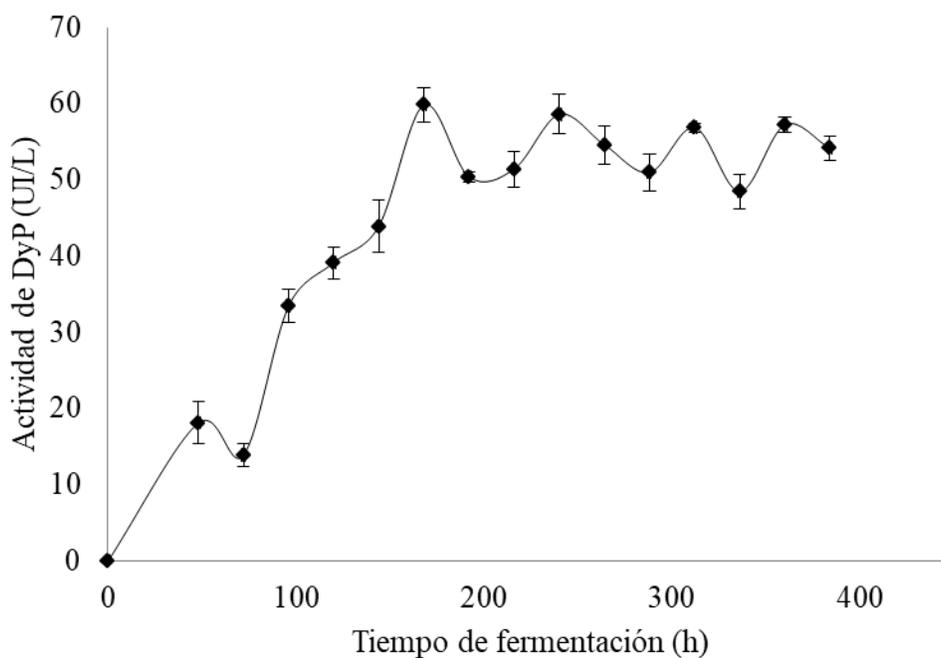


Figura 30. Actividad enzimática de decolorante peroxidasa de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sólida. Las barras que se muestran en cada punto ($\bar{\square}$) corresponden a la desviación estándar.

8.3. Parámetros cinéticos

8.3.1. Parámetros cinéticos de lacasas

En los parámetros cinéticos de la enzima lacasa de *Pleurotus ostreatus* obtenidos en fermentación sólida y líquida se puede observar que los valores de actividad máxima, el rendimiento de la enzima producida con respecto a la biomasa producida, la productividad de la enzima y la tasa específica de formación de la enzima son mayores en la fermentación sólida (tabla 5). Asimismo, se puede observar la actividad enzimática en los dos sistemas fermentativos a lo largo del desarrollo del hongo (figura 31).

Tabla 5. Parámetros cinéticos de lacasa producidas por *Pleurotus ostreatus*

Tipo de fermentación /Parámetro	X_{max} (g L ⁻¹)	E_{max} (UI L ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (gX gS ⁻¹)	$Y_{E/X}$ (UI gX ⁻¹)	PRO (UIL ⁻¹ h ⁻¹)	q_p (UI h ⁻¹ gX ⁻¹)
FL	7.3 ^a	41.87 ^a	0.02 ^a	0.75 ^a	5.73 ^a	0.13 ^a	0.11 ^a
FS	6.7 ^b	879.66 ^b	0.05 ^b	0.70 ^b	131.29 ^b	6.10 ^b	6.56 ^b

La media es seguida de distintas letras que reflejan diferencia significativa ($p \leq 0.05$)

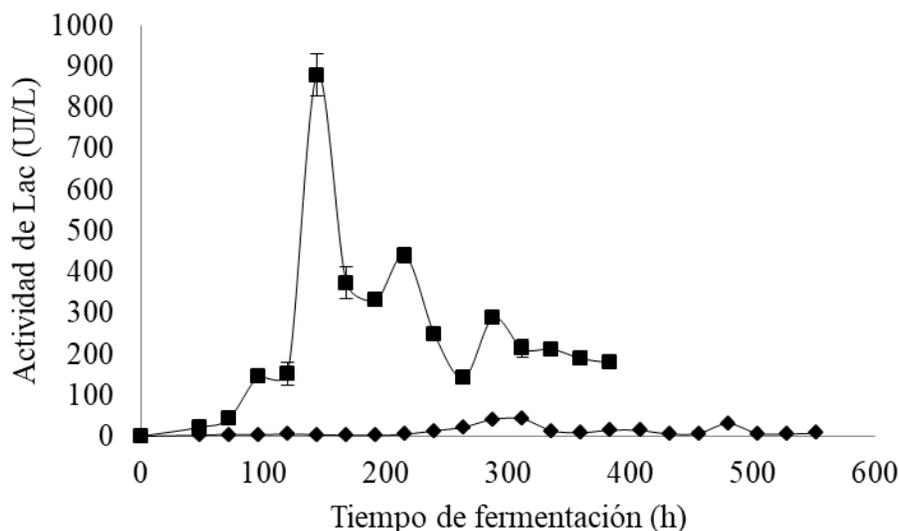


Figura 31. Actividad enzimática de lacasas en fermentación líquida (◆) y sólida (■). Las barras que se muestran en cada punto (⊥) corresponden a la desviación estándar.

8.3.2. Parámetros cinéticos de alcohol veratríl oxidasa

Los parámetros cinéticos de la enzima alcohol veratríl oxidasa en las fermentaciones sólida y líquida se puede observar que la actividad máxima, el rendimiento de la enzima producida con respecto a la biomasa y la tasa específica de formación de la enzima son mayores en la fermentación sólida. Para el caso de la productividad de la enzima es la misma en ambas fermentaciones y el rendimiento de biomasa con respecto al sustrato fue mayor en la fermentación líquida (tabla 6). Asimismo, la actividad enzimática de AVO de ambas fermentaciones se muestra en la figura 32.

Tabla 6. Parámetros cinéticos de alcohol veratríl oxidasa producidas por *Pleurotus ostreatus*

Tipo de fermentación /Parámetro	X_{max} (g L ⁻¹)	E_{max} (UI L ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (gX gS ⁻¹)	$Y_{E/X}$ (UI gX ⁻¹)	PRO (UI L ⁻¹ h ⁻¹)	q_p (UI h ⁻¹ gX ⁻¹)
FL	7.3 ^a	20.14 ^a	0.02 ^a	0.75 ^a	2.75 ^a	0.056 ^a	0.05 ^a
FS	6.7 ^b	21.46 ^b	0.05 ^b	0.70 ^b	3.20 ^b	0.056 ^a	0.16 ^b

La media es seguida de distintas letras que reflejan diferencia significativa ($p \leq 0.05$)

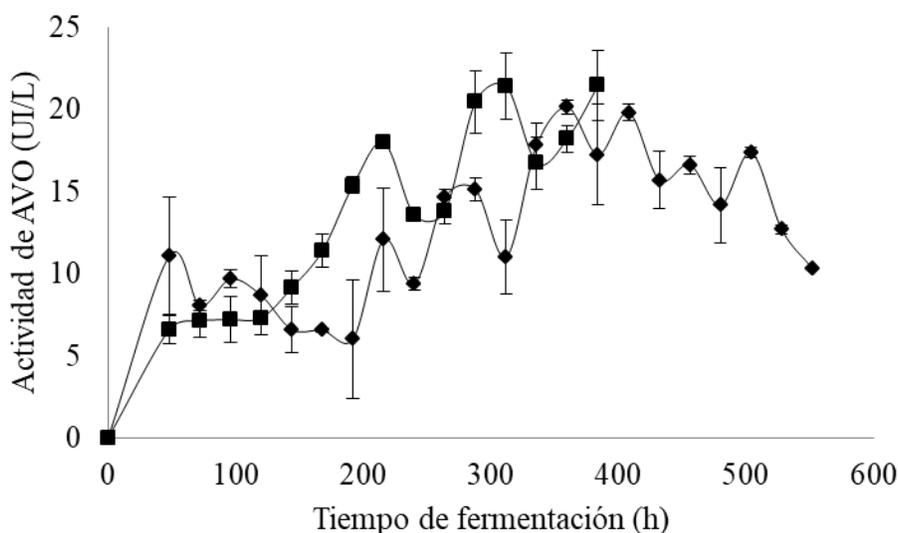


Figura 32. Actividad enzimática de alcohol veratríl oxidasa en fermentación líquida (◆) y sólida (■). Las barras que se muestran en cada punto (⊥) corresponden a la desviación estándar.

8.3.3. Parámetros cinéticos de versátil peroxidasa

En los parámetros cinéticos de la enzima versátil peroxidasa del sistema fermentativo en estado sólido y líquido. Se puede observar valores altos en la actividad máxima y el rendimiento de biomasa con respecto al sustrato en la fermentación líquida. Por su parte, el rendimiento de la enzima producida con respecto a la biomasa, la productividad de la enzima y la tasa específica de formación de la enzima se registraron con valores altos en la fermentación sólida con respecto a la líquida (tabla 7). La actividad enzimática de los dos sistemas fermentativos se pueden observar en la figura 33.

Tabla 7. Parámetros cinéticos de versátil peroxidasa producida por *Pleurotus ostreatus*

Tipo de fermentación /Parámetro	X_{max} (g L ⁻¹)	E_{max} (UI/L ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (gX gS ⁻¹)	$Y_{E/X}$ (UI gX ⁻¹)	PRO (UI/L ⁻¹ h ⁻¹)	q_p (UI h ⁻¹ gX ⁻¹)
FL	7.3 ^a	32.76 ^a	0.02 ^a	0.75 ^a	4.49 ^a	0.19 ^a	0.09 ^a
FS	6.7 ^b	129.1 ^b	0.05 ^b	0.70 ^b	19.26 ^b	0.72 ^b	0.96 ^b

La media es seguida de distintas letras que reflejan diferencia significativa ($p \leq 0.05$)

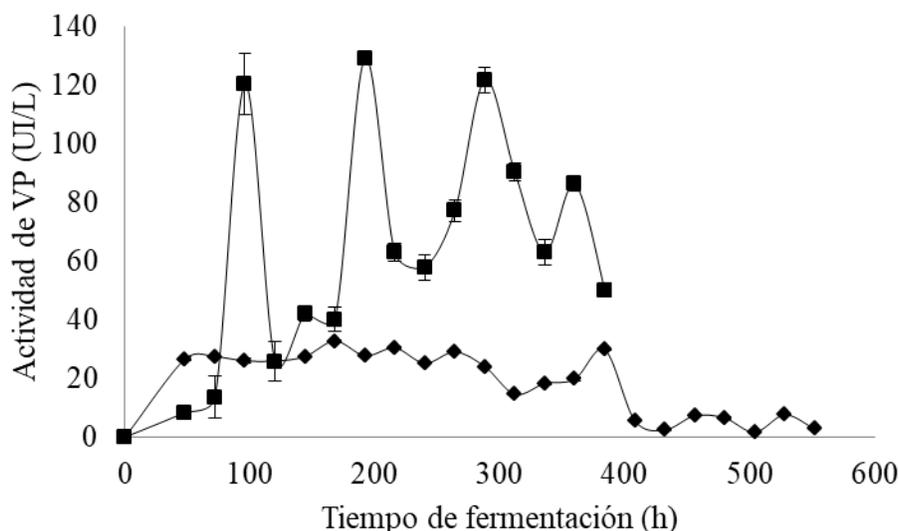


Figura 33. Actividad enzimática de versátil peroxidasa en fermentación líquida (◆) y sólida (■). Las barras que se muestran en cada punto (⊥) corresponden a la desviación estándar.

8.3.4. Parámetro cinético de manganeso peroxidasa

Los parámetros cinéticos de la enzima manganeso peroxidasa de los sistemas fermentativos se observó que la actividad máxima, el rendimiento de la enzima producida con respecto a la biomasa, la productividad de la enzima y la tasa específica de formación de la enzima registraron valores altos en la fermentación líquida (tabla 8). Asimismo, la actividad enzimática a lo largo de la fermentación se muestra en la figura 34.

Tabla 8. Parámetros cinéticos de manganeso peroxidasa producidas por *Pleurotus ostreatus*

Tipo de fermentación /Parámetro	X_{max} (g L ⁻¹)	E_{max} (UI L ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (gX gS ⁻¹)	$Y_{E/X}$ (UI gX ⁻¹)	PRO (UI L ⁻¹ h ⁻¹)	q_p (UI h ⁻¹ gX ⁻¹)
FL	7.3 ^a	36.23 ^a	0.02 ^a	0.75 ^a	4.96 ^a	0.302 ^a	27.47 ^a
FS	6.7 ^b	10.12 ^b	0.05 ^b	0.96 ^b	1.51 ^b	0.14 ^b	0.07 ^b

La media es seguida de distintas letras que reflejan diferencia significativa ($p \leq 0.05$)

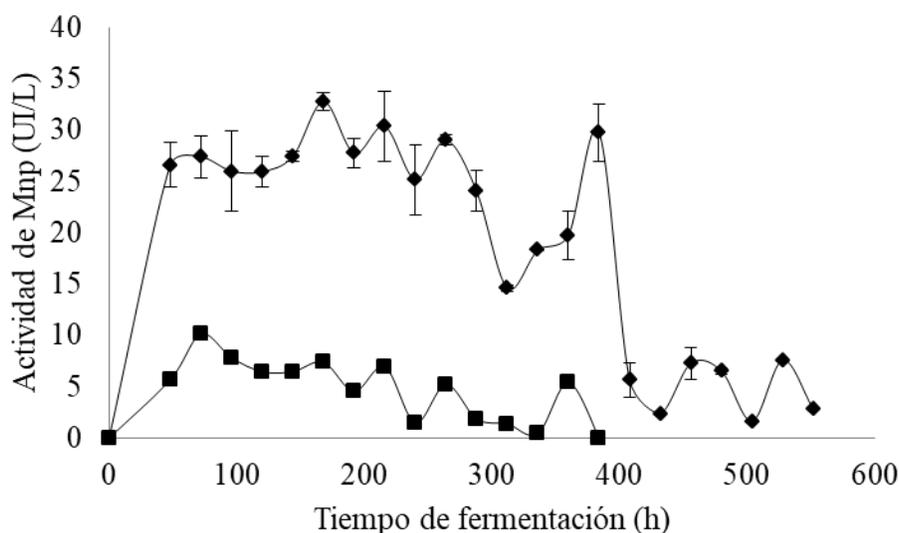


Figura 34. Actividad enzimática de manganeso peroxidasa en fermentación líquida (◆) y sólida (■). Las barras que se muestran en cada punto (⊥) corresponden a la desviación estándar.

8.3.5. Parámetro cinético de decolorante peroxidasa

Los parámetros cinéticos de la enzima decolorante peroxidasa obtenida en dos sistemas de fermentación (sólido y líquido) se observó que la actividad máxima, el rendimiento de la enzima producida con respecto a la biomasa, la productividad y la tasa específica de formación de la enzima obtuvieron valores significativos en la fermentación sólida (tabla 9). La actividad enzimática de DyP en los dos sistemas fermentativos se muestra en la figura 35.

Tabla 9. Parámetros cinéticos de decolorante peroxidasa producidas por *Pleurotus ostreatus*

Tipo de fermentación /Parámetro	X_{max} (g L ⁻¹)	E_{max} (UI L ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (gX gS ⁻¹)	$Y_{E/X}$ (UI gX ⁻¹)	PRO (UIL ⁻¹ h ⁻¹)	q_p (UI h ⁻¹ gX ⁻¹)
FL	7.3 ^a	4.26 ^a	0.02 ^a	0.75 ^a	0.58 ^a	0.009 ^a	0.012 ^a
FS	6.7 ^b	59.84 ^b	0.05 ^b	0.70 ^b	8.93 ^b	0.35 ^b	0.44 ^b

La media es seguida de distintas letras que reflejan diferencia significativa ($p \leq 0.05$)

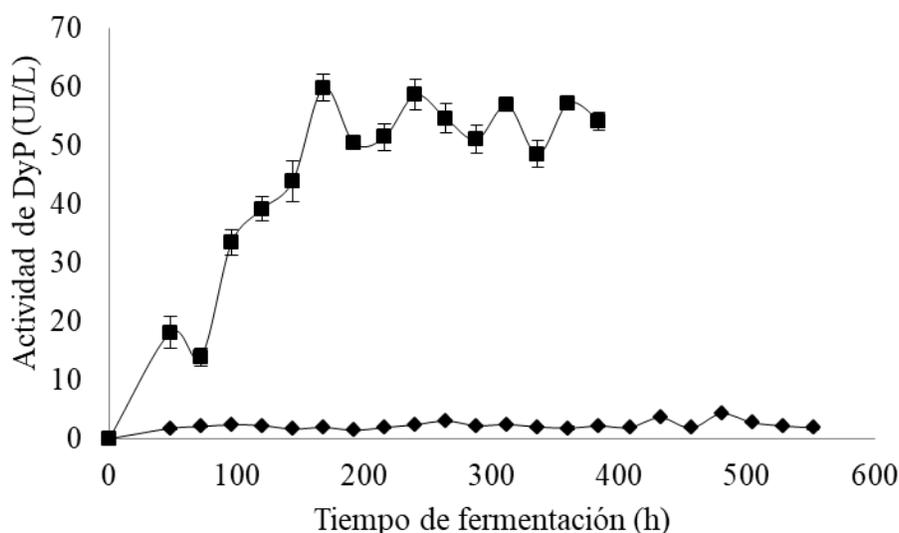


Figura 35. Actividad enzimática de decolorante peroxidasa en fermentación líquida (◆) y sólida (■). Las barras que se muestran en cada punto ($\bar{\text{I}}$) corresponden a la desviación estándar.

9. DISCUSIÓN

La fermentación líquida y sólida son los sistemas de producción de metabolitos más estudiados y controlados, sin embargo, existen pocos estudios que reporten los parámetros cinéticos del crecimiento del hongo y la producción de enzimas fenoloxidasas.

Algunos autores mencionan el uso de los inductores para favorecer o incrementar la producción enzimática (Gómez Dorado y cols. 2005). Sin embargo, en esta investigación no fue necesaria el uso de inductores para el desarrollo del hongo *Pleurotus ostreatus* en los dos sistemas fermentativos no fue necesaria la presencia de inductores para poder tener un incremento de actividad enzimática los valores más altos que se registraron en esta investigación en la fermentación líquida para las enzimas lacasas, manganeso peroxidasa, versátil peroxidasa, alcohol veratril oxidasa y decolorante peroxidasa fue de 41.87, 36.23, 32.76, 20.14 y 4.26 UI/L, respectivamente. Para el caso de la fermentación sólida se obtuvieron los siguientes valores para lacasas, manganeso peroxidasa, alcoholveratril oxidasa, versátil peroxidasa y decolorante peroxidasa de 879.66, 10.12, 21.46, 129.1 y 59.84 UI/L, respectivamente. Otra investigación, en la que emplearon el mismo género de hongo, evaluó el crecimiento del hongo y la actividad de la enzima lacasa en dos sistemas fermentativos en estado líquido y sólido en la cual reportaron una biomasa máxima de 5.6 y 4.5 g/L, respectivamente (Téllez Téllez y cols. 2008). Por lo que en esta investigación la biomasa máxima reportada en la fermentación líquida y sólida fue de 7.3 y 6.7 g/L lo que sugiere que la cepa *Pleurotus ostreatus* ARS 3526 es un hongo con gran capacidad de generar biomasa en los dos sistemas fermentativos en condiciones basales. Con respecto a la enzima lacasa ellos obtuvieron una actividad de 13 000 y 2430 U/L en la fermentación líquida y sólida, respectivamente. La actividad máxima obtenida en este trabajo fue de 41.87 y 879.66 UI/L en fermentación líquida y sólida, respectivamente. Transformando un equivalente a U/L la actividad enzimática es 8373.33 y 17593.33 U/L, respectivamente. Lo cual se sigue confirmando lo que menciona el autor Degollado-Estrada en el 2008 que no es suficiente contar con un organismo de pudrición blanca para garantizar la producción de enzimas lacasas, sino que también es necesario encontrar la mejor cepa productora de enzimas y la cepa ARS 3526 que se menciona en esta investigación tiene una gran producción de enzima lacasa en los dos tipos de fermentación.

En relación con el pH, (Arantes y cols. 2011) para saber la eficiencia de producción de la enzima manganeso peroxidasa excretada por el hongo *Lentinula edodes* desarrollado en una fermentación en estado sólido empleando como sustrato residuos de eucalipto. Los autores mencionan que la mayor producción enzimática fue a pH óptimo entre 4.0 y 5.0, con una actividad enzimática de 1500 a 1700 UI/kg. Cabe mencionar que esta investigación se llevo a cabo con un pH inicial de 6.5 con una actividad enzimática de 10.12 UI/L. Transformando los valores se obtiene una actividad enzimática de 6.48 UI/kg. En esta ocasión los valores reportados en este trabajo fueron menores.

Asimismo, Chan y cols. 2016 reportaron actividad enzimática de lacasa y manganeso peroxidasa en dos sistemas fermentativos utilizando tres hongos *Trametes máxima* SM9, *Pycoporus sanguineus* ACT1 y *Daedalea elegans* PM7. Reportando una actividad máxima de lacasa y manganeso peroxidasa en fermentación líquida de 9121.8 y 477.9 U/mg, con el hongo *Trametes máxima* SM9, 5422.2 y 41.0 U/mg con el *Pycoporus sanguineus* ACT1, y finalmente para *Daedalea elegans* PM7 obtuvieron 1784.2 y 40.0 U/mg. En este estudio la actividad máxima reportada de lacasa fue de 879.66 UI/L el equivalente de unidades por miligramo sería de 2.79. Para la enzima manganeso peroxidasa la actividad máxima fue de 36.23 UI/L el equivalente de unidades sería de 0.0049 U/mg. En el caso de la fermentación sólida reportaron una actividad máxima de lacasa de 1409.9 y 1404.8 U/mg empleando como soporte paja de trigo y bagazo de caña de azúcar, respectivamente. Mientras que la actividad de manganeso peroxidasa fue mejor sobre bagazo de caña tanto para *Pycoporus sanguineus* y *Trametes máxima* con 619.6 y 519.6 U/mg, respectivamente. En esta investigación se reportó una actividad máxima de manganeso peroxidasa de 10.12 UI/L con un equivalente de 0.75 U/mg. Por lo que ellos reportan actividades más altas en comparación de esta investigación.

Sin embargo los resultados reportados de la actividad enzimática de lacasa y manganeso peroxidasa por Retes Pruneda en el 2014 de los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Trametes trogii* fueron de 120, 390, 710 y 720 UI/L, respectivamente. A comparación con esta investigación la actividad de lacasa y manganeso peroxidasa en fermentación líquida fueron de 879.66, 36.23 UI/L, respectivamente. Mostrando así que empleando el mismo género *Pleurotus*, en esta investigación la actividad enzimática de lacasa fue siete veces más alta. Asimismo, sigue siendo ligeramente más alta a comparación con el hongo

Trametes trogi. Para el caso de la enzima manganeso peroxidasa en esta investigación se muestran baja.

Vladimir Elisashvili y cols. (2008) reportaron la actividad enzimática de manganeso peroxidasa y lacasa en dos sistemas fermentativos a un pH de 6, empleando diferentes hongos (*Cerrena máxima* IBB 681, *Funalia trogii* IBB 146, *Trametes pubescens* IBB 663 y *Trametes versicolor* IBB 897, *Coloriolopsis polizona* 38443, *Pycnoporus coccineus* 38527 y *Pleurotus ostreatus* 2191). Mostrando que en la fermentación en estado sólido los hongos *C. máxima*, *C. polizona*, *F. trogii*, *P. ostreatus*, *T. pubescens* y *T. versicolor* obtuvieron una actividad máxima de 253, 290, 988, 339, 208, y 662 U l⁻¹ de enzima lacasa, respectivamente. En el caso de la enzima manganeso peroxidasa el autor reporta una actividad de 152, 454, 685, 234, 690 y 690 U l⁻¹, respectivamente. En esta investigación la actividad máxima reportada para la enzima lacasa en fermentación sólida fue de 373.66 UI/L lo que equivale a 17593 U/L, mostrando así que la actividad en esta investigación es mayor a comparación con los hongos previamente mencionados. Para el caso de la fermentación en estado líquido las actividades máximas de lacasa en los hongos *C. máxima*, *C. polizona*, *F. trogii*, *P. ostreatus*, *T. pubescens* y *T. versicolor* fue de 7620, 1780, 2832, 631, 1680, 3008 U l⁻¹, respectivamente. Para la actividad de manganeso peroxidasa fue de 367, 896, 1263, 55, 172 y 202 U l⁻¹, respectivamente.

Sin embargo, en esta investigación la mayor actividad enzimática de lacasa reportada fue de 41.86 UI/L mostrando el equivalente de unidades para la actividad es de 8373.33 U/L lo que se muestra nuevamente que la actividad en esta investigación es mayor en comparación con todos los hongos ya mencionados. Asimismo, en comparación con la actividad de la enzima manganeso peroxidasa reportada en esta investigación que fue de 36.23 UI/L lo que equivale a 4200 U/L, se muestra que sigue siendo elevadas actividades. En consecuencia se sugiere que *Pleurotus ostreatus* en un hongo con una excelente producción de enzimas lacasa y manganeso peroxidasa. Finalmente, para el caso del hongo *P. coccineus* el autor menciona que no presentó actividad enzimática de manganeso peroxidasa. Sin embargo, en esta investigación si se hace presente la actividad de la enzima manganeso peroxidasa.

Grace Karp y cols (2015) optimizaron la producción de la enzima lacasa y la delignificación del bagazo de caña de azúcar utilizando el hongo *Pleurotus ostreatus* de la

universidad federal de Paraná en un sistema fermentativo en estado sólido con diferentes concentraciones de extracto de levadura y nitrógeno. Obteniendo como resultado que la mejor concentración de extracto de levadura fue con 7.5 g/L y un 7 % de nitrógeno total con una máxima actividad reportada de 151.6 U/g y se registró entre los días 4 y 5 de la fermentación.

Janja Babic y cols. (2012) optimizaron la actividad enzimática ligninolítica y la tasa de producción y probar la capacidad de las enzimas obtenidas para decolorar diversos colorantes sintéticos utilizando el hongo *Cerporiopsis subermispora* empleando un medio de cultivo en estado líquido añadiéndole cubos de diferentes maderas (madera de haya y madera de pino, asimismo cubos de poliuretano). Obteniendo como actividades más altas de la enzima lacasa en la madera de haya y en la de pino con 150 U/L y 135 U/L, respectivamente. En contraste con la enzima Manganese peroxidasa con una actividad máxima de 60 U/L en el medio de cultivo con cubos de madera de haya y 20 U/L con cubos de madera de pino. La producción de enzimas en la espuma de poliuretano no fue muy alta ya que reportaron 2 U/L para la enzima lacasa y 40 U/L para la enzima MnP.

Por otra parte, Cruz y cols. (2015) evaluaron el efecto del colorante textil amarillo azo en la actividad y perfil de expresión de los genes que codifican para la enzima versátil peroxidasa del hongo *Pleurotus ostreatus* desarrollado en una fermentación sumergida. Realizaron una fermentación basal y otra con el colorante, obteniendo en la fermentación con colorante una actividad máxima de 703.8 U/ml a las 187 h y en la fermentación basal obtuvieron 448 U/ml a las 175 h.

Ese mismo año, Cuamatzi Flores y cols. (2015) determinaron el efecto de un colorante sobre la cinética de crecimiento y actividad de la enzima decolorante peroxidasa producida por *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida. Realizaron una fermentación basal y otra con el colorante, donde en la fermentación con colorante se obtuvo una ligera disminución en la biomasa (X_{max}) producida 7.217 g/L⁻¹ y en la velocidad específica de crecimiento (μ) 0.034 h⁻¹ esto a comparación con la fermentación basal sin colorante en donde la X_{max} fue de 8.4 g/L⁻¹ y la μ de 0.055 h⁻¹. Respecto a la actividad enzimática, determinaron el pH y la temperatura óptima de actividad que fue de 3.0 y 45 °C respectivamente. Asimismo, observaron un claro efecto de inducción del colorante en la

actividad obteniendo una actividad máxima de 1576 UI/L en comparación con la actividad máxima alcanzada en la fermentación basal la cual fue de 852 UI/L.

Finalmente en el 2016 Ortellado y cols. formularon un medio de cultivo suplementado con compuestos aromáticos e iones metálicos con el fin de aumentar los valores de actividad de lacasas por el hongos *Trametes* sp. utilizando como única variable el Mn^{+2} . Reportando la mayor actividad enzimática de lacasas con 272.46 U/L con una concentración de 4.5 mM de Mn^{+2} .

10. CONCLUSIONES

- ✓ La mayor producción de biomasa de *Pleurotus ostreatus* fue en el sistema de fermentación líquida
- ✓ La fermentación sólida presentó la mayor producción de enzimas oxidasas con excepción de Mnp
- ✓ La fermentación líquida presentó la mayor producción de enzima MnP
- ✓ *Pleurotus ostreatus* 3526 es una especie potencial para la producción de enzimas oxidasas.
- ✓ Los mejores rendimientos teóricos fueron en la fermentación sólida con respecto a la fermentación líquida

11. PERSPECTIVAS

- ✓ Se sugiere evaluar el efecto de la temperatura de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* ARS 3526 sobre la actividad enzimática de oxidasas obtenidas por fermentación líquida y sólida.
- ✓ Se sugiere evaluar el efecto del pH inicial de desarrollo de *Pleurotus ostreatus* ARS 3526 sobre la actividad enzimática de oxidasas obtenidas por fermentación líquida y sólida.
- ✓ Realizar un perfil de expresión de las enzimas oxidasas (Lac, MnP, VP, AVO y DyP) de *Pleurotus ostreatus* ARS 3526 en fermentación líquida y sólida.

12. REFERENCIAS

1. Aguirre E, Ulloa M, Aguilar S, Cifuentes J y Valenzuela R. 2014. Biodiversidad de hongos en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 85: 76-81.
2. Alarcón Payán DA. 2017. Diseño de nanopartículas de quitosano con actividad peroxidasa para la degradación de contaminantes. Centro de Investigación y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. Tesis de Maestría.
3. Alexopoulos CJ, Misims CW y Blackwell M. 1996. *Introductory mycology*. Ed. John Wiley & Sons, Inc. U. S. A.
4. Almeida E, Espin N. 2015. Obtención de extractos enzimáticos con actividad ligninolítica en una fermentador de bandejas con el hongo *Phanerochaete chrysosporium*. *Revista politécnica*. 36:2 1-8.
5. Akyuz M y Kirbag S. 2009. Antimicrobial Activity of *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* Grown on Various Agro-wastes. *EurAsian Journal of BioSciences* 3: 58-63.
6. Arantes V, Silva EM y Milagres AMF. 2011. Optimal recovery process conditions for manganese peroxidase obtained by solid-state fermentation of *eucalyptus* residue using *Lentinula edodes*. *Biomass and bioenergy* 35: 4040-4044.
7. Asgher M, Aslam B y Nasir Iqbal H. 2013. Novel catalytic and effluent decolorization functionalities of sol-gel immobilized *Pleurotus ostreatus* IBL-02 manganese peroxidase produced from bio-processing of wheat straw. *Chinese Journal of Catalysis*. 34: 1756-1761.
8. Asgher M, Bhatti HN, Ashraf M y Legge RL. 2008. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation* 19: 771-783.
9. Backa S, Gierer J, Reitberger T y Nilsson T. 1993. Hydroxyl radical activity associated with the growth of white-rot fungi. *Holzforschung* 47: 181-187.
10. Baldrian P. 2006. Fungal lacasses-ocurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev*. 30: 215-242.
11. Bermúdez R, Ramos I, Donoso C, García N y Martínez C. 2002. Fermentación sólida de la cascara de cacao por *Pleurotus sp.* *Tecnología Química* 22:3 53-8.

12. Bidlack Malonge JM y Benson R. 1992. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. Proceedings of the Oklahoma Academy of Sciences 51-56.
13. Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.
14. Barrato MC, Juárez Moreno K, Pogni R, Basosi R y Vázquez Duhalt R. 2015. EPR and LC-MS studies on the mechanism of industrial dye decolorization by versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. Environmental Science and Pollution Research 22:11 8683-8692.
15. Büttner E, Ullrich R, Strittmatter E, Piontek K, Plattner D A, Hofrichter M y Liers C. 2015. Oxidation and nitration of mononitrophenols by a DyP-type peroxidase. Archives of biochemistry and biophysics. 574: 86-92.
16. Cabezas K. 2014. Obtención de un extracto enzimático con actividad lacásica por fermentación líquida del hongo *Pleurotus ostreatus* en un medio con bagazo de maíz a escala laboratorio para decoloración de colorantes textiles Quito: Escuela Politecnica Nacional.
17. Call HP y Mucke I. 1997. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym® process). Journal of Biotechnology 53:163-202.
18. Catalina Bermúdez R, Morris H y Donoso C. 2003. Influencia de la luz en la calidad proteica de *Pleurotus ostreatus* var. Florida. Revista Cubana Investigación Biomedica 22: 226-231.
19. Castro SMA. 2005. Oxidación enzimática de sustratos utilizando diversos mediadores. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. México. 96 p.
20. Cañas P. 2009. Diseño de nuevos sistemas para lacasas mediador: empleo de mediadores de origen natural y mejora de lacasas por evolución dirigida. Tesis Doctoral. Universidad de Alcalá. Madrid, España. 209 p.

21. Cayetano M y Bernabé T. 2008. Cultivo de *Pleurotus* sobre residuos de cosecha de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y Plátano (*Musa paradisiaca*). *Revista Mexicana de Micología* 26:57-60.
22. Chable Villacis R del R. 2015. Evaluación de la cepas de hongos ligninolíticos nativos de Yucatán en la decoloración y remoción de fenoles en vinazas y efluentes de su digestión anaeróbica. Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.
23. Chan Cupul W, Heredia Abarca GP y Rodríguez Vázquez R. 2016. Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática ligninolítica de macromicetos del estado de Veracruz, México. *Rev. Int. Ambie.* 32:3 339-351.
24. Chang ST y Miles PG. 2004. Mushrooms Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental impact. *Second Edition. CRC Press Inc., United States.* 451 p.
25. Chávez Veliz JD. 2017. Obtención y evaluación de extractos enzimáticos con actividad celulítica y ligninolítica a partir del hongo *Pleurotus ostreatus* cultivado en tuza de maíz. Universidad Estatal de Quevedo. Tesis Ingeniero Agropecuario. 9-11.
26. Chawachart N, Khanongnuch C, Watanabe T y Lumyong S. 2004. Rice bran as an efficient substrate for laccase production from thermotolerant basidiomycete *Coriolus versicolor* strain RC3. *Fungal Diversity.* 15: 23-32.
27. Cho K, Kwon E J, Kim SK, Kambiranda DM, Math RK y Lee YH. 2009. Fungal Diversity in Composting Process of Pig Manure and Mushroom Cultural Waste Based on Partial Sequence of Large Subunit rRNA. *Journal Microbiology and Biotechnology.* [10.4014/jmb.0807.455] 19(8):743-8.
28. Cisterna C. 2003. Cultivo del champiñón ostra en Chile. 1ª Edición. Editorial Mycotec, Ltda. Chile. 118 p.
29. Cohen R, Persky L y Hadar Y. 2002. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 58: 582-594.
30. Colpa DI, Fraaije MW y Van Bloois E. 2014. DyP-type Peroxidases: A Promising an Versatile Class of Enzymes *J. Ind. Microbiol. Biotechnol* 41: 1-7.

31. Christen P, Auria R, Villegas E y Revah S. 1993. Growth of *Candida utilis* in solid state fermentation. *Biotechnology Advances*. 11: 549-557.
32. Cruz S, Nava S, Díaz R y Bibbins M. 2015. Evaluación de la actividad de versátil peroxidasa producida por *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida en presencia del colorante amarillo azo. XVI Congreso Nacional de Biotecología y Bioingeniería. Junio 21-26. Guadalajara Jalisco, México.
33. Cuamatzi Flores JL, Nava Galicia BS, Díaz Godínez R, Garrido-Bazán V, Tlecuitl-Beristain S y Bibbins Martínez MD. 2015. Determinación de la actividad de la enzima Dyp producidas por *Pleurotus ostreatus* y su capacidad oxidativa de colorantes textiles. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias*. 6:13 44-56.
34. Das N, Sengupta S y Mukherjee M. 1997. Importance of laccase in vegetative growth of *Pleurotus florida*. *Applied Environment Microbiology*; 63:41 20-4122.
35. Dávila G y Vázquez Duhalt R. 2006. Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. *Mensaje Bioquímico*. 30:1 29-55.
36. Dávila Vázquez G, Tinoco R, Pickard MA y Vázquez Duhalt R. 2005. Transformation of halogenated pesticides by versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. *Enzyme and Microbial Technolofy* 35:2-3 223-231.
37. Degollado Estrada A. 2008. Evaluación sobre diferentes sustratos de la actividad de lacasas de dos cepas de *Pleurotus ostreatus* producida por fermentación sumergida. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala. México.
38. Desai SS y Nityanand C. 2011. Microbial laccases and their applications: A review. *Asian J Biotechnol*. 3:2 98-124.
39. Díaz R, Téllez Téllez M, Bibbins Martínez MD, Sánchez C, Díaz Godínez G y Soriano Santos J. 2013. Influence of initial pH of the growing medium on the activity, production and expression profiles of laccases produced by *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*. 16:4 6.
40. Díaz Godínez G, Soriano Santos J, Augur C y Viniegra González G. 2001. Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid state and submerged fermentation: a comparative study. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology*. 26: 271-275.

41. Dosoretz CG, Chen HC, y Grethlein HE. 1990. Effect of environmental conditions on extracellular protease activity in lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 56:2 395-400.
42. Dreveny I, Gruber K, Glieder A, Thompson A, y Kratky C. 2001. The hydroxynitrile lyase from almond: a lyase that looks like an oxidoreductase. *Structure*, 9:9 803-815.
43. Durand A, Broise D y Blachere H. 1988. Laboratory scale bioreactor for solid stated processes. *Journal of biotechnology*. 8: 59-66.
44. Evans CS, Dutton MV, Guillén F y Veness RG. 1994. Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. *FEMS Microbiology. Reviews*. 13: 235-240.
45. Faison BD y Kirk TK. 1983. Relationship between lignin degradation and production of reduced oxygen species by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Environment Microbiology*. 46: 1140-1145.
46. Ferreira N. 2004. Estudios estructura-función sobre la enzima aril-alcohol oxidasa implicada en la biodegradación de la lignina. Tesis Doctoral Universidad de Alcalá, De España.
47. Fraaije MW y Van Bloois E. 2013. DyP-type Peroxidases: A Promising an Versatile Class of Enzymes. *Enzyme Eng*. 2012.
48. Fukushima Y, Okada K, Kawai G y Motai H. 1991. Efficient production of mycelium of *Lentinusedodes* by a continuous culture. *Mushroom Science* 13: 721-725.
49. Fujii K, Uemura M, Hayakawa C, Funakawa S y Kosaki T. 2013. Environmental control of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase activities in forest floor layers in humid Asia. *Soil Biology and Biochemistry*. 57: 109-115.
50. Gaitán Hernández R, Salmenes D, Pérez Merlo R y Mata G. 2006. Aislamiento, siembra y producción. Manual práctico de cultivo de setas. Instituto de Ecología.
51. Galhaup C, Goller S, Peterbauer CK, Strauss J y Haltrich D. 2002. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiol*. 148: 2159-2169.

52. García Oduardo N, Catalina Bermúdez S, Rodríguez Pérez S, Aguilera Rodríguez, IA y Kourouma A. 2010. Potencial biotecnológico de la pulpa de café para producir enzimas ligninolíticas por FES. *Tecnología Química* 3:2 102-107.
53. Gayosso Canales M. 2001. Caracterización de los componentes de un extracto de primordios de *Pleurotus ostreatus* que induce su purificación. Tesis. Universidad de Colima, México.
54. Gernaey KV y Gani RA. 2010. A Model-based systems approach to pharmaceutical product-process design and analysis. *Chemical Engineering Science* 65:57 57-69.
55. Ghisla S y Massey V. 1989. Mechanisms of flavoprotein catalyzed reactions. *The FEBS Journal*, 181:1), 1-17
56. Gianfreda L, Xu F y Bollag JM. 1999 Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal* 3:1-25.
57. Giardina P, Palmieri G, Fontanella B, Rivieccio V y Sannia G. 2000. Manganese Peroxidase Isoenzymes Produced by *Pleurotus ostreatus* Grown on Wood Sawdust. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 376: 171-179.
58. Giovannozzi G, Luigi P, Baldo R, Porri A, D`Annibale A, Perani C, inventors. 2002 Process for the Production of Cellulose Paper Pulps by Biodelignification Vegetative Masses. EE:UU patent US 6,379,495 B1.
59. Glazer AN y Nikaido H. 2007. *Microbial Biotechnology: fundamentals of applied microbiology*. Cambridge University Press.
60. Graciano G, Avila E, Fossati L, Antunes A y Vieira J. 2009. Protein Enrichment and Digestibility of Soft Rush (*Juncus effusus*) and Rice Residues Using Edible Mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju*. *World J Microbiol Biotechnol* 25 449-56.
61. Gómez Dorado C, Martínez Salgado M, Nieto Mosquera D, Pedrosa Rodríguez A, Rodríguez Vázquez R y Rosas Acosta J. 2005. Estudio del efecto de dos inductores y un protector enzimático sobre la actividad de las enzimas mn-peroxidasa y lacasa producidas por *Trametes versicolor* y su efecto en la decoloración de efluentes de la industria papelera. *Universitas Scientiarum*.10:2 37-45.

62. González AL y Gutiérrez I. 2001. Producción comercial y usos de hongos comestibles *Pleurotus* cultivados en residuos lignocelulósicos. Ciudad de La Habana: ICIDCA. 107.
63. Gottschalk LMF, Oliveira RA y Bon EPdS. 2010. Cellulases, xylanases, glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. *Biochemical Engineering Journal* 51: 72-8.
64. Guerrero Torres JV, Juárez Martínez AB y Tapia Santoyo A. 2007. Obtención de Componentes Monocarióticos de Hongos Comestibles del Género *Pleurotus ostreatus*. Instituto Politécnico Nacional. Tesis de Ingeniero. 2-20.
65. Guillén F. y Evans CS. 1994. Anisaldehyde and veratraldehyde acting as redox cycling agents for H₂O₂ production by *Pleurotus eryngii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 2811-2817.
66. Guillén F, Martínez AT, Martínez MJ. y Evans CS. 2000. Hydrogen peroxide-producing system of *Pleurotus eryngii* involving the extracellular enzyme aryl-alcohol oxidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 41: 465-470.
67. Guinberteau J. 1990. Definition and taxonomical place of the genus *Pleurotus* in the mushrooms classification. *Bulletin de la Federation Nationale des Syndicats Agricoles de Cultivateurs de Champignons* (Francia) 48: 261-264.
68. Gutiérrez A, Caramelo L, Prieto A, Martínez MJ y Martínez AT. 1994. Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 1783-1788.
69. Gutiérrez AM, Jiménez Salgado T, Tapia Hernández A, Cavazos Arroyo J y Pérez Armendáriz B. 2014. Biodegradation of hydrocarbons exploiting spent substrate from *Pleurotus ostreatus* in agricultural soils. *African Journal of Biotechnology*. 13:33 3385-3393.
70. Guo Qing Z, Yi Fan W, Xiao Qing Z, Tzi BN y He Xiang W. 2009. Purification and characterization of a novel laccase from the edible mushroom *Clitocybe maxima*. *Process Biochem*. 45:5 627-633.

71. Guzmán G. 2000. Genus *Pleurotus* (Jacq.:Fr.) P. Kumm. (Agaricomycetidae): Diversity. Taxonomic Problems, and Cultural and traditional Medicinal Uses. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 2: 95-123.
72. Hadar Y, Kerem Z, Gorodecki B y Ardon O. 1992. Utilization of lignocellulosic waste by the edible mushroom, *Peurotus*. *Biodegradation*. 3:189-205.
73. Harvey LM. y McNeli B. 1993. Liquid fermentation system an product recobery of *Aspergillus*. *Biotechnology Handbooks*. 7a., ed. J. E. Smith. Plenum Press, New York.
74. Hatakka A, Mohammad O, Lundell T. 1989. The potential of white-rot fungi and their enzymes in the treatment of lignocellulosic feed. *Food Biotechnology* 3: 45-58.
75. Have R y Teunissen PJM. 2001. Oxidative Mechanisms Involved In Lignin Degradation. Whiterot fungi. *Journal Chemical Reviews*, 101 3397-3413.
76. Hawksworth DL. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res*. 105:12 1422–1432.
77. Heinzkill M, Bech L, Halkier T, Schneider P y Anke T. 1998. Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family Coprinaceae). *Applied and Environmental Microbiology*. 64:5 1601-1606.
78. Herrera Gamboa J, Naranjo Jiménez N, Páez Oliván LA, Cisneros de la Cueva MG, Gurrola Armendáriz DL, Torres Ricario R, Monreal García HM y Hernández Amparan S. 2015. Los hongos de la pudrición Blanca involucrados en la fertilidad del suelo. *Vidsupra Visión Científica*. 7:1 22-25.
79. Henzler HJ, Schedel M. 1991. Suitability of the shaking flask for oxygen supply to microbial cultures. *Bioprocess Engineering*. 7: 123-1 31.
80. Hesseltine CW. 1972. *Biotechnology report: Solid state fermentations*. *Biotechnology and Bioengineering*. 14 517-532.
81. Hölker U, Höfer M y Lenz J. 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64: 175-186.
82. Herrera Mora JA, Rosas Acosta JM, Mercado M, Martinez MMy Pedroza AM. 2004. Efecto de las enzimas ligninolíticas de los hongos *Trametes versicolor* y *Phanerochaete chrysosporum* inmovilizados en espuma sobre la remoción decolor,

- demanda química de oxígeno y clorofenoles en aguas residuales de industria papelera colombiana. *Universitas Scientiarum*. 10:2 27-36.
83. Herrera T, Ulloa M. 1998. El reino de los hongos: micología básica y aplicada. Fondo de cultura económica. México, D.F.
84. Horton JS, Palmer GE, Smith WJ. 1999. Regulation of dikaryon-expressed genes by FRT1 in the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Fungal Genetics and biology*. 26: 33-47.
85. Kalac P y Svoboda L. 2000. A review of trace element concentrations in edible mushrooms. *Food Chem*. 69: 273-281.
86. Kalmis E y Sargn S. 2004. Cultivation of two *Pleurotus* species on wheat straw substrates containing olive mill waste water. *International Biodeterioration & Biodegradation* 53 43-7.
87. Kelley RL, Reddy CA. 1986. Identification of glucose oxidase activity as the primary source of hydrogen peroxide production in ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Microbiology*. 144:248-253.
88. Kersten PJ y Kirk TK. 1987. Involvement of a new enzyme, glioxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal Bacteriology*. 169: 2195-2201.
89. Kirk TK y Cullen D. 1998. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. En: Young, R. A. y Akhtar, M. (Eds). Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. TAPPI Press. Atlanta.
90. Kirk TK y Farrell RL. 1987. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol*, 41: 465-505.
91. Knapp J, Newby P. y Reece P. 1995. Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. *Enzyme and Microbial technologic*. 17: 664-668.
92. Koenigs JW. 1974. Production of hydrogen peroxide by wood-rotting fungi in wood and its correlation with weight loss, depolymerization, and pH changes. *Archives of Microbiology* 99: 129-145.
93. Koltin Y, Stamberg J. y Lemke P. 1972. Genetic structure and evolution of the incompatibility factors in higher fungi. *Bacteriol. Rev*. 36:2 156-171.

94. Krause A, Lance A y Elrin M. 1983. Plastic analysis guide chemical and instrumental methods. Hanser Publishers. P1 118-123.
95. Krzywonos M y Seruga P. 2012. Decoloration of sugar beet Molasses Vinasse, a Strength Distillery Wastewater, by Lactic Acid Bacteria. Pol. J. Environ. Stud 21:4 943-948.
96. Kutchan TM, y Dittrich H. 1995. Characterization and mechanism of the berberine bridge enzyme, a covalently flavinylated oxidase of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis in plants. Journal of Biological Chemistry. 270:41 24475-24481.
97. Lehninger AL. 1979. Bioquímica. 2a ed. Omega. Barcelona, España. 203-205.
98. Leonowicz A, Matuszewska A, Luterek J, Ziegenhagen D, Wosta wasilewska M, Cho NS, Hofrichterl M. y Rogalsk. 1999. Biodegradation of lignin white rot fungi. Fungal genetics and biology 27: 175-185.
99. Liers C, Aranda E, Strittmatter E, Piontek K, Plattner DA, Zorn H y Hofrichter M. 2014. Phenol oxidation by DyP-type peroxidases in comparison to fungal and plant peroxidases. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 103 41-46.
100. López C, Moreira MT, Feijoo G y Lema JM. 2006. Tecnologías para en tratamiento de efluentes de industrias textiles. Revista de Química Teórica y Aplicada 64:531 560-573.
101. Marín BJ. 2011. Dinámica de fungicidas en suelos de viñedo enmendados con sustratos postcultivo de hongos. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca. Facultad de Ciencias Químicas. Salamanca. España.
102. Martinez Carrera D, Morales P, Sobal M, Bomilla M y Martinez M. 2006. México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción de los hongos comestibles. In: El cultivo de Pleurotus en México. ECOSUR-COLPOS, México, D. F.
103. Martínez Restrepo J. 2014. Selección de hongos filamentosos con potencia para la degradación de lignocelulosa aislada de desechos agroindustriales de café e higuera. Universidad católica de Manizalez. 21-28.
104. Marzullo L, Cannio R, Giardina P, Santini MT y Sannia G. 1995. Veratryl alcohol oxidase from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevents

- polymerization of laccase-oxidized substrates. *The Journal of Biological Chemistry*. 270: 3823-3827.
105. Massey IJ, Aitken MD, Ball LM, y Heck PE. 1994. Mutagenicity screening of reaction products from the enzyme-catalyzed oxidation of phenolic pollutants. *Environmental toxicology and chemistry*. 13:11 1743-1752.
 106. Mayer AM y Staples RC. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochem*. 60: 551-565.
 107. Menéndez VJ y Oliveros P. 2004. Hongos Basidiomycetes. Características generales. Recuperado el 2 de agosto de 2013, de <http://www.asturnatura.com/articulos/hongos/basidiomycetes.php>
 108. Mester T y Tien M. 2000. Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 46: 51-59.
 109. Miller G. 1959. Use of Dinitrosalicilic acid for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31: 426-428.
 110. Moeller GE y Garzon MA. 2003. Desarrollo de tecnologías no convencionales para el tratamiento de efluentes de la fabricación de colorantes del tipo azo. *Anuarioimta*.
 111. Moo Young M, Moreira AR y Tengerdy RP. 1983. Principles of the Solid Substrate Fermentation. In *Filamentous Fungi*. 4. Ed. J. E. Smith, D. R. Berry and B. Kristianse, Edward Arnold. 117–144.
 112. Moreira F, Arrias FF, Azzano SR, Lenartovicz VM, Áquez DE, Souza CG y Peralta R. 1999. Production of amylases by *Aspergillus tamarii*. *Revista Microbiol* 30: 157-162.
 113. Montoya S, Sánchez OJ y Levin L. 2014. Evaluación de actividades endoglucanasa, exoglucanasa, lacasa y lignino peroxidasa en diez hongos de pudrición blanca. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 12:2 115-124.
 114. Mudgett RE. 1986. Solid State Fermentation. En: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Ed: Demain. Mo Graw Hill, New York, Londres, Paris. 7: 66-83.

115. Muñoz M, Gomez Rico MF, Font R. 2014. PCDD/F formation from chlorophenols by lignin and manganese peroxidases. *Chemosphere*. 110: 129-135.
116. Nishida A, Eriksson KE. 1987. Formation, purification, and partial characterization of methanol oxidase, a H₂O₂ producing enzyme in *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 9: 325-338.
117. Osorio Echavarría J, Vidal Benavides AI y Quintero Díaz JC. 2011. Decoloración de aguas residuales textiles utilizando el hongo ligninolítico anamorfo R1 de *Bjerkandera* sp. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*. 57: 85-93.
118. Othschild NL, Evkowitz AH, Adar YD, Osoretz C. 1999. Manganese deficiency can replace high oxygen levels needed for lignin peroxidase formation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:2 483-488.
119. Pandey P, Selvakumar P, Soccol CR, Nigan P. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science* 27:1 491-1 62.
120. Peláez A, Meneses M, Miranda L, Megías M, Barcena R y Loera O. 2008. Ventajas de la fermentación sólida con *Pleurotus sapidus* en ensilaje de caña de azúcar. *Archivos de Zootecnia* 57:217 25-33.
121. Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Scaloni A, Capasso A y Sannia G. 1997. A novel white lacasa from *Pleurotus ostreatus*. *Journal Biological Chemistry*; 272:31 301-30307.
122. Pérez Boada M, Ruiz Dueñas FJ, Pogni R, Basosi R, Choinowski T., Martínez, MJ y Martínez AT. 2005. Versatile Peroxidase Oxidation of High Redox Potential Aromatic Compounds: Site-directed Mutagenesis, Spectroscopic and Crystallographic Investigation of Three Long-range Electron Transfer Pathways. *Journal of Molecular Biology*. 385-402.
123. Pineda Insuasti JA, Ramos Sánchez LB y Soto Arroyave CP. 2014. Producción de *Pleurotus ostreatus* por fermentación en estado sólido: una revisión. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*. 48:2 13-23.
124. Peñas M, Ásgeirsdóttir SA, Lasa I, Culiañez Maciá FA, Pisabarro AG, Wessels JGH y Ramírez L. 1998. Identification, characterization and in situ detection of a

- fruti-body-specific hidrophobin of *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology 4028-4034.
125. Pire DV. 2001. (En Línea): las asombrosas setas. Mayo 15. Argentina. <http://agronet.com.mx/cgi/articles.cgi?Action=Viewhistory&Article=4&Type=A&Datemin=2001-05-01%2000:00:00&Datemax=2001-05-31%2023:59:59>
 126. Pozdnyakova N, Makarov O, Chenyshova M, Turkovskaya O y Jarosz-Wilkolazka A. 2013. Versatile peroxidase of *Bjerkandera fumosa*: Substrate and inhibitor specificity. Enzyme and Microbial Technology 52:1 44-53.
 127. Quiñones NM. 2012. Aprovechamiento de residuos agroforestales para el cultivo de hongos comestibles (*Pleurotus spp.*). Tesis de maestría. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional unidad Durango, Instituto Politécnico Nacional. México.
 128. Rahmanpour R y Bugg, TD. 2015. Characterisation of Dyp-type peroxidases from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5: Oxidation of Mn(II) and polymeric lignin by Dyp1B. Archives of Biochemistry and Biophysics.
 129. Raimbault M. 1980. Fermentation en Milieu Solide. Croissance des Champignons Filamenteux sur Sustrat Amilacé. Tesis Doctoral, U. Paul Sabatier, Francia.
 130. Raimbault M. 1998. General and microbiological aspects of solid state fermentation. Journal of Biotechnology. www.ejb.org. Accesado el 28/Mar/2009.
 131. Rakesh Kumar S, Daljit-Singh A. 2010. Production of lignocellulolytic enzymes and enhancement of in vitro digestibility during solid state fermentation of wheat straw by *Phlebia floridensis*. Bioresource Technology. 101: 9248-9253.
 132. Ramírez L, Larraya L. y Pisabarro A. 2000. Molecular tools for breeding basidiomycetes. Int. Microbiol. 3:3 147-152.
 133. Ramírez NE, Vargas MC, Ariza JC y Martínez C. 2003. Caracterización de la lacasa obtenida por dos métodos de producción con *Pleurotus ostreatus*. Rev Colomb Biotec. 5:2 64-72.
 134. Retes Pruneda JL. 2014. Biorremediación de vinazas de la industria tequilera y mezcalera mediante tratamiento fisicoquímico y biológico. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Centro de Ciencias Básicas. Tesis de doctorado.

135. Revueltas A. 2013. Evaluación del potencial enzimático de macromicetos lignícolas del centro del estado de Veracruz. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Veracruzana. México.
136. Righelato RC. 1975. Growth kinetics of mycelial fungi. En *Filamentous fungi* Vol.1 (Industrial mycology). Smith, J. E., Berry, D. (Eds.) Edward Arnold, London.
137. Robinson T, McMullan G, Marchant R, Nigman P. 2001. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*. 77: 247-255.
138. Rodakiewicz Nowak J, Jarosz Wilkolazka A y Iuterek J. 2006. Catalytic activity of versatile peroxidase from *Bjerkandera fumosa* in aqueous solutions of water-miscible organic solvents. *Applied Catalysis. A: General* 308 56-61.
139. Rodríguez CS, Gundín M, Lorenzo M y Sanromán MA. 2002. Screening of supports and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions. *Process Biochem*. 38: 249-255.
140. Rodríguez CS. y Toca HJL. 2007. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnol Adv*. 24: 500-513.
141. Romero J, Rodríguez M y Pérez R. 2000. *Pleurotus ostreatus*. Importancia y tecnología de cultivo. Universidad de Cienfuegos “Carlos Rafael Rodríguez”. Cuatro caminos, Ciudad de Cienfuegos. 155 p.
142. Rothschild NL, Etkowitz AH, Adar Y y Dosoretz C. 1999. Manganese deficiency can replace high oxygen levels needed for lignin peroxidase formation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:2 483-488.
143. Rothschild NH, Adar YD y Dosoretz C. 1995. Ligninolytic system formation by *Phanerochaete chrysosporium* in air. *Applied and Environmental Microbiology* 61:5 1833-1838.
144. Royse DJ. 2003. Cultivation of Oyster Mushrooms. Pennsylvania: Pennsylvania State University, Sciences CoA. Report No. CAT UL207.
145. Ruiz Dueñas FJ y Martínez AT. 2009. Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we take advantage of this. *Microbial Biotechnology* 2:2 164-177.

146. Ruiz Dueñas FJ, Morales M, García E, Miki Y, Martínez MJ y Martínez AT. 2009. Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. *Jornal of Experimental Botany* 60:2 441-452.
147. Ruiz Dueñas FJ, Lundell T, Floudas D, Nagy LG, Barrasa JM, Hibbett DS, y Martínez AT. 2013. Lignin-degrading peroxidases in Polyporales: an evolutionary survey based on 10 sequenced genomes. *Mycologia*. 105:6 1428-1444.
148. Sáez M, Barrios AM, Vizcaíno AJ, López G, Alarcón FJ y Martínez TF. 2015. Efecto of alginate and chitosan encapsulation on the fate of BSA protein delivered orally to gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Animal Feed Science and Tecnology* 210: 114-124.
149. Sánchez Escudero L. 2016. Identificación y caracterización de hongos de interés para su uso industrial y, en especial, en la industria alimentaria mediante el uso de métodos moleculares. Grado de inovación en procesos y productos alimentarios Universidad Pública de Navarrete. 9-14.
150. Sánchez Hernández, C., Díaz- Godínez, R., Díaz- Godínez, G. (2015). Metabolismo Microbiano. *Conciencia Grafica*. 80
151. Sánchez JE. y Royse D. 2001. La biología y el cultivo de *Pleurotus pp*. Limusa. Mexico, D. F.
152. Sánchez VJE y Royse DJ. 2001. Crecimiento y fructificación. En: La biología y el cultivo de *Pleurotus spp*. Ecosur. El Colegio de la Frontera Sur, San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México, Ed.
153. Salvachúa D, Prieto A, Martínez ÁT y Martínez MJ. 2013. Characterization of a novel dye-decolorizing peroxidase (DyP)-type enzyme from *Irpex lacteus* and its application in enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Applied and Environmental Microbiology*, 79: 4316-4324.
154. Saunders J, Frish K. 1964. Polyurethanes: Chemistry and technology. Vol. XVI part 1. John Wiley and Sons.
155. Schlosser DG, Rey RF y Ritsche W. 1997. Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra and intracellular enzymes activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. *Applied Microbiology and Biotechnology* 47: 412-418.

156. Schmit JP, Mueller GM. 2007. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. *Biodivers Conserv.* 16:1 99–111.
157. Shraddha S, Rakesh V, Savita D, y Praveen J. 2011. Evaluation of water quality of Narmada river with reference to physico-chemical parameters at Hoshangabad city, MP, India. *Research Journal of Chemical Sciences.* 1:3 40-48.
158. Schwarze F, Engels J, Mattheck C. 2000. Fundamental aspects. fungal strategies of wood decay in trees. *Editorial Springer* 1: 5-31.
159. Serrat M, Bermúdez R. 2009. Bioconversión de pulpa y mucilago de café en una bebida alcoholica y otros productos útiles. Cuba patent 23340A1.
160. Shraddha R S, Sehgal S, Kamthania M, Kumar A. 2011. Laccase: Microbial, sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme Res.* Artículo in press.
161. Simbaña Cazar CJ. 2016. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de la parroquia taracoa en Francisco de Orellana, mediante el hongo *Pleurotus ostreatus*. Escuela Superior Politecnica de Chimborazo. Tesis de ingeniería en Biotecnología. Facultad de Ciencias.
162. Stajic M, Persky L, Friesem D, Hadar Y, Wasser S, Nevo E y Vukojevic J. 2006. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme and Microbial Technology* 38: 65-73.
163. Stamets P y Chilton JS. 1983. The mushroom cultivator. Olympia, Washington. Ed. Agarikon Press. Chapter I Introduction to mushroom culture.
164. Snajdr J, Baldrian P. 2007. Temperature Affects the Production, Activity and Stability of Ligninolytic Enzymes in *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor*. *Folia Microbiol.* 52:5 498-502.
165. Solís Oba M, Bárzana E, García-Garibay M y Viniegra González G. 2007. El ABTS+: agente oxidante de diversos compuestos químicos y su mecanismo de reciclado entre la lacasa y el sustrato. *Rev Mex Ing Qui.* 6:3 275-281.
166. Suárez C, 2010. Obtención in vitro de micelio de hongos comestibles, shiitake (*Lentinula edodes*) y orellanas (*Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius*) a

- partir de aislamientos de cuerpos fructíferos, para la producción de semilla [Especialización]. Bogotá D.C.: Universidad Nacional de Colombia.
167. Sugano Y. 2009. DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 66: 1387-1403.
 168. Taboada Puig R, Junghanns C, Demarche P, Moreira MT, Feijoo G, Lema JM y Agathos SN. 2011. Combined cross-linked enzyme aggregate from versatile peroxidase and glucose oxidase: production, characterization and application for the elimination of endocrine disruptors. *Bioresource technology* 102:11 6593-6599.
 169. Taboada Puig R, Lu Chau TA, Eibes G, Feijoo G, Moreira MT y Lema JM. 2015. Continuous removal of endocrine disruptors by versatile peroxidase using a two-stage system. *Biotechnology Progress* 31:4 908-916.
 170. Téllez-Téllez M, Fernández J, Montiel A, 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.
 171. Thurston CF. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology-UK* 140:19-26.
 172. Tinoco R, Verdin J y Vázquez Duhalt R. 2007. Role of Oxidizing mediators and Tryptophan 172 in the decoloration of industrial dyes by the versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. *Journal of Molecular Catalysis B. Enzymatic* 46:1-4 01-07.
 173. Tlecuítl-Beristain S, Díaz Godínez G, Soriano Santos J, Romero Gómez S, Sánchez C. 2003. Effect of the initial concentration of glucose or sucrose on exopolysaccharide production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. *Chemica Oggi/Chemistry Today*.
 174. Torres E y Ayala M. 2010. Biocatalysis Based on Heme Peroxidases. Peroxidases as potential industrial biocatalysts. Springer, Mexico.
 175. Torres Guerrero JV, Martínez Juárez AB y Tapia Santoyo A. 2007. Obtención de componentes monocarióticos de hongos comestibles del género *Pleurotus*. *Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología*. 9-23.

176. Touahar IE, Haroune L, Bellenger JP y Cabana H. 2014. Characterization of combined cross linked enzyme aggregates from laccase, versatile peroxidase and glucose and their utilization for the elimination of pharmaceuticals. *Science of The Total Environment* 481: 90-99.
177. Ullah MA, Kadhim H, Rastall RA, Evans CS. 2000. Evaluation of solid substrates for enzymes production by *Coliorus versicolor*, for use in bioremediation of chorophenols in aqueos effluents. *Applied Microbiology and biotechnology*. 54: 832-837.
178. Valencia del Toro G. (2002). Estudio sobre la expresión de color de los esporóforos en *Pleurotus spp.* Por apareamiento de neohaplontes compatibles y progenies monospóricas. Tesis- Doctorado. UNAM. México D.F.
179. Viniegra-González, G., Favela Torres, E., Aguilar, C.N., Rómero Gómez, S.J., Díaz Godínez, G. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, 13: 157–167.
180. Viniegra González G. 1993. Solid State Fermentation: Definition, Characteristics, limitations and monitoring. Publ., Dordrecht, Chapter 2: 5-22.
181. Wessels JGH. 1999. Fungi in their own right. *Fungal Genetics and biology* 27: 134-145.
182. Yang Y, Fuying M, Hongbo Y, Fangfang F, Xia W, Xiaoyu Z, y Mulan J. 2011. Characterization of a laccase gene from the white-rot fungi *Trametes sp.* 5930 isolated from Shennongjia Nature Reserve in China and studying on the capability of decolorization of different synthetic dyes. *Biochemical Engineering Journal*, 57: 13-22.
183. Yegres S, Sánchez J, belmar M, Riveros W y Belmar D. 2001. Producción de enzimas pécticas ensayos preliminares. *Saber, Universidad de Oriente, Venezuela*13:1 55-59.
184. Yu S, Yu H-s y Buswell J.1997. Efect of Nutrient Nitrogen and Manganese on Manganese Peroxidase and Laccase Production by *Pleurotus sajor-caju*. *FEMS Microbiology Letters* 147 133-7.

13. GLOSARIO DE TERMINOS

pH	Potencial de hidrogeno
LAC	Lacasa
AVO	Alcohol Veratríl Oxidasa
VP	Versátil Peroxidasa
MnP	Manganeso Peroxidasa
DyP	Decolorante peroxidasa
mM	mili Molar
ABTS	2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico
DMP	2,6- dimetoxifenol
UI/L	Unidad Internacional por Litro
X_{max}	Valor máximo de biomasa
E_{max}	Valor máximo de actividad enzimatica
μ	Velocidad especifica de crecimiento
$Y_{X/S}$	Rendimiento de biomasa con respecto a sustrato
$Y_{E/X}$	Rendimiento de producto con respecto a biomasa
P_{RO}	Máximo de actividad
q_p	Tasa especifica de formación de la enzima
rpm	Revoluciones por minuto
μl	Micro litro
h	hora
$^{\circ}\text{C}$	Grado Celcius
FL	Fermentación Líquida
FS	Fermentación Sólida

DNS	Ácido 2-hidroxi- 3,5- dinitrosalicílico
X	biomasa
Sp	Especie
kDa	Kilo Daltones
L	Litros
min	Minutos
ARS	
nm	Nanómetro
°C	Grados Celsius
pl	Punto Isoeléctrico
PM	Peso Molecular
PUF	Espuma de poliuretano
cols.	Colaboradores
g/L	Gramos con respecto a litros
h	horas
h⁻¹	Horas a la menos uno
mL	Mililitros
<i>P. ostratus</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>
g	Gramos
mV	Milivoltios

14. PUBLICACIONES

14.1. Laccase activity and specific growth rate of *Pleurotus ostreatus* NRRL 3526 grown on solid-state fermentation and submerged fermentation

Laccase activity and specific growth rate of *Pleurotus ostreatus* NRRL 3526 grown on solid-state fermentation and submerged fermentation

Maribel González³, Carmen Sánchez¹, Gerardo Díaz-Godínez¹, Daniel Martínez-Carrera², Rubén Díaz¹

¹Centro de Investigación en Ciencias Biológicas UATx, Tlaxcala, México; ²Colegio de Posgraduados, Puebla, México; ³Maestría en Ciencias Biológicas de la UATx, Tlaxcala, México, Tel 01 248 48 15482, rdiazgod@hotmail.com.

Laccases are glycoproteins that catalyze the oxidation, methylation, demethylation, depolymerization and polymerization of phenolic compounds (1). These enzymes have been found in white-rot fungi, insects, plants and bacteria (2). *Pleurotus* is an edible fungus able to produce such enzymes. It has been suggested that the number and type of isoenzymes depend on the fungus growth conditions (3). In this work, the specific growth rate and the laccase activity were evaluated in *Pleurotus ostreatus* NRRL 3526 grown in solid-state fermentation (SSF) and in submerged fermentation (SmF). Mycelial fragments (4 mm diam) taken from the periphery of a 7 days old colony were used as inoculum in all the experiments. SSF studies were carried out in Erlenmeyer flask (250 ml) containing 0.5 g of polyurethane foam as inert support added with 15 ml of culture medium. SmF analyses were undertaken in Erlenmeyer flask of 125 ml containing 50 ml of culture medium. Samples were taken each 24 h for 22 days (stationary phase). In all the samples, mycelial biomass was obtained by filtration and the specific growth rate was evaluated (μ) using the logistic equation as previously reported (3). Intracellular laccase activities were evaluated in the supernatant using 2,6-dimethoxyphenol as substrate. Values of maximal biomass (X_{max}) were 5.9 and 7.3 g/l and μ values were 0.055 and 0.02 h⁻¹ for SSF and SmF, respectively. Highest laccase activities were 8400 and 17500 U/l for SSF and SmF, respectively. These results suggest that the highest laccase activity was observed in the exponential phase of the fungus in both fermentation systems.

References

1. Giardina, P, Palmieri, G, Scaloni, A, Fontanella, B, Faraco, V, Cennamo, G, Sannia, G. (1999). Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochem. J.* 341: 655-663.
2. Galhaup, C, Goller, S, Peterbauer, C, Strauss, J, Haltrich, D. (2002). Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology*. 148: 2159-2169.
3. Díaz, R, Telle-Tellez, M, Sánchez, C, 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 fermentations. *Electron. J. Biotechnol.* 16 (4) Fulltext 6.

Acknowledgements: We thank CONACYT for providing a MSc scholarship to Maribel González. We also are grateful to PRODEP for supporting this research (Grant CP72-2086).



Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C.
FUNDADA EN 1957

AVE. CIPRESES S/N COL. SAN ANDRÉS TOTOLTEPEC
C.P. 14400 MÉXICO, D.F.
APARTADO POSTAL 70-606, CIUDAD UNIVERSITARIA
TEL. Y FAX: (55)5622-5742
<http://www.smb.org.mx>
Correo Electrónico: smbq@fc.unam.mx

MESA DIRECTIVA 2015 - 2017

PRESIDENTE
DR. MIGUEL LARA FLORES

VICE-PRESIDENTE
DRA. IRENE BEATRIZ CASTAÑO NAVARRO

SECRETARIA TESORERA
DRA. ELDA GUADALUPE ESPIN OCAMPO

SUB-SECRETARIO TESORERO
DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOL

SOCIOS FUNDADORES

Dr. Barbarín Arreguín Lozano
Dr. Edmundo Calva Cuadrilla
Dr. Guillermo Carvajal Sandoval (†)
Dr. Joaquín Cravioto (†)
Dr. Carlos del Río Estrada (†)
Dr. Silvestre Frenk Freund
Dr. Mario García Hernández (†)
Dr. Jesús Guzmán García (†)
Dr. Jesús Kumate Rodríguez
Dr. José Laguna García (†)
Dr. Guillermo Massieu Helguera (†)
Dr. Raúl Ondarza Vidaurreta
Dr. Efraín G. Pardo Codina
Dr. Guillermo Soberón Acevedo

Otorga la presente

CONSTANCIA a:

Maribel González Palma

Quien asistió y presentó el trabajo:

Laccase activity and specific growth rate of *Pleurotus ostreatus* NRRL 3526 grown on solid-state fermentation and submerged fermentation

Por:

Maribel González Palma, Carmen Sánchez, Gerardo Díaz Godínez,
Daniel Martínez Carrera, Rubén Díaz Godínez

En la modalidad de cartel durante el XXXI Congreso Nacional de Bioquímica del 6 al 11 de noviembre de 2016 en Aguascalientes, Ags.

Atentamente
Por el Comité Organizador

Dr. Miguel Lara Flores
Presidente

14.2. Evaluación de enzimas oxidasas y crecimiento de *Pleurotus ostreatus* ARS 3526 crecido en fermentación sólida



III ENCUESTRO INTERNACIONAL
SOBRE BIOTECNOLOGÍA EN LA UATX
4-7 DE DICIEMBRE 2016, TLAXCALA, MÉXICO



EVALUACIÓN DE ENZIMAS OXIDASAS Y CRECIMIENTO DE *Pleurotus ostreatus* ARS 3526 CRECIDO EN FERMENTACIÓN SÓLIDA

González-Palma, M.² Sánchez, C. Díaz-Godínez,¹ G. Martínez-Carrera, D. C.³ Díaz, R.¹

¹Centro de Investigación en Ciencias Biológicas UATx, Tlaxcala, México; ²Colegio de Posgraduados, Puebla, México; ³Maestría en Ciencias Biológicas de la UATx, Tlaxcala, rdiazgod@hotmail.com.

Palabras clave: Enzimas oxidasas, Fermentación sólida, *Pleurotus ostreatus*.

Introducción

Las enzimas producidas por hongos de pudrición blanca poseen un amplio espectro de especificidades de sustrato y pueden ser usadas en diferentes áreas de procesos industriales tales como: manufactura de pulpa de papel y revalorización de subproductos agroindustriales (1). *Pleurotus ostreatus* es un hongo que produce enzimas oxidasas como lacasas (LAC), Manganese Peroxidases (MnP), Alcohol Veratril Oxidase (AVO), Versátil Peroxidase (VP) y Decolorantes Peroxidase (DyP) (2). Las cuales necesitan modificar la estructura de la lignina para poder usarla como sustrato, esto lo logran mediante mecanismos de oxidación (3). Por lo que en este trabajo se evaluó la actividad enzimática de oxidasas de *Pleurotus ostreatus* desarrollado en fermentación sólida (FS).

Materiales y métodos

Se realizó una FS en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 0.5 g de espuma de poliuretano como soporte inerte con 15 mL de medio de cultivo. El inóculo fue de tres fragmentos de micelio de *P. ostreatus* ARS 3526. Se obtuvo la biomasa por filtración, el muestreo se realizó cada 24 h hasta la fase estacionaria. Del sobrenadante se evaluó la actividad de LAC, MnP, AVO, VP y DyP utilizando como sustrato 2,6 Dimetoxifenol (DMP) a 2mM, sulfato manganoso a .5 mM, alcohol veratrilico a 70 mM, sulfato de manganoso a .1 mM y 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) a 2.5 mM, respectivamente, todas por espectrofotometría.

Resultados

La figura 1 muestra el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en FS, se obtuvo una X_{max} de 7.02 g/L, con una μ de 0.055 h^{-1} . La biomasa máxima de *Pleurotus ostreatus* ARS 3526 fue a las 168 h, a inicios de la fase estacionaria, a comparación de Grandes-Blanco (2011) que obtuvo su biomasa máxima de *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783, de una fermentación líquida, de 5.7 g/L alrededor de las 360 h. La figura 2 muestra las actividades enzimáticas de LAC, AVO, VP y DyP se dan en la fase exponencial y estacionaria de la fermentación sólida observando valores máximos de 17593, 1996, 8393 y 1753 U/L, a las 144, 384, 288 y 168, respectivamente, con excepción de las Mnp que se da en la fase de adaptación con 1173 U/L a las 72 h. Mientras que Grandes-Blanco en 2011 obtuvo menor actividad enzimática en fermentación líquida de LAC, MnP y AVO de 10415, 900 y 1718 U/L a las 432, 50 y 480 h, respectivamente.

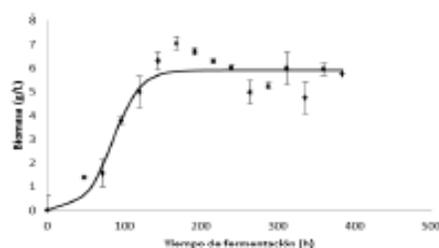


Fig. 1. Crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en FS

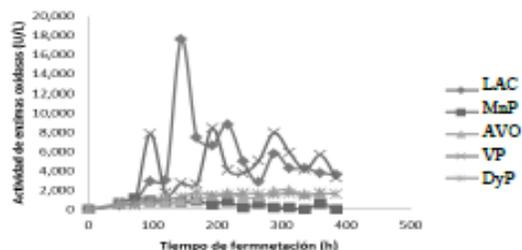


Fig. 2. Actividad de enzimas oxidasas en FS

Conclusiones. En esta investigación la fermentación sólida del hongo *Pleurotus ostreatus* ARS 3526 presentó excelente producción de biomasa. Asimismo, se obtuvieron elevadas actividades enzimáticas.

Agradecimientos

Se agradece a CONACYT por proporcionar una beca de maestría a Maribel González Palma. Asimismo, a ProdeP por apoyar esta investigación (Grant CP72-2086).

Bibliografía

1. Arebeloa, M., J. Leseleuc, G. Goma and J.C. Pommier (1992). TAPPI J. vol. (75): 215.
2. Evans, C. Veness, R.G. and Ullah, M. (1989). J. Chem. Technol. Biotechnol Vol. (71): 357.
3. Kirk, T. and Cullen, D. (1998). Enzymology and molecular genetic of wood degradation by White-rot fungi. Environmentally Friendly Technologies for Pulp and Paper Industry. John Wiley and Sogns, Inc. New York. Vol (1): 273-307.
4. Grandes-Blanco, A. I. (2011). Evaluación de la actividad de fenol oxidasas de *Pleurotus ostreatus* producidas en fermentación sumergida en presencia de DMP y azul remazol. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada.



**III ENCUENTRO INTERNACIONAL
SOBRE BIOTECNOLOGÍA EN LA UATX**

Otorga la presente
CONSTANCIA
A:

González-Palma, M. Sánchez, C. Díaz-Godínez, G. Martínez-Carrera, D. C., Díaz R.

Por la presentación en cartel del trabajo

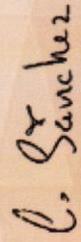
**EVALUACIÓN DE ENZIMAS OXIDASAS Y CRECIMIENTO DE *Pleurotus ostreatus* ARS 3526 CRECIDO
EN FERMENTACIÓN SÓLIDA**

en el "III Encuentro Internacional sobre Biotecnología en la UATX"

celebrado en la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México los días 4-7 de diciembre de 2016.



Dr. Gerardo Díaz Godínez
Líder del Cuerpo Académico
de Biotecnología



Dra. Ma. del Carmen Sánchez Hernández
Presidente del III Encuentro Internacional
sobre Biotecnología



Dr. Rubén Díaz Godínez
Jefe del Laboratorio
de Biotecnología



14.3. Evaluación de enzimas oxidasas y crecimiento de *Pleurotus ostreatus* ARS 3526 desarrollado en fermentación líquida



XII Congreso de Biotecnología "CHIAPAS 2017"



Evaluación de enzimas oxidasas y crecimiento de *Pleurotus ostreatus* ARS 3526 desarrollado en fermentación líquida

González-Palma Maribel², Sánchez Carmen¹, Martínez-Carrera Daniel Claudio³ Díaz Rubén^{1*}

¹Centro de Investigación en Ciencias Biológicas UATx, Carretera San Martín Texmelucan-Tlaxcala Km. 10.5 Tlaxcala-México. *rdiazgod@hotmail.com.

²Maestría en Ciencias Biológicas UATx, Carretera Tlaxcala-Puebla km. 1.5, Tlaxcala, Mexico.

³Colegio de Posgraduados, Carretera Federal México-Puebla Km. 125.5, Puebla, México.

Aporte principal del trabajo

El presente trabajo muestra la actividad enzimática del hongo *Pleurotus ostreatus* en fermentación líquida en condiciones basales para su desarrollo. Se sugiere que la cepa ARS 3526 es candidata para la producción de enzimas oxidasas.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas producidas por hongos de pudrición blanca poseen un amplio espectro de especificidades de sustrato y pueden ser usadas en diferentes áreas de procesos industriales tales como: manufactura de pulpa de papel y revalorización de subproductos agroindustriales⁽¹⁾. *Pleurotus ostreatus* (*P. ostreatus*) es un hongo que produce enzimas oxidasas como lacasa (LAC), Manganese Peroxidasas (MnP), Alcohol Veratríil Oxidasa (AVO), Versátil Peroxidasa (VP) y Decolorantes Peroxidas (DyP)⁽²⁾. Las cuales necesitan modificar la estructura de la lignina para poder usarla como sustrato, esto lo logran mediante mecanismos de oxidación⁽³⁾. Por lo que en este trabajo se evaluó la actividad enzimática de oxidasas de *Pleurotus ostreatus* desarrollado en fermentación líquida (FL).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una FL en matraces de 125 mL con 50 mL de medio de cultivo. El inóculo fue de tres fragmentos de micelio de *P. ostreatus* ARS 3526. Se obtuvo la biomasa por filtración, el muestreo se realizó cada 24 h por 22 días. Del sobrenadante se evaluó la actividad de LAC, MnP, AVO, VP y DyP utilizando como sustrato 2,6 Dimetoxifenol (DMP) a 2 mM, sulfato manganoso a 0.5 mM, alcohol veratrílico a 70 mM, sulfato de manganeso a 0.1 mM y 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) a 2.5 mM, respectivamente, todas por espectrofotometría.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 muestra el crecimiento de *P. ostreatus* en FL, se obtuvo una X_{max} de 7.31 g/L, con una μ de 0.020 h⁻¹. La biomasa máxima de *P. ostreatus* ARS 3526 fue a las 552 h, en la fase estacionaria, a comparación de Grandes-Blanco (2011) que obtuvo su X_{max} de *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783, en fermentación líquida, de 5.7 g/L alrededor de las 360 h. En la figura 2 se muestran las mejores actividades enzimáticas de LAC, AVO, VP y DyP expresadas en la fase exponencial y estacionaria de la fermentación sólida observando valores máximos de 41.86, 20.14, 32.76 y 4.26 UI/L, a las 312, 360, 168 y 480, respectivamente, con excepción de las MnP que se da en la fase de adaptación con 36.23 UI/L a las 120 h. Mientras que Grandes-Blanco en 2011 obtuvo menor actividad enzimática en fermentación líquida de LAC, MnP y AVO de 10415, 900 y 1718 U/L a las 432, 50 y 480 h, respectivamente.

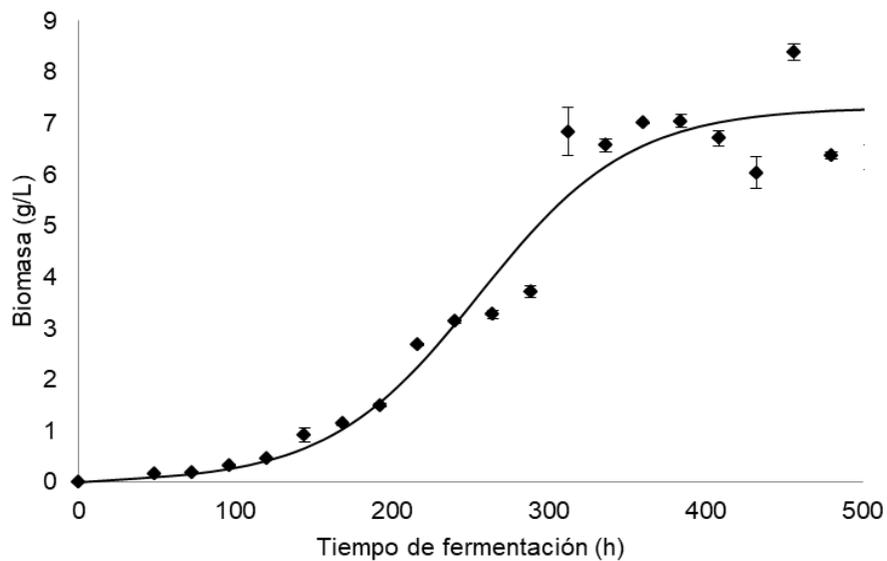


Fig. 1. Crecimiento de *P. ostreatus* en FL

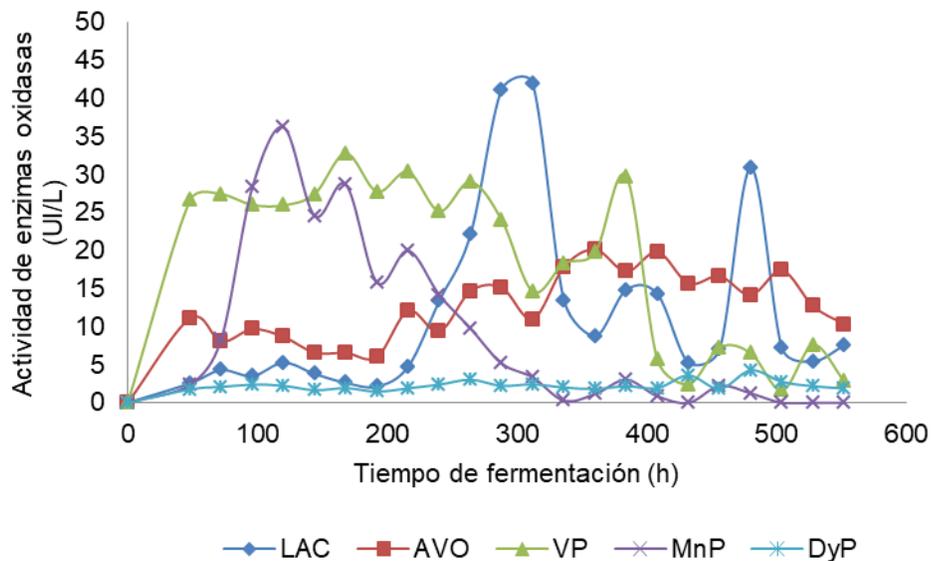


Fig. 2. Actividad de enzimas oxidasas de *P. ostreatus* en FL

CONCLUSIONES

En esta investigación la fermentación líquida el hongo *P. ostreatus* ARS 3526 presentó actividad enzimática de todas las enzimas analizadas, siendo en la transición de la fase exponencial a la fase estacionaria donde se observaron los valores más altos en todos los casos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arebeloa M J, Leseleuc G, Goma and, Pommier JC (1992). *TAPPI J.* 75:215.
2. Evans C, Veness R G and Ullah M (1989). *J. Chem. Technol. Biotechnol* 71:357.
3. Kirk T, and Cullen D (1998). *Enzymology and molecular genetic of wood degradation by White-rot fungi. Environmentally Friendly Technologies for Pulp and Paper Industry.* John Wiley and Sogns, Inc. *New York.* 1:273-307.
4. Grandes-Blanco A I (2011). *Evaluación de la actividad de fenol oxidasas de Pleurotus ostreatus producidas en fermentación sumergida en presencia de DMP y azul remazol.* (pp. 60-75) .Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional.



Colegio de Biotecnólogos de Chiapas A. C.

OTORGA LA PRESENTE

CONSTANCIA

A: González-Palma Maribel, Sánchez Carmen, Martínez-Carrera Daniel Claudio, Díaz Rubén

Por su participación con el trabajo en modalidad CARTEL:

Evaluación de enzimas oxidasas y crecimiento de *Pleurotus ostreatus* ARS 3526 desarrollado en fermentación líquida

en el marco del XII Congreso de Biotecnología Chiapas 2017 celebrado en Comitán de Domínguez, Chiapas, los días 23-26 de Mayo de 2017



MB. Gamaliel Velázquez Ovalle Presidente
Dr. Rodolfo Torres De Los Santos Secretario

Colegio de Biotecnólogos de Chiapas A.C
R.F.C. CBC-021108-AHA



14.4. Evaluación de enzimas oxidasas y crecimiento de *Pleurotus ostreatus* ARS 3526 desarrollado en fermentación sólida



XII Congreso de Biotecnología "CHIAPAS 2017"



Evaluación de enzimas oxidasas y crecimiento de *Pleurotus ostreatus* ARS 3526 en fermentación sólida

González-Palma Maribel², Sánchez Carmen¹, Martínez-Carrera Daniel Claudio³ Díaz Rubén^{1*}

¹Centro de Investigación en Ciencias Biológicas UATx, Carretera San Martín Texmelucan-Tlaxcala Km. 10.5 Tlaxcala-México. *rdiazgod@hotmail.com.

²Maestría en Ciencias Biológicas UATx, Carretera Tlaxcala-Puebla km. 1.5, Tlaxcala, Mexico.

³Colegio de Posgraduados, Carretera Federal México-Puebla Km. 125.5, Puebla, México.

Aporte principal del trabajo

El presente trabajo muestra la producción enzimática de *Pleurotus ostreatus* ARS 3526 en fermentación sólida en condiciones basales para su desarrollo, este hongo es considerado como un buen candidato para la producción de enzimas oxidasas.

INTRODUCCIÓN

Los hongos comestibles, como *Pleurotus ostreatus*, han sido ampliamente investigados en la recuperación de efluentes provenientes de industrias papeleras, debido a la producción de un sistema enzimático capaz de degradar la lignina y compuestos fenólicos⁽¹⁾. Este proceso se realiza mediante la modificación de la estructura de la lignina para poder usarla como sustrato, esto lo logran mediante mecanismos de oxidación⁽³⁾. *P. ostreatus* es un hongo que expresa enzimas oxidasas, como lacasa (LAC), Manganese Peroxidasas (MnP), Alcohol Veratríl Oxidasa (AVO), Versátil Peroxidasa (VP) y Decolorantes Peroxidas (DyP)⁽²⁾. Por lo que en este trabajo se evaluó la actividad enzimática de enzimas oxidasas de *Pleurotus ostreatus* desarrollado en fermentación sólida (FS).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó la FS en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 0.5 g de espuma de poliuretano como soporte inerte con 15 mL de medio de cultivo con un inóculo de tres fragmentos de micelio de *P. ostreatus* ARS 3526. Se obtuvo la biomasa por filtración, el muestreo se realizó cada 24 h hasta la fase estacionaria. Del sobrenadante se evaluó la actividad de LAC, MnP, AVO, VP y DyP utilizando como sustrato 2,6 Dimetoxifenol (DMP) a 2mM, sulfato manganoso a 0.5 mM, alcohol veratrílico a 70 mM, sulfato de manganeso a 0.1 mM y 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) a 2.5 mM, respectivamente, todas por espectrofotometría.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 muestra el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en FS, se obtuvo una X_{max} de 7.02 g/L, con una μ de 0.055 h⁻¹ a las 168 h, al inicio de la fase estacionaria. Las actividades enzimáticas de

LAC, AVO, VP y DyP se expresaron en la fase exponencial y estacionaria de la fermentación sólida observando valores máximos de 879.66, 20.46, 129.12 y 59.84 UI/L, a las 144, 288, 192 y 168, respectivamente, con excepción de las MnP que se da en la fase de adaptación con 10.12 UI/L a las 72 h (figura 2). Por su parte Chan Cupul (2016) obtuvo de los hongos *Trametes maxima* SM9, *Pycnoporus sanguineus* ACT1 y *Daedalea elegans* PM7 una actividad enzimática menor a los resultados obtenidos en esta investigación con valores enzimáticos de MnP con 60.2, 100.1 y 2.1 U/L a las 144, 144 y 216 h, respectivamente, en una fermentación sólida utilizando como soporte aserrín de pino.

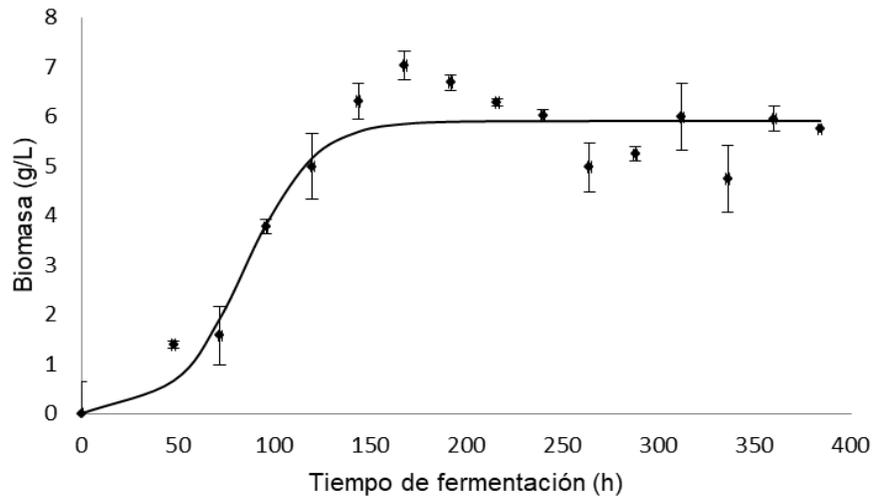


Fig. 1. Crecimiento de *P. ostreatus* en FS

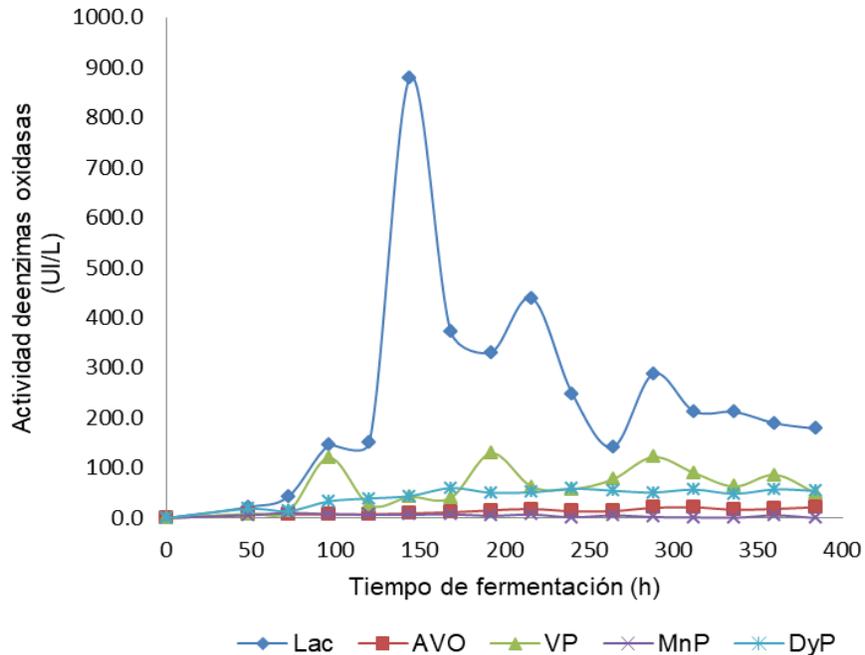


Fig. 2. Actividad de enzimas oxidasas de *P. ostreatus* en FS

CONCLUSIONES

En esta investigación la fermentación sólida de *P. ostreatus* ARS 3526 presentó actividad enzimática de todas las oxidasas analizadas, en la fase exponencial a la fase estacionaria se obtuvieron valores significativos en todos los casos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gómez Dorado C, Martínez Salgado M, Nieto Mosquera D, Pedrosa Rodríguez A, Rodríguez Vázquez R y Rosas Acosta J. (2005). Estudio del efecto de dos inductores y un protector enzimático sobre la actividad de las enzimas Mn-Peroxidasa y lacasa producidas por *Trametes versicolor* y su efecto en la decoloración de efluentes de la industria papelera. *Universitas Scientiarum*. 10:37-45.
2. Evans C, Veness R G and Ullah M (1989). *J. Chem. Technol. Biotechnol* 71:357.
3. Kirk T, and Cullen D (1998). Enzymology and molecular genetic of wood degradation by White-rot fungi. Environmentally Friendly Technologies for Pulp and Paper Industry. John Wiley and Sons, Inc. *New York*. 1:273-307.
4. Chan Cupul W, Herendia Abarca G P y Rodríguez Vázquez R (2016). Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática ligninolítica de macromicetos del estado de Veracruz, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 32:339-351.



Colegio de Biotecnólogos de Chiapas A. C.

OTORGA LA PRESENTE

CONSTANCIA

A: González-Palma Maribel, Sánchez Carmen, Martínez-Carrera

Daniel Claudio Díaz Rubén

Por su participación con el trabajo en modalidad CARTEL:

Evaluación de enzimas oxidasas y crecimiento de *Pleurotus ostreatus* ARS 3526 en fermentación sólida

en el marco del XII Congreso de Biotecnología Chiapas 2017 celebrado en Comitán de Domínguez, Chiapas, los días 23-26 de Mayo de 2017

MB. Gamaliel Velázquez Ovalle

Presidente

Dr. Rodolfo Torres De Los Santos

Secretario

Colegio de Biotecnólogos de Chiapas A.C

R.F.C. CBC-021108-AHA



14.5. Evaluación de enzimas oxidadas y crecimiento de *Pleurotus ostreatus* ARS 3526 desarrollado en fermentación sólida y líquida



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado



Otorga la presente

CONSTANCIA

A **Maribel González Palma**
Estudiante Maestría en Ciencias Biológicas

Por impartir el seminario

“Evaluación de la actividad enzimática de oxidadas de *Pleurotus ostreatus* (ARS 3526), crecido en fermentación sólida y líquida”

Tlaxcala, Tlax., noviembre 25 de 2016

Dña. Margarita Martínez Gómez
Coordinadora Maestría y Doctorado en Ciencias Biológicas