

DRA. ALBA MÓNICA MONTIEL GONZALEZ
DRA. ARACELI TOMASINI CAMPOCOSIO

TUTORES:

DR. GERARDO DÍAZ GODÍNEZ

DIRECTOR:

QFB. SUSANA ALONSO BOZADA

PRESENTA:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

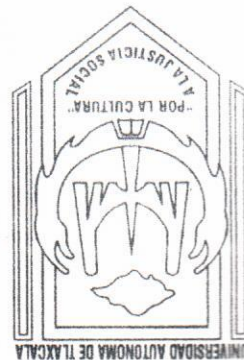
PARA OBTENER EL GRADO DE:

TESIS

“Caracterización de la fermentación líquida
para la producción de lacasas de dos
cepas de *Pleurotus ostreatus*”

DIVISIÓN EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA



COORDINACIÓN DE LA MAESTRIA
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGIA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que la QFB. Susana Alonso Bozada realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es: "Caracterización de la fermentación líquida para la producción de lacasas de dos cepas de *Pleurotus ostreatus*"

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
Tlaxcala, Tlax., agosto 8 de 2008

Dr. Gerardo Diaz Godínez



Dra. Alba Mónica Montiel González




Dra. Araceli Tomasi Campocoso



Dra. Ma. del Carmen Sánchez Hernández



Dr. Octavio Loera Corral



El presente trabajo se desarrolló en el Centro de Investigación de Ciencias Biológicas (CICB) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala con apoyo financiero del proyecto 47396 de CONACYT (SEF-CIENCIA BÁSICA 2004). Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de la presente tesis - No. De registro 198759. La Maestría en Ciencias Biológicas está registrada en el Programa para el Fortalecimiento del Posgrado Nacional. Padrón Nacional de Posgrado (PNP)

RESUMEN

Pleurotus ostreatus es un basidiomicete de pudrición blanca que tiene la capacidad de producir enzimas lacasas, dichas enzimas son importantes desde el punto de vista biotecnológico debido a que pueden oxidar compuestos fenólicos entre los cuales se encuentran colorantes utilizados en la industria del tejido de telas y en la industria del papel, mismos que resultan altamente contaminantes.

Debido a esto y a otras aplicaciones de esta enzima es de suma importancia contar con cepas de este organismo que presenten una alta producción de lacasas para caracterizarlas y poder manejarlas a gran escala.

En este trabajo se caracterizó la producción de lacasas de las cepas ATCC 201216 y ATCC 201218 (Po 3 y Po 7 respectivamente) de *P. ostreatus* por fermentación líquida, en ausencia y presencia de sulfato de cobre (0.25 g/L). Todas las fermentaciones se incubaron a 25°C durante 21 días con agitación orbital de 120 rpm. Los resultados obtenidos muestran que para la cepa Po 3, el sulfato de cobre resultó tóxico, ya que inhibió el crecimiento, sin embargo, la producción de lacasas se vio aumentada aproximadamente al doble. Para la cepa Po 7, el sulfato de cobre favoreció la producción de la enzima sin afectar su crecimiento.

Se observó una respuesta diferente en crecimiento y producción de lacasas de las cepas a la presencia del sulfato de cobre, aun siendo de la misma especie, encontrando que la cepa Po 7 es mejor que la Po 3. Este estudio contribuye a la búsqueda de las mejores cepas y condiciones de producción de lacasas.

INDICE

7	1. INTRODUCCIÓN	7
9	1.1 Morfología de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	9
9	1.2 Ciclo de vida de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	9
12	1.3 Lignina	12
13	1.4 Enzimas lacasas	13
15	1.5 Fermentación.	15
17	2. ANTECEDENTES	17
20	3. JUSTIFICACION.	20
21	4. PREGUNTA DE INVESTIGACION.	21
21	5. OBJETIVOS.	21
21	5.1. General	21
21	5.2. Particulares	21
22	6. METODOLOGIA.	22
23	6.1. Microorganismo empleado en este estudio	23
23	6.2. Condiciones de cultivo.	23
24	6.3. Caracterización de la fermentación sumergida y de la producción de lacasas	24
24	6.3.1. Obtención de los extractos crudos enzimáticos y de la biomasa.	24
24	6.3.2. Determinación de los parámetros cinéticos de crecimiento de <i>P. ostreatus</i> y de producción de lacasa	24
26	6.3.3. Cuantificación de la proteína soluble en el ECF.	26
26	6.3.4. Cuantificación de la actividad de lacasas extracelulares.	26
26	6.3.5. Cuantificación de azúcares residuales.	26
26	6.3.6. Determinación del pH	26
27	7. RESULTADOS	27
27	7.1 Fermentación adicionada con cobre.	27
27	7.1.1 Determinación de biomasa	27
28	7.1.2. Concentración de proteína soluble en el ECF	28
28	7.1.3 Actividad volumétrica de lacasas	28
29	7.1.4. Actividad específica	29
30	7.1.5 Cuantificación de azúcares residuales	30
31	7.1.6. pH	31
32	7.2. Fermentación sin adición de cobre	32
32	7.2.1 Determinación de biomasa	32
33	7.2.1. Concentración de proteína soluble en el ECF	33
34	7.2.2. Actividad volumétrica de lacasas	34
35	7.2.3. Actividad específica	35
36	7.2.4. Cuantificación de azúcares residuales	36
37	7.2.5. pH	37
38	7.3 Evaluación de los parámetros cinéticos de las fermentaciones.	38
39	8. DISCUSIONES.	39
41	9. CONCLUSIONES.	41
42	10. REFERENCIAS	42

INDICE DE FIGURAS

Tabla 1. Composición del medio de cultivo.	6
Tabla 2. Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>P. ostreatus</i> y de producción de lacasas	6
Figura 1. Partes fundamentales de <i>Pleurotus</i> (Sanchez 1998).	10
Figura 2. Ciclo de vida del género <i>Pleurotus</i>	11
Figura 3. Crecimiento de las cepas Po 3 (□) y Po 7 (■) de <i>P. ostreatus</i> en fermentación líquida.	27
Figura 4. Concentración de proteína soluble en el ECE obtenido en fermentación líquida de las cepas Po 3 (□) y Po 7 (■) de <i>P. ostreatus</i>	28
Figura 5. Actividad volumétrica de lacasas de las cepas Po 3 (□) y Po 7 (■) de <i>P. ostreatus</i> obtenida en fermentación líquida.	29
Figura 6. Actividad específica de lacasas de las cepas Po 3 (□) y Po 7 (■) de <i>P. ostreatus</i> obtenida en fermentación líquida.	30
Figura 6. Consumo de azúcares de las cepas Po 3 (□) y Po 7 (■) de <i>P. ostreatus</i> en fermentación líquida.	31
Figura 7. Perfiles de pH de los ECE obtenidos por fermentación líquida de las cepas Po 3 (□) y Po 7 (■) de <i>P. ostreatus</i>	32
Figura 8. Crecimiento de las cepas Po 3 (◇) y Po 7 (◆) de <i>P. ostreatus</i> en fermentación líquida	33
Figura 9. Concentración de proteína soluble presente en el extracto crudo enzimático obtenido en fermentación líquida de las cepas Po 3 (◇) y Po 7 (◆) de <i>P. ostreatus</i>	34

Figura 10. Actividad de lacasas de las cepas Po 3 (◊) y Po 7 (◆) de *P. ostreatus* desarrolladas en el medio de cultivo sin Cu.....35

Figura 11. Actividad específica de las cepas Po 3 (◊) y Po 7 (◆) de *P. ostreatus* en fermentación líquida.....36

Figura 12. Consumo de azúcares de las cepas Po 3 (◊) y Po 7 (◆) de *P. ostreatus* desarrolladas en el medio de cultivo sin Cu.....37

Figura 13. Perfiles de pH de las cepas Po 3 (◊) y Po 7 (◆) de *P. ostreatus* en fermentación líquida.....38

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del medio de cultivo..... 23

Tabla 2. Parámetros cinéticos de crecimiento de *P. ostreatus* y de producción de lacasas 39

1. INTRODUCCIÓN

Se tiene información de que desde hace aproximadamente dos mil años a.c., el hombre ha utilizado a los hongos como alimento, se estima que en la naturaleza existen aproximadamente dos millones de especies de hongos.

Uno de los hongos comestibles más conocidos en México es *Pleurotus ostreatus* (*P. ostreatus*), mismo que representa una fuente de proteína de alto valor nutritivo, comparable a las carnes de res, pollo, cerdo y con la leche (Laborde 1995). A este hongo se le conoce como "seta" y también con los nombres de orejas de palo, orejas de patacán, orejas de izote y orejas de cazahuate. La denominación de "seta" deriva del nombre que se da a cualquier hongo en España (Guzmán 1993). Además de la importancia nutricional, el cultivo de hongos desempeña un papel muy importante en el campo económico y ecológico.

Desde el punto de vista ecológico, el cultivo de *P. ostreatus* es importante debido a su capacidad para degradar compuestos lignocelulósicos presentes en los residuos agrícolas, reciclandose así estos compuestos en la naturaleza (Martínez-Carrera y cols. 1993).

Las especies de *Pleurotus* pertenecen a la familia de los basidiomicetos, son de color blanco, amarillento o rosado, a veces grisáceo o color oscuro, sus esporas presentan una forma cilíndrica (raramente elipsoides). El género está distribuido en Europa, Asia, África, Australia y Latinoamérica (Guinberteau 1990). Puede ser cultivado sobre sustratos preparados con materiales celulósicos, como fragmentos de papel, aserrín de pino y encino, o con paja de gramíneas y harina de frijol, al que se le adicionan algunas sales minerales como carbonato y sulfato de calcio; también es cultivado en troncos de árboles muertos y en una variedad de desperdicios agrícolas lignocelulósicos como rastrojo de maíz o de sorgo, olotes de maíz y bagazo de caña de azúcar o de café, los cuales contienen aproximadamente 60-70% de celulosa y 15% de lignina. Debido a su capacidad de degradar celulosa, hemicelulosa y lignina es clasificado como hongo de pudrición blanca, esta degradación la lleva a cabo gracias a las

enzimas que poseen, entre ellas se encuentran las lacasas. Se ha reportado que estas enzimas **son** producidas también por insectos, plantas y bacterias (Galhau y cols. 2002).

Las enzimas lacasas catalizan la oxidación de sustratos fenólicos, así como la polimerización, depolimerización y metilación y/o dimetilación de compuestos fenólicos, reduciendo al oxígeno en agua (Edens y cols. 1999). En los hongos, estas enzimas están implicadas en la pigmentación, formación de cuerpos fructíferos, además de jugar un papel importante en la patogenicidad en plantas y degradación de lignina, aunque pocas de estas funciones han sido demostradas experimentalmente (Egger y cols. 1996). Los basidiomicetes de pudrición blanca además de lacasas presentan lignina peroxidadas y manganeso peroxidadas entre otras peroxidadas (Muñoz y cols. 1997). *Pleurotus ostreatus* produce lacasas, manganeso peroxidadas y veratril alcohol oxidasas, pero no produce lignina peroxidada (Palmieri y cols. 1997). Es el tercer hongo comestible más cultivado en el mundo, después de *Lentinula edodes* y *Agaricus bisporus* (Sanchez 2004).

Estas enzimas han sido utilizadas comercialmente en depolimerización de lignina y ligninosulfonatos, preparación de vino y estabilización de jugos de frutas. Actualmente, la importancia del estudio de las lacasas radica principalmente en las aplicaciones en procesos biotecnológicos como degradación de colorantes industriales, delignificación de pulpa de papel y aplicaciones ambientales como neutralización de contaminantes tóxicos en suelos (Meza 2007), por ello es de suma importancia encontrar organismos productores de lacasas para obtener dichas enzimas en gran cantidad y a bajo costo.

La producción de lacasas en los organismos depende de muchos factores como son pH, temperatura, medio de cultivo, tipo de fermentación, uso de inductores y mediadores (Meza 2007) así como también en nuestro laboratorio de ha encontrado que la adición de cobre al medio de cultivo favorece la producción de esta enzima en la cepa Po 83. En la búsqueda de las mejores cepas y condiciones de producción de lacasas, en este estudio se evaluaron las cepas Po 3 y Po 7 de *Pleurotus ostreatus* en condiciones de fermentación líquida caracterizando su crecimiento y actividad de lacasas.

1.1 Morfología de *Pleurotus ostreatus*.

El hongo tiene una apariencia de masa algodonosa, generalmente blanca, que técnicamente se llama micelio y la cual crece sobre el sustrato elegido para el desarrollo del hongo. La unidad microscópica fundamental de un hongo se denomina hifa, la cual es un filamento tabicado. El micelio es el que se cultiva en el laboratorio sobre medios sintéticos en cajas de Petri para obtener una cepa. Esta crece en forma radial y por ello se forman masas discoidales sobre la superficie en donde crecen (Guzmán y cols. 1993).

1.2 Ciclo de vida de *Pleurotus ostreatus*.

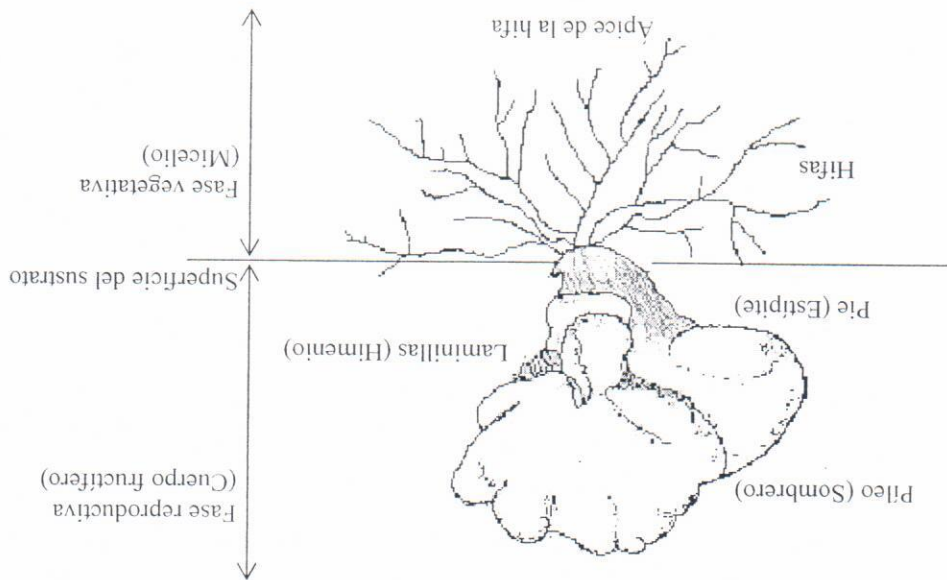
Las especies de *Pleurotus* pertenecen a la familia de los basidiomicetos y son generalmente de color blanco, amarillento o rosado a veces grisáceo o color oscuro. Su forma puede ser de embudo, pétalo de flor o de ostra. En relación con el estípite puede carecer de éste o puede ser lateral o excéntrico y puede ser corto, mediano o largo. Sus hifas presentan numerosas asas de anastomosis. Las laminitas son longitudinalmente decedentes sobre la base del estípite, con frecuencia anastomosadas transversalmente al nivel de la inserción del pie (Figura 1). Las esporas son lisas de color blanco, crema o lila pálido y presentan una forma cilíndrica (raramente elipsoides).

El crecimiento de la hifa causa que se formen sitios adicionales para la síntesis de la pared en la región sub-apical, originando ramificaciones laterales las que a su vez, sintetizan una nueva pared. La formación de las ramificaciones, requiere de la producción de un nuevo ápice de la célula madre existente (Deshpande 1992). 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 (Klein 1996).

Es un hongo saprófito, crece sobre troncos, ramas o árboles muertos y algunas veces se encuentra en la tierra sobre raíces podridas. La temperatura óptima de desarrollo de las especies de este género varía. *P. ostreatus* se desarrolla en climas templados en una temperatura de alrededor de 25° C.

La fase vegetativa está constituida por un conjunto de filamentos (hifas) denominado micelio (Herrera y Ulloa 1998). El crecimiento de éste se realiza sólo en las puntas. El micelio es un sistema de biomasa ramificada que se origina de la germinación de esporas o a partir de fragmentos de hifas.

Figura 1. Partes fundamentales de *Pleurotus* (Sanchez 1998).



En los basidiomicetes existen dos modelos sexuales: 1) el homotalismo: Los que pertenecen a este grupo son auto compatibles, es decir la unión sexual puede efectuarse entre elementos de un mismo micelio y 2) el heterotalismo: Son necesarios dos micelios para llevar a cabo la reproducción. El género *Pleurotus* está dentro de este modelo. En éste las basidiosporas con un núcleo germinan (micelio primario monocarriótico) (A) y se fusionan dos micelios primarios compatibles, en los cuales hay un intercambio nucleico recíproco (plasmogamia) (B), formando el micelio secundario dicarriótico con la presencia de fibulas (C), la fusión nuclear (cariogamia) ocurre en los basidios, que se encuentran en las laminitas del cuerpo fructífero (D), posteriormente ocurre la meiosis, dando origen a células haploides (basidiosporas) (E). En éste las basidiosporas, que son expulsadas hacia el ambiente (F) (Figura 2).

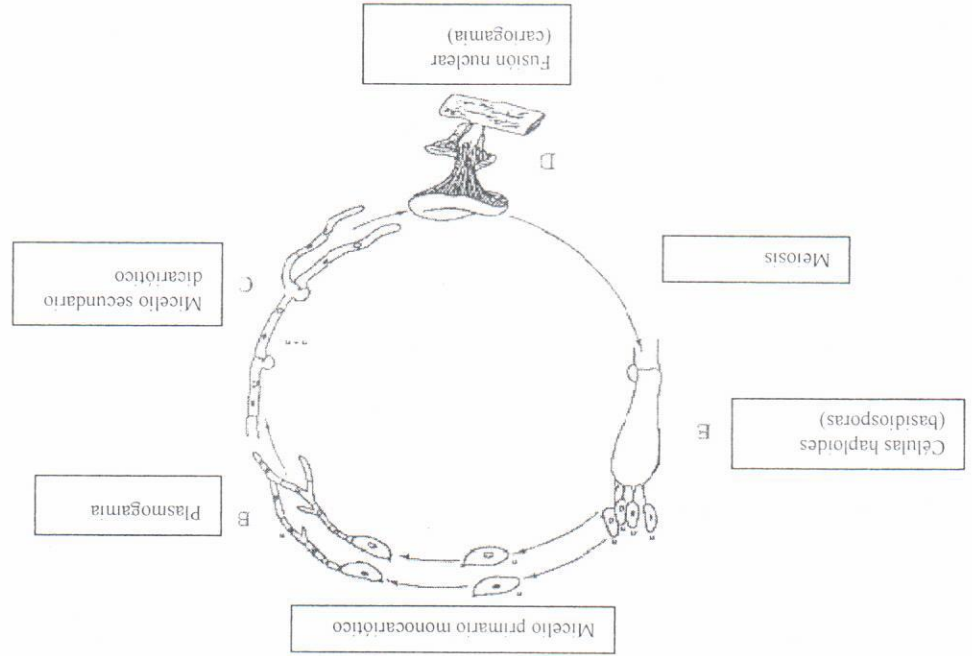


Figura 2. Ciclo de vida del género *Pleurotus*

1.3 Lignina

La lignina es un biopolímero heterogéneo componente de la pared celular de plantas consistente en unidades de fenilpropano y es la principal fuente de compuestos aromáticos encontrados en la naturaleza, es extremadamente resistente al ataque de muchos microorganismos. Los hongos degradadores de madera poseen el sistema degradativo de lignina y son frecuentemente usados en la biorremediación de compuestos aromáticos como los encontrados en efluentes industriales. (Dekker y cols. 2002). Entre los hongos capaces de degradar lignina se encuentran los basidiomicetes y ascomicetes los cuales crecen en el suelo y son colonizadores de desechos de plantas, pero ciertos actinomicetes y bacterias también pueden degradar lignina en menor grado.

La lignina es altamente resistente a la degradación química y biológica y confiere resistencia mecánica a la madera. La elevada concentración de este recalcitrante polímero se encuentra en la lamella donde actúa como un cemento entre las fibras de la madera, pero está presente en capas de la pared celular (especialmente en la pared celular secundaria) formando conjuntamente con la hemicelulosa una matriz amorfa en la cual las fibras de celulosa están embebidas y protegidas de la biodegradación (Martínez y cols. 2005).

Los hongos ligninolíticos no son capaces de utilizar lignina como la única fuente de obtención de energía y carbono, ellos dependen de polisacáridos mas digeribles en los sustratos biodegradables y la primera función de la ligninólisis es exponer estos polisacáridos por celulasas y hemicelulasas fúngicas. En muchos hongos examinados, la ligninólisis ocurre durante el metabolismo secundario, por ejemplo, bajo condiciones limitadas de nutrientes, en estas condiciones los hongos sintetizan y secretan agentes ligninolíticos que les permiten acceder a otros sustratos diferentes a la lignina. El nutriente limitante para el crecimiento fúngico en muchas maderas y suelos es probablemente el nitrógeno y muchos laboratorios estudian a los hongos ligninolíticos en medios de cultivo limitados de nitrógeno.

Las lacasas son enzimas que han sido estudiadas desde el siglo XIX. Inicialmente se obtuvieron del exudado del árbol japonés lacquer (*Rhus vernicifera*) y fueron descritas por Yoshida en 1883. Posteriormente Bertrand (1896) y Laborde (1896) demostraron por primera vez la actividad de lacasas en hongos, estas enzimas catalizan la oxidación de p-difenoles acoplada a la reducción del oxígeno en agua (Eggert y cols. 1998), aunque catalizan sobre un amplio rango de sustratos y se conocen reacciones de polimerización, depolimerización, metilación y dimetilación de compuestos fenólicos o formación de quinonas (Edens y cols. 1999; Abadulla y cols. 2000) también pueden degradar compuestos no fenólicos en la presencia de mediadores redox apropiados (Li y cols. 1999). La función fisiológica de estas enzimas no ha sido comprendida totalmente; se ha reportado que en plantas, las lacasas participan en la lignificación y en hongos en la morfogénesis (formación de esporas, de pigmentos de los cuerpos fructíferos), patogénesis, virulencia y degradación de lignina, pero también se ha reportado actividad de lacasas en algunos insectos y bacterias, en los cuales todavía no es clara su función (Galhau y cols. 2002), aunque pocas de estas funciones han sido demostradas experimentalmente (Eggert y cols. 1998).

Las enzimas lacasas forman parte del grupo de las fenoloxidasas, además pertenecen al grupo ligninolítico, son glicoproteínas, con peso molecular entre 60-80 kDa (Heinzkill y cols. 1998), son secretadas en múltiples isoformas dependiendo de la especie del hongo y de las condiciones de desarrollo (Giardina y cols. 1999) generalmente son producidas por hongos de pudrición blanca (Guillén y cols. 2000). El grupo de enzimas ligninolíticas se dividen básicamente en tres: manganeso peroxidasa (MnP), lignin peroxidasa (LiP) y lacasas (D'Souza y cols. 1999).

Las lacasas (bencenodiol, oxígeno oxido reductasas EC 1.10.3.2.) pertenecen a un grupo de enzimas que catalizan la oxidación de un gran número de compuestos fenólicos y aminas aromáticas usando oxígeno como aceptor de electrones que es reducido a agua (Muñoz-Guillén y cols. 1997), contienen comúnmente en su sitio activo cuatro átomos de cobre de tres

diferentes tipos T1, T2 y T3 (Edens y cols. 1999), uno de los cuales le otorga su característico color azul (Baldrian 2005). El centro T1 oxida al sustrato y transfiere los electrones generados a un grupo trinuclear formado por un centro T2 y dos centros T3 (Messerschmidt y Huber 1990), en éste se lleva a cabo la reducción del oxígeno molecular a agua (Xu 1997).

Las lacasas son enzimas muy importantes porque tienen un gran número de aplicaciones, por ejemplo, en biocatálisis, delignificación, biorremediación como detoxificación y tratamiento de efluentes textiles, usos en la tecnología de alimentos, para cuidado personal y aplicaciones médicas, como biosensor y en aplicaciones analíticas. Para entender mejor estas aplicaciones biotecnológicas y ambientales es importante conocer sus propiedades, a nivel cinético y molecular, para lo cual se requieren grandes cantidades de enzima cruda o purificada.

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

Las lignin peroxidadas (LiP; EC 1.11.1.14) son glicoproteínas que contiene un grupo hemo en hongos de pudrición blanca (Guillén y cols. 2000). La habilidad de la LiP en la degradación de la lignina es atribuida, en parte, a su potencial redox, que se reporta como alto comparado con otras peroxidadas. Esta habilidad de LiP para catalizar las reacciones normalmente no está asociada con otras peroxidadas, en particular la oxidación de sustancias no fenólicas. Se ha reportado que LiP puede oxidar compuestos aromáticos con un potencial de ionización calculado en valores cercanos a 9.0 electrón Volts (Ward y cols. 2002).

Según el organismo y sus condiciones de crecimiento, la vía de la glucólisis puede cumplir distintas funciones. En muchos microorganismos que viven en condiciones anaeróbicas, sirve como la principal vía productora de energía por catabolismo de los carbohidratos, lo que da por resultado la formación de productos metabólicos finales específicos, como etanol, ácido láctico y glicerol. Este tipo de proceso suele llamarse fermentación (Bohinski 1991). El término fermentación deriva del verbo Latin *fervere*, de ebullición, describiendo así la apariencia que tiene la acción de las levaduras en los extractos de las frutas o en los granos de la malta. 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. Sin embargo, el término fermentación tiene diferentes significados para los bioquímicos y para los microbiólogos industriales. El significado bioquímico está relacionado con la generación de energía por el catabolismo de compuestos orgánicos, mientras que su significado en microbiología industrial se refiere a los procesos microbiológicos donde se producen compuestos de utilidad práctica para el hombre (Díaz-Godínez 2001).

El proceso de fermentación puede ser clasificado por el mecanismo de reacción involucrado en convertir los materiales crudos en productos, estos incluyen reducciones, oxidaciones simples y complejas, conversión de sustratos, transformaciones, hidrólisis, polimerizaciones, biosíntesis de complejos y formación de células.

Una fermentación puede ser vista como una reacción química catalizada en la cual las enzimas son los catalizadores y los materiales celulares el soporte catalizado (Alba 1973).

La mayoría de las fermentaciones industriales en la sociedad occidental han utilizado y desarrollado la denominada "fermentación en medio líquido" o "sumergida" (FML) (Hesseltine 1972, Harvey y McNeil 1993) en la cual los microorganismos son inoculados en una suspensión acuosa de nutrientes que se agita a fin de obtener un adecuado contacto entre estos y la fase abiótica (Scriban 1985). Independientemente del tipo de fermentación (con

excepción de algunos procesos de transformación) el proceso puede ser dividido en seis partes

componentes:

- a) Formulación del medio que se usará en el cultivo del microorganismo 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.

Existe también la fermentación en medio sólido (FMS), la cual es una técnica de cultivo de microorganismos sobre la superficie de partículas sólidas humedecidas a un grado tal que permite el crecimiento de dichos microorganismos en contacto con una fase aérea porque el nivel de humedad no excede el nivel de retención máxima de agua de la matriz sólida (Viniestra-González y cols. 2003).

Los productos de la fermentación se relacionan directamente con las áreas siguientes:

- a) Industria alimentaria (producción de proteína, saborizantes, aminoácidos, etc.)
- b) Industria farmacéutica (antibióticos, vitaminas, esteroides, etc.)
- c) Industria química (solventes, ácidos orgánicos, enzimas, etc.)
- d) Contaminación ambiental (tratamiento de aguas y de residuos sólidos, recuperación de minerales, etc.)
- e) Otras en que interaccionan indirectamente: agricultura y ganadería, promotores del crecimiento e insecticidas biológicos; energía, producción de metano; medicina, uso de enzimas inmovilizadas para diagnóstico médico, etc.

Ciertos avances recientes de la tecnología de la fermentación industrial han hecho posible la preparación de soluciones enzimáticas libres de células, y en las técnicas de separación bioquímica se han logrado, mediante avances similares, varios grados de pureza, lo que ha permitido que se extienda el empleo de las soluciones enzimáticas (Quintero 1987).

2. ANTECEDENTES

El estudio de las lacasas se ha realizado para conocer a los organismos productores, el número de isoformas intra y extracelulares, sus propiedades fisicoquímicas, con fines de caracterización, para utilizarlas en diferentes procesos, incluyendo a los de biorremediación Edens y cols. (1999) evaluaron la catalisis sobre varios sustratos de las lacasas puras de un ascomicete patógeno denominado *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* que causa varias infecciones en la raíz del trigo y la cebada. Las lacasas de basidiomicetes han sido muy estudiadas, como es el caso de *Ceriporiopsis subvermispora* (hongos de pudrición blanca) que presentó dos isoenzimas, L1 y L2 con una masa molecular de 71 y 68 kDa respectivamente. *Trametes pubescens* secreta varias isoformas de lacasas.

Es difícil definir a las lacasas por el sustrato que reducen, debido a que existe un gran rango de sustratos, el cual varía de una lacasa a otra, y se sobrepone con el rango de oxidación de otras enzimas como las monofenol oxidasas y tirosinasas (Baldrian 2005), sin embargo su incapacidad de oxidar tirosina puede ser tomada como un indicador de la actividad de lacasa (Thurston 1994). Las lacasas son frecuentemente llamadas difenoloxidasas, monofenoles como el 2,6-dimetoxifenol o guayacol son frecuentemente mejores sustratos que los difenoles catecol o hidroquinona. La siringaldazina [N,N'-bis(3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzilidina)hidracina], es frecuentemente considerada el único sustrato para la lacasa, sin embargo este compuesto también es oxidado por las peroxidasas (Thurston 1994). Muchas lacasas son enzimas extracelulares y presentan un considerable nivel de estabilidad en el ambiente extracelular. En los hongos de pudrición blanca se han encontrado lacasas intracelulares y extracelulares. Es posible que las lacasas intracelulares de hongos participen en la transformación de fenoles de bajo peso molecular presentes en la célula. La pared celular y las

La adición de cobre lleva a un incremento en la actividad de lacasa independientemente del tiempo de adición. Cuando el cobre es agregado durante los primeros días el incremento en la actividad no es inmediato, si el cobre se adiciona después del tercer día de crecimiento, la actividad empieza a incrementarse alrededor del día nueve, cuando el crecimiento del cultivo empieza a desacelerarse, a diferencia del cadmio, después de la adición de cobre se eleva la

dos isoenzimas de *P. ostreatus*, con masas moleculares de 61 y 67 kDa. *Lentinus edodes* con una masa molecular de 72.2 kDa. Palmieri y cols. (1997) caracterizaron elemento (Palmieri y cols. 2000, 2003). Nagai y cols. (2002) aislaron una enzima lacasa de por la presencia de cobre y se han obtenido dos isoenzimas dimericas en presencia de este 2003; Giardina y cols. 1999). La producción de isoenzimas lacasas en *P. ostreatus* es regulada cuales han sido aisladas y caracterizadas (Sannia y cols. 1986; Palmieri y cols. 1993, 1997, en especies fungicas, *P. ostreatus* produce al menos ocho diferentes isoenzimas, seis de las kDa con un pl ácido cercano a un pH de 4.0. Varias isoenzimas de lacasas han sido detectadas (Galhau y cols. 2002). La lacasa fungica típica es una proteina de aproximadamente 60-70 alimentos, biosensores, detoxificación de desechos, transformación de colorantes y biocatalisis una enzima de interés industrial, dado que tiene diversas aplicaciones: en la tecnología de lacasas proporcionan ventajas de gran interés para aplicaciones biotecnológicas. Es directamente del metabolismo fungico y actuar como mediadores (Egger y cols. 1996). Las hongos de pudrición blanca pueden ser derivados de unidades de lignina oxidadas o enzima. Muchos compuestos involucrados en la degradación natural de la lignina por los los mediadores pueden difundir fuera del micelio a los sitios que son inaccesibles para la así mismo, para oxidar otros compuestos que normalmente no son sustratos para las lacasas, compuestos que en principio no son sustratos para las lacasas debido a su bajo potencial redox, ser oxidados hasta radicales estables y pueden actuar como mediadores redox oxidando otros molecular típico de lacasas monoméricas. Algunos compuestos de bajo peso molecular pueden homodimérica, esta enzima está compuesta de dos subunidades idénticas con un peso Muchas lacasas fungicas son proteínas monoméricas, varias lacasas exhiben una estructura compuestos protectores de la pared celular (Egger y cols. 1995; Galhau y cols. 2001). esporas asociadas a lacasas fueron relacionadas con la posible formación de melanina y otros

actividad de lacasa durante la duración del cultivo (Baldrian 2002). La adición de sulfato de cobre tiene como resultado un incremento sustancial en la actividad total de lacasa y en la producción de la isoenzima POXA1b, mientras que POXA1w no se afecta cuando se agrega cobre (Palmieri y cols. 2000). En los estudios realizados por Collins y Dobson (1977) se mostró que la adición de cobre al medio de crecimiento incrementa significativamente la formación de lacasa.

Galhau y Haltrich (2001) mencionaron que la formación de lacasa extracelular en *Trametes pubescens* puede ser estimulada por la adición de cobre en un rango milimolar el cual al ser adicionado a un medio simple basado en glucosa durante la fase de crecimiento del organismo ejerce su máximo efecto. Giardina y cols. (1999) indujeron otra isoforma de lacasas al adicionar cobre al medio. Palmieri y cols. (2003) purificaron y caracterizaron otras dos isoenzimas de *F. ostreatus*, las cuales presentaron la misma característica que las anteriores: no detectaron actividad al utilizar guayacol como sustrato. Das y cols. (1997) en *F. ostreatus* (cepa *florida*) hallaron dos lacasas L₁ y L₂. De Souza y cols. (2002) trabajaron con *F. pulmonarius* crecido sobre paja de trigo, donde la máxima producción de lacasas del extracto crudo enzimático fue de 8600 U/g de sustrato a los cinco días de crecimiento.

Tlecuitl y cols. (2008) trabajaron con la cepa ATCC 32783 en fermentación líquida con un medio mineral, encontraron por zimografía cuatro isoformas de lacasa durante la fase estacionaria de desarrollo y una máxima actividad de 12 196 U/L; por otro lado Juárez (2006) utilizó un medio mineral adicionado con sulfato de cobre y después de una optimización del medio de cultivo involucrando el tamaño de inculo, la cantidad de fuente de carbono y de sulfato de cobre, observó tres isoformas de lacasas y en un medio sin adición de cobre se presentaron cuatro isoformas. Los mejores resultados de actividad de lacasas en estas condiciones fueron los obtenidos en el medio de cultivo adicionado con 0.25 g/L de sulfato de cobre, donde se obtuvo una actividad máxima de 37 500 U/L, lo cual sugiere un incremento de 3 veces con respecto a lo obtenido por Tlecuitl y cols. (2008).

Los hongos de pudrición blanca son eficientes productores de enzimas lacasas, sin embargo se ha observado que la actividad y número de isoformas de lacasas varía dependiendo de la especie de hongo, así como de las características del medio ambiente donde se desarrolla. Por otro lado, estas enzimas tienen usos importantes, han sido utilizadas en la industria de fabricación del papel para delignificación y blanqueamiento de la pulpa, se ha propuesto utilizarlas en la industria del tejido de telas para decolorar efluentes donde dichas industrias vierten sus desechos así como para la remoción de diversos compuestos fenólicos en descargas de aguas de diversas industrias, por lo que estas enzimas tienen un potencial uso en procesos de biorremediación. Dado lo anterior y debido a que en nuestro laboratorio se cuenta con un banco de cepas cuya caracterización en la fermentación líquida aún no está completamente definida, se pretende participar en la búsqueda de la mejor cepa y a las mejores condiciones de producción de lacasas con la finalidad de utilizarlas en posteriores investigaciones.

3. JUSTIFICACION.

En esta investigación llevada a cabo en nuestro laboratorio con la finalidad de evaluar la actividad de lacasas sobre cinco diferentes sustratos de 10 cepas del género *Pleurotus* desarrolladas sobre agar en un medio sin adición de sulfato de cobre, se encontró que las cepas de *P. cornucopiae* y *P. ostreatus* fueron las cepas que presentaron mayor actividad extracelular entre las evaluadas, sin embargo las actividades obtenidas en *P. ostreatus* son menores a las obtenidas en fermentación líquida en medio adicionado con cobre, en cuanto a los patrones zimográficos para *P. ostreatus* se muestran tres isoformas utilizando DMP como sustrato (Téllez-Téllez y cols. 2005).

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Las cepas Po 3 y Po 7 de *Pleurotus ostreatus* presentarían diferente actividad de lacasas extracelulares obtenidas por fermentación sumergida?

¿La eliminación del cobre del medio de cultivo tiene algún efecto sobre la actividad de lacasas y sobre el crecimiento de las cepas de *P. ostreatus*?

5. OBJETIVOS.

5.1. General

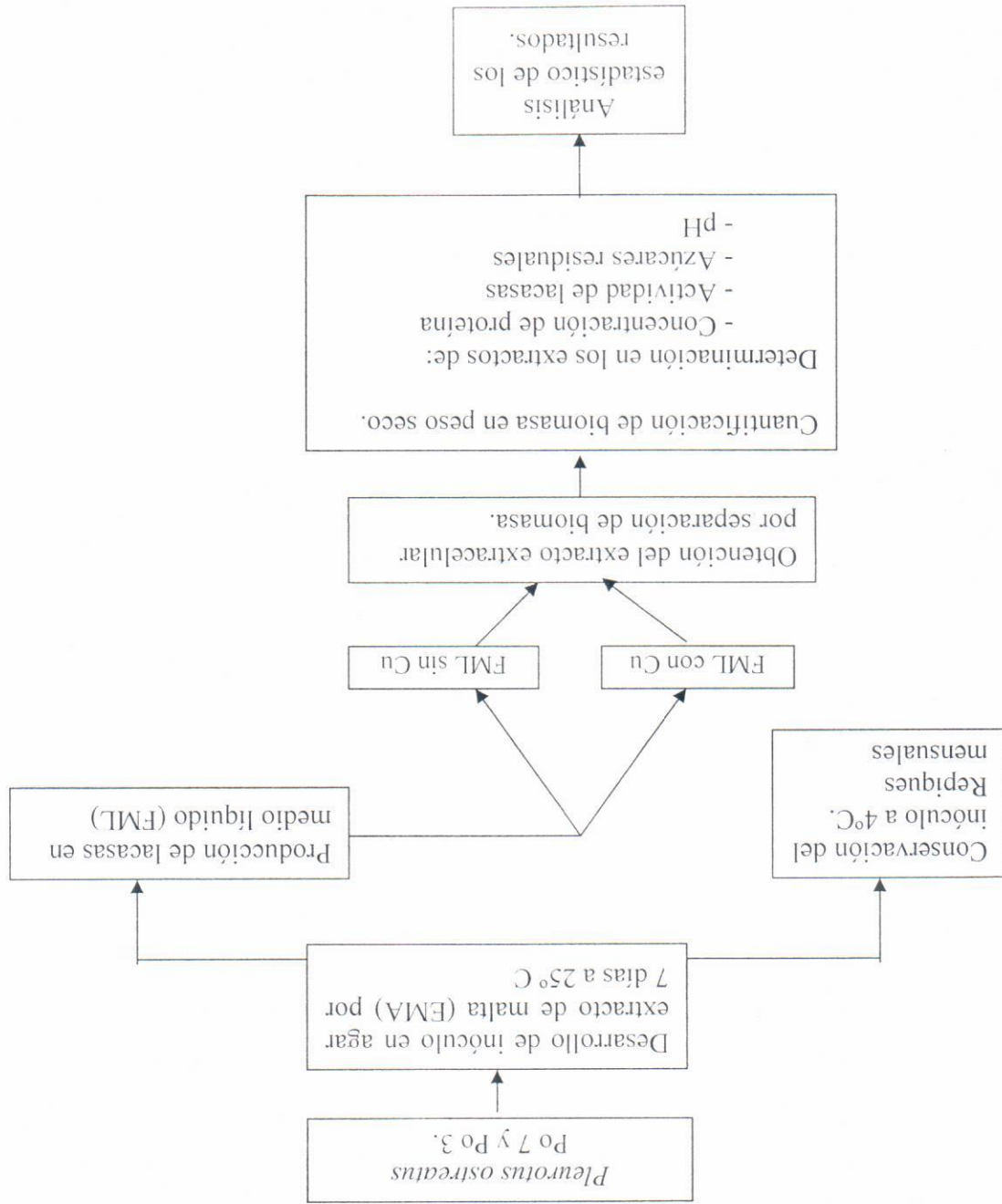
Evaluar la actividad de lacasas extracelulares de dos cepas de *Pleurotus ostreatus* obtenidas por fermentación sumergida.

5.2. Particulares

1. Evaluar la actividad de lacasas y el crecimiento de las cepas Po 3 y Po 7 de *Pleurotus ostreatus* obtenidos por fermentación sumergida utilizando un medio de cultivo previamente optimizado para la producción de lacasas por otra cepa de *P. ostreatus*.
2. Evaluar el efecto de la eliminación del cobre del medio de cultivo sobre la actividad de lacasas y crecimiento de las cepas Po 3 y Po 7 de *Pleurotus ostreatus* obtenidos por fermentación sumergida.

6. METODOLOGIA.

En el siguiente diagrama de bloques se muestran las actividades desarrolladas en esta investigación.



6.1. Microorganismo empleado en este estudio

Las cepas utilizadas para llevar a cabo este proyecto fueron las cepas de *P. ostriatus*, Po 3 y Po 7 (201216 y 201218 respectivamente, registradas en American Type Culture Collection, ATCC Maryland, U.S.A). Ambas cepas se desarrollaron sobre agar extracto de malta (EMA, Bioxon) preparado con extracto de paja, se incubaron durante siete días a una temperatura de 25 °C. Se almacenaron a 4°C. La infusión del extracto de paja se preparó con 100 g de paja de trigo por litro de agua a 80°C por una hora. La infusión obtenida se filtró utilizando papel filtro Whatman número 1 y se utilizó como solvente para la preparación del medio EMA.

6.2. Condiciones de cultivo.

La composición del medio de cultivo para las fermentaciones se muestra en la Tabla 1, El pH inicial de la fermentación se ajustó a 6.0 con NaOH 0.1 M. El inóculo se tomó con un horador de 4 mm de diámetro de la periferia de la colonia de *P. ostriatus*. Se colocaron tres fragmentos de micelio para cada matraz de la fermentación.

Tabla 1. Composición del medio de cultivo.

Componente	Concentración en g/L
Extracto de levadura	5
Glucosa	10
K ₂ HPO ₄	0.4
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.001
KH ₂ PO ₄	0.6
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.05
MnSO ₄ H ₂ O	0.05
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.25

(Juárez, 2006)

La solución de la ecuación logística se muestra a continuación (2):

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

El desarrollo de biomasa en función del tiempo $X = f(t)$ se ajustó con la ecuación logística (1) por la minimización del error cuadrático, utilizando la herramienta Solver de la hoja electrónica de Excel (Microsoft) (Díaz-Godínez y cols. 2001).

producción de lacasa

6.3.2. Determinación de los parámetros cinéticos de crecimiento de *P. ostreatus* y de

El caldo de fermentación se obtuvo por filtrado y retención de la biomasa a través de papel filtro Whatman No 1 a peso constante y fue considerado como extracto crudo enzimático (ECE). La biomasa retenida sobre el papel Whatman se secó a peso constante para su cuantificación y se reportó en g de biomasa seca (X) por litro de medio de cultivo (g/L). Para realizar el secado se utilizó un horno (AOAC 1990).

6.3.1. Obtención de los extractos crudos enzimáticos y de la biomasa.

6.3. Caracterización de la fermentación sumergida y de la producción de lacasas

Todas las fermentaciones y los análisis se realizaron por triplicado, reportando la media y desviación estándar.

Las fermentaciones se realizaron en matraces Erlenmeyer de 125 mL. Se colocaron 50 mL de medio y se inocularon bajo condiciones asepticas con tres fragmentos de micelio. Todos los cultivos se incubaron a 25°C con agitación orbital de 120 rpm, durante 21 días y se tomaron muestras cada 24 horas a partir del tercer día para realizar los análisis. Se realizaron fermentaciones bajo las mismas condiciones excepto la adición de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

q_s = Tasa específica de consumo de sustrato, $q_s = \mu/Y_{X/S}$

q_p = Tasa específica de la formación de la enzima, $q_p = \mu * Y_{E/X}$

$$P = \mu * X_{max} * Y_{E/X}$$

P = Productividad en el pico máximo de actividad, dada por la siguiente expresión:

estimada como la relación de la E_{max} (U/L) y azúcar residual (g/L).

$Y_{E/S}$ = rendimiento teórico de la actividad de lacasa con respecto al consumo de sustrato,

estimada como la relación de la máxima actividad (E_{max}) (U/L) y X_{max} (g/L).

$Y_{E/X}$ = rendimiento teórico de la actividad de lacasa con respecto a la biomasa producida,

$Y_{X/S}$ = rendimiento teórico de la biomasa producida con respecto al consumo de sustrato.

Se calcularon además los siguientes parámetros:

$$C = (X_{max} - X_0) / X_0$$

C = valor que presenta la relación entre la diferencia de X_{max} y X_0 :

X_0 = Valor de biomasa inicial (g/L).

X_{max} = Valor de biomasa máxima o de equilibrio (g/L).

μ = Velocidad específica de crecimiento (h^{-1}).

Donde

$$X = X_{max} / (1 + C e^{-\mu t}) \quad (2)$$

6.3.3. Cuantificación de la proteína soluble en el ECE.

La proteína total en los extractos extracelulares se midió por el método de Bradford (Bradford, 1976). A 50 µl de ECE se le adicionaron 200 µl del reactivo de Bradford (Sigma), el volumen se ajustó a 1 mL con agua destilada, y se leyó la absorbancia a 595 nm. Se usó albúmina sérica bovina como proteína estándar (Díaz Godínez y cols. 2001).

6.3.4. Cuantificación de la actividad de lasasas extracelulares.

La actividad de lasasas extracelulares se determinó en el ECE utilizando como sustrato 2,6 dimetoxifenol (DMP). La mezcla de reacción contenía 950 µl DMP 2 mM en buffer de fosfatos 0.1 M y pH de 6.5, se leyó la absorbancia 468 nm. Se siguió una cinética de reacción durante un minuto a temperatura ambiente en un espectrofotómetro Jenway. Una unidad de actividad de lacasa (U) se consideró como la cantidad de enzima que provoca un incremento de una unidad de absorbancia por minuto.

La actividad específica se calculó como el cociente de la actividad volumétrica dividida entre la concentración de proteína en cada tiempo de muestreo de la fermentación.

6.3.5. Cuantificación de azúcares residuales.

El consumo de azúcares se evaluó midiendo los azúcares residuales de acuerdo a la técnica de cuantificación de azúcares reductores por el método del ácido 3,5- dinitrosalicílico (Miller 1959). Se preparó una curva de calibración con glucosa.

6.3.6. Determinación del pH

Todas las determinaciones del pH se realizaron utilizando un potenciómetro marca Conductronic Pc 45

7. RESULTADOS

7.1 Fermentación adicionada con cobre

7.1.1 Determinación de biomasa

En la figura 3 se muestra crecimiento de los hongos. La cepa Po 3 mostró un retardo en su crecimiento, no se puede observar una clara definición de sus fases de crecimiento, lo cual no había sido reportado por otras cepas de *P. ostreatus* desarrollados bajo las mismas condiciones en nuestro laboratorio, este fenómeno es atribuido principalmente al alto contenido de Cu en el medio de cultivo y a la elevada sensibilidad a este compuesto por parte del hongo. Se logró determinar la velocidad específica de crecimiento (μ) con valor de 0.0074 h^{-1} y una biomasa máxima (X_{max}) de 2.27 g/L a las 456 h . Por otro lado, la cepa Po 7 mostró una fase de adaptación de aproximadamente 72 h de fermentación, después de ese tiempo se observó el crecimiento del hongo con una μ de 0.02 h^{-1} , obteniendo 7.24 g/L de X_{max} a las 312 h .

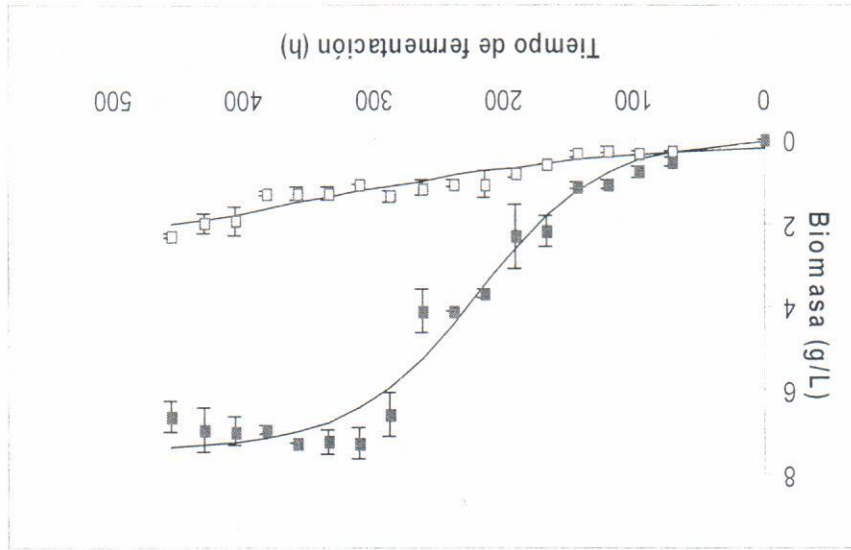
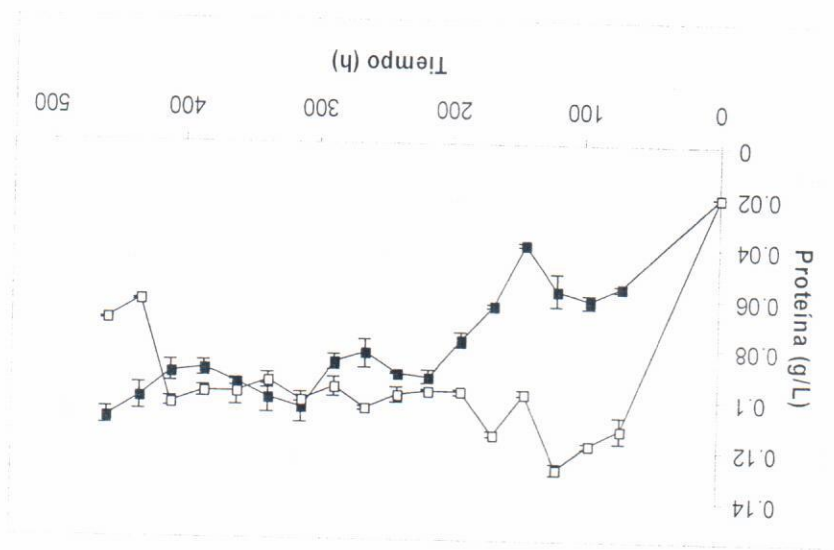


Figura 3. Crecimiento de las cepas Po 3 (□) y Po 7 (■) de *P. ostreatus* en fermentación líquida.

Los perfiles de actividad de lacasas se muestran en la figura 5. La cepa Po 3 mostró niveles muy bajos de actividad de lacasas durante toda la fermentación (aprox. 2 000 U/L), debido seguramente al poco crecimiento del hongo causado por el efecto tóxico del Cu, aunado a la baja producción de esta cepa. La cepa Po 3 mostró dos periodos de actividad a lo largo de la fermentación, el primero observado en los tiempos de crecimiento exponencial obteniendo aproximadamente 15 000 U/L y el segundo periodo se observó durante la fase estacionaria de crecimiento del hongo alcanzando aproximadamente 26 000 U/L a las 456 h.

7.1.3 Actividad volumétrica de lacasas

Figura 4. Concentración de proteína soluble en el ECE obtenido en fermentación líquida de las cepas Po 3 (□) y Po 7 (■) de *P. ostreatus*.



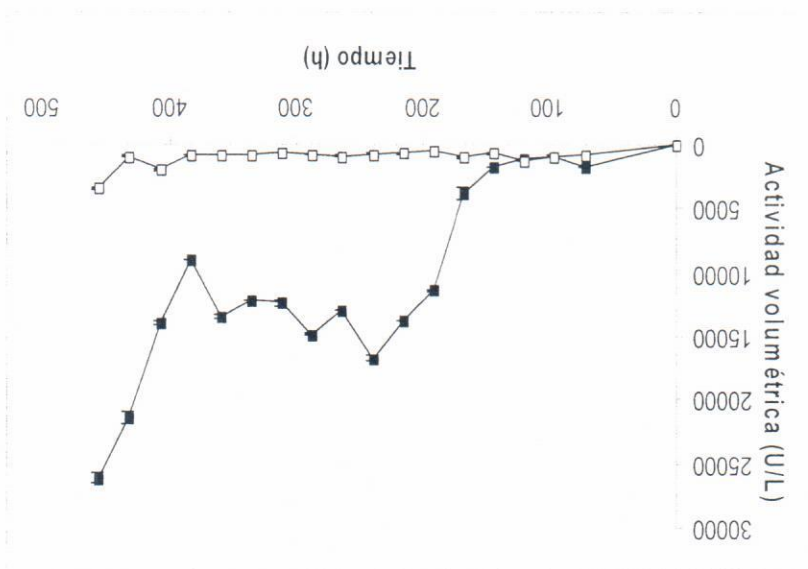
Los perfiles de concentración de proteína soluble en el ECE de las cepas Po 3 y Po 7 se puede observar en la figura 4. En la FML con la cepa Po 3 se observaron niveles de proteína entre valores de 0.11 y 0.07 g/L en promedio a lo largo de la fermentación, mientras que en el ECE de la cepa Po 7 se incrementó de 0.056 g/L hasta 0.11 g/L a las 456 h.

7.1.2. Concentración de proteína soluble en el ECE

La actividad específica se muestra en la figura 6, observándose el mismo comportamiento de la actividad volumétrica, obteniéndose un valor máximo a las 456 h para ambas cepas (48.91 U/mg proteína para la cepa Po3 y 242.35 U/mg proteína para la cepa Po7).

7.1.4. Actividad específica

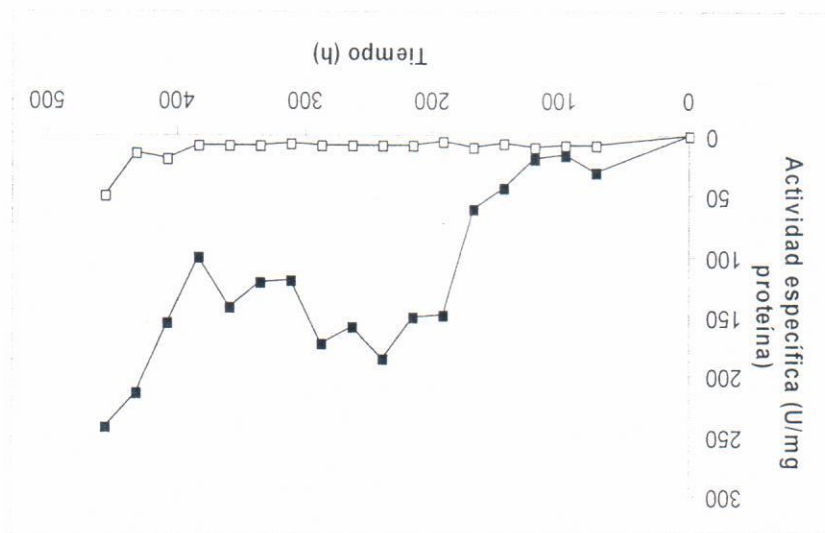
Figura 5. Actividad volumétrica de las cepas Po 3 (□) y Po 7 (■) de *P. ostreatus* obtenida en fermentación líquida.



La concentración de azúcar durante el transcurso de la fermentación se mantiene constante para la cepa Po 3, lo cual concuerda con el crecimiento observado por esta cepa, indicando que el problema por el cual no existió crecimiento es seguramente el nivel de Cu que resultó tóxico para esta cepa en específico. La cepa Po7 consumió rápidamente los azúcares durante la fase exponencial, agotándolos a las 288 h, tiempo en el cual se detuvo el crecimiento.

7.1.5 Cuantificación de azúcares residuales

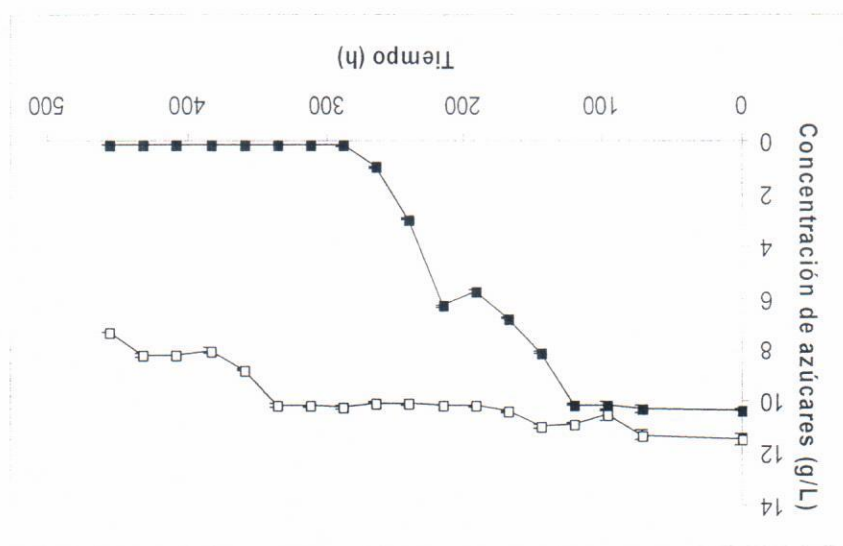
Figura 6. Actividad específica de las cepas Po 3 (□) y Po7 (■) de *P. ostreatus* obtenida en fermentación líquida.



Los valores de pH se mantuvieron sin cambios drásticos, siendo los valores alrededor de 6 – 7 para ambas cepas, encontrándose los valores más altos en la fase estacionaria de crecimiento. El incremento en una unidad de pH puede atribuirse a algún compuesto de carácter básico generado durante el desarrollo del organismo.

7.1.6. pH

Figura 6. Consumo de azúcares de las cepas Po 3 (□) y Po 7 (■) de *P. ostreatus* en fermentación líquida.

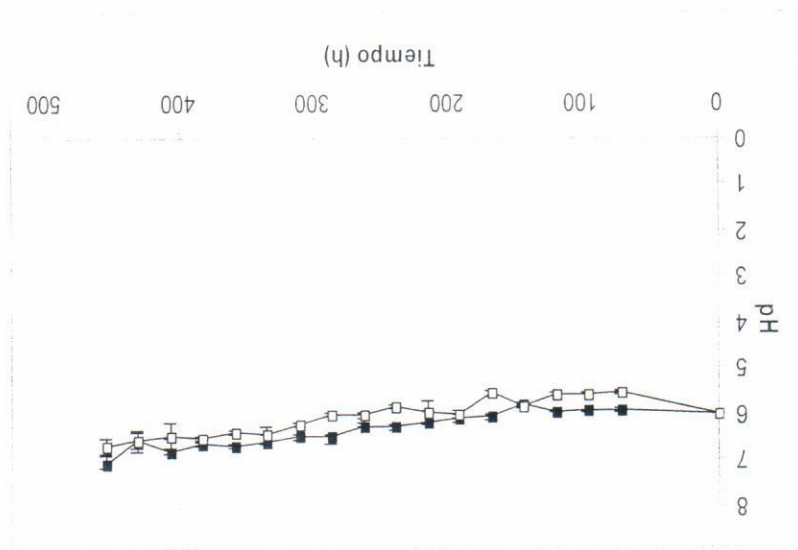


El crecimiento de las cepas en el medio de cultivo sin cobre se muestra en la figura 8. Estos resultados sugieren que el Cu presentó un efecto tóxico que inhibió el crecimiento de la cepa Po 3, ya que sin cobre, el hongo mostró una μ de 0.012 h^{-1} y una X_{max} de aprox. 5.5 g/L de X_{max} . La cepa Po7 mostró una μ de 0.019 h^{-1} con una X_{max} de aprox. 8.0 g/L .

7.2.1 Determinación de biomasa

7.2. Fermentación sin adición de cobre

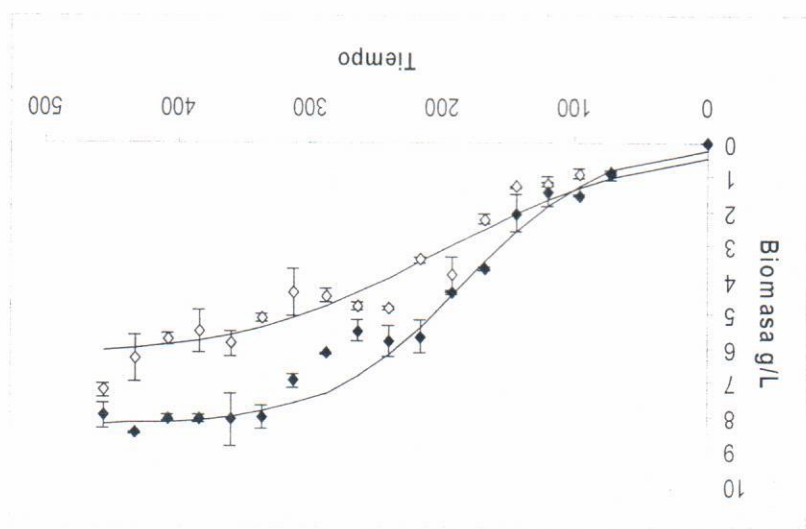
Figura 7. Perfiles de pH de los ECE obtenidos por fermentación líquida de las cepas Po 3 (□) y Po 7 (■) de *P. ostreatus*.



Los perfiles de concentración de proteína soluble en el ECE de las cepas Po 3 y Po 7 desarrolladas en el medio de cultivo sin Cu se puede observar en la figura 9. La cepa Po 3 mostró valores desde aprox. 0.171 g/L a las 72 horas de fermentación, hasta alcanzar valores de 0.240 g/L a lo largo de la fermentación. La cepa Po 7 mostró valores ligeramente superiores a los de la otra cepa, alrededor de 0.3 g/L durante toda la fermentación.

7.2.1. Concentración de proteína soluble en el ECE

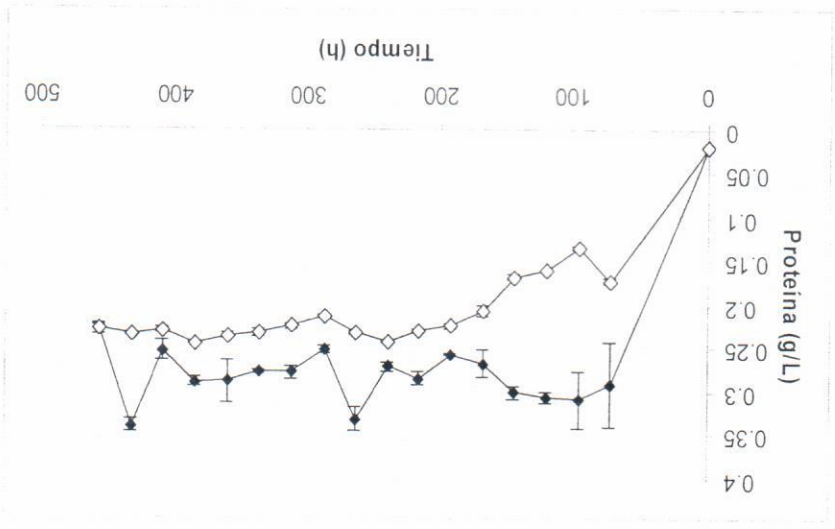
Figura 8. Crecimiento de las cepas Po 3 (◇) y Po 7 (◆) de *P. ostreatus* en fermentación líquida



En la figura 10 se muestran los valores de actividad de las casas de las cepas Po 3 y Po 7 desarrolladas en el medio de cultivo sin Cu. La cepa Po 3 mostró valores mínimos de actividad durante toda la fermentación, siendo el valor más alto a las 336 h con aprox. 1 000 U/L, mientras que la cepa Po 7 mostró un pico de actividad de aprox. 20 000 U/L en los tiempos del inicio de la fase estacionaria, ya que antes de ese tiempo se presentaron valores menores.

7.2.2. Actividad volumétrica de las casas

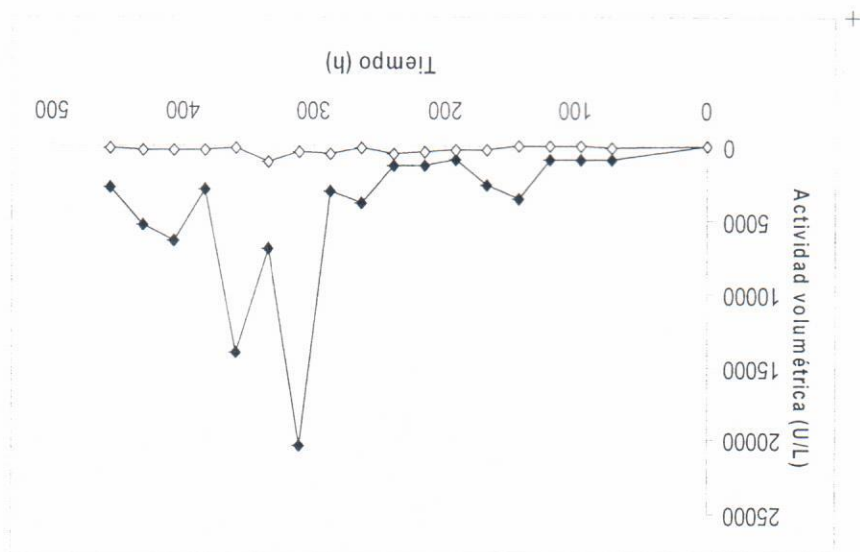
Figura 9. Concentración de proteína soluble presente en el extracto crudo enzimático obtenido en fermentación líquida de las cepas Po 3 (◇) y Po 7 (◆) de *P. ostreatus*



7.2.3. Actividad específica

El perfil de la actividad específica es en general igual al de la actividad volumétrica (figura 11), pero con valores muy bajos. La cepa Po 3 mostró su máximo valor alrededor de 5 U/mg proteína a las 336 h, mientras que la cepa Po 7 observó un punto máximo de actividad en la fase estacionaria donde se alcanzaron aprox. 70 U/mg proteína a las 312 h.

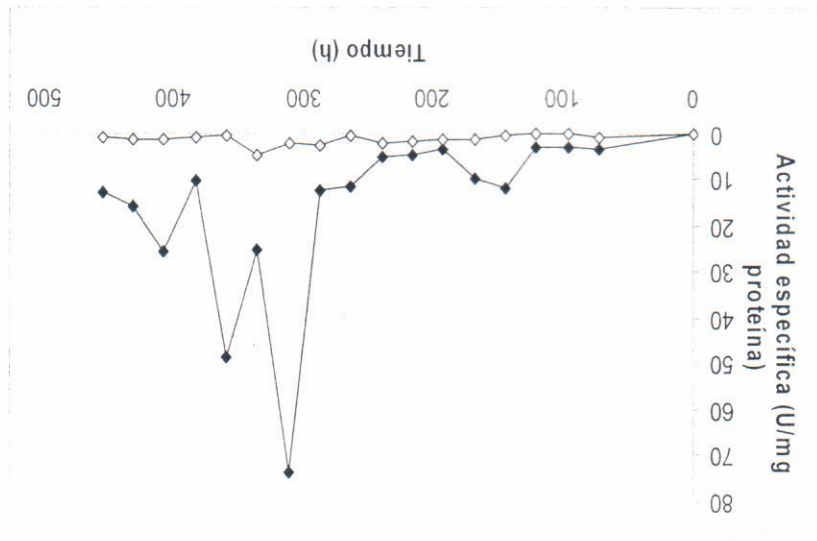
Figura 10. Actividad de lacasas de las cepas Po 3 (◇) y Po 7 (◆) de *P. ostreatus* desarrolladas en el medio de cultivo sin Cu.



El consumo de azúcares de las cepas Po 3 y Po 7 desarrolladas en el medio de cultivo sin Cu se muestra en la figura 12. Existió un consumo más rápido por la cepa Po7, sin embargo en los dos casos existió agotamiento de los azúcares.

7.2.4. Cuantificación de azúcares residuales

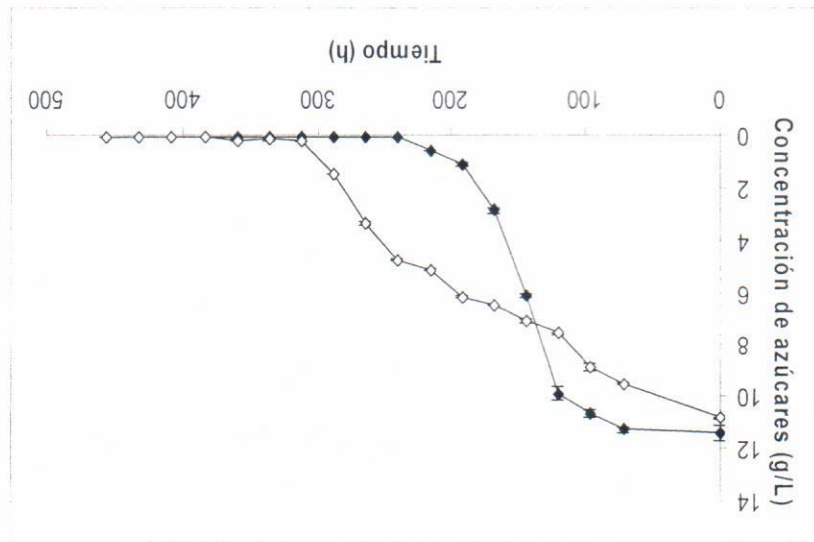
Figura 11. Actividad específica de las cepas Po 3 (◇) y Po7 (◆) de *P. ostreatus* en fermentación líquida.



Los valores de pH observados durante el transcurso de la fermentación son similares para ambas cepas, es decir, muestran una variación que se establece en 6.0 ± 1.0 unidades de pH.

7.2.5. pH

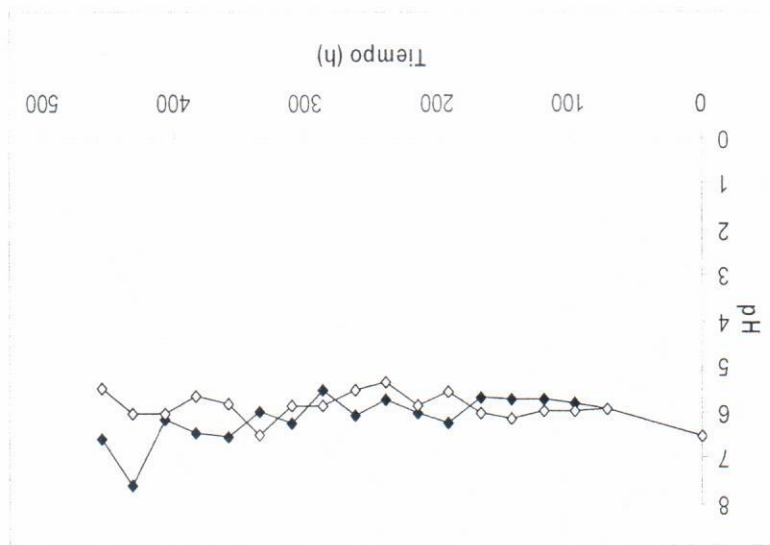
Figura 12. Consumo de azúcares de las cepas Po 3 (◇) y Po 7 (◆) de *P. ostreatus* desarrolladas en el medio de cultivo sin Cu.



En la Tabla 2 se muestran los parámetros cinéticos de crecimiento y de producción de lacasas de ambas cepas. Estos resultados sugieren que la cepa Po 3 no es buena productora de lacasas en fermentación sumergida y que además el Cu le es tóxico, ya que inhibió su crecimiento (μ de 0.007 h^{-1} para el medio con Cu y de 0.012 h^{-1} para el medio sin Cu). La cepa Po 7 mostró los valores mayores en cuanto a producción de lacasas como de crecimiento, donde su μ no fue afectada por el Cu. En ambos casos se observó que el Cu favorece la actividad de lacasas, siendo mayor el efecto en la cepa Po 3, pues aunque el crecimiento de la cepa Po 3 en presencia de Cu fue mínimo, mostró aproximadamente el doble de actividad que sin Cu, siendo casi 5 veces mayor el Y_{EX} con cobre comparado con el obtenido sin Cu; mientras que el Y_{EX} de la cepa Po 7 fue solo 1.5 veces mayor con Cu que sin Cu. La productividad observada en la cepa Po 3 fue muy baja en ambos medios de cultivo y con valores muy cercanos entre sí (15 y 12 U/L h para el medio con Cu y sin Cu respectivamente), por otro lado, la cepa Po 7 mostró valores mucho mayores, siendo aproximadamente un 40% mayor en el medio con Cu comparado con el medio sin Cu.

7.3 Evaluación de los parámetros cinéticos de las fermentaciones.

Figura 13. Perfiles de pH de las cepas Po 3 (◇) y Po 7 (◆) de *P. ostreatus* en fermentación líquida



La fermentación líquida es el sistema de producción de metabolitos más estudiada y controlada, y también lo es en el caso de las lacasas (Palmieri y cols. 1997), sin embargo existen pocos estudios que describan la fermentación utilizando *P. ostreatus* y que se reporten los parámetros cinéticos, tanto del crecimiento del hongo como de su producción de lacasas. En este trabajo, el crecimiento de ambas cepas *P. ostreatus* fue descrito por el modelo matemático de la ecuación logística encontrando una $R^2 > 98\%$, lo cual indica que es un buen modelo para describir el comportamiento de este hongo en fermentación sumergida. Palmieri (1999) utilizó un medio de cultivo similar al utilizado en este estudio en cuanto a la cantidad adicionada de cobre y encontró que la cantidad de biomasa formada es independiente de la adición de cobre, sin embargo menciona que la actividad de lacasa se ve incrementada al adicionar este elemento. Songulashvili (2006) trabajando con *Phellinus robustus* variando la fuente de nitrógeno, encontró que la biomasa y la actividad de lacasa se incrementan proporcionalmente y este incremento en actividad lo atribuye específicamente a la mayor producción de biomasa. Tlecutil y cols. (2008) observaron que la cepa ATCC 32783 de *P. ostreatus* produjo biomasa independiente de la actividad de lacasa. Juárez (2006) trabajando con la misma cepa que Tlecutil pero utilizando un medio de cultivo diferente determinó que la producción de lacasa es independiente de la cantidad de biomasa producida. En nuestro trabajo fue claro que la cepa Po 7 se desarrolló mejor que la cepa Po 3, además esta última cepa

8. DISCUSIONES.

Corrida	Y x/s	Y e/x	Y e/s	q _s	q _p	X _{max}	μ	P		
									g X/g S	U/g X
Po 3	0.50	881	500	0.015	6.5	2.22	0.007	15	Con Cu	Po 7
									0.51	3591
Po 7	0.45	181	83	0.026	2.17	5.50	0.012	12	Sin Cu	Po 3
									0.55	2500

Tabla 2. Parámetros cinéticos de crecimiento de *P. ostreatus* y de producción de lacasas

Los parámetros cinéticos de producción de lacasas sugieren que el Cu es un factor importante. Ya que los medios con Cu reportaron valores mayores de P , q_p , $Y_{E/X}$ en comparación con

obtenidos por la cepa Po 83 en FML (Júarez 2006).
 lo reportado en otros estudios, mientras que la cepa Po 7, alcanzó los mismos valores (Tllecuitl 2005; Juárez 2006). La X_{max} obtenida en este estudio por la cepa Po 3 fue menor que valor es similar al observado por otras cepas de *P. ostreatus* desarrollado también en FML Po 3, ya que la cepa Po 7, mostró un valor alrededor de 0.02 en ambos medios de cultivo, tal Respecto a la velocidad específica de crecimiento ésta fue afectada por el Cu solo en la cepa

las mejores condiciones para la producción de lacasas.
 laboratorio, y le dan mayor sustento a la justificación de este trabajo, buscando la mejor cepa y trata de la misma especie; dichos resultados nos llevan a fortalecer los objetivos generales del efecto positivo sobre la actividad de lacasas, no es igual en las diferentes cepas, aun cuando se un 70 % más que lo obtenido por la cepa Po 7, esto sugiere que aun cuando el Cu tiene un han obtenido hasta 37 500 U/L de actividad de lacasas (Júarez 2006), siendo aproximadamente 32783), que utilizando el mismo medio de cultivo con Cu que utilizamos en este trabajo, se *P. ostreatus* más estudiada en fermentación líquida en nuestro laboratorio es la Po 83 (ATCC trabajo, encontrando que la cepa Po 7 presentó 8 veces más actividad que la Po 3. La cepa de diez cepas desarrolladas sobre agar, dentro de esas cepas se encontraban las estudiadas en este independiente de la biomasa formada. Téllez-Téllez (2005) evaluó la actividad de lacasas de resultados obtenidos en nuestro trabajo confirmamos que la actividad enzimática es actividad de lacasas que la Po3 y en el medio sin Cu aproximadamente 20 veces, con los que la Po 3. En el medio con Cu, la cepa Po 7 mostró aproximadamente 18 veces más cabe mencionar que en ambos medios de cultivo, la cepa Po 7 fue mejor productora de lacasas disminución del 23% de la actividad, y en el caso de la cepa Po 3 la caída fue del 50%, aunque a la actividad de lacasas, ya que para la cepa Po 7 la eliminación del Cu resultó en una típico microbiano. Sin embargo, la presencia del Cu resultó ser un factor importante en cuanto cuando se eliminó este compuesto, la cepa se desarrolló mejor, mostrando un crecimiento resultó ser muy sensible a la concentración de Cu que se adicionó al medio de cultivo, ya que

aquellos obtenidos en el medio sin Cu. Por otro lado, se observaron diferencias fisiológicas importantes entre las dos cepas, ya que la Po 3 creció mas lento y con menor producción de biomasa que la Po 7, además que es muy sensible al Cu, el cual inhibió el crecimiento del hongo; en cuanto a la producción de lacasas, la cepa Po 3 no es una cepa recomendable para la producción de estas enzimas, sin embargo la contribución al conocimiento integral de las cepas es de suma importancia para estudios posteriores.

9. CONCLUSIONES.

Los resultados de este estudio nos permiten dar respuesta a las preguntas de investigación planteadas al inicio del trabajo, ya que al estudiar bajo las mismas condiciones a dos cepas de *P. ostreatus*, se observaron diferencias importantes, principalmente a nivel de desarrollo, pues la cepa Po 7 creció más rápido y con mayor rendimiento de biomasa, así como en la producción de lacasas, ya que la cepa Po 3 mostro valores muy bajos en comparación con la cepa Po 7, siendo el mismo comportamiento en ambos medios de cultivo. Por otro lado, se observó que la concentración de Cu en el medio de cultivo resultó ser tóxico para la cepa Po 3, inhibiendo el crecimiento del hongo, ya que la cantidad de biomasa y la μ observadas fueron aproximadamente 2.5 y 1.7 veces menores respectivamente en presencia de Cu.

Estos estudios, además, son una contribución importante al conocimiento de organismos productores de lacasas en medio líquido usando el Cu como un factor que favorece la actividad de lacasas. Abriendo nuevas perspectivas de estudio, tales como determinar las causas de la elevada sensibilidad al Cu de la cepa Po 3, así como determinar el número de isoformas producidas por ambas cepas en presencia y ausencia de Cu, evaluar el uso de inductores en ambas cepas en ausencia y presencia de cobre buscando a su vez emplear inductores no aromáticos debido a su toxicidad y probar aquellos que no sean tóxicos y a su vez resulten económicos.

10. REFERENCIAS

1. Abadulla E, Tzanov T, Costa S, Robra KH, Covaco-Paulo A y Gubitiz. 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsute*. Applied and Environmental Microbiology 66: 3357-3362.
2. Alba S, Humphrey AE, Mills NF. 1973. Biochemical Engineering. Academic Press, Inc. New York y London.
3. Baldrian P. 2005. Fungal laccases-occurrence and properties. Federation of European Microbiological Societies 30(2006)215-242
4. Bertrand G. 1896. Sur la presence simultanee de la laccase et dela tyrosinase dans le suc de quelques champignons. CR Hebd Seances Acad Sci. 9:463-465.
5. Bohinski, CR. (1991). Bioquímica. Quinta edición. Addison Wesley Iberoamericana. México. pp 491-492.
6. Collins PJ, y Dobson ADW. 1997. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. Applied and Environmental Microbiology 63: 3444-3450.
7. Das S, Sengupta S y Mukherjee M. 1997. Importance of laccase in vegetative growth of *Pleurotus florida*. Applied and Environmental Microbiology 63: 4120-4122.
8. Dekker RFH, Barbosa MA, Sargent K. (2002). The effect of ligin-in-related compounds on the growth and production of laccases by the ascomycete *Botryosphaeria sp.* Enzyme and Microbial Technology. 30:374-380.
9. Deshpande V. 1992. Proteinases in fungal morphogenesis. World J Mycol Biotechnol 8: 242-250.
10. D'Souza, TM, Merritt, SC y Reddy, A. (1999). Ligin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. Applied and Environmental Microbiology 65(12):5307-5313.
11. Diaz-Godínez, G. (1997). Producción de exopoligalacturonasas de *Aspergillus niger* por fermentación en medio sólido utilizando como soporte espuma de poliuretano. *Tesis de Maestría en Biotecnología*. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México.
12. Diaz-Godínez G, Soriano-Santos J, Augur C, Viniégua-González G (2001) Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid state and submerged fermentation: a comparative study. J. Ind. Microbiol Biotechnol. 26: 271-275.
13. Edens W, Goins T, Dooley D y Henson J. 1999. Purification and characterization of secreted laccase of *Gaumannomyces graminis* var. *tritici*. Applied and Environmental Microbiology 65: 3071-3074.
14. Eggert C, LaFayette PR, Temp U, Eriksson KE y Dean J. 1998. Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. Applied and Environmental Microbiology 64: 1766-1772.
15. Eggert C, Temp U y Eriksson KE. 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. Applied and Environmental Microbiology 62 (4): 1151-1158.

16. Galhau C, Goller S, Peterbauer C, Strauss J y Haltrich D. 2002. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology* 148: 2159-2169.
17. Galhau C, Wagner H, Hinterstoisser B y Haltrich D. 2002. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 529-536.
18. Giardina P, Palmieri G, Scaloni A, Fontanella B, Faraco V, Cennamo G y Sannia G. 1999. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Journal* 341: 655-663.
19. Guillén F, Muñoz C, Gómez-Torbio V, Martínez AT y Martínez MJ. 2000. Oxygen activation during oxidation of methoxyhydroquinones by laccase from *Pleurotus eryngii*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 170-175.
20. Guinbertau J. 1990. Definition and taxonomical place of the genus *Pleurotus* in the mushroom classification. *Bulletin de la Federation Nationale des Syndicats Agricoles de Cultivateurs de Champignons (France)*, 48: 261-264.
21. Guzmán GG, Mata, Salmones D, Soto-Velasco C y Guzmán-Dávalos L. (1993). El cultivo de hongos comestibles. México D.F. IPN, pp 1-13
22. Harvey LM y McNeil B. 1993. Liquid fermentation systems and product recovery of *Aspergillus*. *Biotechnology Handbooks*. 7a., ed. J. E. Smith. Plenum Press, New York.
23. Hesselstine-CW. 1972. *Biotechnology report: Solid state fermentations*. *Biotechnology Bioengineering* 14: 517:532.
24. Heinzkill M, Bech L, Halkier T, Schneider P y Anke T. 1998. Characterization of laccase and peroxidases from wood-rotting fungi (family *Coprinaceae*). *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1601-1606.
25. Herrera, T. y Ulloa, M (1998). El reino de los hongos. *Micología básica y aplicada*. Segunda edición. México. D.F., UNAM. pp 25-35.
26. Juárez Hernández J (2006). Estudio de las condiciones de fermentación sumergida para la producción de lacasas en *Pleurotus ostreatus*. *Tesis de maestría en Ciencias Biológicas*. Universidad Autónoma de Tlaxcala
27. Klein K. 1996. Pattern formation and development of the fungal mycelium. *Patterns in fungal development* (Ed. Sui-Wai Chiu y David Moore). Cambridge, University Press. Great Britain, pp. 70-82.
28. Laborde J. 1896. Sur laccasse des vins. *CR Hebd Seances Acad Sci*. 123: 1074-1075
29. Laborde J. 1995. Dossier Peurote. INRA, Centre de Recherches de Bordeaux station de Recherches sur les Champignons. Bordeaux, France.
30. Li K, Xu F y Eriksson LK. 1999. Comparison of fungal laccase and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2654-2660.
31. Martínez TA, Speranza M, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martínez MJ, Gutiérrez A, Del Río JC. 2005. Biodegradation of ligninocellulosic microbial, chemical and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*. 8:195-204.
32. Martínez-Carrera D, Larque-Saavedra A, Morales P, Sobal M, Martínez W y Aguilar A. 1993. Los hongos comestibles en México: Biotecnología de su reproducción. *Ciencia y Desarrollo* 18(108): 41-49.

33. Messerschmidt A. y Huber R. (1990). The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase ceruloplasmin. Modelling and structural relationships. European Journal of Biochemistry 187:341-352.
34. Meza J.C.; Auria R, Lomascolo A, Sigouillot J.C, Casalot L.(2007) Role of ethanol on growth, laccase production and protease activity in *Pycnoporus cinnabarinus* ss3 Enzyme and Microbial Technology. 41: 162-168.
35. Miller Gail L. (1959). Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31 (3):426-428.
36. Muñoz C, Guillén F, Martínez, TA y Martínez JM. (1997). Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn^{2+} oxidation. Applied and Environmental Microbiology 63 (6):2166-2174.
37. Nagai M, Sato T, Watanabe H, Saito K, Kawata M y Enei H. 2002. Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes. Applied Microbiology and Biotechnology 60: 327-335.
38. Nüske J, Scheibner K., Dombberger U., Ullrich R. y Hofrichter M. (2002). Large scale production of manganese-peroxidase using agaric white-rot fungi. Enzyme and Microbial Technology. 30:556-561.
39. Palmieri G, Cennamo G, Faraco V, Amoresano A, Sannia G y Giardina P. 2003. Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. Enzyme and Microbial Technology 33: 220-230.
40. Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Scaloni A, Capasso A y Sannia G. 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. Journal of Biological Chemistry 272: 31301-31307.
41. Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Fontanella B y Sannia G. 2000. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology. 66:920-924
42. Palmieri G, Giardina P, Marzullo L, Desiderio B, Nitti G, Cannio R y Sannia G. 1993. Stability and activity of a phenol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. Applied Microbiology and Biotechnology. 39:632-636.
43. Quintero R. 1987. Ingeniería Bioquímica. Teoría y aplicaciones. Ira. Edición. Editorial Alambra Mexicana, S. A. de C. V. México D. F. 18-23.
44. Sanchez C. 1998. Ultrastructural physiological and histological study of *Pleurotus* species. Ph. D. Dissertation. Manchester UK; The University Of Manchester.
45. Sánchez C. 2004. Modern aspects of mushroom culture technology. Appl Microbiol Biotechnol 64:756-762.
46. Sannia G, Giardina P, Luna M, Rossi M, y Buonocore V. (1986). Laccase from *Pleurotus ostreatus*. Biotechnology Letters 8:797-800.
47. Scriban R. 1985. Biología. Manual Moderno. México. 98, 163, 168-170.
48. Songulashvili G, Elisashvili, S Wasser, Nevo E, Hadar Y.(2006) Laccase and manganese peroxidase activities of *Phellinus robustus* and *Ganoderma adpersum* grown on food industry wastes in submerged fermentation. Biotechnology Letters 28: 1425-1429.

49. Tellez-Tellez M, Sanchez C, Loera O, Diaz-Godinez G. 2005 Differential patterns of constitutive intracellular laccases of the vegetative phase of *Pleurotus* species. *Biotechnology Letters*. 27(18):1391-4.
50. Thurston CF. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140: 19-26.
51. Tellez-Beristain S, Sanchez C, Loera O, Robson GD y Diaz-Godinez G. 2008. Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: Production of a novel laccase isoform. *Mycological Research*, doi:10.1016/j.mycres.2008.03.001
52. Tellez Beristain S. 2005. Purificación y caracterización parcial de una enzima lacasa extracelular de *Pleurotus ostreatus*. *Tesis de maestría en Ciencias Biológicas*. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
53. Xu F. 1997. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *Journal of Biological Chemistry* 272: 924-928.
54. Ward, G, Belinky AP, Hadart Y, Bilikis I, y Dosoretz GC. 2002. The influence of non-phenolic mediators and phenolic co-substrates on the oxidation of 4-bromophenol by lignin peroxidase. *Enzyme and Microbiology Technology* 30:490-498.
55. Zhu Y, Knol W, Smits JP y Bol J. 1994. A novel solid-state fermentation system using polyurethane foam as inert carrier. *Biotechnology*. 16:643-648.
56. Zhu Y, Knol W, Smits JP y Bol J. 1996. Medium optimization for nuclease P1 production by *Penicillium citrinum* in solid-state fermentation using polyurethane foam as inert carrier. *Enzyme and Microbial Technology*. 18:108-112.

ABREVIATURAS USADAS

ABTS	=	2,2 azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)
ATCC	=	American Type Culture Collection
°C	=	Grados Celsius
Cu	=	Cobre
DMP	=	2,6-dimetoxifenol
ECE	=	Extracto Crudo Enzimático
EMA	=	Agar extracto de Malta
FML	=	Fermentación en Medio Líquido
g	=	Gramos
g/L	=	Gramos sobre litros
gS/gX	=	Gramos de Sustrato sobre gramos de Biomasa
gS/gX h	=	Gramos de Sustrato sobre gramos de Biomasa por hora
gX/gS	=	Gramos de Biomasa sobre gramos de Sustrato
h	=	Horas
h ⁻¹	=	Unidad de velocidad específica de crecimiento
L	=	Litro
Lip	=	Lignin Peroxidasa
mL	=	Millilitros
mM	=	Concentración millimolar
Mn	=	Manganeso
MnP	=	Manganeso Peroxidasa
μ	=	Velocidad específica de crecimiento
μL	=	Microlitros
pH	=	Potencial de Hidrógeno
P _{RT}	=	Productividad en el pico máximo de actividad de lacasas
q _p	=	Tasa específica de formación de la enzima
q _s	=	Tasa específica de consumo de sustrato

Revoluciones por minuto	=	rpm
Unidad arbitraria de actividad de lacasas	=	U
Unidad arbitraria de actividad de lacasas sobre gramos de biomasa	=	U/gX
Unidad arbitraria de actividad de lacasas sobre hora	=	U/h
Unidad arbitraria de actividad de lacasas sobre litro	=	U/L
Unidad arbitraria de actividad de lacasas sobre miligramo de proteína	=	U/mg
Biomasa máxima de crecimiento	=	X_{max}
Biomasa inicial	=	X_0
Rendimiento de Enzima respecto a la Biomasa	=	$Y_{E/X}$
Rendimiento de Biomasa respecto al Sustrato	=	$Y_{X/S} \dots$