

"Evaluación sobre diferentes sustratos de la actividad de lacasas de dos cepas de *Pleurotus ostreatus* producida por fermentación sumergida"

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

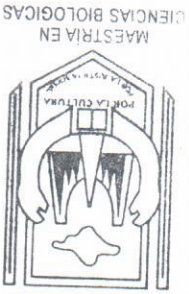
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**Biol. Abdíel Degollado Estrada**

Comité Tutorial:

Dra. Alba Mónica Montiel González  
Dra. Martha Dolores Bibbins Martínez  
Dra. Ma. del Carmen Sánchez Hernández  
Dr. Jorge Soriano Santos  
Dra. Blanca Rosa Rodríguez Pastrana



Octubre 2008

TLAXCALA, TLAX.



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

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que el **Biol. Abdiel Degollado Estrada** realiza para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es: **"Evaluación sobre diferentes sustratos de la actividad de lasasas de dos cepas de *Pleurotus ostreatus* producida por fermentación sumergida"**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
Tlaxcala, Tlax., octubre 24 de 2008

Dra. María del Carmen Sánchez  
Hernández  
Dra. Martha Dolores Bibbins Martínez

Dr. Gerardo Díaz Godínez  
Dr. Jorge Soriano Santos

Dra. Alba Mónica Montiel González  
Dra. Blanca Rosa Rodríguez Pastrana

El presente proyecto se realizó bajo la dirección del Dr. Gerardo Díaz Godínez en las instalaciones del laboratorio de biotecnología del CICB, Universidad Autónoma de Tlaxcala (Unidad periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Autónoma de México) y contó con financiamiento del proyecto 47396 de CONACYT (SEP-CIENCIA BÁSICA 2004) y con la beca número 198760 otorgada al Biol. Abdíel Degollado Estrada para estudios de maestría.

La tesis fue desarrollada en las instalaciones de la Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, la cual está registrada en el Programa para el Fortalecimiento del Posgrado Nacional, Padrón Nacional de Posgrado (PNP).

## AGRADECIMIENTOS

Te agradezco a ti, *Mily*, por ser mi gran maestra desde siempre y porque en gran medida he llegado hasta aquí gracias a ti. ¡Qué Dios te bendiga donde quiera que estés! Te extraño.

Gracias *Papa y Mamá* por su incondicionalidad, también gracias a esta tesis descubrí que son los mejores padres que pudieron haberme tocado. Siempre van en mi corazón.

Un agradecimiento especial a *Edgar e Itzel*, por la seguridad de siempre estar en sus mentes a pesar de la distancia. Los amo en verdad.

A "los grises" por todos los momentos buenos y difíciles juntos. Mis mejores deseos para cada uno de ustedes.

A todos los profesores que coincidieron en mi formación en esta maestría, principalmente a los que estuvieron muy cerca colaborando y enriqueciendo este trabajo:

*Dr. Gerardo*, por confiar en mí y por el apoyo desde el primer día y hasta el último momento. Por todas las enseñanzas.

*Dr. Monica*, gracias por tu profesionalismo y sencillez. Mil gracias por escuchar, por estar y por centrarme en esos momentos difíciles para mí.

*Dr. Martha*, por el entusiasmo e interés puesto en mi trabajo y en especial por tu amistad.

El más grande agradecimiento a ti, *Lety*, por la sencilla razón de sentirme al fin comprendido.



INDICE GENERAL

RESUMEN ..... 2

1. INTRODUCCIÓN ..... 4

1.1 HONGOS DE PUDECION DE LA MADERA ..... 4

1.2 SISTEMA LIGNINOLITICO ..... 6

1.3 PRESENCIA DE LACASAS EN LA NATURALEZA ..... 10

1.4 GÉNERO *PLEUROTUS* ..... 11

2. ANTECEDENTES ..... 14

3. JUSTIFICACIÓN ..... 23

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN ..... 24

5. OBJETIVOS ..... 25

5.1 OBJETIVO GENERAL ..... 25

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES ..... 25

6. METODOLOGÍA ..... 26

6.1 CEPAS DE *PLEUROTUS OSTREATUS* ..... 26

6.2 OBTENCIÓN DEL INÓCULO ..... 26

6.3 FERMENTACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO ..... 27

6.4 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS ENZIMÁTICOS Y DE LA BIOMASA ..... 27

6.5 CUANTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA SOLUBLE EN EL ECE ..... 28

6.6 PARÁMETROS CINÉTICOS DE CRECIMIENTO DE *P. OSTREATUS* Y DE PRODUCCIÓN DE LACASA ..... 28

6.7 DETERMINACIÓN DE PH ..... 29

6.8 AZÚCARES RESIDUALES ..... 29

6.9 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LACASAS *IN VITRO* ..... 30

6.10 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LACASAS POR ZIMOGRAFÍA ..... 30

7. RESULTADOS ..... 32

7.1 CARACTERIZACIÓN DE LA FERMENTACIÓN ..... 32

7.2 BIOMASA ..... 32

7.3 CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE EN EL ECE ..... 33

7.4 ACTIVIDAD DE LACASAS ..... 34

7.5 PERFILES DE PH ..... 36

7.6 CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES RESIDUALES ..... 36

7.7 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE ISOFORMAS DE LACASAS ..... 37

7.8 CÁLCULO DE RENDIMIENTOS ..... 38

8. DISCUSIÓN ..... 40

9. CONCLUSIONES ..... 43

10. REFERENCIAS ..... 44

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general para oxidación de fenoles por lacasas. .... 10

Figura 2. Representación tridimensional de una lacasa de *Coprinus cinereus* (Ducros y col. 2001). .... 11

Figura 3. Morfología de *Pleurotus* ..... 12

Figura 4. Ciclo de vida de un basidiomiceto ..... 13

Figura 5. Curva de crecimiento de *P. ostreatus* en fermentación sumergida para las cepas Po 37 (a) y Po 52 (b) 33

Figura 6. Valores de proteína extracelular en las cepas Po 37 y Po 52 ..... 34

Figura 7. Actividad de lacasas de la cepa Po 37 ..... 35

Figura 8. Actividad de lacasas de la cepa Po52 ..... 35

Figura 9. Perfiles de pH obtenidos en fermentación sumergida. .... 36

Figura 10. Determinación de azúcares reductores en el medio. .... 37

Figura 11. Isoformas de lacasas de la cepa Po37..... 38

Figura 12. Isoformas de lacasas de la cepa Po52..... 38

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de *Pleurotus ostreatus* empleadas en el estudio ..... 26

Tabla 2. Composición del medio de cultivo ..... 27

Tabla 3. Parámetros cinéticos de crecimiento de *P. ostreatus* y de producción de lacasas ..... 39

## RESUMEN

Las lacasas son enzimas que tiene importancia biotecnológica debido a sus diferentes aplicaciones (entre ellas en los procesos de biorremediación). Su relevancia radica en gran medida de su capacidad para oxidar una amplia variedad de compuestos en poco tiempo sin verse afectadas importante por factores como el pH o la temperatura. Las lacasas (p-difenol: oxígeno oxido-reductasas, E.C. 1.10.3.2) requieren cobre y oxígeno para oxidar fenoles, polifenoles, aminas aromáticas y diferentes sustratos no fenólicos y forman parte de las enzimas ligninolíticas presentes en los hongos de pudrición blanca. Recientemente como especies del género *Pleurotus* considerados como de pudrición blanca, se han propuesto como organismos de interés para la obtención de lacasas.

En el presente estudio se utilizaron dos cepas de *Pleurotus ostreatus* (ATCC-38537 y ATCC-58052), las cuales se desarrollaron en fermentación sumergida a 25° C por veinte días para la producción de lacasas. Se utilizaron como sustratos: siringaldazina, p-anisidina, o-tolidina, 2,6-dimetoxifenol (DMP) y 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazina-6-ácido sulfónico) (ABTS), además se determinaron por zimografía el número de isoenzimas producidas por cada cepa. Se observó que existen diferencias en los niveles de actividad de lacasas y en los patrones de

producción de estas enzimas dependientes de la cepa, aun siendo la misma especie desarrolladas bajo las mismas condiciones. Esto sugiere que no es suficiente contar con un organismo de pudrición blanca para garantizar la producción de lacasas, sino que es necesario buscar la mejor cepa productora, aunado a las mejores condiciones de producción de las enzimas.



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Hongos de pudrición de la madera

Entre las formas de vida de los hongos encontramos las de pudrición (xilófagos). Según sea esta pudrición se clasifican en hongos de pudrición blanda, oscura y blanca.

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

Otra característica de estos hongos es su asociación con coníferas probablemente, debida a una adaptación por parte de estos hongos a la estructura su madera blanda. Están restringidos en su habilidad de degradar lignina, por lo que se han considerado como hongos muy específicos comparados con los hongos de pudrición blanca, los cuales se pueden encontrar en una gran variedad de árboles (Schwarze y col. 2000).

Hongos de pudrición oscura. Solo el 6% de todos los hongos de pudrición conocidos actualmente ocasionan la pudrición oscura. La pudrición oscura es causada por hongos basidiomicetes principalmente, lleva este nombre porque al degradar los carbohidratos y polímeros (celulosa y hemicelulosa) presentes en la madera, esta adquiere un color oscuro y una consistencia quebradiza. Para la degradación de celulosa y hemicelulosa se debe asumir que el peróxido de hidrógeno es formado tal vez en una fase pre-celulolítica y que fácilmente penetra en la pared celular (para que puedan actuar las enzimas dependientes de peróxido) y junto con iones de hierro degradan la matriz de lignocelulosa por depolimerización oxidativa. Esta suposición parece necesaria, puesto que las enzimas que descomponen la celulosa son proteínas largas para penetrar en los pequeños capilares de la pared celular, por lo que la hemicelulosa cercana a la celulosa es oxidada y la celulosa se hace accesible para las enzimas que degradan este polímero (celulosas). La degradación preferencial de estos hongos por la celulosa y hemicelulosa está estrechamente asociada con la pérdida de firmeza de la madera después de un corto periodo de degradación (Schwarze y col. 2000).

Encontramos dos tipos de degradación blanda: el tipo 1 se caracteriza por la formación de una serie de cavidades sucesivas de forma cónica, después de un periodo de incremento longitudinal de la hifa, el crecimiento se detiene y forma una cavidad alrededor de la hifa. Este mecanismo degradativo podría ser una forma de suministro de nutrientes. En el tipo 2 la degradación se lleva a cabo en el exterior del lumen, formando pequeñas erosiones en forma de 'V'. Tienen importancia en el ecosistema porque quizá acelera la caída natural en árboles vivos (Schwarze y col. 2000).

## 1.2 Sistema ligninolítico

Algunos hongos pueden causar pudrición simultánea en alguna parte de la madera y en otra parte se lleva a cabo la delignificación. El factor responsable de la ocurrencia de uno u otro tipo de pudrición es incierto (Kirk y Cullen 1998). La degradación de la lignina con respecto a otros componentes depende mucho de las condiciones ambientales (pH, temperatura, grado de humedad) y de la especie de hongo involucrado (Palmieri y col. 1997).

La pudrición blanca es ocasionada principalmente por basidiomicetes y ascomicetes. El nombre de pudrición blanca se deriva de la apariencia blanquecina en la madera al remover la lignina, celulosa y hemicelulosa (Schwarze y col. 2000). Los hongos de pudrición blanca son aerobios obligados, su nutrición es por medio de la combustión biológica de la madera y materiales asociados, usando oxígeno molecular como aceptor terminal de electrones. La vía metabólica de producción de energía interna es la misma que la mayoría de los organismos aeróbicos (Kira y Cullens 1998). Las hifas invaden rápidamente las células de la madera y permanecen en la pared del lumen, secretan enzimas y metabolitos que provocan la depolimerización de la hemicelulosa, celulosa y la fragmentación de la lignina. Presentan dos patrones de descomposición, la pudrición simultánea donde la celulosa es removida antes de la hemicelulosa y celulosa, Los hongos de pudrición blanca rompen la lignina por un proceso oxidativo por medio de fenoloxidasas (lacasas, MnP, LiP, tirosinasas y peroxidasas) que son formadas y liberadas por la hifa (Schwarze y col. 2000).

Hongos de pudrición blanca. Los hongos de pudrición blanca son los principales productores de las enzimas lacasas. Entre este tipo de hongos tenemos a los del género *Pleurotus*, cuyas especies son de interés para la obtención de enzimas lacasas. *Pleurotus* produce diferentes isoformas, al igual que muchos otros hongos de pudrición blanca. Se ha sugerido que la codificación de varias isoenzimas está regulada diferencialmente, algunas se expresan constitutivamente y otras son inducibles (Galhau y col. 2002). El sistema enzimático ligninolítico de los hongos de pudrición blanca es poco específico.



El grupo de enzimas ligninolíticas presenta en esencia tres enzimas: manganeso peroxidasa (MnP), lignin peroxidasa (LiP) y lacasa (D'Souza y col. 1999).

Las manganeso peroxidasa (MnP; EC 1.11.1.13) son enzimas extracelulares oxido-reductasa, con potencial para oxidar a la lignina, sustancias húmicas y varios compuestos orgánicos contaminantes. Esta característica hace que estas enzimas sean consideradas en la aplicación biotecnológica, por ejemplo en el tratamiento de aguas residuales, blanqueamiento de pulpa, remoción de lignino sulfonados, sustancias húmicas, residuos de plantas en la lana de ovejas, así como en la eliminación de compuestos químicos peligrosos (Nüske y col. 2002). Estas enzimas son ampliamente encontradas en basidiomicetos y su producción está regulada por la concentración de  $Mn^{2+}$  (D'Souza y col. 1999).

Las lignina peroxidasa (LiP; EC 1.11.1.14) son glicoproteínas que contienen un grupo hemo (Ward y col 2002), estas enzimas participan en la depolimerización extracelular de la lignina en hongos de pudrición blanca (Guillen y col. 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 peroxidasa. Esta habilidad de LiP para catalizar las reacciones normalmente no está asociada con otras peroxidasa, 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 col. 2002).

En los hongos de pudrición blanca encontramos a las lacasa como parte del sistema ligninolítico el cual tiene como función catalizar reacciones de degradación de la lignina (Guillen y col. 2000). Estas enzimas pueden oxidar compuestos fenólicos produciendo radicales fenoxi libres, mientras que los compuestos no fenólicos son oxidados via radicales catiónicos. De igual manera, éstas pueden oxidar compuestos no fenólicos con un potencial de ionización relativamente bajo, mientras que los no fenólicos de alto potencial de ionización son oxidados por las LiP y las MnP (Srinivasan y col. 1995).



Las lacasas (p-difenol: oxígeno oxidoreductasas EC 1.10.3.2) son un conjunto de enzimas que pertenecen al grupo de las fenoloxidasas, contienen átomos de cobre en su centro catalítico y se nombran comúnmente como multicobre oxidasas. Otros miembros del grupo de las fenoloxidasas son: la ceruloplasmina (presentes en plasma de mamíferos) y las ascorbato oxidasas (presentes en plantas). Típicamente las lacasas contienen cuatro átomos de cobre distribuidos en tres centros diferentes: T1, T2 y T3 (Edens y col. 1999). La adición de agentes quelantes, como la azida de sodio, el cianuro de potasio o EDTA, a una mezcla de reacción catalizada por lacasa provoca una inhibición irreversible, lo que sugiere que los átomos metálicos centrales (cobre) participan en la catálisis (Edens y col. 1999). 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 Humbe 1990), en este grupo se lleva a cabo la reducción del oxígeno molecular a agua (Xu 1997). Las lacasas presentan típicamente coloración azulosa debido a uno de tales centros. Sin embargo, se han encontrado enzimas lacasas que carecen de dicho átomo, a éstas se les ha nombrado como lacasas amarillas o blancas. Cabe mencionar que algunos autores no están de acuerdo en llamar a estas últimas lacasas verdaderas.

Las lacasas son de las pocas enzimas que han sido estudiadas desde finales del siglo XIX. Se demostró su existencia por primera vez en el exudado de *Rhus vernicifera*, el árbol japonés llamado laquer (Yoshida 1883), de allí su nombre. Algunos años después se encontraron en los hongos (Bertrand 1896). Aunque conocidas por mucho tiempo, las lacasas atrajeron la atención científica sólo después de realizarse estudios sobre degradación enzimática en los hongos de pudrición blanca de la madera.

Las reacciones catalizadas por una lacasa sobre sustratos fenólicos, consisten en la oxidación de un electrón convirtiendo el anillo fenólico en un radical libre arilo. Estas especies químicas activas pueden ser convertidas a quinonas en un segundo paso de la oxidación y la quinona, producto de los radicales libres, puede sufrir una polimerización no enzimática (Durán y col. 2002).

La catálisis que llevan a cabo las lacasas —reducción del oxígeno en agua—, va acompañada de la oxidación de un sustrato, usualmente p-dihidroxifenol u otro compuesto fenólico (Eggert y col. 1998). Debido a su amplio rango de sustratos resulta complicado definir a las lacasas a partir de su especificidad pues tienen un amplio rango de sustratos. Este rango de sustratos varía de una lacasa a otra e incluso se solapa con el rango de otras enzimas: las monofenol mono oxígeno tirsosinas (EC 1.14.18.1). Aunque las lacasas son también llamadas difenol oxidasas, algunos monofenoles como el 2,6 dimetoxifenol (DMP) o el guaiacol son a menudo mejores sustratos que los difenoles (catecol o hidroquinona). La siríngaldazina es considerada como un único sustrato para lacasas (Harkin y col. 1974). Las lacasas son entonces oxidasas que actúan sobre polifenoles, fenoles con sustituyentes metoxi, diaminas aromáticas, y un amplio rango de otros compuestos mas no oxidan tirsosina, sustrato único de las tirsosinasas (Muñoz-Guillen y col. 1997).

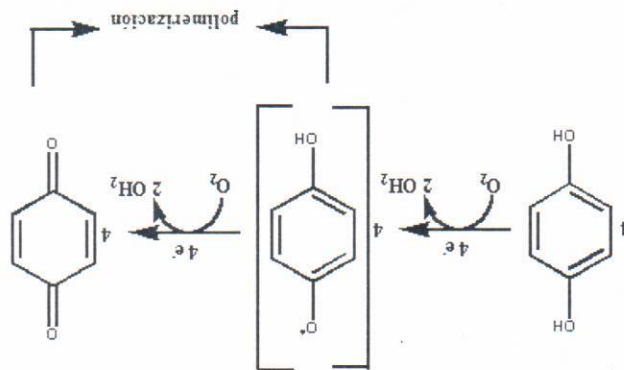
En otras palabras, son glicoproteínas que utilizan al cobre como cofactor, presentan pesos moleculares de entre 43 a 383 KDa (Heinzkill y col. 1998). Catalizan la oxidación de un amplio rango de sustratos llevando a cabo reacciones de polimerización, depolimerización, metilación y dimetilación de compuestos fenólicos (Edens y col. 1999). En la figura 1, se muestra una propuesta del mecanismo de catálisis de una lacasa. Se ha demostrado, que las lacasas fungicas también pueden degradar compuestos no fenólicos de la lignina en presencia de algunos mediadores, tales como sustratos artificiales y metabolitos fungicos. Un ejemplo, es el caso de la oxidación de 1-(3,4-dimetoxifenil-2-(2-metoxifenil) propano-1,3 diol en presencia de mediadores como el 1-hidroxibenzo-triazol (1-hbt) y ácido violúrico (Li y col. 1999). También se ha demostrado que las lacasas de varios microorganismos son capaces, bajo ciertas condiciones, de transformar los colorantes usados en la industria textil, en productos no colorados y en algunos casos han logrado su completa mineralización.



Las lacasas se distribuyen ampliamente en la naturaleza. De manera común las encontramos en plantas y hongos. Sin embargo, también se han reportado en bacterias e insectos (Guillén y col. 2000; Galhau y col. 2002). En plantas participan en los procesos de formación de polímeros de lignina (Sterjiades et al. 1992; Liu et al. 1994; Boudet 2000; Ranocha et al. 2002; Hopes y Dean 2004), mientras que en hongos se les conocen diversas funciones incluyendo morfogénesis, producción de pigmentos, patogénesis, virulencia, defensa antiestres, y degradación de lignina o eliminación de fenoles tóxicos que surgen durante tal degradación (Thurston 1994; Mansur y col. 1997). Aunque existen también algunos reportes de actividad de lacasa en bacterias (Alexandre y Zhulin 2000; Martins y col. 2002, Claus, 2003; Givaudan y col. 2004), no parece probable que las lacasas sean enzimas comunes de los grupos procaríotas. Las proteínas bacterianas parecidas a lacasas son enzimas intracelulares o periplasmáticas (Claus 2003). Probablemente, la lacasa bacteriana mejor caracterizada sea la aislada de *Sinorhizobium meliloti*, la cual fue descrita como una proteína periplasmática de 45kDa con un punto isoeléctrico a pH 6.2 y con la habilidad de oxidar siringaldazina (Rosconi y col. 2005). A pesar del conocimiento adquirido hasta ahora falta por esclarecer del todo la función biológica de las lacasas. En la figura 2, se aprecia la estructura tridimensional de una lacasa.

### 1.3 Presencia de lacasas en la naturaleza

Figura 1. Esquema general para oxidación de fenoles por lacasas.

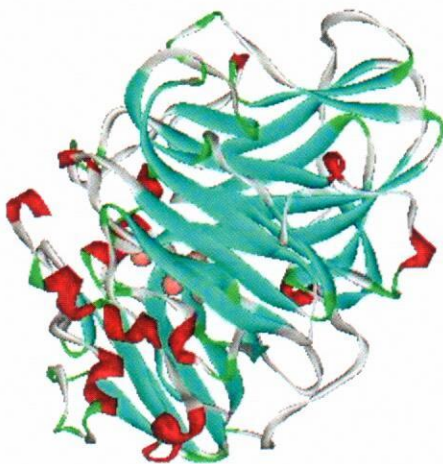


En la figura 3, se muestran las partes fundamentales de *Pleurotus*, las cuales son el sombrero o pileo, que protege a las laminitas o el himenio, este último es la parte fértil del hongo en donde se producen las esporas. El sombrero es sostenido por el pie o estípite (Guzman y col. 1993).

El género *Pleurotus* comprende especies generalmente de color blanco, amarillento, rosado, grisáceo o de color oscuro. Su forma puede ser de embudo, pétalo de flor o concha de ostra. En relación con el estípite puede carecer de éste, ser lateral o excéntrico y/o corto, mediano o largo. Las esporas son de color blanco, crema o lila pálido, presentan una forma cilíndrica (muy raramente elipsoides) y son lisas. El género es cosmopolita, está distribuido en Europa, Asia, África, Australia y Latinoamérica (Gimbertey 1990). 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.

#### 1.4 Género *Pleurotus*

Figura 2. Representación tridimensional de una lacasa de *Coprinus cinereus* (Ducros y col. 2001).

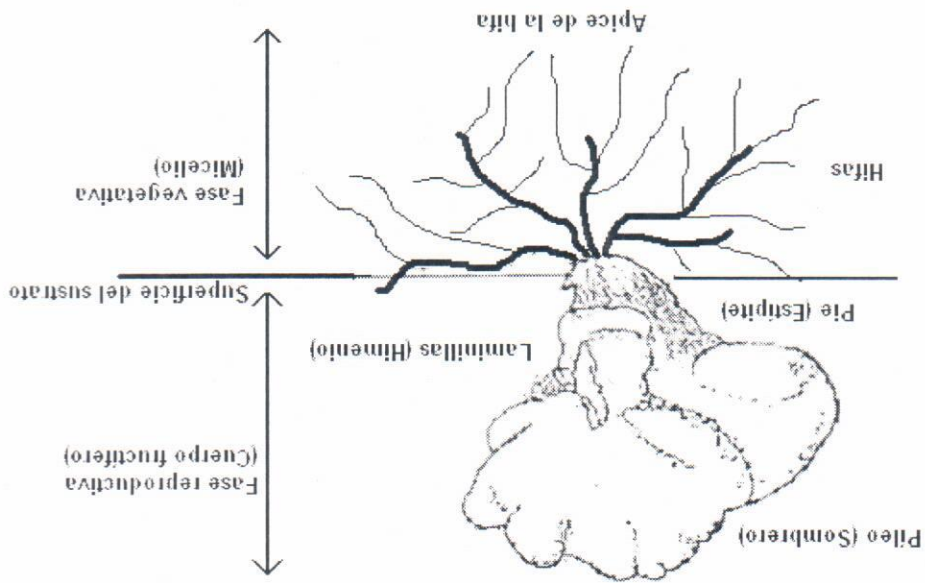




El crecimiento de la hifa causa que se formen sitios adicionales para la síntesis de la pared en la región subapical, originando ramificaciones laterales las que a su vez, sintetizan una nueva pared. La formación de las ramificaciones, requiere de la producción de un nuevo ápice de la célula madre existente (Despande 1992). El micelio tiene por función adquirir y

La fase vegetativa es filamentosa porque 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. Su crecimiento se atribuye a un fenómeno complejo en el que participan vesículas. Estas 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 subapical y se transportan por medio de un mecanismo hasta llegar al centro distribuidor de vesículas. Desde ahí son distribuidas en forma radial y aleatoria hacia la pared apical dando lugar al crecimiento de las hifas (Viniestra-González y col. 1993).

Figura 3. Morfología de *Pleurotus*



distribuir los nutrientes, así como el crecimiento y la formación de la estructura de soporte para el desarrollo de los cuerpos fructíferos (Klein 1996).

En los basidiomicetos existen dos modelos sexuales: el homotalismo, donde los organismos son autocompatibles, es decir, la unión sexual puede efectuarse entre elementos de un mismo micelio; y el heterotalismo, en el que son necesarios dos micelios para llevar a cabo la reproducción. El género *Pleurotus* está dentro de este último modelo. En éste, las basidiosporas con un núcleo germinan (micelio primario monocariótico) y se fusionan dos micelios primarios compatibles, en los cuales hay un intercambio nuclear recíproco (plasmogamia), formando el micelio secundario dicariótico con la presencia de fibrillas, la fusión nuclear (cariogamia) ocurre en los basidios, que se encuentran en las laminitas del cuerpo fructífero, posteriormente ocurre la meiosis, dando origen a células haploides (basidiosporas), que son expulsadas hacia el ambiente (ver figura 4).

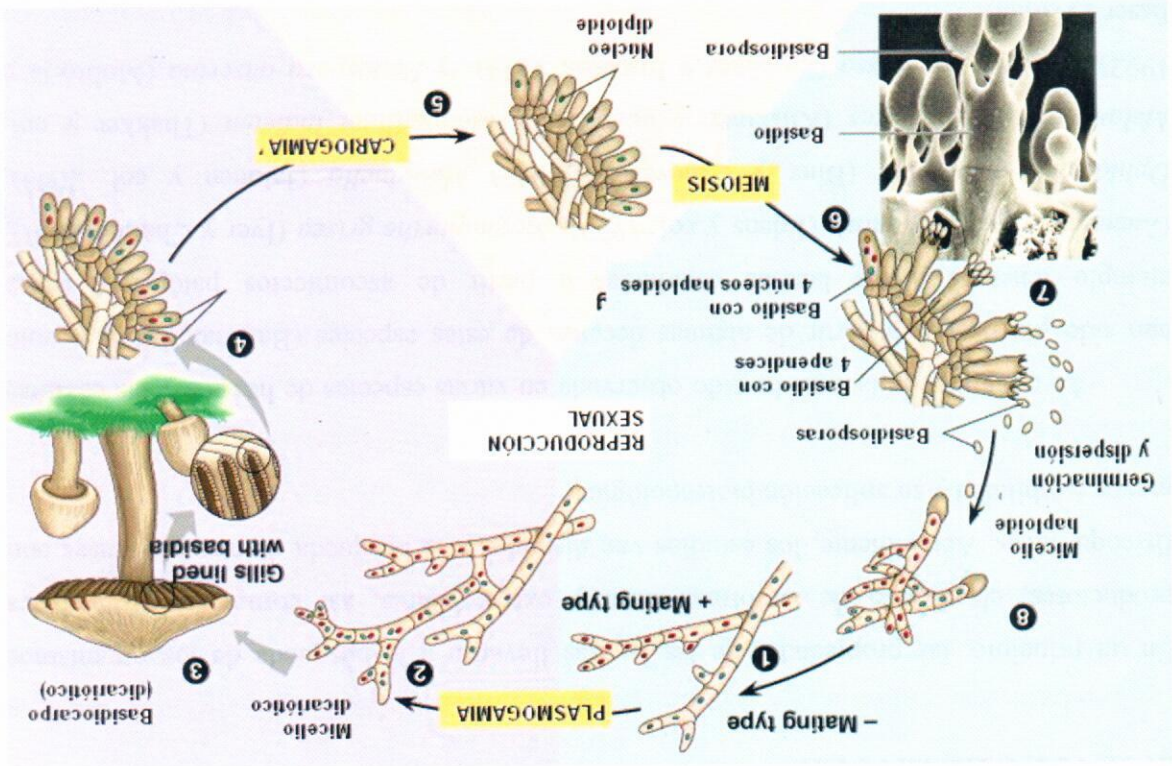


Figura 4. Ciclo de vida de un basidiomiceto

## 2. ANTECEDENTES

En un principio, las propiedades de las lacasas llevaron a la búsqueda de los organismos productores, el número de isoformas intra y extracelulares, así como sus propiedades fisicoquímicas. Actualmente, los estudios van dirigidos a la búsqueda de nuevas lacasas con mayor estabilidad y su aplicación biotecnológica.

La actividad de lacasas ha sido observada en varias especies de hongos y las enzimas han sido purificadas a partir de algunas decenas de estas especies (Baldrian 2006). Como ejemplo tenemos a las lacasas estudiadas a partir de ascomicetos patógenos como *Gaeumannomyces graminis* (Edens y col. 1999), *Magnaporthe grisea* (Iyer y Chattoo 2003), *Ophiostoma novo-ulmi* (Binz y Canevascini 1997) *Manginella* (Jalonen y col. 2003), *Melanocarpus albomyces* (Kiskinen y col. 2002), *Monocillium indicum* (Thakker y col. 1992), *Neurospora crassa* (Froehner y Ericsson 1974) y *Podospora anserina* (Molitoris y Esser 1970).



Con relación a la inducción de lacasas, D'Souza y col. (1999) realizaron estudios comparativos sobre la producción de enzimas degradativas de la lignina de *Ganoderma lucidum* en donde variaron las concentraciones iniciales de nitrógeno desde 2.4 mM hasta 24 mM, en presencia de sustratos naturales como pino o roble, además de glucosa y celulosa como fuente de carbono. La actividad lacasa fue medida con 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) como sustrato. Los resultados mostraron que las

2002).

Las enzimas lacasas son enzimas que se encuentran en una gran variedad de hongos de pudrición blanca, sin embargo, pueden ser inducidas por cobre (Palmieri y col. 2000) o medios ricos en nitrógeno (D'Souza y col. 1999). En algunas especies la adición de inductores al medio de cultivo resulta en la biosíntesis de nuevas isoformas extracelulares (Duran y col.

la fecha han sido purificadas en poco más de 100 isoformas.

Dentro del grupo de los basidiomicetos casi todas las especies reportadas como de pudrición blanca de la madera han presentado lacasas en diferentes grados (Hatakka 2001), a

de lacasas estudiadas y por supuesto de las aún no descritas.

Los estudios realizados a partir de lacasas purificadas –principalmente de basidiomicetos–, demuestran las siguientes características: los pesos moleculares que se han encontrado van desde 43 000 hasta 383 000 Da. Puntos isoeléctricos de 2.6 a 6.9. Temperaturas óptimas desde los 25° C hasta los 80° C. El pH óptimo de actividad esta entre 2-5 unidades (Baldrian 2006). Lo anterior es importante, pues nos da idea de la gran diversidad

ante fungicidas (Zhu y col. 2001).

Del mismo modo encontramos trabajos donde se ha reportado actividad de lacasas en ascomicetos no patógenos de ambientes acuáticos y terrestres. Tales estudios involucran a los géneros *Aspergillus*, *Curvularia* y *Penicillium* (Baldrian 2006). Del grupo de las levaduras (formado por ascomicetos y basidiomicetos), sólo se ha encontrado actividad lacasas en el patógeno para el humano *Cryptococcus neoformans*, en él, la lacasa contribuye a la resistencia



Sethuraman y col. (1999) evaluaron la actividad de las lacasas de *Cyathus stercoreus* con diferentes sustratos, obteniendo la mayor actividad con ABTS y DMP en tanto la menor actividad se mostró con pirogalol. Klonowska y col., (2002) compararon dos isoenzimas de lacasas (LAC1 y LAC2) producidas por el hongo C30 (el cual coloniza las hojas perennes del roble *Quercus ilex*), donde encontraron claras diferencias entre las dos isoformas en los

valores más altos de  $K_m$  se obtuvieron al utilizar vainillina (Fukushima y Kita 1995).  $K_m$  de ambas isoenzimas fue la más baja, con DMP presentaron una  $K_m$  más alta, pero los óptimo de actividad es dependiente del tipo de sustrato utilizado; con ABTS como sustrato la respectivamente. Este estudio mostró evidencias de que la afinidad de las isoformas y el pH blanca) que presentó dos isoenzimas: L1 y L2 con una masa molecular de 71 y 68 kDa entre lacasas de basidiomicetes a las de *Ceriporiopsis subvermispora* (hongo de pudrición con ABTS como sustrato, seguida de guayacol, DMP y siringaldazina. También encontramos (2003) reportaron la actividad específica de lacasas de *Mangrovea* sp., la cual fue más alta para muchas lacasas de hongos, seguido de siringaldazina, DMP y guayacol. Jalonen y col., de *Melanocarpus albomyces* fue más grande en presencia de ABTS como ha sido reportado  $K_m$  más alta se encontró al oxidar guayacol. Kiiskinen y col. (2002) mostraron que la actividad *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. El sustrato que presentó la menor  $K_m$  fue el DMP, y la Edens y col. (1999) evaluaron la catálisis sobre varios sustratos de las lacasas puras de

sustratos, siendo siringaldazina el único sustrato específico. actividad de lacasas, no obstante que el guayacol y el DMP son considerados los mejores (1994) reportó que las hidroquinonas y el catecol son sustratos muy utilizados para determinar estudiadas entre sí, pues los trabajos utilizan diferentes condiciones para probarlas. Thurston Debido a su amplio margen en cuanto a sustratos, parece difícil comparar las lacasas

donde la actividad de lacasa fue muy baja. siete días de cultivo fueron altos en comparación con concentraciones bajas de nitrógeno, en concentración de la fuente de nitrógeno fue alta, los niveles de actividad de lacasas después de lacasas fueron las únicas que presentaron actividad a diferencia de las MnP y LiP. Cuando la

parámetros cinéticos utilizando como sustratos compuestos fenólicos (siringaldazina y guayacol) y el ABTS (no fenólico) aunque la afinidad de las enzimas por los tres sustratos es baja como lo demuestran los grandes valores de  $K_m$ , LAC2 mostró ser más eficiente en la oxidación de los sustratos. Las diferencias observadas en la cinética pueden ser consecuencia de la variabilidad de ciertos aminoácidos involucrados en la especificidad de la enzima, dependiendo del sustrato.

Del mismo modo, *Trametes pubescens* secreta varias isoformas de lacasas, de las cuales sólo se ha caracterizado una (Galhau y col. 2002), la cual presentó una masa molecular de 65 kDa. De esta enzima se determinó el valor de  $K_m$  sobre diferentes sustratos. La afinidad de mayor a menor fue como sigue: siringaldazina, ABTS, DMP, guayacol y p-anisidina. El valor bajo de la  $K_m$  en presencia de siringaldazina también ha sido reportado para otras lacasas de hongos en un hongo de la familia Chaetomiaceae, el valor de la  $K_m$  fue de 9  $\mu$ M comparado con 1000  $\mu$ M al utilizar como sustrato un contaminante con actividad estrogénica. Las lacasas de *Neurospora crassa* sólo oxidan o- y p-difenoles con excepción de cloroglucinol (Germann y col. 1988), pero las lacasas de *Pyricularia oryzae* prefieren el cloroglucinol como sustrato sobre otros fenoles mono-sustituidos (Alsbaey y col. 1996). Las lacasas de *Cerrena unicolor* y *Trametes versicolor* oxidan fenoles meta-sustituidos en diferentes grados, la enzima de *Cerrena unicolor* oxida principalmente fenoles para-sustituidos mientras que la de *Trametes versicolor* oxida fenoles orto-sustituidos (Jolivalt y col. 1999).

Se han realizado trabajos de purificación de lacasas provenientes de hongos comestibles, de los cuales algunos suponen a sus enzimas como más seguras para ser utilizadas por los humanos. En el caso de *Lentinula edodes* (shitake), el segundo hongo comestible más importante a nivel mundial, Nagai y col. (2002) aislaron una enzima lacasa con una masa molecular de 72.2 kDa, y determinaron su sustrato específico, utilizando ABTS, pirogalol, guayacol, ácido féulico, DMP y catecol. La lacasa de este hongo presentó más afinidad por ABTS en comparación con DMP. Savoix y Mata (2003), reportaron que *Lentinula* y *Pleurotus* presentan una sobreproducción de enzimas lacasas al estar en contacto con un



organismo antagonista como es el caso de *Trichoderma*. Sin embargo, Mata y col. (2004), reportan que la presencia del antagonista induce la sobreproducción de las enzimas oxidasas, no sólo de lacasas en *Pleurotus*, y se observa que no induce isoformas al analizar los zimogramas. Das y col., (1997) en *Pleurotus ostreatus* (cepa florida) hallaron dos lacasas L1 y L2. Utilizaron diferentes sustratos para determinar la afinidad de ambas isoenzimas. Para L1 la  $K_m$  fue de 28.5mM con guayacol y para L2 fue de 3.13 mM, con o-tolidina para la isoforma L1 los resultados fueron  $K_m=0.33$  mM y  $L2 K_m=0.29$  mM. La catálisis sobre guayacol fue más eficiente en la L2 que en la L1. Muñoz y col., (1997) encontraron dos isoenzimas de lacasas I y II en el medio de cultivo de *Pleurotus eryngii*. La afinidad de ambas isoenzimas por los sustratos utilizados fue similar excepto para DMP, p-hidroquinona (QH2) y metil-p-hidroquinona (MeQH2), con los cuales presentó alta afinidad la lacasa II y catecol en el caso de la lacasa I. Comparando las constantes cinéticas obtenidas con p-metoxifenol y p-anisidina, se observó que la afinidad de ambas isoenzimas fue más alta para compuestos fenólicos que para aminas aromáticas, aunque la proporción de oxidación de p-metoxifenol fue baja en ambos casos, la lacasa I oxidó de manera más eficiente los fenoles y la lacasa II las aminas. De Souza y col. (2002) trabajaron con *Pleurotus pulmonaris* 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. La enzima lacasa fue la única fenoloxidasas producida por este hongo en el medio sólido, por lo que parece ser que la paja de trigo es un excelente medio para producción de lacasas, probablemente por su composición lignocelulósica. De Souza y Peralta (2003) purificaron la principal isoenzima que se presentó en estas condiciones de crecimiento de *Pleurotus pulmonaris* y determinaron los parámetros cinéticos utilizando siringaldazina, ABTS y guayacol como sustratos. La enzima Lcc2 presentó un bajo valor de  $K_m$ . Se han reportado muchas reacciones catalizadas por lacasas de diferentes hongos. Un estudio comparativo de lacasas obtenidas de diferentes hongos mostró que tienen la habilidad de oxidar ácido metoxifenólico El grado de oxidación es variable y depende del pH (Bollag y Leonowicz 1984). Guillen y col., (2000) reportaron que *Pleurotus eryngii* oxidó dos derivados de hidroquinonas llamadas 2-metoxi-1,4-benzohidroquinina y 2,6-dimetoxi-1,4-benzohidroquinona y que la auto-oxidación de las semiquinonas producidas por la reacción catalítica de lacasas indujo la activación del oxígeno. El compuesto 2,6-dimetoxi-1,4-



benzohidroquinona fue oxidado más eficientemente que el 2-metoxi-1,4-benzohidroquinona,

lo que se puede correlacionar con la alta afinidad de las lacasas por DMP.

Al paso del tiempo se ha incrementado la aplicación de los hongos de pudrición blanca en la biorremediación, la cual fue definida por la EPA (Environmental Pollution Administration) de los Estados Unidos de Norteamérica en 1991, como un proceso que utiliza microorganismos para transformar sustancias tóxicas o peligrosas, en sustancias menos tóxicas o no tóxicas. Los microorganismos pueden ser bacterias u hongos. Algunos hongos de pudrición blanca se están utilizando en la biorremediación debido a su complejo sistema para depolimerización y mineralización de la lignina (Wilkkolazka y col. 2002). En cuanto a las aplicaciones biotecnológicas tenemos los siguientes antecedentes.

En los procesos industriales tales como el blanqueamiento del papel se producen compuestos organoclorados que incluyen clorofenoles, catecol y guayacol. La enzima lacasa de *Coriolus versicolor* mostró decolorar el tetracloroguaiacol y liberar iones cloro. Las lacasas de *Trametes villosa* y *Trametes hirsuta* tienen la habilidad de modificar ácidos grasos y resinas. La cantidad de ácido linoléico, oleico y linolénico, se redujo en los ácidos grasos y la cantidad de resinas conjugadas también disminuyó (Karlsson y col. 2001). En la actualidad, la presencia de compuestos fenólicos en aguas residuales es un problema, ya que éstos son tóxicos y se originan por la utilización de herbicidas fenólicos en la agricultura o actividades industriales (Abadilla y col 2000). Hoy en día, se utilizan las lacasas para oxidar estos compuestos. Las enzimas lacasas producidas por *Pycnoporus sanguineus* se utilizan en la oxidación de colorantes presentes en aguas residuales. *Pycnoporus cinnabarinus* ha mostrado que degrada una amplia gama de colorantes (Hardin y col. 2000). También, se tienen registros de la capacidad de una isoforma de *Lentinula edodes* para transformar algunos colorantes como el azul brillante R, Azul de bromofenol, Rojo de metilo, Negro azul naftol, entre otros (Nagai y col., 2002). Algunos hongos de pudrición blanca son capaces de transformar el 2,4,6-trinitrotolueno a dinitrotolueno, asimismo llevan a cabo la mineralización a CO<sub>2</sub> (Pointing 2001). Por otra parte, *Phanerochaete chrysosporium*, *Bjerkandera adusta* y *Phlebia radiata* tienen la habilidad de degradar diversos colorantes los cuales pueden ser parcialmente

Como antecedentes directos de este trabajo tenemos lo siguiente. El hongo de pudrición blanca *Pleurotus ostreatus* produce al menos ochos diferentes isoenzimas de lacasas, seis de ellas han sido aisladas y caracterizadas (Sannia y col. 1986; Palmieri y col. 1993, 1997; Giardina y col. 1999). La principal proteína presente en los cultivos es la de 59kDa con pI en 2.7. Las isoenzimas POXA2, POXB1 y POXB2 mostraron un peso molecular alrededor de los 67kDa, mientras que POXA1b y POXA1w son menores (61kDa). Las

mediadores redox (Pozdnyakova y col. 2004). aromático (95% en dos días) y al fluoranteno (14% en dos días) con un pH óptimo de 6 sin por el hongo. La lacasa amarilla de *Pleurotus ostreatus* degrada al antraceno policíclico como el aceptor final de electrones, en cambio el peróxido de hidrógeno debe ser producido molecular a diferencia del peróxido de hidrógeno está disponible en el sistema de reacción lacasas a diferencia de las peroxidadas ligninolíticas utilizan oxígeno molecular. El oxígeno col. 2004). Estas propiedades son importantes al momento de pensar en biorremediación. Las 2003), pesticidas (Torres y col. 2003) y compuestos policíclicos aromáticos (Pozdnyakova y col. 2003), colorantes sintéticos (Rodríguez y col. 1999; Abadulla y col. 2000; Zille y col. rango de compuestos xenobióticos (Royarcand y Archibald 1991; Roper y col. 1995; Bollag y muestran una especificidad amplia por sustrato y por tanto, son capaces de oxidar un amplio producción de enzimas y con 2,5-xilidina mostró alta actividad de lacasas. Las lacasas incremento 2.8 y 2.0 veces más respectivamente, mientras que con guayacol no se estimuló la utilizando inductores. Con lignosulfonato y alcohol veratrílico la actividad de las lacasas se Eggert y col. (1996) incrementaron la actividad de lacasa en *Pycnoporus cinnabarinus*

incompleta.

angulares, lineales o agrupados y se forman principalmente como producto de la combustión compuestos aromáticos que contienen dos o más anillos bencénicos fusionados en arreglos altamente tóxicos y están distribuidos en ambientes terrestres y acuáticos, son un grupo de (PAHs) hay incorporación directa del oxígeno dentro del anillo aromático. Los PAHs, que son col. (1996) reportaron que durante la oxidación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos mineralizados por el sistema enzimático de estos hongos (Wilkolazka y col. 2002). Collins y



Recientemente, Téllez-Téllez y col., (2005) evaluaron la actividad intracelular y extracelular de 10 cepas del género *Pleurotus* sobre cinco sustratos (DMP, ABTS, siríngaldazina, p-anisidina y o-tolidina). Los resultados muestran a los hongos del género *Pleurotus* como importantes productores de enzimas lacasas, pues todas las cepas presentaron actividad sobre todos los sustratos. En general, la actividad extracelular fue mayor que la intracelular. El mejor sustrato para evaluar actividad de lacasas fue ABTS seguido de o-tolidina. Los patrones zimográficos de lacasas mostraron una relación entre el número y tamaño de las isoformas con la especie estudiada.

Hublik y Schinner (2000) purificaron una isoforma lacasa de *Pleurotus ostreatus* cepa RK 36, la cual se indujo por la adición de ácido telúrico al medio de cultivo. La enzima presentó un peso molecular de 67kDa y un punto isoeléctrico de 2.6. Se identificaron sus centros de cobre por espectrofotometría, encontrando T1 con un pico de absorbancia a 604nm. Reportaron un pico de absorbancia a 324nm que sugiere la presencia de T3. La actividad enzimática fue estable en un rango de pH de 5 a 9 con siríngaldazina como sustrato y una temperatura óptima de actividad de 50° C. La enzima purificada y caracterizada fue inmovilizada por enlaces covalentes para la eliminación continua del DMP en solución acuosa (1mM).

isoenzimas POXA3a y POXA3b son heterodímeros compuestas por una proteína grande (61kDa) y una subunidad chica (16 o 18 kDa). A pesar de que POXC es la de mayor abundancia en los cultivos tanto intracelulares como extracelulares, la mayor producción de mRNA se detectó en POXA1b, la cual es probablemente la principal enzima intracelular o asociada a la pared. La producción de isoenzimas lacasas en *Pleurotus ostreatus* está regulada por la presencia de cobre y las dos isoenzimas dimericas sólo fueron detectadas en presencia de cobre (Palmieri y col. 2000, 2003) La isoenzima POXA1 mostró la máxima actividad en un intervalo de 45-65°C y POXA2 tuvo intervalos inferiores de temperatura, con valores de actividad máxima entre 25-35°C.



Ticutil-Berstein y col., (2008), purificaron una enzima lacasa de *Pleurotus ostreatus* cepa ATCC 32783, producida por fermentación sumergida. La cepa utilizada presentó cuatro isoformas de lacasa a las 432 horas de fermentación a 25°C y con agitación orbital de 120 rpm. La isoforma purificada presentó un peso molecular de 43.7 KDa, su punto isoeléctrico fue de 2.27, la velocidad máxima de actividad se reportó a 1.18  $\Delta$ Abs/min con 2.6 dimetoxifenol como sustrato. La constante de Michaelis-Menten fue de 90  $\mu$ M, la temperatura óptima de actividad fue de 40°C y su pH óptimo de 4.5. La isoforma purificada es una lacasa no descrita para esta especie de hongo.

Juárez (2005), optimizó las condiciones para la fermentación sumergida con la cepa ATCC 32783 de *P. ostreatus*. La composición del medio de cultivo que utilizó mostró un buen control de pH. Mostró el efecto inductor del cobre en la producción de lacasas por fermentación. Encontró que según las condiciones del medio de cultivo se expresan diferentes isoformas de lacasas. Determinó por zimografía tres isoformas. Concluye sobre la capacidad de utilizar diversos sustratos para lacasas, incluyendo a los colorantes.

#### 4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

?Existen diferencias fisiológicas y de producción de enzimas lacasas observadas por fermentación sumergida entre las cepas P037 y P052 aún siendo de la misma especie?

?Las enzimas lacasas de las cepas P037 y P052 obtenidas por fermentación sumergida tendrán la capacidad de oxidar diferentes sustratos?

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la producción de lacasas por fermentación sumergida de dos cepas de *Pleurotus ostreatus*.

### 5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el desarrollo de dos cepas de *Pleurotus ostreatus* por fermentación sumergida para la producción de lacasas.
- Evaluar la actividad de lacasas sobre cinco diferentes sustratos.
- Evaluar el número de isoformas producidas por cada cepa.



## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Cepas de *Pleurotus ostreatus*

En la Tabla 1 se muestran las cepas que se utilizaron en este estudio. Ambas se sembraron mensualmente sobre agar extracto de malta (AEM) preparado con extracto de paja en una relación de 33.6 g de AEM por cada litro de extracto de paja. Se conservaron en refrigeración a 4°C.

Tabla 1. Cepas de *Pleurotus ostreatus* empleadas en el estudio

Cepa	Abreviatura	Procedencia
ATCC-38537	Po 37	American Type Culture Collection. Maryland, U.S.A.
ATCC-58052	Po 52	American Type Culture Collection. Maryland, U.S.A.

### 6.2 Obtención del inóculo

El micelio que se utilizó como inóculo de las fermentaciones se desarrolló sobre AEM, a una temperatura de 25°C por siete días (Téllez-Téllez y col. 2003). Los inóculos se tomaron de la

periferia de las colonias con un diámetro aproximado de 4 mm, colocando tres de estos discos de micelio por cada matraz. Todo procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad.

### 6.3 Fermentación en medio líquido

Cada cepa se cultivó por fermentación en medio líquido en matraces de 125 ml, con 50 ml del medio de cultivo a pH de 6.0 (Tabla 2). Se incubaron con agitación orbital de 120 rpm a 25°C hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento del hongo, tomando muestras cada 24 h. Cada fermentación se realizó por triplicado.

Tabla 2. Composición del medio de cultivo

Componente	Cantidades (g/l)
Glucosa	10.0
Extracto de levadura	5.0
$K_2HPO_4$	0.4
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.001
$KH_2PO_4$	0.6
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.05
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.25

Juárez (2006).

### 6.4 Obtención de los extractos crudos enzimáticos y de la biomasa

En cada muestreo, el extracto crudo enzimático (ECE) se obtuvo por filtrado y retención de la biomasa a través de papel filtro Whatman No. 4 a peso constante. La biomasa retenida sobre el papel Whatman se seco a una temperatura constante de 50° C para su cuantificación (Díaz-Godínez y col. 2001).

### 6.5 Cuantificación de la proteína soluble en el ECE

La proteína total soluble fue medida en los ECE libres de células por el método de Bradford (1977) por triplicado. A 50 µl de extracto se le adicionaron 200 µl del reactivo de Bradford, el volumen se ajustó a 1 mL con agua destilada, y se leyó la absorbancia a 595 nm. Se utilizó albúmina sérica bovina como estándar.

### 6.6 Parámetros cinéticos de crecimiento de *F. ostreatus* y de producción de lacasa

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 col. 2001).

$$\frac{dX}{dt} = \mu \left( X - \frac{X^2}{X_{\max}} \right) \quad (1)$$

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

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

Donde

$\mu$  = Velocidad específica de crecimiento ( $\text{h}^{-1}$ ).

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

$X_0$  = Valor de biomasa inicial ( $\text{g/L}$ ).

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

$$C = \frac{X_0}{X_{\max} - X_0}$$

Se calcularon además los siguientes parámetros:



Se estableció el contenido de azúcares totales residuales por el método de DNS, por triplicado. Se preparó una solución al 1% de hidróxido de sodio (NaOH), 0.05% de sulfito de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ), 0.2% de fenol, 1% de DNS, disueltos en ese orden uno por uno. Se agregó 1 mL de la muestra disuelta 1:10, posteriormente se adicionaron 2ml del reactivo DNS. Se colocaron los tubos en agua en ebullición durante 5 minutos, inmediatamente se pasaron a agua fría para detener la reacción y se leyó la absorbancia a 575nm.

### 6.8 Azúcares residuales

45.

Todas las mediciones de pH se realizaron utilizando un potenciómetro marca Conductronic Pc

### 6.7 Determinación de pH

$q_s$  = 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.

### 6.9 Determinación de la actividad de lacasas *in vitro*

La actividad de lacasas se cuantificó utilizando como sustratos a los siguientes compuestos: 2,6-dimetoxifenol (DMP), 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS), sirringaldazina, p-anisidina y o-tolidina (Télliez-Télliez y col. 2005). Una unidad de actividad (U) de lacasas medida por cualquier método aquí descrito se consideró como la cantidad de enzima que provoca un incremento de una unidad de absorbancia por minuto. El ensayo enzimático se realizó dependiendo del sustrato utilizado:

a) DMP: la mezcla de reacción contuvo 950  $\mu$ l de DMP 2 mM en buffer de fosfatos 0.1 M y pH de 6.5, 50  $\mu$ l de ECE, se incubó durante 1 min a 39°C. La absorbancia se leyó a 468 nm.

b) ABTS: la mezcla de reacción abarcó 950  $\mu$ l de ABTS 0.5 mM en buffer de acetatos 0.1 M y pH de 5.0 y 50  $\mu$ l de ECE, se incubó durante 1 min a 30°C. La absorbancia se estableció a 420 nm.

c) Sirringaldazina: la mezcla de reacción contuvo 50  $\mu$ l de sirringaldazina al 1% (en etanol), 900  $\mu$ l de buffer de fosfatos 0.1 M y pH de 6.5 y 50  $\mu$ l de ECE, se incubó durante 1 min a 39°C. La absorbancia se determinó a 527 nm.

d) p-anisidina: la mezcla de reacción contuvo 950  $\mu$ l de p-anisidina (10 mM) en buffer de fosfatos 0.1 M y pH de 6.5 y 50  $\mu$ l de ECE, se incubó durante 1 min a 39°C. Se fijó la absorbancia a 460 nm.

e) o-tolidina: la mezcla de reacción contuvo 950  $\mu$ l o-tolidina (2 mM) en buffer de acetatos 0.1 M y pH de 3.7 o 50  $\mu$ l de ECE, se incubó durante 1 min a 30°C. La absorbancia se leyó a 627 nm.

### 6.10 Determinación de la actividad de lacasas por zimografía

La actividad de lacasas se detectó *in situ*, usando zimogramas, basados en la técnica modificada SDS-PAGE de Laemmli (1970). Los zimogramas se realizaron con alícuotas de

ECE con actividad de lacasas. El gel de separación contenía 10% de acrilamida, 2.7% de *bis*-acrilamida. El gel de empaquetamiento 4% de acrilamida y 2.7% de *bis*-acrilamida. El gel de SDS fue de 0.1% en el gel. El buffer de corrida contenía: 0.5% M Tris-HCL pH 6.8, 35% glicerol, 0.01% de azul de bromofenol y 10% de SDS. Se usaron gels de 0.75 mm de espesor en un sistema de electroforesis Mini-Protean III (BioRad) a 150 voltios por 1-1.25 horas. Después de la corrida los gels se lavaron con agua desionizada con ayuda de un agitador orbital (20-30 rpm) por 1-2 horas, se cambió el agua cada media hora para eliminar el SDS y renaturalizar a las proteínas. Posteriormente los gels se incubaron por 18-24 horas a temperatura ambiente en presencia de DMP 2 mM en buffer de fosfatos 0.1M pH 6.5. La actividad oxidativa de lacasas apareció como zonas oscuras en los gels.



## 7. RESULTADOS

### 7.1 Caracterización de la fermentación

Se realizaron las fermentaciones para cada cepa por triplicado bajo las mismas condiciones. Cada muestra se leyó por triplicado para la obtención de todos los datos: biomasa, concentración de proteína, actividad de lacasas y azúcares residuales. Es decir, cada valor obtenido resultó del promedio de nueve valores. Es necesario aclarar que los valores por triplicado de cada muestra son considerados como pseudoréplicas, y únicamente tienen el propósito de disminuir el error experimental. Para el caso del pH sólo se tomo una lectura por muestra.

### 7.2 Biomasa

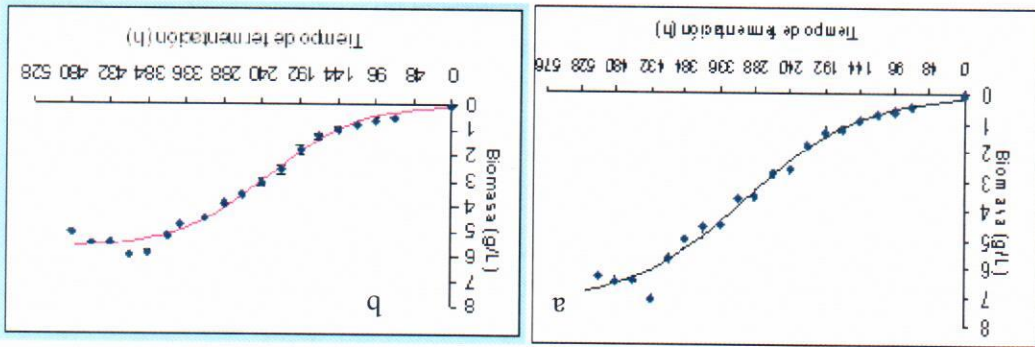
La biomasa producida durante la fermentación para las cepas Po 37 y Po 52 se muestra en la figura 5. Se observó que la fase de adaptación para ambas cepas tardó alrededor de 96 horas, a partir de la cual inició la fase exponencial que terminó a las 432 horas para Po 37 y a las 384

La concentración de proteína soluble en el ECE de ambas cepas se muestra en la figura 6. Se encontró proteína al inicio de la fermentación, lo cual se puede explicar por la presencia de levadura adicionada al medio de cultivo, ésta tuvo un valor cercano a 0.02 g/L. Las dos cepas se mantuvieron a lo largo de la fermentación con cantidades aproximadas de proteína, alrededor de 0.04 g/L, especialmente a partir de las 192 horas para Po 52 y de las 240 horas para Po 37. Hacia el último día de la fermentación la cepa Po 52 mostró la mayor producción de proteína extracelular, correspondiente a 0.07 g/L.

### 7.3 Concentración de proteína soluble en el ECE

Los coeficientes de correlación del modelo matemático y los datos obtenidos experimentalmente fueron de 0.978 y 0.985 para la cepa Po37 y Po52 respectivamente. Los valores de  $\mu$  para cada cepa fueron: Po37 0.017 h<sup>-1</sup> y para Po52 0.012 h<sup>-1</sup>.

Figura 5. Curva de crecimiento de *P. ostreatus* en fermentación sumergida para las cepas Po 37 (a) y Po 52 (b)



horas para Po 52. En seguida observamos la fase estacionaria para cada fermentación. La  $X_{max}$  obtenida fue de 7.08 g/L para Po 37 y de 6.06 g/L para Po 52.

Para la cepa Po 52 la actividad de lacasas, para los cinco sustratos utilizados, se muestra en la figura 8. En este caso el sustrato con el cual se registró mayor actividad corresponde al ABTS, seguido en orden descendente por tolidina, sirtingaldazina, DMP y finalmente por la anisidina. Se puede apreciar que para los cuatro primeros sustratos con mayor actividad, la actividad no presenta cambios hasta las primeras 288 horas. A partir de las 288 horas se incrementó la actividad de lacasa, excepto para anisidina, donde la actividad es baja y sin grandes modificaciones a lo largo de la fermentación.

La actividad de lacasas utilizando 5 diferentes sustratos para la cepa Po 37 se muestra en la figura 7. Se puede observar que se presentaron diferencias en la actividad con cada sustrato, siendo la mayor actividad para sirtingaldazina, seguida de tolidina, ABTS, DMP y anisidina. Con sirtingaldazina, tolidina, ABTS, y DMP, se observó una tendencia al incremento de la actividad conforme avanzó la fermentación. Para anisidina la actividad fue muy poca y osciló alrededor de valores menores de 800 U a lo largo de toda la fermentación.

**7.4 Actividad de lacasas**

**Figura 6. Valores de proteína extracelular en las cepas Po 37 y Po 52**

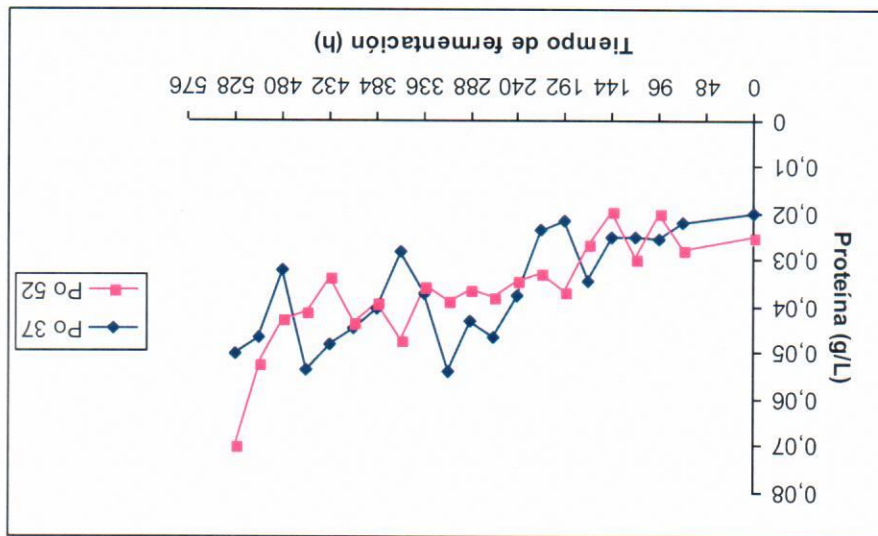




Figura 8. Actividad de lacasas de la cepa Po52

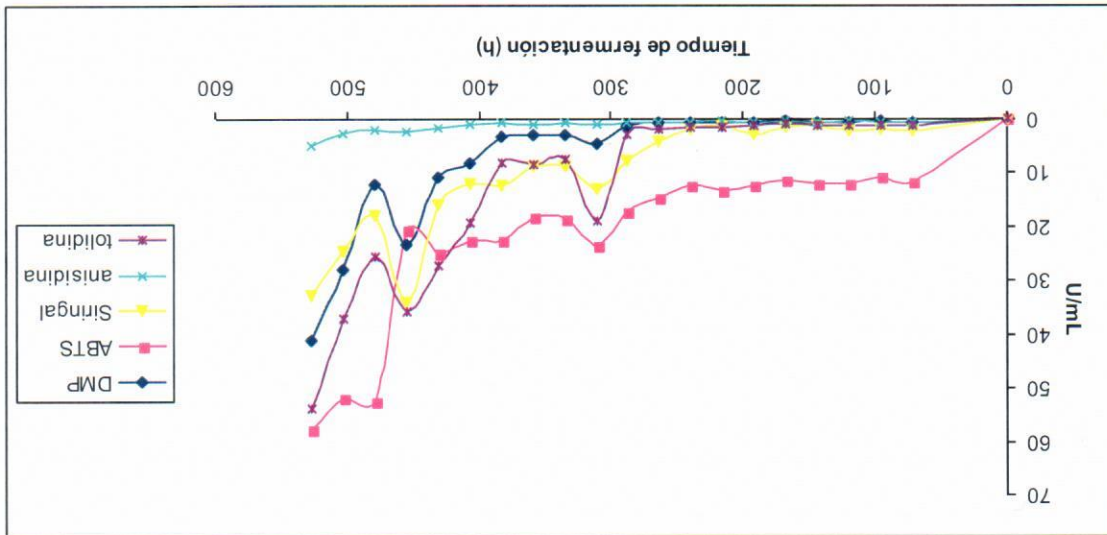
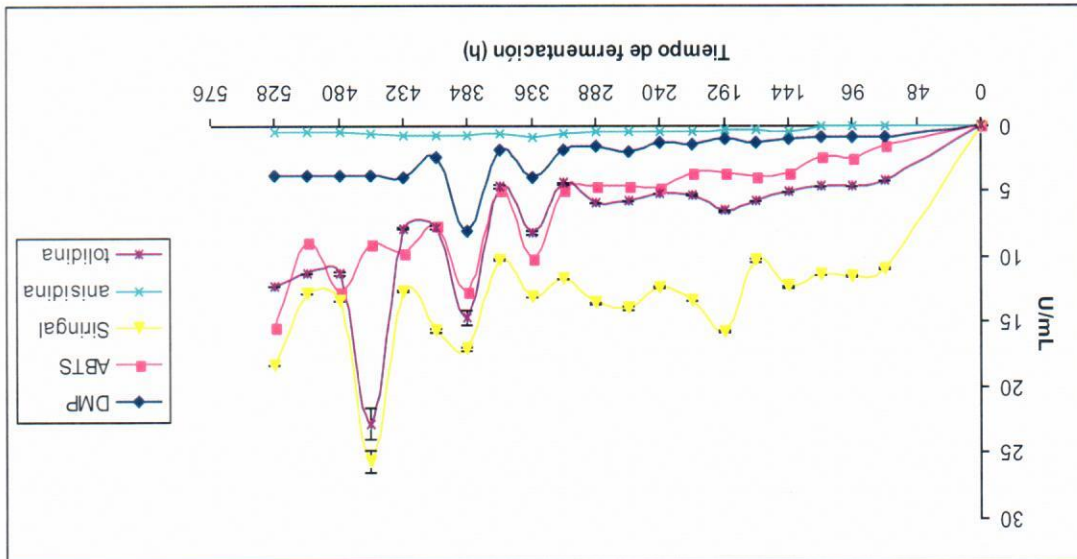


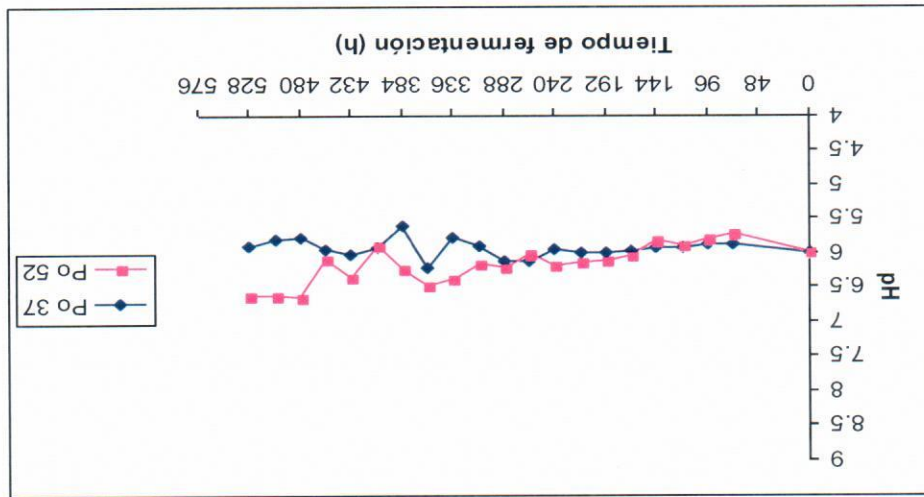
Figura 7. Actividad de lacasas de la cepa Po 37



En la figura 10 se puede observar que la concentración de glucosa se reduce drásticamente pasando las 312 horas, que coincide con el inicio de la fase estacionaria de crecimiento del hongo en ambas cepas. Los valores de glucosa se hacen cero a las 456 horas.

### 7.6 Cuantificación de azúcares residuales

Figura 9. Perfiles de pH obtenidos en fermentación sumergida.



Los cambios de pH en ambas fermentaciones se mantienen alrededor del 6, debido principalmente a la presencia de los aminoácidos presentes en el extracto de levadura y en segundo lugar al buffer de fosfatos que contenía el medio de cultivo. Para la cepa Po 37 se registraron los cambios más drásticos de pH, de las 336 a las 408 horas alcanzando sus valores máximo y mínimo en toda la fermentación: 5.6 y 6.21. Para la cepa Po 52 observamos que hacia el final de la fermentación los valores de pH fueron mayores, alrededor de 6.6. Los resultados se muestran en la figura 9.

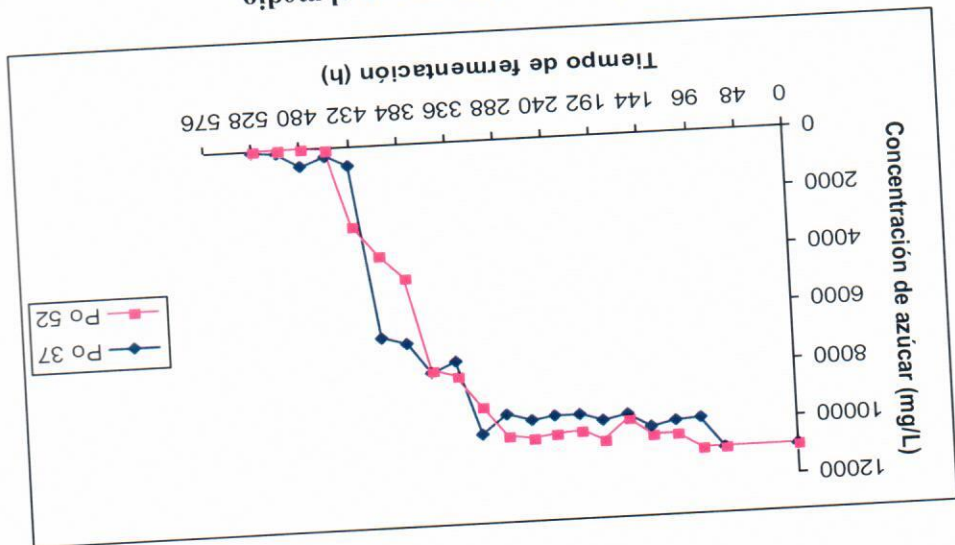
### 7.5 Perfiles de pH

Para la cepa Po52, aparecen al menos tres isoformas. En el primer día de fermentación, no se observó ninguna de ellas. El segundo día observamos dos isoformas, una de ellas —la de mayor peso molecular— se mantiene a lo largo de toda la fermentación y esa banda va aumentando en intensidad gradualmente hasta el final. La segunda banda, aparece y desaparece en los primeros 8 días y a partir de ahí se mantiene constante hasta el final, de igual modo aumenta la intensidad de la banda. Aparece una tercera banda en día tres y hasta el día ocho claramente, después parece ir desapareciendo.

En las figuras 11 y 12 se muestran las isoformas encontradas en cada punto de la fermentación. Para la cepa Po 37 observamos que desde el inicio hay dos isoformas, siendo la de menor peso molecular la que presenta más actividad al inicio y poco a poco la va perdiendo hasta desaparecer al final de la fermentación (día 16). La de mayor peso molecular se presentó en toda la fermentación. En los días 14 y 15 de la fermentación observamos claramente como aparece otra isoforma intermedia. La intensidad de las bandas varía a lo largo de la fermentación, lo que se corresponde con los valores obtenidos de actividad de lacasas.

7.7 Determinación del número de isoformas de lacasas

Figura 10. Determinación de azúcares reductores en el medio.





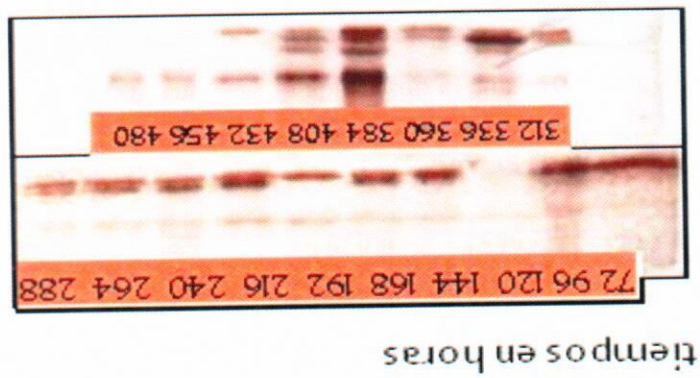
En la Tabla 3 se muestran los parámetros cinéticos de crecimiento y de producción de lacasas de ambas cepas, cabe mencionar que fueron calculados a partir de la actividad observada con DMP para poder comparar con otros estudios donde han utilizado el mismo sustrato.

### 7.8 Cálculo de rendimientos

Figura 12. Isoformas de lacasas de la cepa P052



Figura 11. Isoformas de lacasas de la cepa P037.



Cepa	$Y_{X/S}$	$Y_{E/X}$	$q_s$	$q_p$	$X_{max}$	$\mu$	P
	$g X/g S$	$U/g X$	$g S/g X h$	$U/g X h$	$g/L$	$h^{-1}$	$U/L h$
Po 37	0.51	1423	0.033	24	7.08	0.017	26.1
Po 52	0.54	5665	0.020	68	6.06	0.012	75.8

La cepa Po 52 presentó una  $Y_{E/X}$  aproximadamente 5 mayor, una  $q_p$  y una P aproximadamente 3 veces mayor que la observada por la cepa Po 37, además esta cepa mostro una  $q_s$  50% mayor que la cepa Po 52. Estos resultados sugieren que la cepa Po 52 metaboliza de una manera mas eficiente la glucosa consumida, ya que existe una mayor producción de biomasa y de actividad de lacasas, aunque con una menor  $\mu$  lo cual se refleja en una menor  $q_s$ . La P mayor de la cepa Po 52 sugiere una cepa mas eficiente para la producción de lacasas.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de crecimiento de *P. ostreatus* y de producción de lacasas

## 8. DISCUSIÓN

Se observó que los valores de biomasa producida por ambas fue muy parecida a las obtenidas para otras cepas por FML (6-7 g/L), sin embargo, los valores de  $\mu$  para ambas cepas fue menor, lo que sugiere que estas cepas son lentas para su desarrollo (Tlecutil-Beristain y col. 2008; Téllez-Téllez y col. 2005 y 2008). Con base a las curvas de consumo de sustrato se observó que ambas cepas agotaron los azúcares, por lo que las diferencias en rendimiento de biomasa y de actividad de lacasas se debe a factores intrínsecos independientes de su capacidad de asimilación de carbohidratos. Existen pocos estudios que describan la fermentación y 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.

Una de las ventajas de utilizar *Pleurotus ostreatus* en el estudio de las lacasas está en el hecho de que éstas se encuentran extracelularmente. Por ello es importante, como parámetro



de la fermentación cuantificar la cantidad de proteína extracelular presente en el medio de cultivo. En los resultados obtenidos, se puede observar que la cantidad de proteína se mantiene con ligeras variaciones a lo largo de la fermentación con una clara tendencia a aumentar hacia el final de dichas fermentaciones. Podemos observar que la cepa Po 52 tuvo un mayor valor con respecto a su proteína máxima (0.07 g/L), mientras que para la Po 37 fue menor (0.055 g/L), suponemos que las diferencias se deben al metabolismo intrínseco de cada cepa. Comparando lo anterior con los datos obtenidos para biomasa, podemos sugerir que, mientras la cepa Po 37 utiliza una mayor cantidad de nutrientes en la producción de biomasa, la cepa Po 52 utiliza menos recursos en este aspecto, favoreciendo así, la producción de proteína, lo cual también se reflejó en la actividad de las casas.

Con respecto a la actividad enzimática, las diferencias observadas entre cepas sugiere que a pesar de ser la misma especie, las condiciones ambientales en las cuales estaban adaptadas naturalmente cada cepa promovió diferente respuesta en la producción de las casas, posiblemente el estrés ambiental promueve la producción de mas isoformas. Por otro lado, la respuesta sobre los diferentes sustratos sugiere la presencia de diversas isoformas y en diferentes proporción, lo cual se corrobora con los zimogramas. En otros estudios sobre la producción de las casas se P. ostreatus se han observado por FML de tres a cuatro isoformas, lo que se ha atribuido a las condiciones de desarrollo, pero con estos estudios también se atribuye a las condiciones en las cuales se desarrollaba naturalmente.

Las diferencias en actividad observadas entre los diferentes sustratos podrían ser debidos, como se menciono antes a la especificidad de las isoformas por un sustrato en específico y a la concentración de esa isoforma. Sin embargo, no implica que el sustrato que mostro mayor color sea mas oxidado, ya que ese valor depende del coeficiente de extinción molar de cada compuesto.

La  $E_{max}$  observada con DMP en la cepa Po 52 fue aproximadamente igual a la obtenida en las mejores condiciones de FML desarrollando la cepa Po 83, mientras que la cepa Po 37 reportó aproximadamente 4 veces menos (Júarez 2006).

En general, la cepa Po 52 es mejor pensando en términos de aplicaciones biotecnológicas. Pues es una cepa que por un lado, utiliza los recursos disponibles en el medio para generar mayor cantidad de proteína en detrimento de su producción de biomasa. Por otro lado, la proteína que excreta presenta mayor actividad catalítica que la excretada por la cepa Po 37.

## 9. CONCLUSIONES

Se observó que la actividad de lacasas es dependiente de la cepa y no solo de la especie y condiciones de desarrollo, mostrando que la cepa Po 52 es mejor productora de lacasas.

Se determinó que la actividad de lacasas de estas cepas de *P. ostreatus* obtenida por FML, tiene la capacidad de actuar sobre los sustratos evaluados, sin embargo, depende del número de isoformas y concentración de ellas en el ECE.

Dados los patrones de producción de lacasas, se pueden establecer los tiempos de máxima producción dependiendo del tipo de sustrato sobre el cual se aplicará.



- Abadulla E, Tzanov T, Costa S, Robra K-H, Covaco-Paulo A y Gübitz. (2000). Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsute*. Applied and Environmental Microbiology 66:3357-3362.
- Allen RC, Saravis CA, y Maurer HR. (1984). Gel electrophoresis and isoelectric focusing of protein. Ed. Gruter, New York, pp 1-15.
- Alexandre G y Zhulin (2000). Laccases are widespread in bacteria. Trends Biotechnol 18: 41-42.
- Bertrand G (1896) Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. C. R. Hebd. Seances Acad Sci 123: 463-465.
- Binz T y Canevascini G (1997). Purification and partial characterization of the extracellular laccase from *Ophiostoma novo-ulmi*. Curt Microbiol 35: 278-281.
- Bohinski RC. 1991. Bioguinica. Pearson Education. México D.F.
- Bollag JM, Chu HL, Rao MA y Gianfreda L (2003). Enzymatic oxidative transformation of chlorophenol mixtures. J Environ Qual 32: 63-69.
- Boudet AM (2000). Lignins and lignification: selected issues. Plant Physiol Biochem 38: 81-96.
- Bradford MM. (1977). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72:248.
- Bryan W y Wilson K. 1976. Electrophoretic techniques. En Principles and techniques of practical biochemistry. Eduard Arnold 8ed.) John Wiley y Sons, Inc. New York, USA. Pp 98-118.
- Claus H (2003). Laccases and their occurrence in prokaryotes. Arch Microbiol 179: 145-150.

## 10. REFERENCIAS

- Collins PJ, Kotterman MJ, Field JA y Dobson ADW (1996). Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. Appl Environ Microbiol **62**: 4563-4567.
- D'Souza TM, Merritt SC y Reddy A. (1999). Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. Applied and Environmental Microbiology **65**(12):5307-5313.
- Diaz-Godinez G, Soriano J, Augur C y Viniegra-Gonzalez G. (2001). Exopectinases Produced by *Aspergillus niger* in Solid-State and Submerged Fermentation: A Comparative Study. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology **26**:271-275.
- Duran N, Rosa AM, D'Amminibale A y Giatreda L (2002). Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. Enzyme and Microbial Technology. **31**: 907-931.
- Edens W, Goins T, Dooly D y Henson J. (1999). Purification and characterization of secreted laccase of *Gaumannomyces graminis* var. tritici. Applied and Environmental Microbiology **65**:3071-3074.
- Egert C, LaFayette PR, Temp U, Eriksson K-E y Dean J. (1998). Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarius*. Applied and Environmental Microbiology **64**:1766-1772.
- Egert C, Temp U y Eriksson K-E. 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarius*: purification and characterization of the laccase. Applied and Environmental Microbiology **62**: 1152-1158.
- Froehner SC y Eriksson KEL (1974). Purification and properties of *Neurospora crassa* laccase. J Bacteriol **120**: 458-465.
- Fukushima Y y Kirk TK (1995). Laccase component of the *Ceriporiopsis subvensispora* lignin degrading system. Appl Environ Microbiol **61**: 872-876.
- 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.
- 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*. Biochem J **341**: 655-663.
- Givaudan A, Effosse A, Faure D, Potier P, Bouilliant ML y Bally R (2004). Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: evidence for a laccase in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*. FEMS Microbiol Lett **108**: 205-210.



- 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.
- Harkin JM, Larsen MJ & Obst JR (1974) Use of syringaldazine for detection of laccase in sporophores of wood rotting fungi. Mycologia 66: 469-476.
- Hatakka A (2001). Biodegradation of lignin. *Lignin, Humic Substances and Coal* (Hofrichter M & Steinbüchel A, eds), pp. 129-179. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- 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.
- Herrera T y Ulloa M (1998). El reino de los hongos: Micología básica y aplicada. Segunda edición. México. DF, UNAM, pp 25-35.
- Hoopes JT y Dean JFD (2004). Ferr oxidase activity in a laccase-like multicopper oxidase from *Liriodendron tulipifera*. Plant Physiol Biochem 42: 27-33.
- Hublik G y Schinner F. (2000). Characterization and immobilization of laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. Enzyme and Microbial Technology 27:330-336.
- Iyer G y Chattoo BB (2003). Purification and characterization of laccase from the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. FEMS Microbiol Lett 227: 121-126.
- Juárez HI. (2005) Optimización de las condiciones de fermentación sumergida para la producción de laccasas de *Pleurotus ostreatus*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala. México.
- Kiiskinen, L. L., Viikari, L. y Krus, K. (2002). Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. Applied Microbiology Biotechnology 59:198-204.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- 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.
- M. Tellez-Tellez, J. F. Fernández, A. M. Montiel-González, C. Sánchez and G. Díaz-Godínez. (2008). Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology. DOI: 10.1007/s00253-008-1628-6



- Mansur M, Suárez T, Fernández-Larrea J, Britsuela M y González A. (1997). Identification of a laccase gene family in the new lignin-degrading basidiomycete CECT 20197. Applied and Environmental Microbiology 63:2637-2646.
- Martins LO, Soares CM, Pereira MM, Teixeira M, Costa T, Jones GH y Henriques AO (2002). Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. J Biol Chem 277: 18849-18859.
- Messerschmidt, A. y Huber, R. (1990). The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase ceruloplasmin. Modelling and structural relationships. *European Journal of Biochemistry* 187:341-352.
- Miller Gail L., (1959). Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31 (3):426-428.
- Molitoris HP y Esser K (1970) The phenoloxidases of the ascomycete *Podospora anserine*. V. properties of laccase I after further purification. Arch Mikrobiol 72: 267-296.
- Munoz C, Guillen F, Martinez AT & Martinez MJ (1997) Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. Curr Microbiol 34: 1-5.
- Munoz C, Guillen F, Martinez AT y Martinez MJ (1997) Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn<sup>2+</sup> oxidation. Appl Environ Microbiol 63: 2166-2174.
- Nagai M, Sato T, Watanabe H, Kawata M y Enri 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.
- Nüske J., Scheibner K., Domberger 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.
- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Scoloni A, Capasso A y Sannia G (1997). A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. The Journal of Biological Chemistry 272(50):31301-31307.
- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Fontanella B y Sannia G. (2000). Copper induction of laccase isoenzymes en the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology 66: 920-924.
- Palmieri G, Cennamo G, Faraco V, Amoresano A, Sannia G y Giardina P (2003). Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. Enzyme Microb Technol 33: 220-230.

- Pozdnyakova NN, Rodakiewicz-Nowak J y Turkovskaya OV (2004). Catalytic properties of yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1. *J Mol Catal B* 30: 19-24.
- Ranocha P, Chabannes M, Chamayou S, Danoun S, JaunEAU A, Boudet AM y Goffner D (2002). Laccase down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar. *Plant Physiol* 129: 1-11.
- Rodriguez E, Pickard MA y Vazquez-Duhalt R (1999). Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Curr Microbiol* 38: 27-32.
- Roper JC, Sarkar JM, Dec J y Bollag JM (1995). Enhanced enzymatic removal of chlorophenols in the presence of co-substrates. *Water Res* 29: 2720-2724.
- Rosconi F, Fraguas LF, Martinez-Dreis G y Castro-Sowinski S (2005). Purification and characterization of a periplasmic laccase produced by *Sinorhizobium meliloti*. *Enzyme Microb Technol* 36: 800-807.
- Royarcand L y Archibald FS (1991). Direct dechlorination of chlorophenolic compounds by laccases from *Trametes (Coriolus) versicolor*. *Enzyme Microb Technol* 13: 194-203.
- Sannia G, Giardina P, Luna M, Rossi M y Buonocore V (1986). Laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnol Lett* 8: 797-800.
- Schwarze F, Engels J y Mattheck C. 2000. Fundamental aspects. En Fungal strategies of wood decay in trees. Springer. pp 5-31.
- Sethuraman A, Akin DE y Eriksson KEL (1999). Production of ligninolytic enzymes and synthetic lignin mineralization by the bird's nest fungus *Cyathus stercoreus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 52: 689-697.
- Srinivasan C, D'Souza TM, Boominathan K y Reddy CA (1995). Demonstration of laccase in the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. *Appl Environ Microbiol* 61: 4274-4277.
- Sterjiades R, Dean JFD y Eriksson KEL (1992). Laccase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) polymerizes monolignols. *Plant Physiol* 99: 1162-1168.
- Thakker GD, Evans CS y Rao KK (1992). Purification and characterization of laccase from *Monocillium indicum* Saxena. *Appl Microbiol Biotechnol* 37: 321-323.
- Tellez-Tellez M, Diaz-Godínez G y Sánchez C. (2003). Physiology of a colony of *Pleurotus pulmonarius* grown on medium overlaid with a cellophane membrane. *Applied Microbiology Biotechnology* 63:212-216.



- Télliez-Télliez M, Sanchez C, Montiel-González AM y Diaz-Godínez G. (2005). Laccase activities of the peripheral and central zones of the vegetative mycelium of colonies of *Pleurotus* species. AgroFoodIndustry HiTech (in press).
- Thurston CF. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140:19-26.
- Timoco R, Pickard AM y Vazquez-Duhalt R. (2001). Kinetics differences of purified laccases from a six *Pleurotus ostreatus* strains. *Letters in Applied Microbiology* 32:331-335.
- Tlecuitl-Bernstain S, Sánchez C, Loera O, Robson GD y Diaz-Godínez G. (2008). Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: production of a novel laccase isoforms. *Mycological Research*. 112: 1080-1084.
- Torres E, Bustos-Jaimés I y Le Borgne S (2003). Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied Catal B-Environ* 46: 1-15.
- Willkollazka AJ, Kochmanska-Rdest J, Malarczyk E, Wardas W y Leonowicz A. (2002). Fungi and their ability to decolourize azo and anthraquinonic dyes. *Enzyme and Microbial Technology* 30:566-572.
- Xu F (1997). Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *J Biol Chem* 272: 924-928.
- Yoshida H (1883). Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. *J Chem Soc* 43. 472-486.
- Zhu XD, Gibbons J, Garcia-Rivera J, Casadevall A y Williamson PR (2001). Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. *Infect Immun* 69: 5589-5596.
- Zille A, Tzanov T, Gubitz GM y Cavaco-Paulo A (2003). Immobilized laccase for decolorization of Reactive Black 5 dyeing effluent. *Biotechnol Lett* 25: 1473-1477.