



Universidad Autónoma de Tlaxcala

**Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado en Ciencias Biológicas**

**Evaluación de enzimas ligninolíticas en micelio y cuerpo
fructífero de *Pleurotus ostreatus***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Biol. Valentín Varela Floriano

D i r e c t o r

Dr. Gerardo Díaz Godínez

Tlaxcala, Tlax.

Mes, Año



Universidad Autónoma de Tlaxcala

**Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado en Ciencias Biológicas**

**Evaluación de enzimas ligninolíticas en micelio y cuerpo
fructífero de *Pleurotus ostreatus***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Valentin Varela Floriano

Comité Tutorial

Director

Dr. Gerardo Díaz Godínez

Asesoras

Dra. Ma. del Carmen Sánchez Hernández

Dra. Maura Téllez Téllez

Tlaxcala, Tlax.

Mes, Año

La presente tesis fue realizada en el laboratorio de enzimología del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, bajo la dirección del Dr. Gerardo Díaz Godínez, con el financiamiento de Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del Proyecto No. **156406**, y el apoyo de la Universidad Autónoma de Tlaxcala a través del Proyecto **CACyPI 2014**.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, por permitir mi formación académica como Maestra.

Al CONACyT por la concesión de una Beca para financiar mis estudios durante toda la maestría (487574).

También, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis, el Dr. Gerardo Díaz Godínez, por todos aquellos conocimientos que ha logrado transmitirme, pero principalmente por haber confiado en mí y de esta manera seguir creciendo de manera intelectual.

A mi comité tutorial.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Agradezco en primer lugar a Dios por concederme la dicha de tener a mis padres, de igual manera agradezco todo su apoyo sincero e incondicional.

En especial a mi mamá por apoyarme en cada paso de mi vida por brindarme su amor y alegría, a mi papá por salir adelante en el cuidado de nuestra familia.

A mis hermanos (Julián y María Elena) por sus sonrisas y apoyo, a mi hermano Jose Eduardo por sus travesuras y risas.

A Julie por acompañarme en estos años, por ser un gran punto de apoyo y solidaridad expresados en forma de amor y muchos otros sentimientos que si se expresaran en palabras se necesitaría únicamente un par ¡TE AMO!

A mis compañeros de laboratorio: Jenny por sus conocimientos y buenos consejos, a Lalo y Miros por querer aprender a mi lado.

A mis amigos: Carlos, Eder, Memo, Beto, el amiguito Saúl, a Sandy, Monse, Nata y Yaja por sus chistes, palabras de apoyo y principalmente por su amistad sincera.

Resumen

La lignina es un heteropolímero muy complejo que es mineralizado a partir de la actividad de una variedad de enzimas ligninolíticas, uno de los organismos capaz de producir dichas enzimas es el hongo *Pleurotus ostreatus* en el presente estudio se desarrolló la cepa 32783, en diferentes sistemas de cultivo: fermentación líquida y fermentación sólida en paja de trigo así como también en espuma de poliuretano. Dentro de los resultados obtenidos pudimos observar en efecto del sistema de cultivo sobre las enzimas de interés, la enzima que presento mayor producción respecto a las otras fue la lacasa. Dentro de los patrones zimográficos pudimos observar que

Índice general

1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1. MARCO TEÓRICO.....	16
1.1.1. Lignina	16
1.2. Microorganismos degradadores de la lignina	18
1.3. Características de los hongos	18
1.4. Hongos de pudrición de la madera.....	18
1.4.1. Hongos de pudrición oscura.....	19
1.4.2. Hongos de pudrición blanda.....	19
1.4.3. Hongos de pudrición blanca.....	19
1.5. Género <i>Pleurotus</i>	20
1.5.1. Ciclo de vida	22
1.5.3. Sitios de unión a sustrato de las peroxidases.	26
1.5.4. Manganeso Peroxidasa.....	27
1.5.5. Versátil peroxidasa.....	29
1.5.6. Alcohol veratril oxidasa (AVO).....	31
1.5.7. Lacasas (LAC)	33
1.5.8. Estructura de lacasas	33
1.6. Importancia biotecnológica de la producción de hongos comestibles.....	34
1.7. Fermentación.....	35
2. ANTECEDENTES.....	36
3. Justificación	41
4. Hipótesis.....	41
5. OBJETIVOS	42
5.1. General	42
5.2. Particulares.....	42

6. METODOLOGÍA	43
6.1. Microorganismo.....	43
6.1.1. Fermentación sólida (FS) en espuma de poliuretano (PUF) y sobre paja de trigo.....	43
6.1.2. Fermentación líquida (FL).....	44
6.2. Obtención del extracto enzimático y cuantificación de biomasa en FL y FS.....	44
6.3. Cuantificación de enzima (LAC).....	45
6.4. Cuantificación enzimática de manganeso peroxidasas.....	45
6.5. Cuantificación enzimática de alcohol veratril oxidasa	46
6.7. Zimografía y geles de electroforesis LAC.....	46
7. RESULTADOS.....	48
7.1. Fermentación sólida sobre paja de trigo para producción de cuerpos fructíferos	48
7.1.1. Oxidasas extracelulares de <i>Pleurotus ostreatus</i> desarrollado sobre paja de trigo.....	48
7.1.2. Actividad enzimática LAC intracelulares fructífero de <i>Pleurotus ostreatus</i> desarrollado sobre paja de trigo.....	49
7.1.3. Actividad enzimática MnP intracelulares de cuerpo fructífero de <i>Pleurotus ostreatus</i> desarrollado sobre paja de trigo.....	50
7.1.4. Actividad enzimática AVO intracelulares de cuerpo fructífero de <i>Pleurotus ostreatus</i> desarrollado sobre paja de trigo.....	51
7.1.5. Actividad enzimática VP intracelulares de cuerpo fructífero de <i>Pleurotus ostreatus</i> desarrollado sobre paja de trigo.....	51
7.2. Fermentación líquida de <i>Pleurotus ostreatus</i>	53
7.2.1. Perfil de pH de fermentación líquida	53
7.2.2. Biomasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> en FL	54
7.2.3. Actividad enzimática de LAC extracelulares en FL	55
7.2.4. Actividad enzimática de MnP extracelulares en FL	56
7.2.5. Actividad enzimática de AVO extracelulares en FL	57

7.2.6.	Actividad enzimática de VP extracelulares en FL	58
7.2.7.	Actividad enzimática de LAC intracelulares en FL	59
7.2.8.	Actividad enzimática de MnP intracelulares en FL	60
7.2.9.	Actividad enzimática de AVO intracelulares en FL	61
7.2.10.	Actividad enzimática de VP intracelulares en FL.....	62
7.3.	Fermentación en medio solido sobre PUF	63
7.3.1.	Perfil del pH de desarrollo de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación solida sobre PUF como sustrato	63
7.3.2.	Biomás de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación solida sobre PUF como sustrato.....	64
7.3.3.	Actividad enzimática LAC extracelulares de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación solida sobre PUF como sustrato	65
7.3.4.	Actividad enzimática MnP extracelulares de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación solida sobre PUF como sustrato	66
7.3.5.	Actividad enzimática AVO extracelulares de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación solida sobre PUF como sustrato.....	67
7.3.6.	Actividad enzimática VP extracelulares de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación solida sobre PUF como sustrato	68
7.3.7.	Actividad enzimática LAC intracelulares de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación solida sobre PUF como sustrato	69
7.3.8.	Actividad enzimática MnP intracelulares de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación solida desarrollado sobre PUF como sustrato.....	70
7.3.9.	Actividad enzimática AVO intracelulares de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación solida sobre PUF como sustrato	71
7.3.10.	Actividad enzimática VP intracelulares de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación solida sobre PUF como sustrato	72
7.4.	Zimogramas de <i>Pleurotus ostreatus</i>	73
7.4.1.	Zimogramas de lacasas del cuerpo fructífero de <i>Pleurotus ostreatus</i>	73

7.4.2.	Zimogramas de lacasas extracelulares producidas en fermentación líquida.....	74
7.4.3.	Zimogramas de lacasas intracelulares producidas en fermentación líquida	75
7.4.4.	Zimogramas de lacasas extracelulares producidas en fermentación sólida	76
7.4.5.	Zimogramas de lacasas intracelulares producidas en fermentación sólida.....	77
7.4.6.	Zimogramas de MnP extracelulares producidas en fermentación líquida	78
7.4.7.	Zimogramas de MnP intracelulares en fermentación sólida.....	79
8.	DISCUSIÓN.....	80
9.	CONCLUSIONES.....	83
10.	BIBLIOGRAFIA.....	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Representación esquemática de la pared celular vegetal.	16
Figura 2.	Estructura parcial de la lignina	17
Figura 3.	<i>Pleurotus ostreatus</i> y sus partes.	21
Figura 4.	Ciclo sexual de <i>Pleurotus</i>	23
Figura 5.	Ciclo de vida de <i>Pleurotus</i> spp.	25
Figura 6.	Lacasas de cuerpo fructífero <i>Pleurotus ostreatus</i>	49
Figura 8.	Actividad enzimática AVO del cuerpo fructífero de <i>Pleurotus ostreatus</i>	51
Figura 9.	Actividad enzimática versátil peroxidasas de cuerpo fructífero de <i>Pleurotus ostreatus</i>	52
Figura 10.	pH de fermentación líquida de <i>Pleurotus ostreatus</i>	53
Figura 11.	Biomás de fermentación líquida de <i>Pleurotus ostreatus</i>	54
Figura 12.	Lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> desarrollado en matraces con medio líquido	55
Figura 13.	Manganeso peroxidasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> desarrollado en matraces con medio líquido	56
Figura 14.	Alcohol Veratril Oxidasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> desarrollado en matraces con medio líquido.	57
Figura 15.	Versátil peroxidasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> desarrollado en matraces con medio líquido.	58

Figura 16. Lacasas intracelulares de <i>Pleurotus ostreatus</i> desarrollado en matraces con medio líquido.	
59	
Figura 17. Manganeseo peroxidadas intracelulares de <i>Pleurotus ostreatus</i> desarrollado en matraces con medio líquido.	60
Figura 18. AVO intracelulares de <i>Pleurotus ostreatus</i> desarrollado en matraces con medio líquido.	
61	
Figura 19. Versátil peroxidadas intracelulares de <i>Pleurotus ostreatus</i> desarrollado en matraces con medio líquido.	62
Figura 20. Perfil de pH de <i>Pleurotus ostreatus</i> desarrollado en Fs con espuma de poliuretano	63
Figura 21. Biomasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> desarrollado en Fs con espuma de poliuretano.	64
Figura 22. Lacasas extracelulares de <i>Pleurotus ostreatus</i> desarrollado en Fs con espuma de poliuretano	65
Figura 23. MnP extracelulares de <i>Pleurotus ostreatus</i> desarrollado en Fs con espuma de poliuretano.	
66	
Figura 24. AVO extracelulares de <i>Pleurotus ostreatus</i> desarrollado en Fs con espuma de poliuretano.	
67	
Figura 25. VP extracelulares de <i>Pleurotus ostreatus</i> desarrollado en Fs con espuma de poliuretano.	
68	
Figura 26. Lacasas intracelulares de <i>Pleurotus ostreatus</i> desarrollado en Fs con espuma de poliuretano.	69
Figura 27. MnP intracelulares de <i>Pleurotus ostreatus</i> desarrollado en Fs con espuma de poliuretano.	
70	
Figura 28. AVO intracelulares de <i>Pleurotus ostreatus</i> desarrollado en Fs con espuma de poliuretano.	
71	
Figura 29. VP intracelulares de <i>Pleurotus ostreatus</i> desarrollado en Fs con espuma de poliuretano.	
72	
Figura 30. Zimograma de lacasas de cuerpo fructífero.	73
Figura 31. Zimograma de lacasas extracelulares producidas en fermentación líquida.	74
Figura 32. Zimograma de lacasas intracelulares producidas en fermentación líquida.	75
Figura 33. Zimogramas de lacasas extracelulares producidas en fermentación sólida.	76

Figura 34. Zimogramas de lacasas intracelulares producidas en fermentación sólida. 77

Figura 35. Manganeso Peroxidasas extracelulares de *Pleurotus ostreatus* obtenidas de fermentación líquida 78

Figura 36. Manganeso Peroxidasas intracelulares de *Pleurotus ostreatus* obtenidas de fermentación sólida 79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividad enzimática de oxidasas extracelulares de *Pleurotus ostreatus*

48

1. INTRODUCCIÓN

Con el pasar de los años, se han generado productos a partir de compuestos químicos que se considerarían como una necesidad para la vida cotidiana, pero dichos productos se convierten en un problema para la población mundial, ya que al ser de origen químico sintético generan un problema de contaminación al ambiente. A éstos compuestos se les denomina xenobióticos, entre los que se encuentran plaguicidas y colorantes por mencionar algunos, aunque de igual manera encontramos compuestos químicos en los desechos de procesos industriales, como en los efluentes de la industria productora de papel y la industria textilera. La mayoría de estos compuestos fenólicos son de carácter tóxico para múltiples sistemas biológicos, ya que son compuestos muy recalcitrantes y con una estructura similar a la lignina, para la degradación de este tipo de compuestos, una alternativa eficaz es la utilización de sistemas enzimáticos — producidos en forma limitada por algunas bacterias y extensivamente por un grupo de hongos— (Kirk y cols. 1987). Dentro de este grupo de hongos degradadores de la lignina se encuentran los denominados, hongos de pudrición blanca, poseen un sistema ligninolítico no específico (Have y cols. 2001). Los hongos de pudrición blanca como *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor*, han sido ampliamente estudiados en la recuperación de efluentes provenientes de la industria papelera, textil, química, por mencionar algunas, su sistema enzimático está constituido principalmente por las enzimas, Manganese peroxidasa (MnP), Lignina peroxidasa (LiP) y Lacasa (LAC), así como las alcohol veratril oxidasa (AVO) y versátil peroxidasa (VP) (Herrera-Mora y cols. 2004; Rothschild y cols. 1999; Ullah y cols. 2000; Cullen y Kersten 2004). Este grupo de enzimas tiene múltiples aplicaciones tanto biotecnológicas, como en el área de la biorremediación, se han realizado múltiples estudios para evaluar y caracterizar sistemas eficientes para la producción de dichas enzimas. De esta manera, en este trabajo se evaluó la actividad enzimática en distintos sistemas de producción como lo son, la fermentación en medio líquido (FL), fermentación en medio sólido (Fs) sobre espuma de poliuretano (PUF), así como su desarrollo sobre paja de trigo donde se evaluaron distintos tamaños del cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus*.

1.1. MARCO TEÓRICO

1.1.1. Lignina

La lignina, después de la celulosa, es el mayor componente de la materia vegetal y la forma más abundante de material aromático en la biosfera. La madera y otros tejidos vasculares contienen alrededor del 20-30% de lignina (Lin y cols. 1992). La mayor parte de ésta se encuentra dentro de las paredes celulares, entremezclada con la hemicelulosa y formando una matriz que rodea las ordenadas microfibrillas de celulosa. Este compuesto provee de rigidez a las plantas superiores ya que actúa como pegamento entre las fibras de celulosa formando la lámina media (Fig. 1) (Kirk y cols. 1987). Estas características le confieren la capacidad de hacer más difícil el acceso a los carbohidratos fácilmente degradables (celulosa, hemicelulosa) de la hidrólisis enzimática microbiana (Fritsche y cols. 1999).

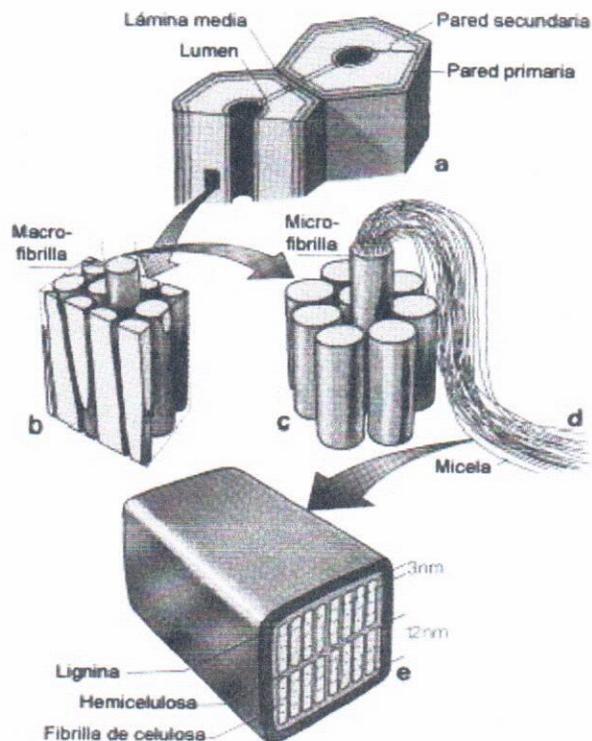


Figura 1. Representación esquemática de la pared celular vegetal. Se muestran cuatro niveles, aumentando de a hacia e. a) Corte transversal de una fibra de madera mostrando la lámina media y la pared celular primaria y secundaria. b) Sección transversal de una porción de la pared secundaria

con microfibrillas. c) Un manojo de microfibrillas. d) Los filamentos micelares. e) Corte transversal de una micela, mostrando la composición ultra estructural: la lignina, hemicelulosa y celulosa.

El espacio entre las fibras vegetales (lámina media), microfibrillas, microfibrillas y los filamentos micelares está ocupado por lignina (Hüttermann y cols. 2001). Este biopolímero contiene alrededor de 10-20% de grupos hidroxilo fenólicos lo cual le confieren rigidez a la pared celular de las plantas, así como la capacidad para protegerlas del ataque de organismos patógenos (Lin y cols. 1992). Una estructura química parcial representativa se muestra en la figura 2.

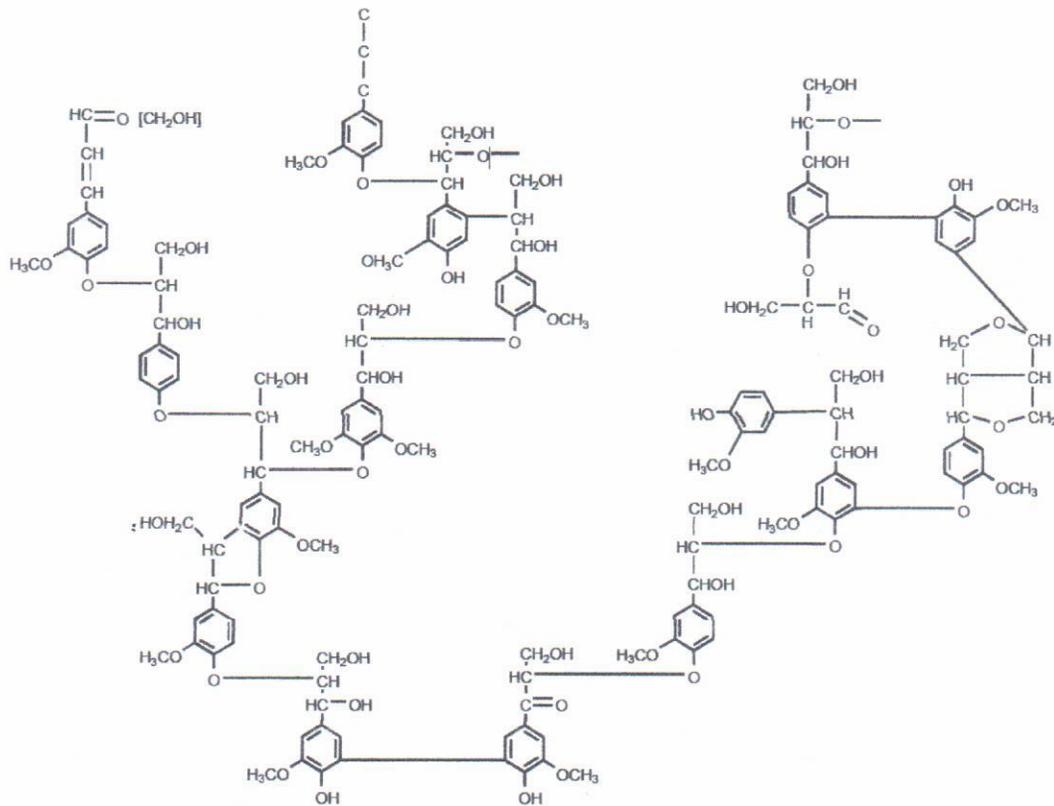


Figura 2. Estructura parcial de la lignina (Dávila y cols. 2006).

1.2. **Microorganismos degradadores de la lignina**

Al ser la lignina un heteropolímero muy recalcitrante, solamente es mineralizado (transformado hasta dióxido de carbono y agua) en forma limitada por algunas bacterias y extensivamente por un grupo de hongos (Kirk y cols. 1987). Dentro de este grupo de hongos degradadores de la lignina se encuentran los denominados hongos de pudrición blanca (Have y cols. 2001). Estos hongos son los únicos organismos capaces de despolimerizar y mineralizar la lignina, permitiendo de esta forma el acceso a los carbohidratos que están embebidos en la matriz de lignina y hemicelulosa (Crawford 1981; Hammel 1997). Este proceso se lleva a cabo, a través de un sistema degradativo no específico y complejo formado por enzimas extracelulares, metabolitos de bajo peso molecular y especies activas de oxígeno capaces de atacar al polímero (Schoemaker 1990).

1.3. **Características de los hongos**

Los hongos, tradicionalmente se han definido con base en sus características, como organismos eucarióticos, productores de esporas, sin clorofila, con nutrición heterótrofa por absorción, capaces de reproducirse sexual y/o asexualmente, cuyos filamentos usualmente son estructuras somáticas ramificadas conocidas como hifas y típicamente son rodeadas por una pared celular rígida (Guzmán y cols. 1993; Alexopoulos y cols. 1996).

1.4. **Hongos de pudrición de la madera**

Los hongos presentan gran variedad de formas de vida, y cada uno con características diferentes así como la manera de degradar la madera. Están clasificados en tres tipos, de pudrición oscura, blanda y blanca.

El ataque enzimático del hongo debilita la madera degradando la celulosa y la lignina de las paredes celulares y sustrayendo la lignina entre células.

1.4.1. Hongos de pudrición oscura

Solo el 6% de los hongos de pudrición conocidos actualmente ocasionan la pudrición oscura. Esta pudrición es causada por hongos basidiomicetos principalmente, lleva este nombre porque al degradar los carbohidratos y polímeros (celulosa y hemicelulosa) presentes en la madera, está adquiere un color oscuro y una consistencia quebradiza (Schwarze y cols. 2000).

1.4.2. Hongos de pudrición blanda

La pudrición blanda la causan, generalmente, los hongos descomponedores de la familia de los ascomicetos, aunque algunos basidiomicetos pueden causar una pudrición similar a la pudrición blanda. Los hongos causantes de pudrición blanda usan un tipo de ataque similar al utilizado por los causantes de pudrición marrón; se degrada preferentemente la celulosa. Los hongos de pudrición blanda atacan la celulosa de las paredes celulares y forman a menudo cavidades microscópicas en la pared secundaria celular (Schwarze y cols. 2000). La pudrición blanda aparece de color paja en fases avanzadas y puede ser difícil distinguirla de la pudrición blanca.

1.4.3. Hongos de pudrición blanca

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

Son organismos aerobios obligados, 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 a partir de la glucólisis en el citoplasma y ciclo de Krebs en la mitocondria que es la misma que la mayoría de los

organismos aeróbicos (Kirk y 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 despolimerización de la hemicelulosa, celulosa y la fragmentación de la lignina.

Presentan dos patrones de descomposición, la pudrición simultánea donde la celulosa, hemicelulosa y lignina, son removidas simultáneamente y la deslignificación, en la cual la lignina es removida antes de la hemicelulosa y celulosa. Los hongos de pudrición blanca rompen la lignina por un proceso oxidativo por medio de fenol-oxidasas que son formadas y liberadas por la hifa, tales como las lacasas, MnP, LiP, tirosinasas y peroxidasas (Schwarze y cols. 2000).

Los hongos basidiomicetos de pudrición blanca como *Pleurotus ostreatus* producen enzimas involucradas en la degradación de la lignina en su hábitat natural (lacasas, MnP y no LiP) (Stajic y cols. 2006; Cohen y cols. 2002). Estos hongos tienen la capacidad de degradar sustancias como dioxinas, bifenilos policlorinados (PCBs), hidrocarburos policíclicos aromáticos, plaguicidas clorados y organofosfatados, entre otras (Robinson y cols. 2001). La acción de estos hongos se basa en la no especificidad del sistema enzimático para depolimerizar y mineralizar la lignina (Moeller y cols. 2003). La degradación de la lignina está estrechamente relacionada con factores ambientales (pH, temperatura, grado de humedad) y con el organismo involucrado en dicha degradación (Palmieri y cols. 1997).

1.5. Género *Pleurotus*

Dada la amplia variedad de hongos y su complejidad estructural, fisiológica y morfológica, ha sido necesario clasificarlos según sus características más intrínsecas. A través del tiempo. De manera general, se considera que las especies del género *Pleurotus* poseen cuerpos fructíferos con un píleo liso o algo escamoso hacia el centro, en forma de embudo, de pétalo de flor o de concha de ostra, con himenóforo lamelado y de consistencia típicamente carnosa o correosa; de colores que van desde el grisáceo, café y hasta rosados; carecen de estípite (sésiles) o bien este es lateral o excéntrico y corto aunque a veces puede ser mediano o largo; sus láminas son poco o nada unidas entre sí en la base, generalmente decurrentes o en algunos casos

subdecurrentes; su carne es blanda y correosa con olor y sabor agradables (Zadrazil, 1974 ; García y cols. 1998; Herrera y Ulloa, 1998). En la figura número 3 se presentan las características estructurales de *Pleurotus*.



Figura 3. *Pleurotus ostreatus* y sus partes. A) El estípite o pie, mientras que en B) hace referencia a píleo o sombrero mientras que C) himenóforo o láminas.

Las especies de *Pleurotus* tienen capacidad de secretar diversas oxidasas y fenoloxidasas lo que les permiten crecer en sustratos que contienen lignina y compuestos fenólicos (Fan y cols. 2003). Al utilizar un sistema que exalte la capacidad que poseen los hongos para degradar compuestos aromáticos complejos, como parte de su metabolismo natural, ha permitido que sean usados en la degradación de diversos compuestos xenobióticos, incluyendo los colorantes sintéticos usados en la industria. Muchos basidiomicetos y ascomicetos han sido usados en la

decoloración de colorantes. Esto puede deberse a que los filamentos fúngicos, son menos sensibles a variaciones en temperatura, pH, nutrientes y aireación (Pant y cols. 2007).

1.5.1. Ciclo de vida

Al conjunto de hifas ramificadas de los hongos se le conoce como micelio, mismo que puede encontrarse en forma monocariótica (un solo núcleo) o dicariótica (dos núcleos). En el caso de los basidiomicetos, bajo condiciones fisiológicas y ambientales específicas, el micelio dicariótico comienza a formar estructuras reproductoras denominadas cuerpos fructíferos (también llamados carpóforos, esporóforos o basidiocarpos) y este proceso es acompañado por la transcripción de genes específicos que producen abundante ácido ribonucleico mensajero (ARNm) (Futoshi y cols. 2004). En el ciclo de vida de estos organismos, se presentan tres fenómenos importantes (Moore-Landecker, 1996; Herrera y Ulloa, 1998):

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

**Cariogamia:* Fusión de los núcleos.

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

Como se muestra en la Figura 4, la fase haploide se presenta cuando existe un número n de cromosomas y las células o grupos de células en este estado se denominan haplontes. La fase diploide se obtiene cuando hay un número $2n$ de cromosomas y las células o grupos de células en este estado se llaman diplontes. En algunos basidiomicetos como en el caso de *Pleurotus*, la cariogamia no se lleva a cabo de manera inmediata a la plasmogamia de tal forma que se produce una fase dicariótica o dicariofase en la cual, se obtiene una célula denominada dicariocito o dicariote misma que posee dos núcleos con diferentes factores de incompatibilidad y cada uno de ellos se conoce como dicarión (Herrera y Ulloa, 1998).

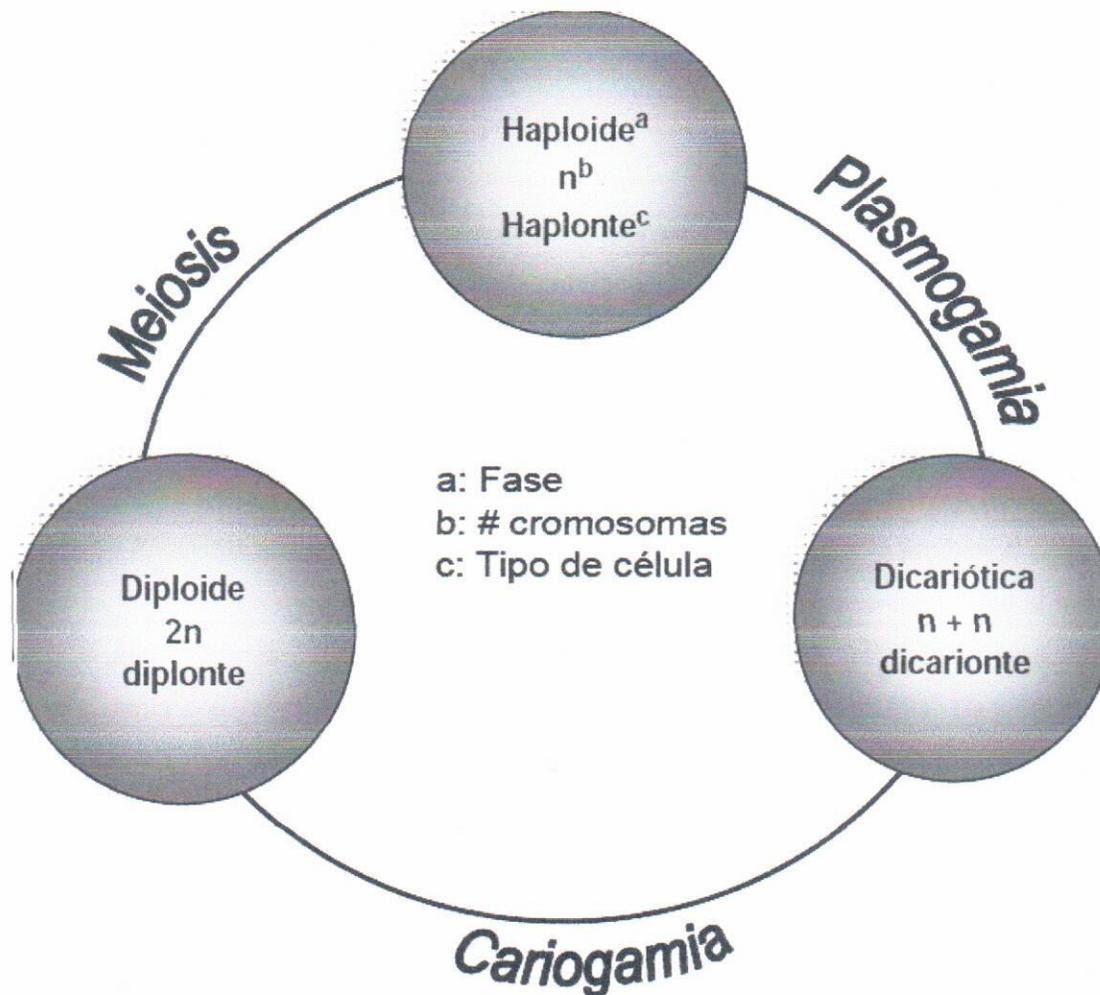


Figura 4. Ciclo sexual de *Pleurotus* (Tomado de Maldonado-Astudillo2007)

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

biológico de *Pleurotus*, se presentan tres fases del desarrollo micelial correspondientes a los tipos primario, secundario y terciario. El micelio primario se forma a partir de la germinación de una basidiospora y está constituido por hifas en estado haploide cuyo único núcleo en cada compartimiento celular se encuentra separado por una estructura denominada septo o doliporo. El micelio secundario por su parte consta de células binucleadas o dicarióticas, deriva del micelio primario y se caracteriza por la presencia de fíbulas [estructuras que permiten la migración nuclear entre hifas en proceso continuo de elongación] y finalmente, el micelio terciario se origina a partir del micelio secundario, se encuentra organizado en tejidos especializados que forman los cuerpos fructíferos y es el tipo de micelio característico en la reproducción sexual de este basidiomiceto (Koltin y cols. 1972; Guzmán y cols. 1993; Herrera y Ulloa 1998). En la Figura 5 se puede apreciar el ciclo de vida de las especies pertenecientes al género *Pleurotus* mediante el cual, la germinación de una basidiospora produce el desarrollo de hifas filamentosas monocarióticas y haploides quienes al ramificarse conforman al micelio, mismo que continúa creciendo de forma monocariótica hasta que pueda realizarse la plasmogamia con otro micelio contiguo que sea sexualmente compatible. Después de que ambas células se fusionan, el septo o doliporo (que permanecía cerrado para evitar el intercambio intracelular) se abre para que pueda ocurrir la migración nuclear y posteriormente la formación del micelio secundario dicariótico mediante la división conjugada simultánea de los dos núcleos iniciales y la distribución de los pares de núcleos hermanos compatibles o dicariones en las células hijas. Una vez formado el cuerpo fructífero, a partir del micelio indiferenciado generado por crecimiento vegetativo, se llevan a cabo los procesos de cariogamia y meiosis. Como producto de este último, se obtienen núcleos haploides (quienes poseen de manera aislada un factor de incompatibilidad), que emigran a una tétrada de esporas formadas en la parte externa del basidio y una vez allí, son liberados durante el proceso de esporulación del basidiocarpo maduro. Si encuentran condiciones ambientales apropiadas, estas basidiosporas germinan produciendo micelio monocariótico y comienzan nuevamente el ciclo (Larraya y cols. 1999; Ramírez y cols. 2000; Valencia-del Toro, 2002).

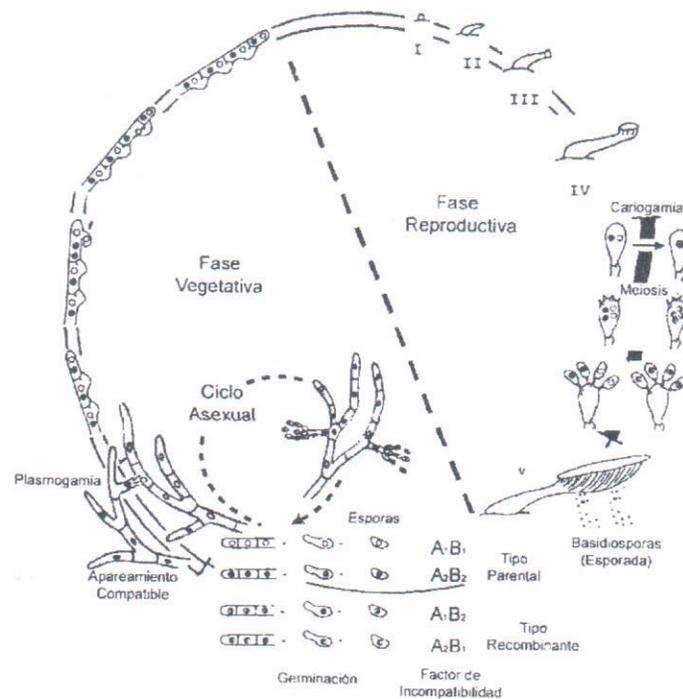


Figura 5. Ciclo de vida de *Pleurotus* spp. (Tomado de: Valencia-del Toro, 2002)

1.5.2. Enzimas ligninolíticas

Durante los setenta, se descubrió la acción de diversas enzimas extracelulares capaces de realizar la ruptura oxidativa de anillos aromáticos, en presencia de peróxido de hidrógeno. El sistema ligninolítico de los hongos de pudrición blanca como *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor*, ha sido ampliamente estudiado en la recuperación de efluentes provenientes de la industria papelera, textil, química, etc., este sistema enzimático está constituido principalmente por Mn-P, LiP y LAC (Herrera-Mora y cols. 2004; Rothschild y cols. 1999; Ullah y cols. 2000). Entre los basidiomicetos más estudiados productores de peroxidases extracelulares se encuentra *Phanerochaete chrysosporium* (Aitken y cols. 1989).

Al ser las enzimas expresadas por los hongos como un proceso idiofásico, el cual está ligado a la limitación de carbono y/o nitrógeno o sulfato en el medio y su síntesis es particularmente activa con altas tensiones de oxígeno (Dosoretz y cols. 1990; Michel y cols. 1991; Rothschild y cols. 1995; Rothschild y cols. 1999; Schlosser y cols. 1997). Estas enzimas ligninolíticas pueden actuar separadas o en cooperación, dependiendo si el hongo es capaz de producir una o más (Dávila y cols. 2006).

1.5.3. Sitios de unión a sustrato de las peroxidasas.

Las peroxidasas catalizan la oxidación de una gran variedad de sustratos. Estos van desde metaloproteínas (como el citocromo *c*) o polímeros de gran tamaño (como la lignina) hasta pequeñas moléculas aromáticas (sustrato de peroxidasas de plantas y hongos) o iones inorgánicos (como el Mn^{2+} sustrato de peroxidasas producidas por los hongos ligninolíticos). La especificidad de estas enzimas frente a los diferentes sustratos depende de dos factores.

Potencial de reducción de las diferentes formas activas de la enzima (Compuestos I y II) con respecto al potencial de reducción de los sustratos: esta propiedad está determinada por la capacidad de la enzima para estabilizar los elevados estados de oxidación del hierro durante el ciclo catalítico, que se debe tanto al fuerte carácter aniónico del quinto ligando del hierro (histidina proximal) como a la naturaleza hidrofílica de los residuos del lado distal del hemo y a las interacciones electrostáticas en el interior de la molécula (Banci, 1997).

Propiedades estructurales de la proteína, que determinan los sitios de unión a los sustratos: esta especificidad está probablemente modulada por algunos cambios en la superficie de las peroxidasas y por sustituciones en un pequeño número de aminoácidos, sin llegar a provocar un cambio significativo a nivel de la estructura secundaria y del plegamiento global de la proteína (Li y Poulos, 1994; Poulos y cols. 1995).

Mientras que para otras hemoproteína, como los citocromos *P450*, hay estudios cristalográficos sobre la unión proteína-sustrato, en el caso de las peroxidasas dicha interacción ha sido determinada mediante rayos-X solamente en tres ocasiones: en la unión

entre citocromo *C* y citocromo CP (Pelletier y Kraut, 1992), en la unión del Mn^{2+} a la MnP (Sundaramoorthy y cols. 1994) y más recientemente en la unión del BHA (ácido benzohidroxámico) a la peroxidasa de rábano, (Henriksen y cols. 1998). En el primer caso parece ser que las interacciones hidrofóbicas y de Van der Waals son las fuerzas dominantes que mantienen unido el complejo citocromo c-CcP, mientras que en la MnP la esfera de coordinación del Mn^{2+} se mantiene gracias a la formación de un complejo entre el Mn^{2+} y una serie de residuos ácidos de la proteína. En el caso de la HRP se ha observado la existencia de un bolsillo hidrofóbico que rodea el anillo aromático del sustrato en el canal del hemo. En lo que se refiere a la unión de las peroxidasas a otros sustratos aromáticos, la falta de datos estructurales imposibilita la identificación de los sitios de unión, aunque se han realizado diversas aproximaciones. Así, para la LiP se han construido modelos en los que se reflejan posibles sitios de unión para el alcohol veratrílico (3,4-dimetoxibencílico) (Poulos y cols. 1993), que es un sustrato tipo de esta enzima y actúa como mediador en la degradación del polímero de lignina. También se han determinado posibles sitios de unión, que incluyen residuos de fenilalanina, en base a estudios de $^{111}\text{-NMR}$ (Banci y cols. 1993). Incluso se han realizado estudios de mutagénesis dirigida con la HRP analizando posteriormente la proteína recombinante por $^1\text{H-NMR}$ (Veitch y cols. 1995).

1.5.4. Manganeso Peroxidasa.

Como se describió anteriormente, la principal reacción catalizada por la MnP es la oxidación del Mn^{2+} a Mn^{3+} por el H_2O_2 (Glenn y cols. 1986). El Mn^{3+} es un oxidante con una vida media muy corta en medios acuosos (Archibald y Fridovich, 1982). Sin embargo, los hongos de podredumbre blanca secretan metabolitos aromáticos (como el alcohol veratrílico y el anisaldehído) y alifáticos al mismo tiempo que las enzimas ligninolíticas, incluyendo ácidos dicarboxílicos que actúan eficientemente como quelantes de iones metálicos como el Mn^{3+} (Kirk y Farrell, 1987; Kuan y Tien, 1993). Estos quelantes, entre los que se encuentran el oxalato, no compiten con la enzima por el Mn^{2+} debido a que presentan una constante de unión

muy baja por él. Sin embargo, unen el Mn^{3+} facilitando su disociación de la enzima y lo estabilizan en solución acuosa con un potencial redox elevado (0.9-1.2).

Tras la estabilización del Mn^{3+} producido por la MnP, éste puede difundir en el medio de reacción llegando a zonas donde la enzima no puede acceder. La desventaja que presenta el Mn^{3+} quelado como agente ligninolítico con respecto a la LiP es su bajo poder oxidante en condiciones fisiológicas. La pareja MnP/Mn oxida solamente las unidades fenólicas de la lignina que son minoritarias en la composición global de este polímero, y es capaz de oxidar las unidades no fenólicas. Sin embargo, se ha comprobado que la MnP es capaz de llevar a cabo una despolimerización de la lignina *in vitro* (Wariishi y cols. 1991b), tal como se había demostrado para la LiP. Por otro lado, en un estudio sobre la degradación de la lignina en condiciones naturales por *Pleurotus pulmonarius*, un hongo que no produce LiP, se ha podido comprobar como la adición de Mn estimula fuertemente la mineralización de la lignina (Camarero y cols. 1996). El mecanismo de acción del Mn^{3+} sobre modelos fenólicos es vía formación de un radical fenoxilo que posteriormente evoluciona dando lugar a una serie de productos de reacción parecidos a los obtenidos tras la oxidación por la LP. Se ha comprobado que se producen rupturas $C\alpha-C\beta$ sobre compuestos de tipo diaril propano (Wariishi y cols. 1989).

a) Rupturas alquilfenil y oxidaciones $C\alpha$. Para explicar algunos de los resultados expuestos anteriormente, algunos autores han propuesto que además de poder oxidar compuestos fenólicos a través de la acción del Mn^{3+} , la MnP también puede oxidar compuestos aromáticos no fenólicos a través de ciertos intermediarios entre los que se encuentran radicales derivados de tioles y lípidos insaturados. En presencia de agentes reductores, como los tioles (GSH, DTT, DTE,), el Mn^{4+} puede conducir a la oxidación de compuestos aromáticos no fenólicos (Wariishi y cols. 1989).

b) El mecanismo seguido, a diferencia del de la LiP, no implica la formación de un radical catiónico. El Mn^{3+} producido por la MnP oxida los tioles a radicales tiilo y éstos a continuación pueden sustraer un electrón del $C\alpha$ de un compuesto aromático no fenólico. La degradación oxidativa de compuestos modelo de lignina (fenólicos y no fenólicos) y lignina sintética también se ha observado en reacciones en las se produce la peroxidación de lípidos

insaturados en presencia de MnP y ausencia de H₂O₂ (Bao y cols. 1994). Parece ser que el mecanismo comienza con la autooxidación de los lípidos insaturados, generándose los hidroperóxidos correspondientes. La reducción de éstos por parte de la MnP en presencia de Mn³⁺ daría lugar a radicales peroxilo de los ácidos grasos, responsables en última instancia de la oxidación de la lignina o compuestos relacionados. Los radicales de los lípidos formados por mediación de la MnP son relativamente estables, con una vida media de segundos, y suficientemente pequeños como para poder entrar por los poros de la madera donde enzimas como la LiP no puede penetrar.

1.5.5. Versátil peroxidasa

La VP, es diferente de la MnP y LiP de *Phanerochaete chrysosporium*, es capaz de oxidar MnP²⁺ a MnP³⁺ y catalizar reacciones sobre sustratos aromáticos en ausencia de MnP²⁺ (Davila & Vasquez 2006). Además se encontró que posee una alta afinidad hacia el MnP²⁺, hidroquinonas y colorantes. También es capaz de oxidar al alcohol veratrílico (a veratrilo aldehído), dimetoxibenceno y dímeros de lignina, aunque con menor afinidad que la LiP. El ciclo catalítico de la VP combina los ciclos de la LiP y la MnP. Sus características básicas son comunes a la mayoría de la peroxidasa. Sin embargo, la VP es única ya que es capaz de oxidar sustratos aromáticos como el alcohol veratrílico (AV) a su correspondiente radical AV, el MnP²⁺ a MnP³⁺ y sustratos que la LiP solo oxida en presencia de alcohol veratrílico. El ciclo de la VP incluye la sustracción de dos electrones de la enzima en estado basal por el peróxido de hidrogeno para producir el compuesto IBAB (C-IBAB), que contiene un oxo-Fe IV=O y un radical catiónico en la porfirina. La reducción en dos reacciones de un electrón produce el compuesto IIBAB (C-IIBAB), que contiene un oxo-Fe IV=O. Y después, la forma basal de la enzima.

El ciclo también incluye el compuesto IBBB (C-IBBB), que contiene un oxo-Fe IV=O y un radical triptófano (Trp•) y el IIBBB (C-IIBBB), que contiene un Fe III y un Trp• involucrado en la oxidación de AV y otros compuestos aromáticos de alto potencial redox (C-IBBB y C-IIBBB están en equilibrio con C-IBAB y C-IIBAB, respectivamente). El porcentaje de las

formas A y B en las dos reacciones puede ser variable y su participación en la catálisis dependerá de los sustratos disponibles. En otras palabras, los compuestos IBAB y IIBAB predominarían durante la oxidación de Mn^{2+} , mientras que un porcentaje del Trp^{\bullet} sería necesario durante la oxidación de AV.

Es importante mencionar que esta enzima oxida directamente hidroquinonas y fenoles sustituidos, los cuales no son oxidados eficientemente por la LiP o la MnP en ausencia de veratril alcohol o Mn^{2+} , respectivamente. Incluso oxida colorantes de alto potencial redox, los cuales solo son catalizados por la LiP en presencia de alcohol veratrilico. Para esta enzima, los pH óptimos para la oxidación de Mn^{2+} y sustratos aromáticos son diferentes. Para la oxidación de Mn^{2+} el pH óptimo es de 5, mientras que para los compuestos aromáticos y colorantes es 3. Estos parámetros son similares a los de MnP y LiP, respectivamente.

Son dos los sitios de unión a sustrato en las VPs de *Pleurotus eryngii*, y *Bjerkander adusta*. Uno exclusivo para el Mn^{2+} cerca del grupo hemo, y otro para los sustratos aromáticos en donde tiene un papel fundamental un triptófano superficial. El flujo de electrones desde el triptófano y el grupo hemo se ha demostrado en la VP de *P. eryngii* y se determinó para la VP de *B. adusta*. Estudios bioquímicos muestran la existencia de una inhibición no competitiva entre la oxidación de Mn^{2+} y los sustratos orgánicos, como colorantes de alto potencial redox e hidrocarburos aromáticos. Estos resultados apoyan la idea de la existencia de dos sitios de oxidación con afinidades distintas, que no se ven afectados por la presencia del sustrato alternativo que actúa como inhibidor (Davila & Vasquez 2006). La acción de estas enzimas peroxidadas, requieren la presencia de H_2O_2 , como cofactor. Este es producido por enzimas generadoras de peróxido, como la alcohol veratril oxidasa (AVO), y la glioxal-oxidasa. La AAO, es una flavo enzima extracelular, la cual cataliza la oxidación de alcoholes aromáticos a los aldehídos correspondientes. El aceptor final de electrones es el oxígeno molecular, lo cual deja como producto H_2O_2 . (Cohen, et al., 2002)

1.5.6. Alcohol veratril oxidasa (AVO)

La alcohol veratril oxidasa (EC 1.1.3.7) es una flavo proteína extracelular, su peso molecular se sitúa alrededor de 58 y 78 kDa, estas variaciones son debidas fundamentalmente a distintos grados de glicosilación (Ferreira 2004). Antes de describirse el papel de las peroxidasas en la degradación de la lignina ya se había observado en *Phanerochaete chrysosporium* su capacidad para producir H₂O₂, y la probable implicación de este compuesto en la degradación de la lignina (Faison y Kirk, 1983; Koenigs, 1974). Inicialmente se pensó que el H₂O₂ requerido por las peroxidasas para degradar la lignina era producido por oxidasas intracelulares como la glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4) y metanol oxidasa (EC 1.1.3.13) (Kelley y Reddy, 1986; Nishida y Eriksson, 1987), pero el transporte del Ff202 al medio extracelular es complicado dado su fuerte carácter oxidante. Los estudios posteriores se centraron en oxidasas extracelulares como la glioxal oxidasa (EC 1.1.3.-) de *Phanerochaete chrysosporium* (Kersten y Kirk, 1987), una metaloenzima que oxida aldehídos alifáticos como el glioxal, y la AVO. Esta enzima es una flavoenzima que genera H₂O₂ dentro de un sistema cíclico de óxido-reducción de metabolitos aromáticos sintetizados por el hongo, incluyendo el p-anisaldehído (4-metoxibencílico), (Guillén y cols., 1994; Guillén y Evans, 1994; Gutiérrez y cols., 1994). Además de ser el co-sustrato de las peroxidasas ligninolíticas, el H₂O₂ podría participar en la degradación de la lignina a través de la generación de otras especies activas de oxígeno. Entre éstas se encuentra el OH, fuerte oxidante que podría estar implicado en el ataque inicial a la lignina cuando las enzimas ligninolíticas no pueden penetrar en la pared celular debido a su compacta arquitectura molecular descrita anteriormente (Backa *et al.*, 1993; Evans *et al.*, 1994; Guillén *et al.*, 2000). También ha sido descrito que AVO evita la repolimerización de los productos liberados durante la biodegradación de la lignina (Marzullo *et al.*, 1995).

Estas proteínas pueden llevar como cofactores flavín-adenín mononucleótido (FMN) o flavín adenín dinucleótido (FAD). Estos grupos prostéticos son esenciales para su actividad enzimática, salvo algunas excepciones como la hidroxinitrilo liasa (EC 4.1.2.10), en la que no se sabe que el FAD esté implicado en reacciones redox, sugiriéndose que desempeña un papel

estructural (Dreveny y cols., 2001; Ghisla y Massey, 1989; Jorns, 1979). El ciclo catalítico de las flavoenzimas lo componen dos reacciones: una primera reacción de reducción, donde la flavina es reducida por un compuesto donador de electrones, y una segunda reacción de oxidación donde la flavina reducida es reoxidada, transfiriendo los electrones a un compuesto aceptor y completando así su ciclo. La parte reactiva de la flavina (7,8-dimetilbenzo[g]pteridina-2,4(3H, 1OH)-diona) es el anillo de isoaloxazina. Esta es una molécula anfipática formada por la fusión de un dimetilbenzeno (parte hidrofóbica) con un anillo de pteridina (para hidrofílica). Su reducción es reversible e implica una serie de cambios químicos en el anillo de flavina que afectan a las posiciones N1, C4 y N5. La reducción puede ser en uno o dos pasos, dependiendo si se transfieren dos electrones o un electrón respectivamente. El potencial redox de la flavina libre es de unos -200 milivoltios (mV), pero en las flavoenzimas puede variar en un rango entre -400 mV y $+60$ mV dependiendo del entorno aminoácido (Ghisla y Massey, 1989).

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

1.5.7. Lacasas (LAC)

Inicialmente se pensó que las lacasas desempeñaban un papel esencial en la degradación de la lignina ya que su presencia constituye una característica típica de todos los hongos de podredumbre blanca (capaces de mineralizar la lignina transformando la madera en un material blanco enriquecido en celulosa) estas enzimas son glicoproteínas con pesos moleculares muy amplios (Heinzkill y cols. 1998, Tlecuitl-Beristain y cols. 2008) y temperaturas óptimas entre 50 y 70°C (Morozova y cols. 2007), sin embargo, es posible encontrar enzimas termoestables como la lacasa de *Pycnoporus sanguineus*, con un tiempo de inactivación de 3 horas a 75°C (Litthauer y cols. 2007). Se han clasificado dentro del grupo de oxidasas de cobre azul. La molécula de lacasa, usualmente contiene cuatro átomos de cobre, distribuidos en tres sitios redox (Gianfreda y cols. 1999) Su punto isoeléctrico varía entre 2.6 y 4.5 y presentan actividad en un amplio rango de pH, entre 2.0 y 8.5 aunque el máximo reportado se encuentra entre 3.0 y 5.0 (Leonowicz y cols. 2001, Morozova y cols. 2007). Poseen potenciales de óxido-reducción entre 0.5 y 0.8 eV. Catalizan la oxidación de compuestos fenólicos y no fenólicos, mineralizando un rango amplio de colorantes sintéticos.

1.5.8. Estructura de lacasas

La lacasa es una glicoproteína que contiene, por lo general, entre dos y cuatro átomos de cobre aunque algunas contienen tres o seis átomos, como es el caso de lacasas producidas por *Rhus vernicifera* y *Rhus succedanca* que contienen cuatro y seis átomos de cobre respectivamente (Reihammar y Oda, 1979). Los átomos de cobre que contiene la lacasa son: Cu tipo 1 (T1), Cu tipo 2 (T2) y dos iones Cu tipo 3 (T3). En sus estados oxidados los cobres T1 y T2 exhiben señales específicas en espectros de resonancia paramagnética de electrones (EPR). Por el contrario, los dos iones cobre T3 no son paramagnéticos. El cobre T1 en su estado oxidado absorbe fuertemente la luz a 610 nm (Andreasson y Reinhammar., 1979) El peso molecular de las lacasas extracelulares está entre 60 a 80 KDa del cual del 15 al 20% son carbohidratos (Thurston, 1994); que incluyen a la hexoseamina, glucosa, manosa, galactosa, fructosa y

arabinosa (Yaropolov y cols. 1994). Es una fenol oxidasa que debe su nombre a que fue descubierta, hace más de un siglo, en el árbol japonés de la laca: *Rhus vernicifera* (Yoshida, H. 1883). Esta enzima se encuentra ampliamente distribuida en las plantas superiores, diversas clases de hongos y algunas bacterias (Gianfreda, y cols. 1999).

Varios trabajos han sostenido la hipótesis de que las familias de lacasa pueden tener diferentes papeles en el ciclo de vida del organismo (Solé y cols. 2008).

1.6. Importancia biotecnológica de la producción de hongos comestibles

El cultivo de hongos comestibles es una industria biotecnológica en continuo proceso de expansión y que poco a poco va cobrando mayor importancia en el ámbito económico de muchos países. Hasta 1980, las cuatro especies de hongos comestibles más importantes por su cultivo eran *Agaricus bisporus* (champiñón), *Pleurotus* spp. (Seta, ostra), *Lentinula edodes* (Shiitake) y *Volvariella volvacea*. Desde entonces el género *Agaricus* ha sido el hongo comestible más cultivado y consumido en Europa, Norteamérica y México. Por su parte, *Lentinula edodes* es producido en su mayor parte en Japón, *Volvariella* en países asiáticos y *Pleurotus* en México y Sudamérica (Chang, 1999). En lo que se refiere a los hongos del género *Pleurotus*, han incrementado su popularidad mundial en los últimos años, debido a su habilidad para crecer en un amplio intervalo de temperaturas (22-28°C) y su capacidad para utilizar como sustrato diversos materiales ricos en lignina y celulosa tales como rastrojo de maíz, paja de cereales (Bonatti y cols. 2004), papel (Baysal y cols. 2003), pulpa de café (Salmones y cols. 2005), viruta de madera (Pérez y Mata, 2005), residuos vegetales así como desechos lignocelulósicos de la industria alimenticia (Cohen y cols. 2002; Shashirekha y cols. 2002); para la preparación y acondicionamiento de estos sustratos, se han utilizado varias técnicas tales como la inmersión en agua caliente, pasteurización, esterilización con inyección de vapor, composteo, etc. (Valencia-del Toro, 2003).

1.7. Fermentación

Se ha definido fermentación como al cambio químico sufrido por ciertas sustancias orgánicas a causa de enzimas microbianas, generalmente con desprendimiento de gases. El término deriva del verbo latin *fervere*, ebullición. La apariencia de ebullición se debe a la producción de burbujas de dióxido de carbono, causado por el catabolismo anaeróbico de los azúcares presentes en el extracto. Desde el punto de vista bioquímico, la fermentación es aquel conjunto de reacciones catabólicas productoras de ATP en las cuales moléculas orgánicas actúan como donadores primarios de electrones y como aceptores finales de los mismos (Lehninger, 1979).

La definición de fermentación sólida (FMS) es un proceso natural, mediante el cual se da continuidad a importantes ciclos vitales, dentro de los cuales se destacan los de descomposición de la materia orgánica mediante hongos y levaduras, los cuales tiene una gran habilidad para asimilar residuos ligninocelulósicos (Kondo, 1996; Zadrazil y cols.1996). Viniegra-González (1997). Plantea que “es un proceso microbiológico que ocurre comúnmente en la superficie de materiales solidos que tienen la propiedad de absorber y contener agua, con o sin nutrientes solubles”, haciendo énfasis en que esta definición abarca a procesos donde el soporte sólido es inerte y los sustratos que utiliza el microorganismo pueden ser sustancias solubles en agua. Mientras que Bellon-Maure y col (2003). Hacen énfasis en que el sólido puede incluir al sustrato o ser soporte solamente.

La fermentación en estado líquido (FEL) o fermentación sumergida (FS) hace referencia a aquella en donde hay por lo menos la misma concentración de agua y de sustrato sólido (nutrientes) en el proceso, es decir que hay una solución (Rodríguez-Couto, S. et al. 2006). Estos nutrientes deben ser preferiblemente líquidos o solubles en agua o en su defecto que se encuentren en suspensión. Es el tipo de fermentación más utilizado en la industria debido a que es sencillo, pueden controlarse muchas más variables que en la fermentación en estado sólido (FES) y el producto final es mucho más fácil de recuperar (Crueger & Crueger. 1993). En esta clase de fermentación los microorganismos se desarrollan flotando en el volumen del medio de cultivo, en el caso de los hongos miceliales (mohos), éstos pueden formar pequeñas

esferas de micelio (pellets) cuando hay agitación, de otra forma, crecen en la superficie. El desarrollo del microorganismo se presenta de forma típica, dando origen a una fase de latencia o acoplamiento, una de crecimiento (fase logarítmica), una fase estacionaria y la última, la fase de muerte. La FEL también puede dividirse en varios tipos, por lote, continua y alimentada entre otras, según la entrada y salida de sustrato y producto, respectivamente (Crueger & Crueger. 1993).

2. ANTECEDENTES

D'Souza y cols. (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 aserrín de pino o roble, además de glucosa y celulosa como fuente de carbono. Donde se evaluó la actividad lacasa utilizando 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) como sustrato, una unidad enzimática internacional (UI) fue definida como la formación de un μmol de producto en un segundo en las condiciones dadas. Los resultados mostraron que las lacasas de *Ganoderma lucidum* son las únicas que presentaron actividad a diferencia de las LiP y MnP. Los valores de actividad lacasa después de siete días fueron altas (50 UI/L aproximadamente) cuando la concentración de nitrógeno fue alta comparada con concentraciones bajas de nitrógeno la actividad lacasa fue muy baja (<10 UI/L). Lo que demuestra que las lacasas de *Ganoderma lucidum* no son inhibidas en medios ricos de nitrógeno con glucosa como fuente de carbono, de lo contrario fue estimulada.

En un estudio realizado sobre el extracto extracelular de dos cepas de *Pleurotus ostreatus* (ATCC-38537 y ATCC-58052) desarrolladas en fermentación sumergida, Degollado-Estrada (2008) demostró que no es suficiente contar con un organismo de pudrición blanca para garantizar la producción de lacasas, sino que también es necesario encontrar la mejor cepa productora. Muchos reportes describen que la producción de enzimas ligninolíticas depende fuertemente de la cepa, sustrato y las condiciones de cultivo (Stajic y cols. 2006).

Al ser la lacasa una enzima con la capacidad de ser utilizada en la biorremediación, se sabe que la producción está influenciada por un gran número de factores ambientales (Téllez-Téllez y cols. 2008). Se sabe que de igual manera existen inductores capaces de favorecer o incrementar la producción de dichas enzimas (Gómez-Dorado y cols. 2005). Las isoenzimas de lacasas extracelulares producidas por *Pleurotus ostreatus* son varias, son enzimas específicas y pueden oxidar una amplia gama de sustratos estructuralmente diferentes (Tlecuítl-Beristain y cols. 2008).

Estudio de las lacasas se ha realizado para conocer a los organismos productores así como sus propiedades fisicoquímicas, con fines de caracterización, para utilizarlas en procesos biotecnológicos, de biorremediación, entre muchos otros.

Téllez-Téllez y cols. (2008), evaluaron el crecimiento y la producción de lacasas de *Pleurotus ostreatus* en fermentación líquida y en fermentación sólida. Dando a conocer que el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* fue mayor en la fermentación líquida que en la fermentación sólida, mostrando una mayor generación de biomasa y una mayor actividad enzimática. El consumo de glucosa fue más rápido en la fermentación sólida que en la fermentación líquida. Los zimogramas revelaron que en cultivos crecidos en fermentación líquida mostraron más de 4 isoformas durante el transcurso del experimento. Por otro lado, Los cultivos crecidos en fermentación sólida mostraron 1 isoforma en la fase log, 2 o posiblemente 3 en la fase exponencial y 2 en la fase estacionaria.

Desde la década pasada, muchos estudios acerca de la aplicación de la FS han sido enfocados en proporcionar valor adicional a los residuos agroindustriales; ciertos procesos han sido desarrollados para mejorar el contenido de proteína en residuos de frutas ricos en almidón, producción de enzimas y síntesis de metabolitos (Pandey 2003). En general, en esos procesos las fuentes de nutrientes son simultáneamente el soporte físico para crecimiento microbiano. Por lo tanto, la degradación del sustrato depende de las propiedades físicas de los materiales

incluyendo la naturaleza cristalina o amorfa, área accesible, área superficial, porosidad y principalmente el tamaño de partícula (Pandey 2003, Viniegra-González y cols. 2003).

Ha sido reportado un incremento en la producción de lacasas extracelulares en muchas especies de hongos de pudrición blanca que pueden crecer en sustratos naturales para el cultivo de *Pleurotus ostreatus*. Los materiales más comúnmente utilizados como fuente de carbono incluyen paja de trigo, de avena, de centeno, de sorgo, y de algodón virutas de madera y cortezas, subproductos del algodón, tallos de plantas de maíz, plantas y desperdicios de café, hojas de té, cáscara de maní, harina de soya, cáscara de semillas de girasol, desperdicios de yuca, agave, residuos de la industria papelera (periódicos, cartones), hojas de plátano, fibra de coco, hojas de limón, tallos de menta, bagazo de caña, entre otros (Stamets, 2003). También se pueden realizar cultivos sobre bloques o troncos sintéticos. Las ventajas principales de utilizar los sustratos antes mencionados en lugar de la producción en troncos naturales, es que el tiempo se acorta y la eficiencia aumenta.

Ramírez y cols. (2003) caracterizaron y evaluaron diferentes métodos de purificación y separación cromatográfica de un caldo rico en enzima lacasa, producida por una variedad del basidiomiceto *Pleurotus ostreatus*. Se llevaron a cabo dos procesos de producción, a) FES (Fermentación en Estado Sólido); b) fermentación en sumergido. El proceso de FES se basó en la producción de un extracto de caldo crudo rico en enzima lacasa a partir del crecimiento micelial sobre salvado con vinaza en relación 1:1 w/v durante 20 días. Se obtuvo un caldo crudo con una actividad promedio de 20 U/ml. En el caso del proceso de fermentación en sumergido, se trabajó con el medio reportado por Hublíck y Schinner (2000) con algunas modificaciones, y se obtuvo un crecimiento del hongo en forma de pellets, en un período de 15 días, con actividad promedio de 10 U/mL en el caldo crudo. Las isoenzimas aisladas en los procesos cromatográficos se caracterizaron de acuerdo a sus propiedades moleculares y cinéticas, se determinó su peso molecular por electroforesis de placa vertical (SDS-PAGE) y sus parámetros cinéticos, por ejemplo estabilidad, en un rango de temperatura y pH.

Mientras que Sarkar y cols. (1996) realizaron la caracterización molecular y bioquímica de MnP producidas por *Pleurotus eryngii* en un medio con glucosa y peptona comparando los genes con los de *Phanerochaete chrysosporium* observando que son diferentes molecularmente.

Por otro lado Quintero y cols. (2006) evaluaron la capacidad para producir las enzimas ligninolíticas manganeso peroxidasa (MnP) y lignin peroxidasa (LiP) en cultivos de los hongos *Bjerkandera adusta* y *Phanerochaete chrysosporium* sobre tres materiales lignocelulósicos: viruta de madera, carozo de maíz y compost de jardinería. De estos materiales, la viruta de madera permitió alcanzar los mayores títulos de la enzima MnP, con valores de 5,0 U/g de material seco cuando se cultiva con *Bj. adusta* y de 1,3 U/g de material seco con *Phanerochaete chrysosporium*, mientras que con carozo de maíz se obtienen las mejores actividades de LiP.

Silva y cols. (2007) Realizaron la extracción de MnP producida por *Lentinula edodes*, realizando la extracción en buffer de citratos con tres diferentes pHs, donde observaron que el mayor parámetro de actividad enzimática fue obtenido en el pH de 5.

Martínez-Salgdo y cols. (2005) estudiaron el efecto de una fuente de carbono (glucosa) y una de nitrógeno (nitrato de amonio) en el hongo *Trametes versicolor* en un biorreactor de lecho fluidizado, con adición al medio de cultivo de 0.02% (v/v) de Tween 80, 12 ppm de MnSO₄ y 1 mM de CuSO₄.

Vernero y cols. (2010) evaluaron el potencial de distintos residuos forestales como sustrato para el cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus*. Para ello, se analizaron la composición química de estos residuos, antes y después de la etapa de cosecha, y midieron distintas variables fenológicas y morfológicas así como el rendimiento y la calidad de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* tras la cosecha. Donde fijaron cuatro tratamientos: astillas de álamo, astillas de eucalipto, mezcla de paja de trigo y eucalipto, y paja de trigo como testigo. Los

resultados obtenidos indicaron que todos los sustratos, principalmente paja de trigo y mezcla paja de trigo más eucalipto son aptos para el cultivo de *Pleurotus ostreatus*. El nivel proteico de este hongo fue elevado en todos los sustratos y la relación carbono/nitrógeno de los mismos disminuyó después de cosecha.

3. Justificación

Las oxidasas obtenidas a partir de sistemas fermentativos de *Pleurotus ostreatus* tiene una importante relevancia ya que estas enzimas forman un complejo multienzimático con la capacidad de degradar la lignina, esto les confiere un importante valor tanto económico como ecológico, por esta razón es importante evaluar los diferentes sistemas de producción tanto en medio líquido como en medio sólido así como un soporte biodegradable y otro que no lo es, y de esta manera evaluar la producción en los sistemas antes mencionados. Para generar conocimiento básico con respecto a la producción y actividad enzimática y así conocer la aplicación de tecnologías en procesos de producción.

4. Hipótesis

Se observará que cada sistema de fermentación favorece la producción de una enzima en particular

5. OBJETIVOS

5.1. General

Evaluar la actividad intra- y extracelular de LAC, AVO, VP y MnP de *Pleurotus ostreatus* desarrollado en fermentación sumergida y en fermentación sólida sobre espuma de poliuretano así como del cuerpo fructífero producido sobre paja de trigo.

5.2. Particulares

Evaluar la actividad intracelular de LAC, AVO, VP y MnP presentes en cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus* desarrollado en fermentación sólida utilizando paja de trigo como soporte.

Evaluar la actividad intra- y extra-celular de LAC, AVO, VP y MnP presentes en fermentación sólida utilizando espuma de poliuretano como soporte inerte.

Evaluar la actividad intra- y extra-celular de LAC, AVO, VP y MnP presentes en fermentación sumergida.

Determinar los patrones zimográficos de las enzimas LAC, y MnP obtenidas en todas las condiciones de crecimiento del hongo.

6. METODOLOGÍA

6.1. Microorganismo.

Se utilizó la cepa de *Pleurotus ostreatus* 32783 de la American Type Culture Collection (Maryland, USA). Se reactivó en agar dextrosa-papa (PDA) y extracto de paja, a una temperatura de 25 °C durante siete días.

6.1.1. Fermentación sólida (FS) en espuma de poliuretano (PUF) y sobre paja de trigo.

Se preparó un medio que contenía (en g por litro): glucosa, 10; extracto de levadura, 5; KH_2PO_4 , 0.6; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; K_2HPO_4 , 0.4; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.25; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.05; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001 (Juárez-Hernández 2006). El pH que se utilizó fue de 6.5 para el desarrollo del organismo. El inóculo para cada matraz de fermentación fue de 3 fragmentos de micelio (4mm de diámetro) tomados de la periferia de una colonia crecida sobre agar extracto de malta a 25 °C durante 7 días. La FS se llevó a cabo en un matraces de 250 ml conteniendo 1 g de espuma de poliuretano (PUF; 17 kg/m³) en cubos (0.5 x 0.5 x 0.5 cm) (Díaz-Godínez y cols. 2001) como soporte inerte impregnado con 30 ml del medio de cultivo estéril. Previamente, los cubos fueron lavados dos veces con agua destilada, secados en horno a 60 °C por 24 h, y después se esterilizaron en autoclave a 120 °C por 15 min. Los cultivos fueron incubados por 21 días a 25 °C.

Para la producción de cuerpos fructíferos, la cepa de *Pleurotus ostreatus*, se sembró sobre paja de trigo con un tamaño de partícula entre 5 a 7 cm. La paja se pasteurizó previamente a una temperatura de 85 °C por una hora. Se sembró en bolsas de nylon, en cada bolsa se alternaron capas de inóculo (0.5 kg) y de paja (5 kg), se compactaron ligeramente y se incubaron en

ausencia total de luz por un periodo de quince días, después de ese periodo, las bolsas se trasladaron al cuarto de producción en presencia de luz. Se regaron hasta obtener tres cortes.

6.1.2. Fermentación líquida (FL)

Se realizó por triplicado en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 50 ml del medio antes descrito en la fermentación sólida sobre PUF. Los matraces se incubaron a 25 °C con agitación orbital a 120 rpm. Se tomaron muestras cada 24 h hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento del hongo.

6.2. Obtención del extracto enzimático y cuantificación de biomasa en FL y FS

El extracto enzimático (EE) del cuerpo fructífero se obtuvo por lisis celular con un macerador de tejidos. Se obtuvieron 7 ECE. Se tomaron 3 tamaños de cuerpo fructífero, de 3 (A), 7 (B) y 15 (C) cm de diámetro, separando el píleo (P) del estípite (E), nombrando a cada extracto como PA, EA, PB, EB, CA, CB, respectivamente, así como también del ECE obtenido por lixiviación de la paja invadida de micelio llamada EL (10 g de paja invadida de micelio en 50 mL de agua, agitada por 30 min).

El EE de los cultivos crecidos bajo condiciones de FS se obtuvo por lixiviación de los cubos de PUF después del crecimiento del hongo. Los cubos de PUF fueron lavados tres veces con agua destilada para remover todos los remanentes del EE y después fueron secados en horno a 60 °C por 24 h. X se determinará por diferencia de peso (Díaz-Godínez y cols. 2001).

El EE de la fermentación sumergida se le considera al caldo de fermentación obtenido en cada muestreo de la fermentación, y después de la filtración con papel Watman No. 1 y posteriormente a través de filtros con tamaño de poro de 0.2 μm . Los EE se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta su uso posterior. La biomasa (X) producida se separó por filtración y

se secó en horno a 60°C durante 24 h; y se reportará el peso seco (Tlecuítl-Beristain y cols. 2008).

6.3. Cuantificación de enzima (LAC)

La actividad de lacasas se determinó en cada ECE, utilizando como sustrato 2,6-dimetoxifenol (DMP). La mezcla de reacción se realizó con 900 µL de DMP 2 mM, en buffer de fosfatos 0.1M y pH de 6.5, 4.5 de buffer de acetatos y 1000 µL de ECE. La actividad se determinó por incremento de absorbancia a 468 nm de mezcla de reacción, en una celda Peltier a 40 °C durante un minuto (Téllez-Téllez y cols. 2008). Una unidad de actividad (U) de lacasa se consideró como la cantidad de enzima que provoca un incremento de una unidad de absorbancia por la LAC reportado por mL o gramo de biomasa seca X. Esto formando una semiquinona lo que provoca la coloración, también, los dos grupos metoxi pueden ser oxidados, lo cual permite que se lleve a cabo la polimerización.

6.4. Cuantificación enzimática de manganeso peroxidasas.

La actividad enzimática de MnP se adaptó de la metodología descrita por Kuwahara y cols. (1984). La mezcla de reacción se realizó con 100 µL de rojo fenol al 0.1%, 100 µL de lactato de sodio 250 mM, 200 µL de albumina sérica bovina al 0.5 %, 50 µL de MgSO₄ 2 mM, 50 µL de H₂O₂ 80 mM, 450 µL de buffer de succinato de sodio 20 mM a pH 4.0 y 50 µL de EEE. Se empleó como blanco toda la mezcla de reacción sustituyendo los 50 µL el MgSO₄ 2 mM por 50 µL de H₂O. La reacción se mantuvo en incubación 1 hora a 35 °C, posteriormente se leyó a una longitud de onda de 610 nm. Una unidad de actividad de MnP (U) se consideró como la cantidad de enzima necesaria que provoca un incremento de una unidad de absorbancia por min.

6.5. Cuantificación enzimática de alcohol veratril oxidasa

La actividad enzimática de AVO se determinó agregando 375 μ l de buffer de tartrato de sodio 0.33 M a pH 3, 125 μ l de alcohol veratrilico 70 mM, 400 μ l de agua y 100 μ l de muestra. Se leyó a una longitud de onda de 310 nm después de 30 minutos de incubación a 40 °C. Una unidad de actividad de AVO (U) se considera como la cantidad de enzima que provoca un incremento de una unidad de absorbancia por min.

6.6. Cuantificación de la enzima Versátil peroxidasa

La actividad VP se midió mediante la oxidación de alcohol veratrilico 2 mM en buffer de tartrato de sodio a pH 3.0 (900 μ L) en presencia de H₂O₂ a 4 mM (50 μ L) y el ECE (50 μ L). La reacción se mantuvo en incubación 30 minutos a 30 °C y posteriormente se leyó a una longitud de onda de 310 nm. Una unidad de actividad de VP (U) se consideró como la cantidad de enzima necesaria que provoca un incremento de una unidad de absorbancia por minuto. Se empleó como blanco toda la mezcla de reacción sustituyendo los 50 μ L H₂O₂ por 50 μ L de H₂O.

6.7. Zimografía y geles de electroforesis LAC.

La actividad lacasa se evaluó *in situ* a través de zimogramas. Se utilizó la técnica previamente reportada (Téllez-Téllez, 2008). Se utilizará un sistema de electroforesis mini-protean II (BioRad) y se aplicaran 150 V por 1-1.25 h. Después de la electroforesis, los geles se lavaron con agua desionizada en un agitador orbital (20-30 rpm) durante 1-2 horas, el agua se cambió cada 30 min para eliminar el SDS. Por último, los geles serán incubados a temperatura ambiente en 2-6 Dimetoxifenol para lacasas.

6.8. Zimografía de MnP

La actividad de MnP se evaluará *in situ* a través de zimogramas. Se modificó la técnica previamente reportada (Téllez-Téllez, 2008). Se utilizó un sistema de electroforesis mini-protean II (BioRad) y se aplicaron 150 V por 1-1.25 h. Después de la electroforesis, se realizaron 2 lavados de 5 min de los geles con agua destilada, posteriormente se equilibraron durante 5 min con un buffer de acetato de sodio 0.1 M (pH 4.5), la solución de visualización se elaboró con alfa naftol (0.1 mg/ml), H₂O₂ (0.05 mM) y MnCl₂·4H₂O (0.1 M) disueltos en buffer de acetato de sodio 0.1M (pH 4.5), incubados a 25°C hasta la aparición de bandas de color café oscuro.

7. RESULTADOS

7.1. Fermentación sólida sobre paja de trigo para producción de cuerpos fructíferos

7.1.1. Oxidasas extracelulares de *Pleurotus ostreatus* desarrollado sobre paja de trigo

En la tabla 1 podemos observar la actividad enzimática de oxidasas extracelulares de *Pleurotus ostreatus* presentes en los extractos de paja sobre los que fue desarrollado. Destacando que en esta tabla no se hace una comparación entre las distintas enzimas evaluadas solo se presentan los resultados obtenidos de la cuantificación por espectrofotometría.

La única diferencia expresada de esta evaluación radica en el origen del ECE ya que uno fue obtenido del proceso de regado para el desarrollo del hongo (lixiviado) y el otro fue obtenido de la técnica previamente descrita (paja).

Tabla 1. Actividad enzimática de oxidasas extracelulares de *Pleurotus ostreatus*

ECE	ENZIMAS			
	LAC U/gSs	MnP UI/gSs	AVO UI/gSs	VP UI/gSs
Paja	4.520 ± 0.002	0,002 ± 0.0007	0.1840 ± 0.0007	1,82E-06 ± 0.0007
Lixiviado	0.0001 ± 0.0007	2.1E-07 ± 0.007	4,05E-06 ± 0.001	0.218 ± 0.005

7.1.2. Actividad enzimática LAC intracelulares fructífero de *Pleurotus ostreatus* desarrollado sobre paja de trigo

En la figura 6 muestra los valores de lacasa intracelulares en unidades por gramo de biomasa seca (U/gXs) del cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus* durante diferentes estadios de desarrollo. El valor máximo reportado se encuentra en el Primordio (187,15 U/gXs) seguido del cuerpo fructífero de tamaño 8.9 en la estructura perteneciente al pie.

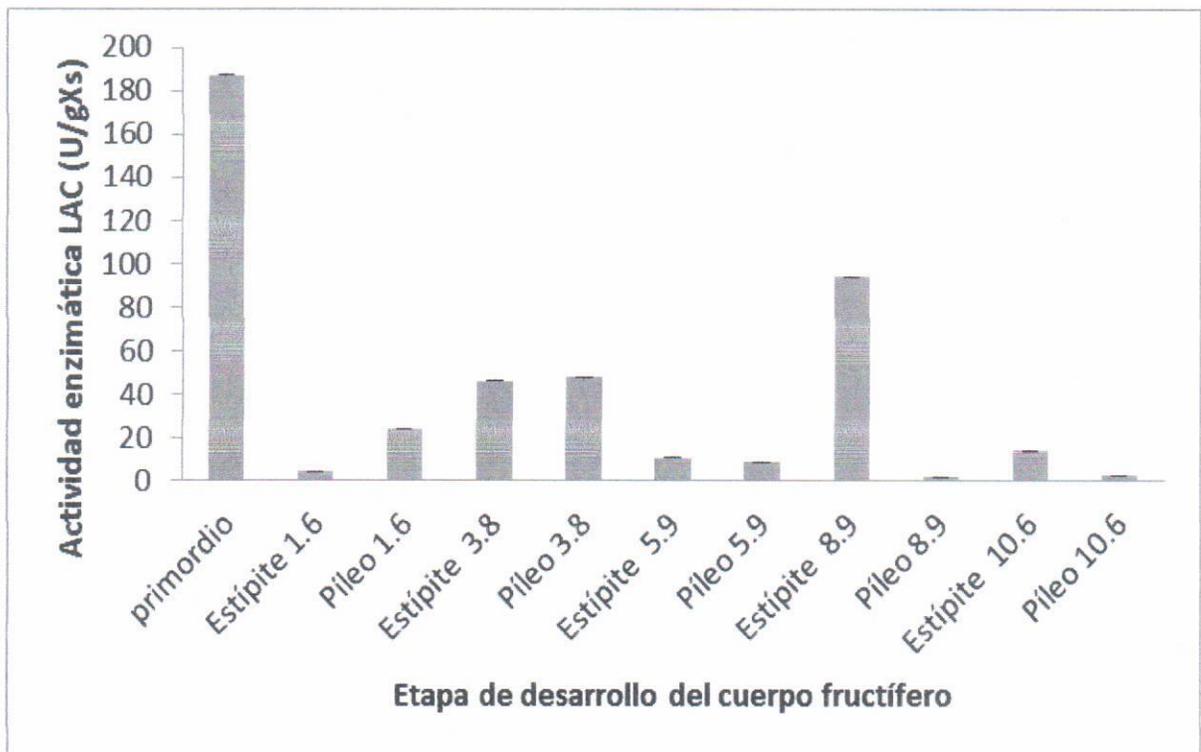


Figura 6. Lacasas de cuerpo fructífero *Pleurotus ostreatus*

7.1.3. Actividad enzimática MnP intracelulares de cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus* desarrollado sobre paja de trigo

En la figura 7. Podemos observar la actividad enzimática intracelular de Mn-p expresada en U/gXs. Donde el valor máximo se presenta en el estípite de 3.8 cm de aproximadamente 0.07 U/gXs.

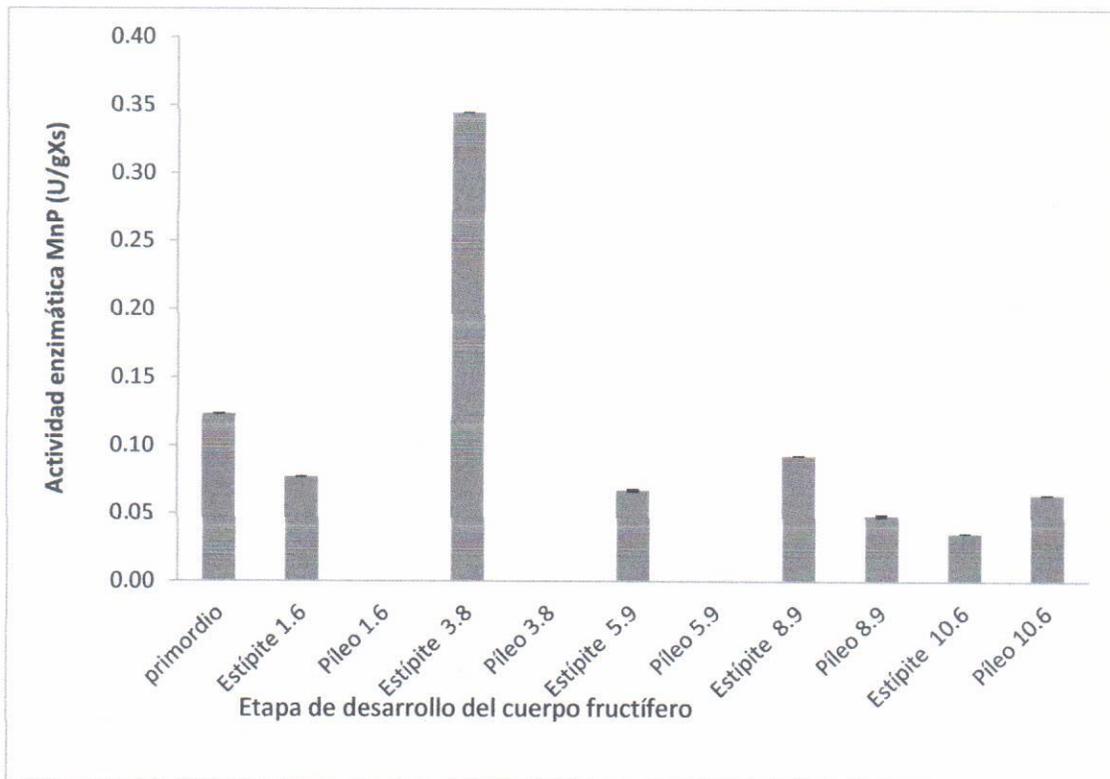


Figura 7. Actividad enzimática MnP del cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus*

7.1.4. Actividad enzimática AVO intracelulares de cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus* desarrollado sobre paja de trigo

De los valores de actividad enzimática el mayor se encuentra en los primordios con aproximadamente 1 U/gXs, seguida del píleo del cuerpo fructífero de 1.6 cm de diámetro esta enzima se encuentra presente durante todos los distintos tamaños del cuerpo fructífero de *Pleurotus*.

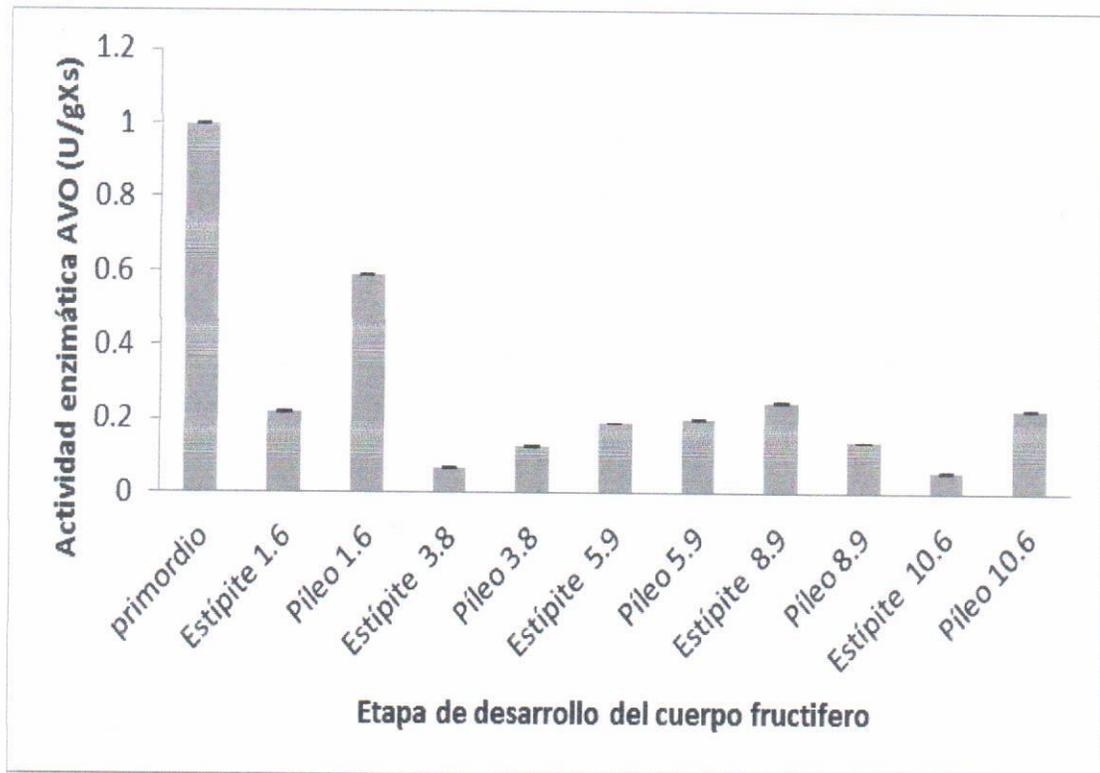


Figura 8. Actividad enzimática AVO del cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus*

7.1.5. Actividad enzimática VP intracelulares de cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus* desarrollado sobre paja de trigo

En la figura 9 se muestran los valores de VP donde los valores máximos se encuentran en el sombrero de 10.6 cm.

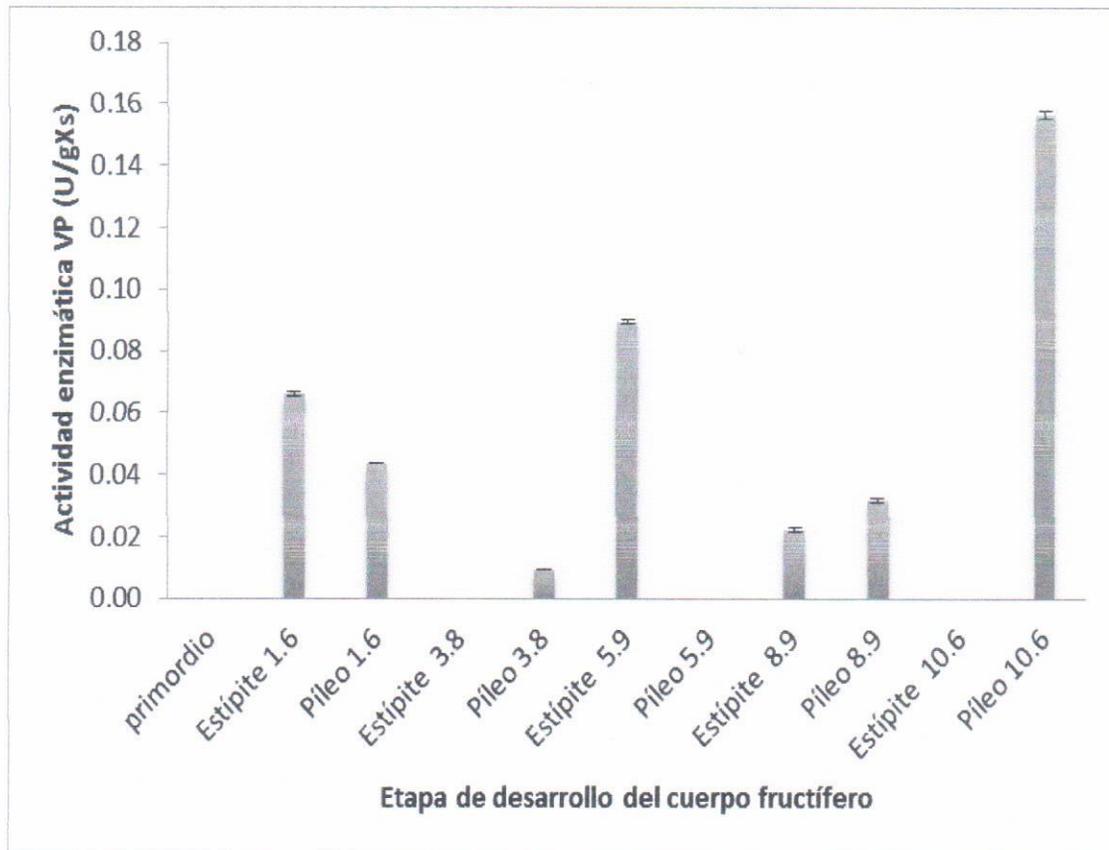


Figura 9. Actividad enzimática versátil peroxidasas de cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus*

7.2. Fermentación líquida de *Pleurotus ostreatus*

7.2.1. Perfil de pH de fermentación líquida

Dentro de los resultados obtenidos de la FL observamos en la figura 10 que los valores de pH se mantienen constantes a lo largo de los 22 días de duración

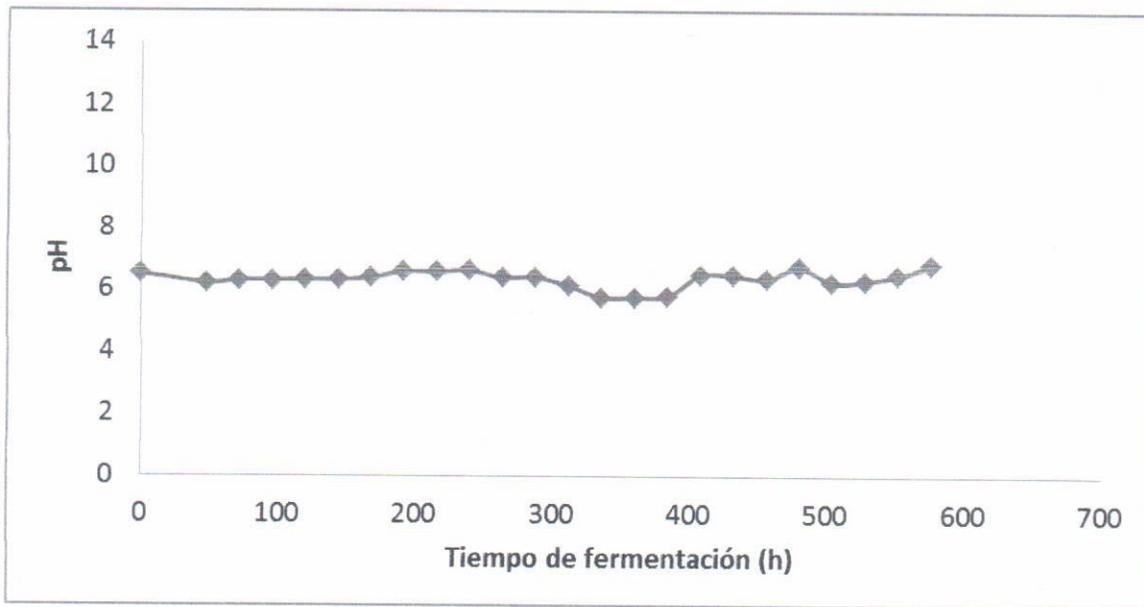


Figura 10. pH FL de *Pleurotus ostreatus*

7.2.2. Biomasa de *Pleurotus ostreatus* en FL

En la figura 11 observamos que el valor máximo obtenido de la fermentación es de 7.345 g por litro de medio de cultivo esto obtenido a las 360 h de fermentación para posteriormente dar inicio a la fase estacionaria.

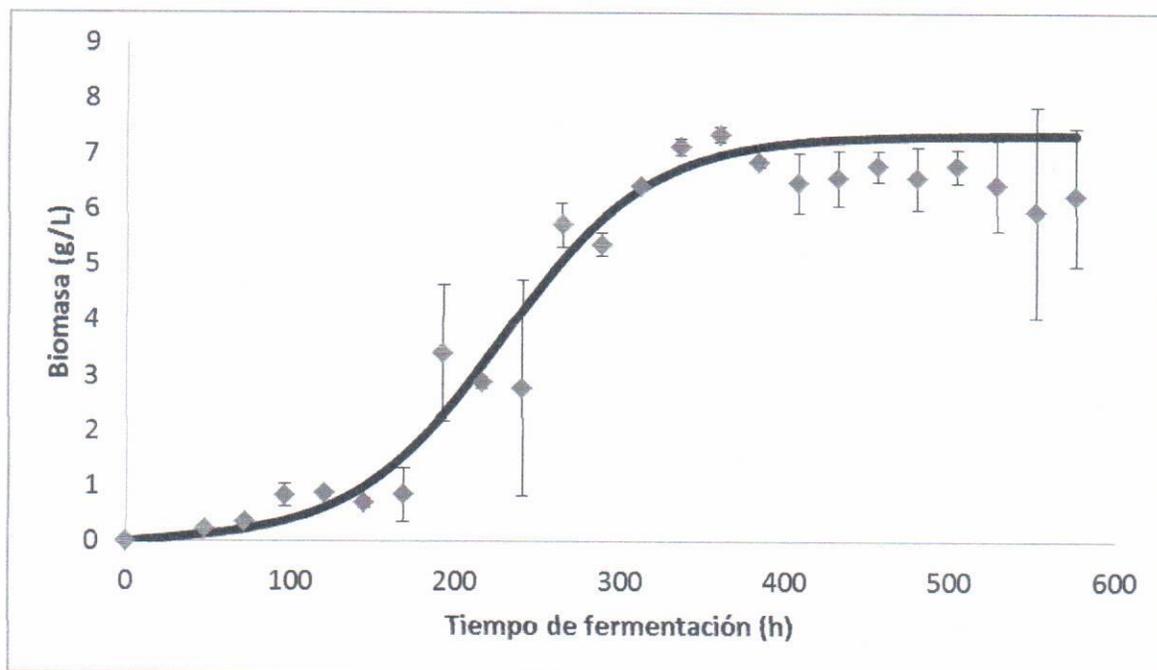


Figura 11. Biomasa de FL de *Pleurotus ostreatus*

7.2.3. Actividad enzimática de LAC extracelulares en FL

En la figura 12 observamos la actividad enzimática de lacasas donde el valor máximo obtenido fue cerca de las 300 horas de fermentación.

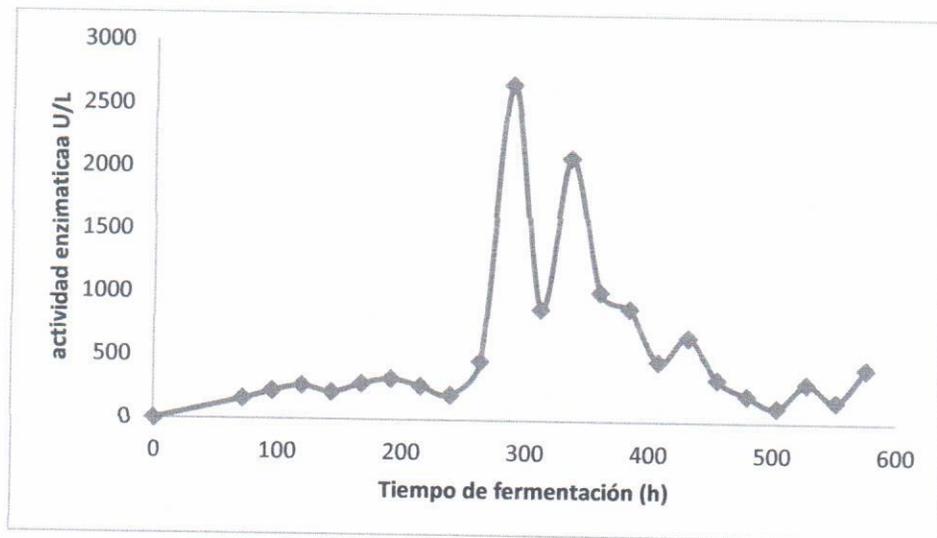


Figura 12. Lacasas de *Pleurotus ostreatus* desarrollado en matraces con medio líquido

7.2.4. Actividad enzimática de MnP extracelulares en FL

En la figura 13 existen dos puntos máximos de actividad enzimática esto a las 120 y 240 horas del tiempo de fermentación.

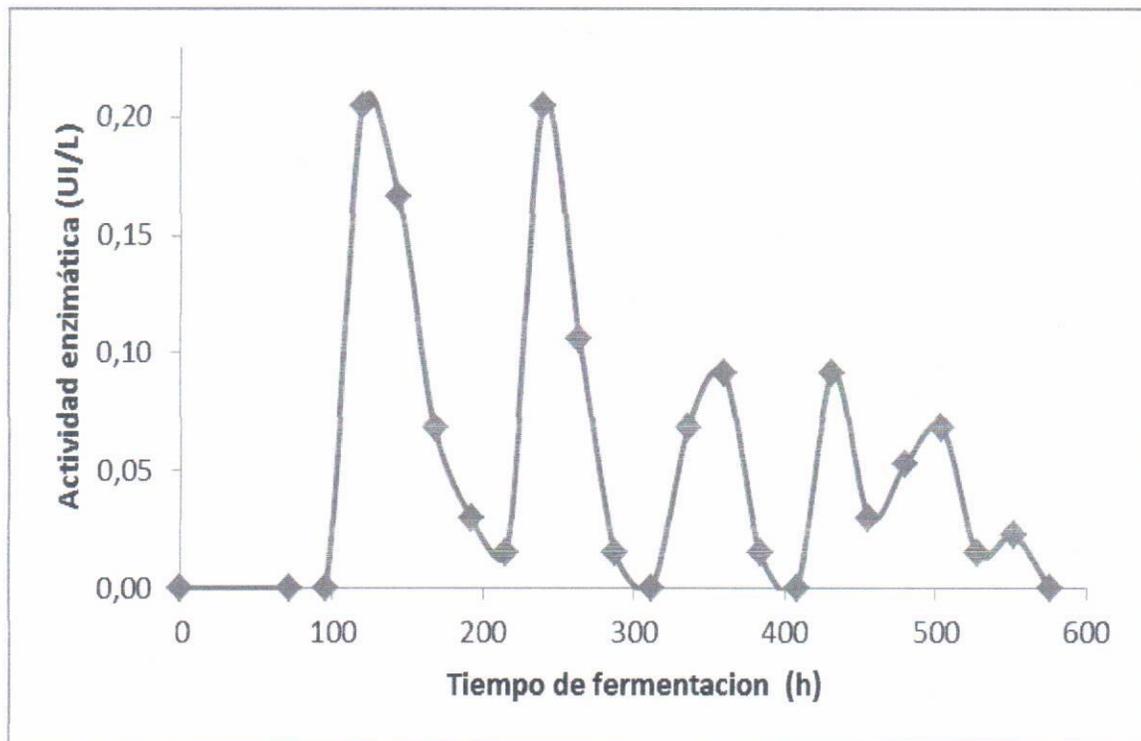


Figura 13. Manganeso peroxidadas de *Pleurotus ostreatus* desarrollado en matraces con medio líquido

7.2.5. Actividad enzimática de AVO extracelulares en FL

En la figura 14 podemos observar que estas enzimas están presentes durante el tiempo de la fermentación obteniéndose el valor máximo a las 432 h con aproximadamente 40 unidades por litro de medio de cultivo.

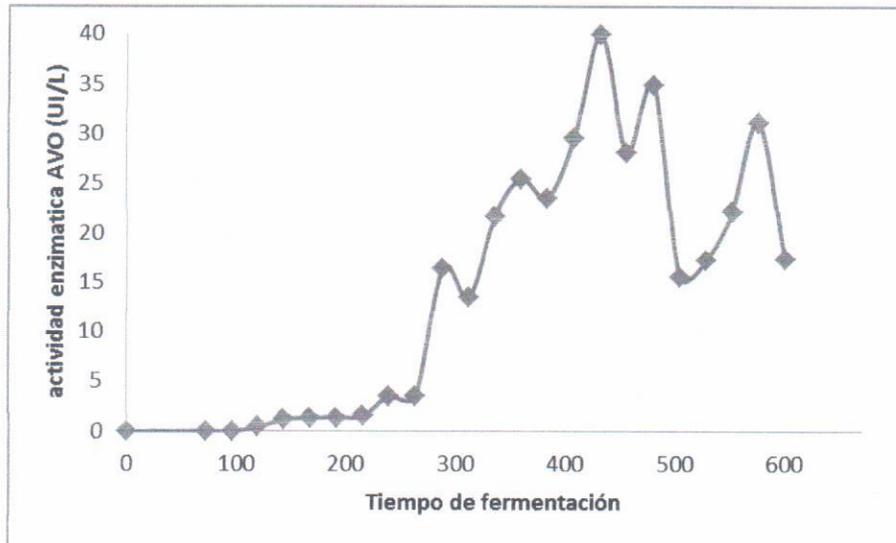


Figura 14. Alcohol Veratril Oxidasas de *Pleurotus ostreatus* desarrollado en matraces con medio líquido.

7.2.6. Actividad enzimática de VP extracelulares en FL

En la figura 15 a las 312 h de fermentación le valor máximo obtenido fue de aproximadamente 10 unidades internacionales por litro.

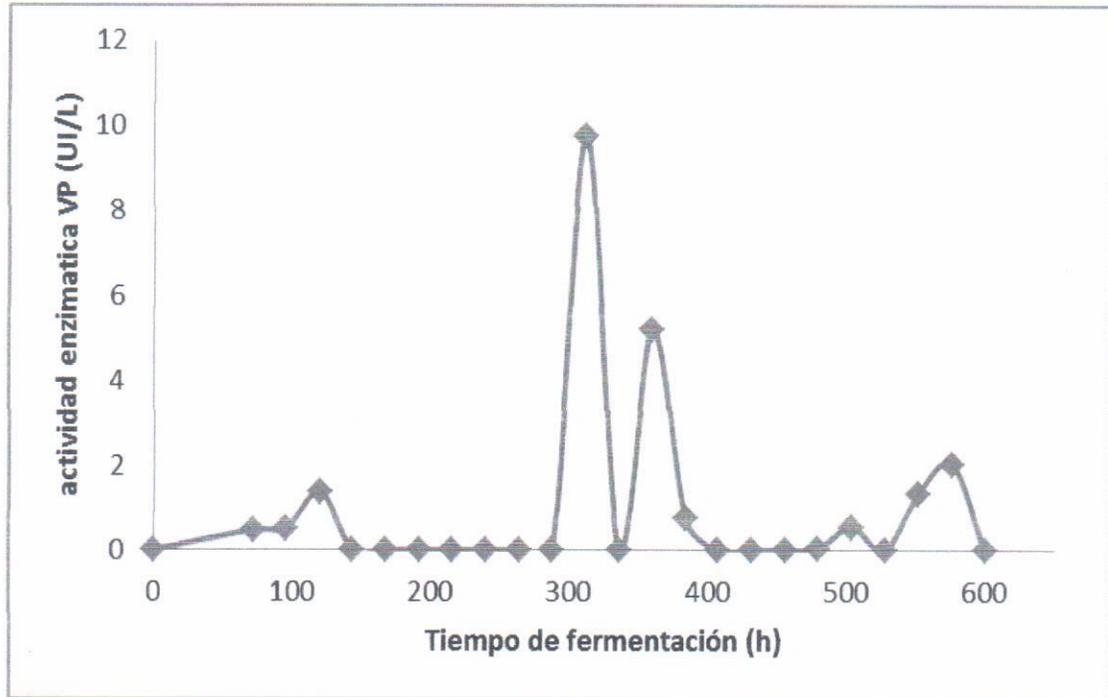


Figura 15. Versátil peroxidasa de *Pleurotus ostreatus* desarrollado en matraces con medio líquido.

7.2.7. Actividad enzimática de LAC intracelulares en FL

En la figura 16 el valor máximo obtenido fue de aproximadamente 200 unidades por gramo de biomasa seca, esto a las 400 hora de fermentación.

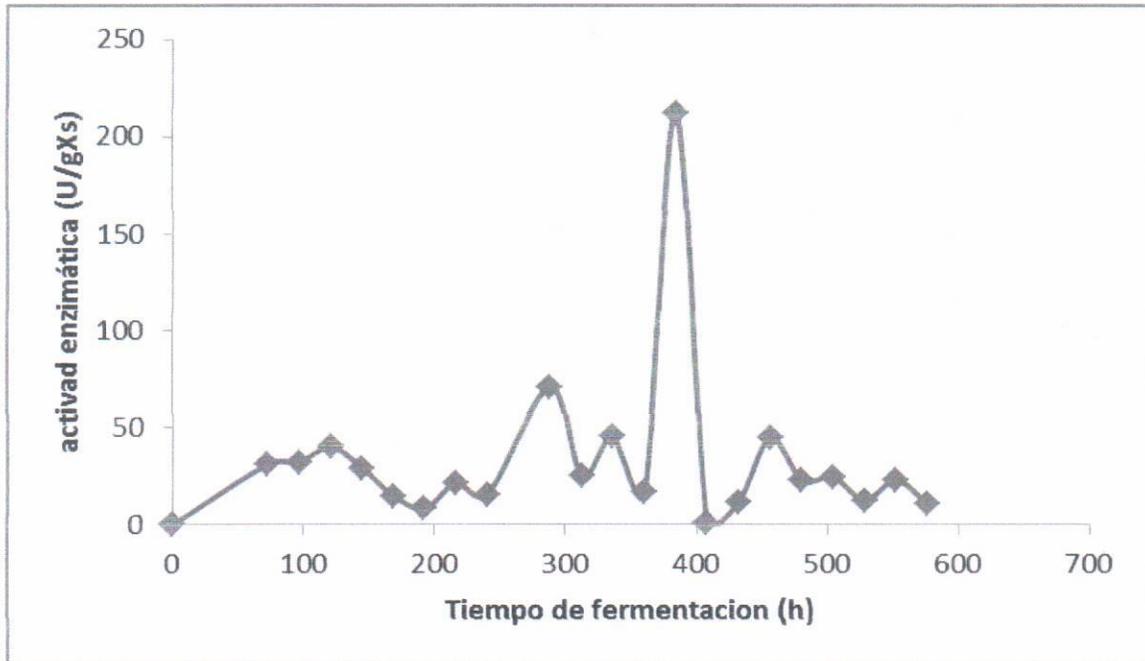


Figura 16. Lacasas intracelulares de *Pleurotus ostreatus* desarrollado en matraces con medio líquido.

7.2.8. Actividad enzimática de MnP intracelulares en FL

La actividad máxima reportada es de aproximadamente 0.02 unidades internacionales por gramo de biomasa seca esto en las primeras 100 horas del tiempo de fermentación.

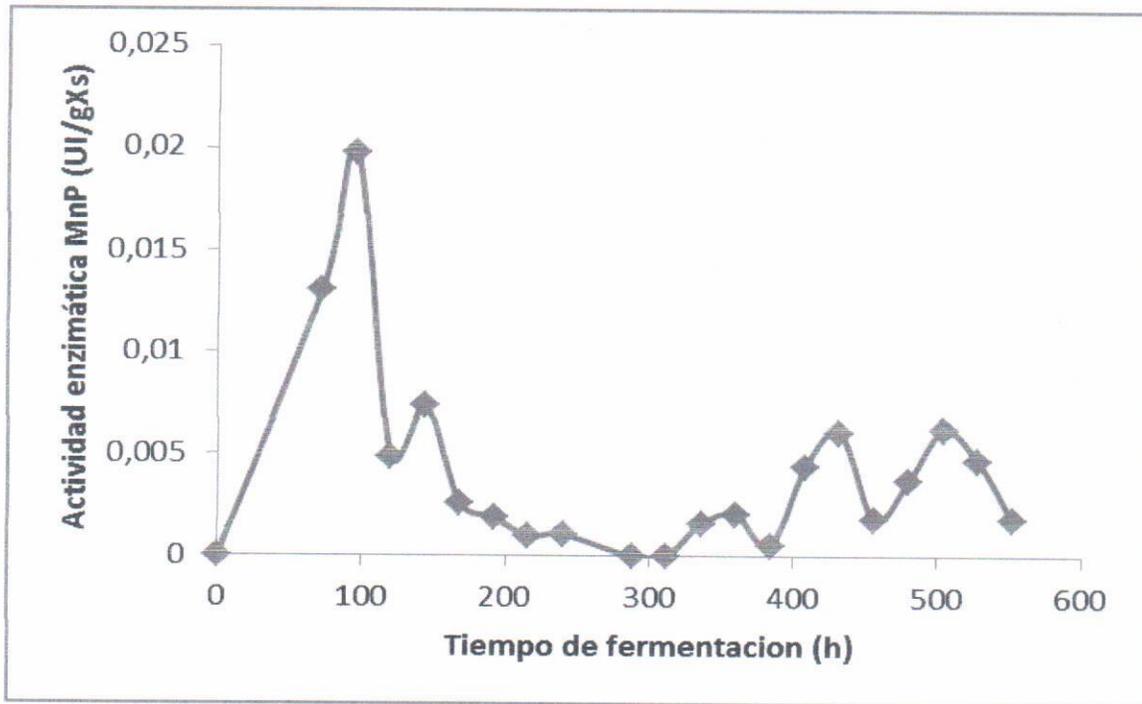


Figura 17. Manganeso peroxidasas intracelulares de *Pleurotus ostreatus* desarrollado en matraces con medio líquido.

7.3.2. Biomasa de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sólida sobre PUF como sustrato

La figura 21 muestra la biomasa máxima de *Pleurotus ostreatus* desarrollado sobre espuma de poliuretano donde la biomasa máxima fue de 6.30 g/L de medio de cultivo donde la μ fue de 0.088 en esta grafica se observa un comportamiento atípico del desarrollo de esta cepa ya que no es similar a resultados previamente reportados de la misma.

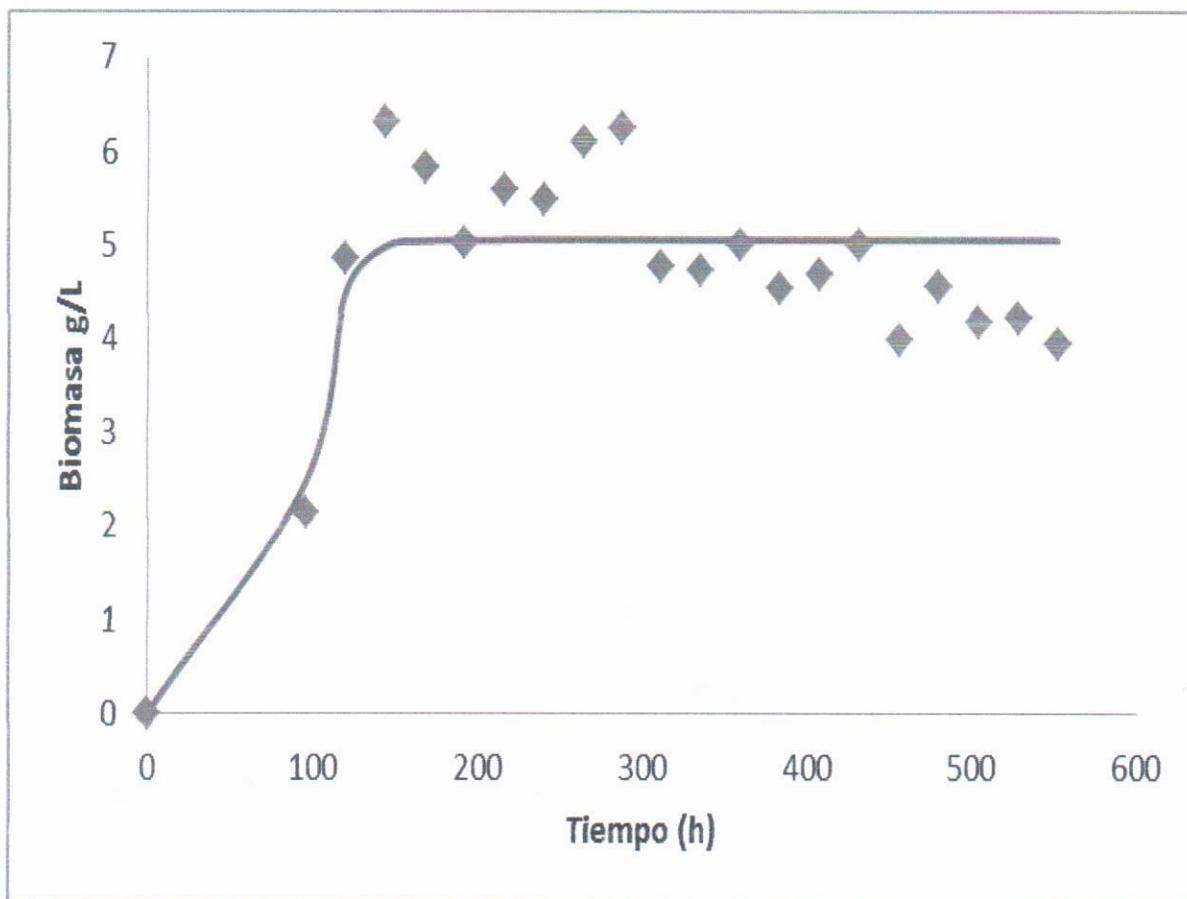


Figura 21. Biomasa de *Pleurotus ostreatus* desarrollado en fermentación sólida sobre PUF.

7.2.10. Actividad enzimática de VP intracelulares en FL

La actividad máxima se reporta a las 552 horas de fermentación donde el valor obtenido es de 0.08 unidades internacionales por gramo de biomasa seca.

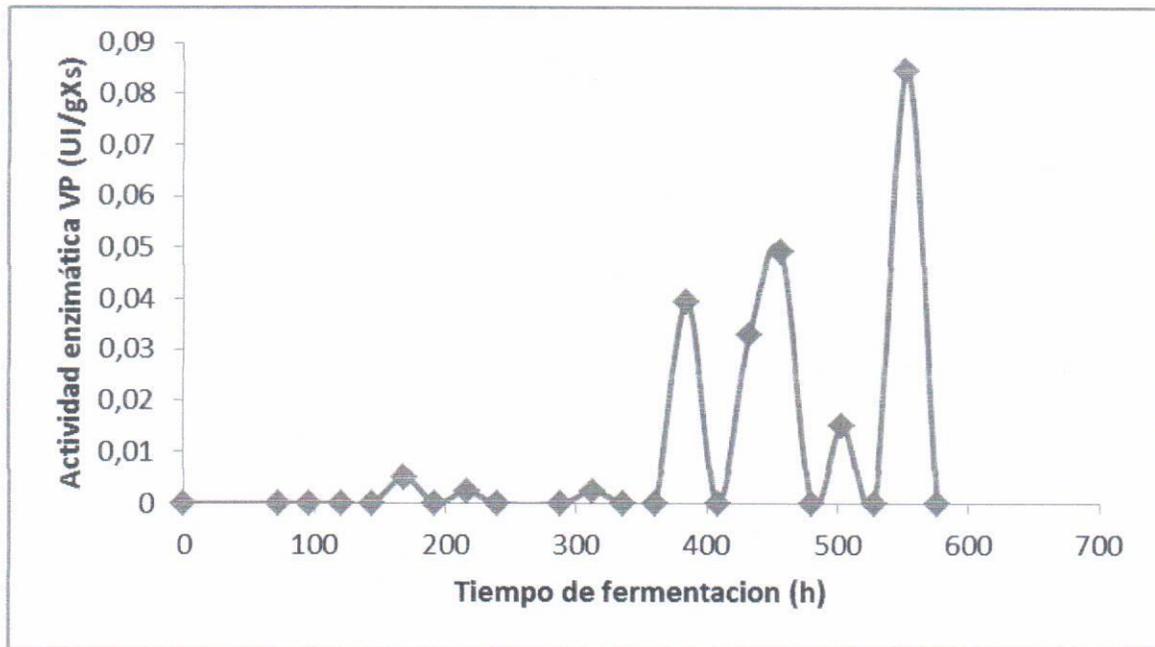


Figura 19. Versátil peroxidasa intracelulares de *Pleurotus ostreatus* desarrollado en matraces con medio líquido.

7.3.3. Actividad enzimática LAC extracelulares de *Pleurotus ostreatus* en fermentación solida sobre PUF como sustrato

En la figura 22 los valores maximos obtenidos fueron a las 144 y 168 horas de fermentacion con valores de aproximadamente 13500 U/L.

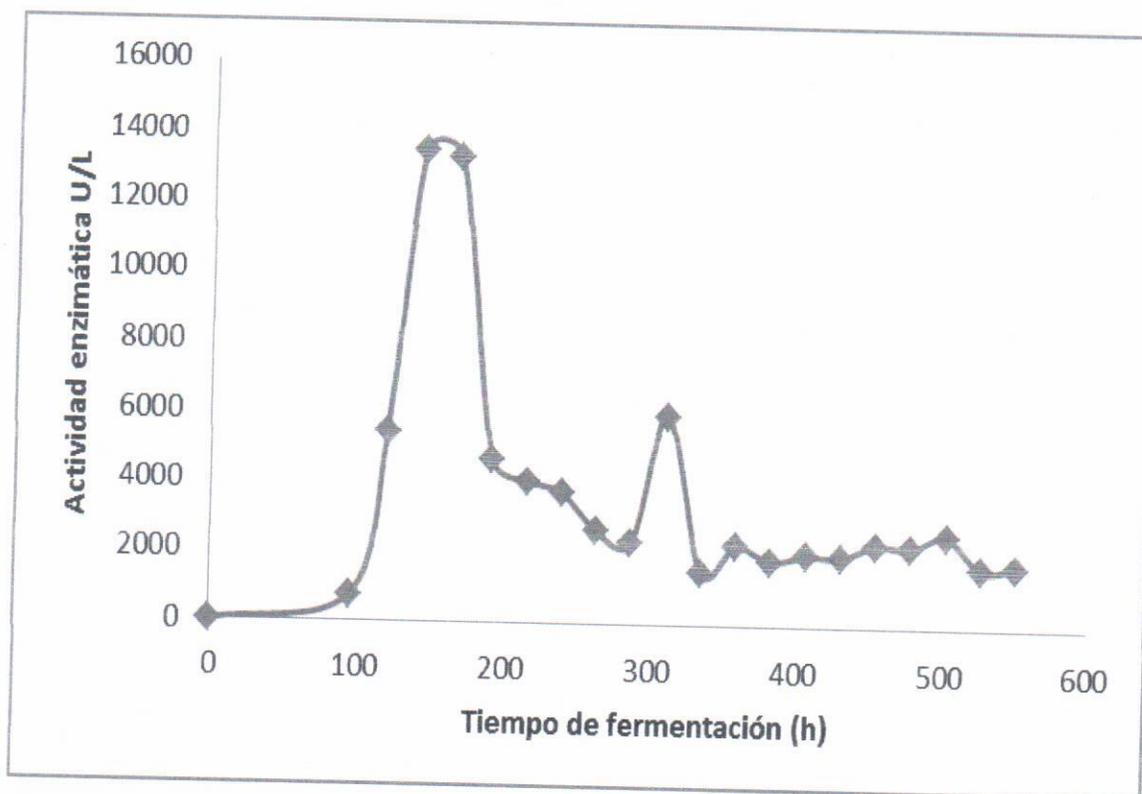


Figura 22. Lacasas extracelulares de *Pleurotus ostreatus* desarrollado sobre PUF

7.2.9. Actividad enzimática de AVO intracelulares en FL

En la figura 18 podemos observar que para la enzima AVO los valores máximos obtenidos fueron a las 384 y 432 horas de fermentación.

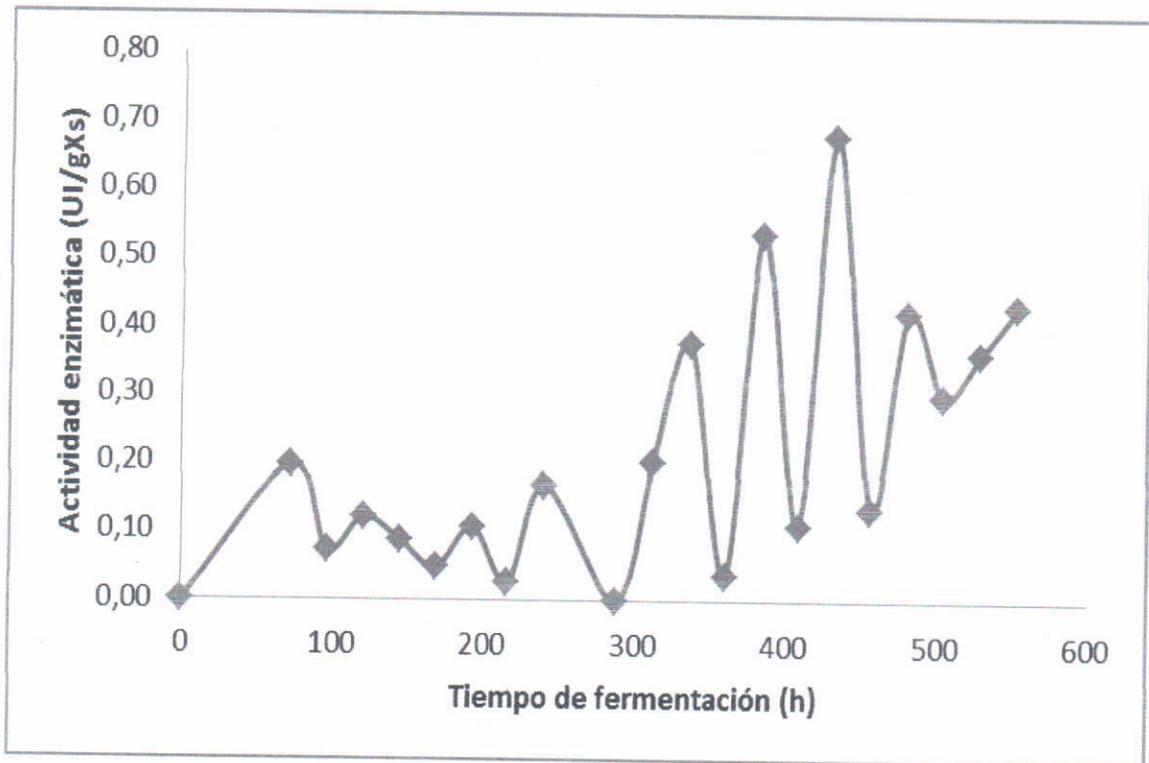


Figura 18. AVO intracelulares de *Pleurotus ostreatus* desarrollado en matraces con medio líquido.

7.3.4. Actividad enzimática MnP extracelulares de *Pleurotus ostreatus* en fermentación solida sobre PUF como sustrato

En la figura 23 podemos observar que el valor máximo reportado fue de 1.03 Ui/L, esto a las 480 h de cultivo.

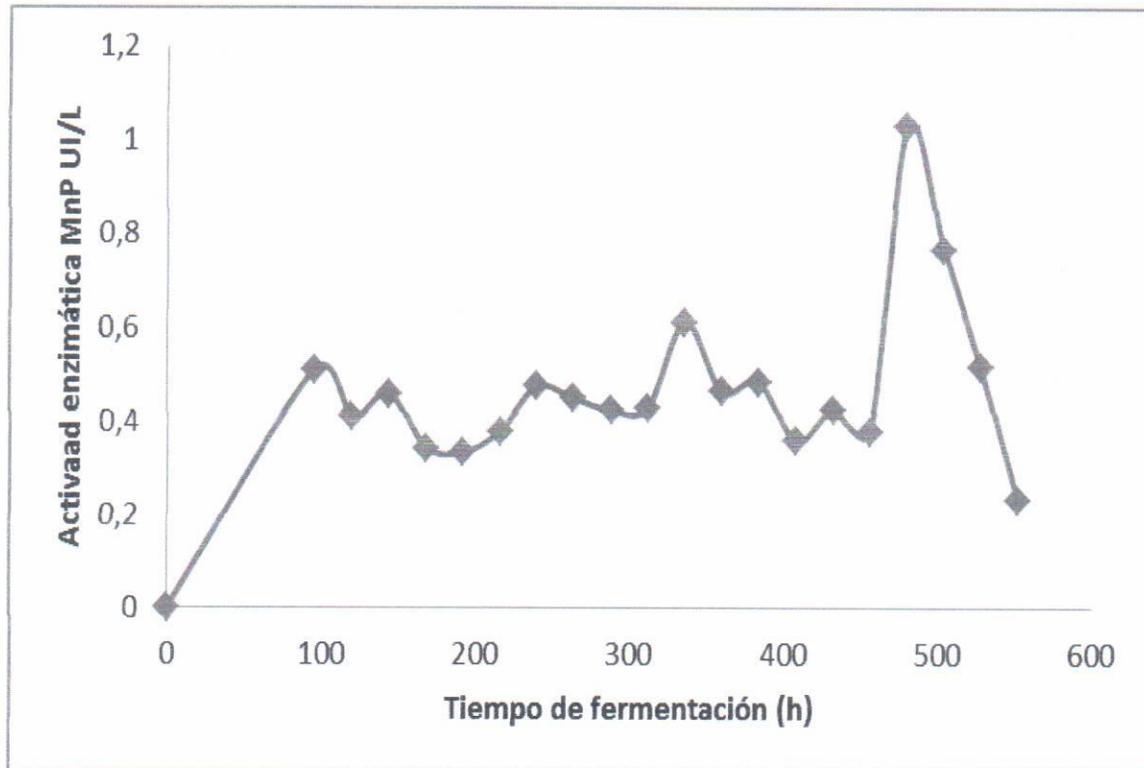


Figura 23. MnP extracelulares de *Pleurotus ostreatus* desarrollado en Fs con espuma de poliuretano.

7.3.5. Actividad enzimática AVO extracelulares de *Pleurotus ostreatus* en fermentación solida sobre PUF como sustrato

A las 432 y 456 h de fermentación se obtienen los valores máximos de AVO que se aproximan mucho a 4 UI/L de medio de cultivo.

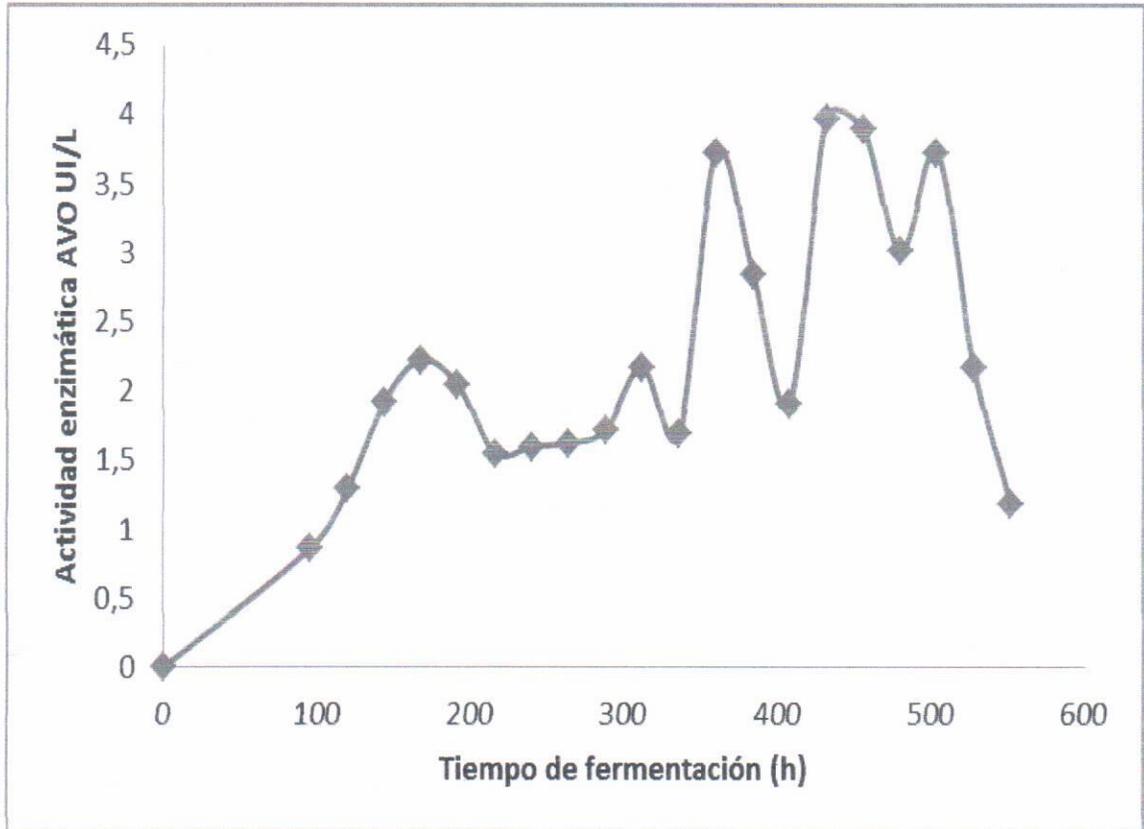


Figura 24. AVO extracelulares de *Pleurotus ostreatus* desarrollado sobre PUF

7.3.6. Actividad enzimática VP extracelulares de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sólida sobre PUF como sustrato

En la figura 25 podemos observar que el valor máximo obtenido es aproximadamente a las 200 h de fermentación donde son casi 6 unidades internacionales por litro de medio de cultivo y de igual manera esta enzima se encuentra presente durante todo el tiempo de fermentación.

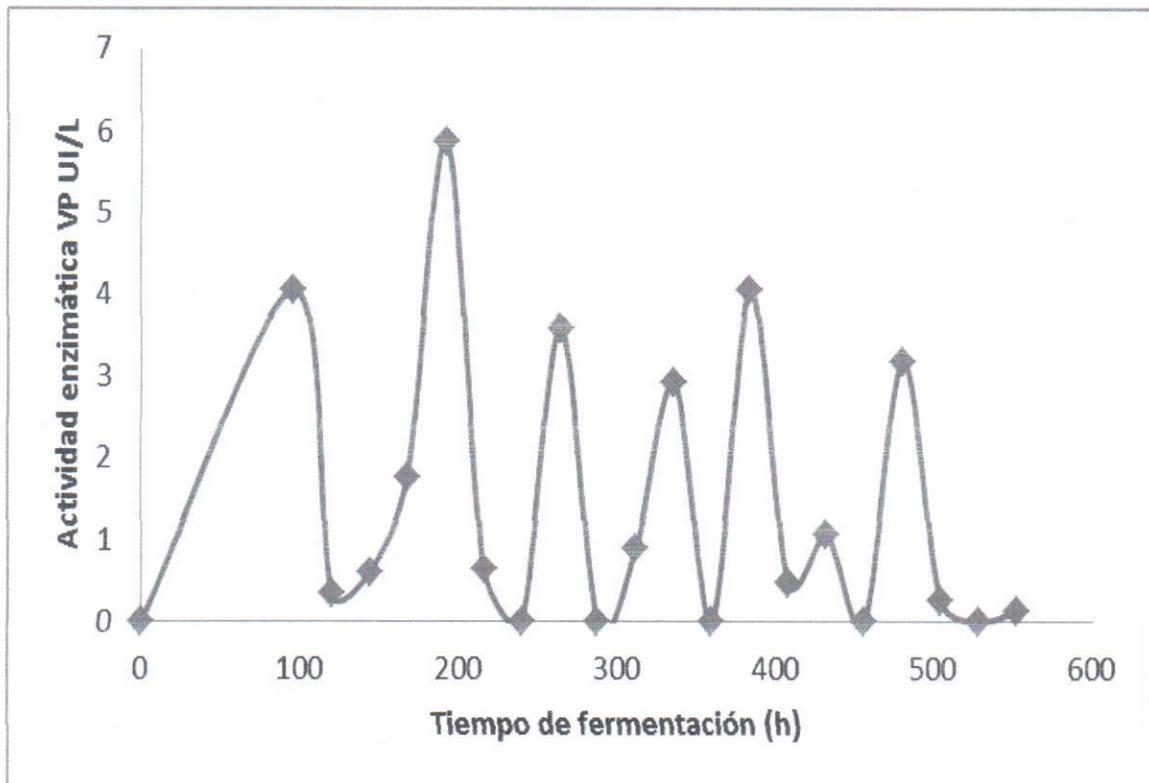


Figura 25. VP extracelulares de *Pleurotus ostreatus* desarrollado sobre PUF

7.3.7. Actividad enzimática LAC intracelulares de *Pleurotus ostreatus* en fermentación solida sobre PUF como sustrato

En la figura 26 se observan los puntos máximos a las casi 200 h

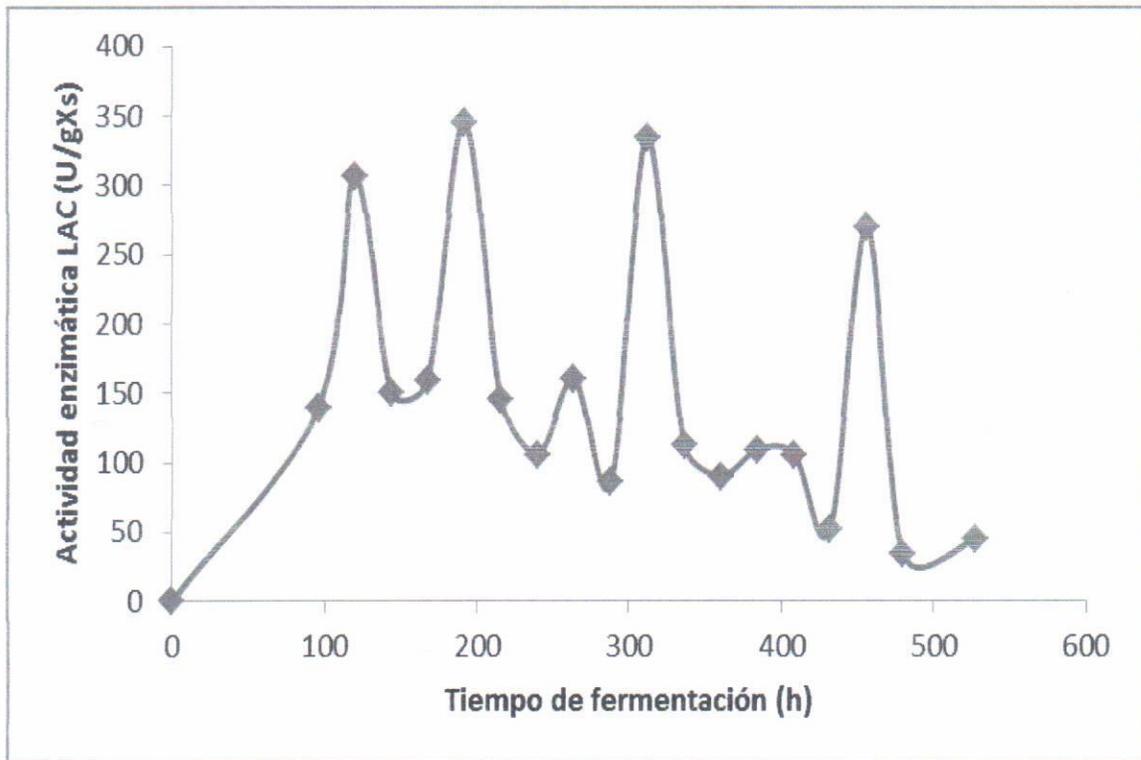


Figura 26. Lacasas intracelulares de *Pleurotus ostreatus* desarrollado sobre PUF como sustrato.

7.3.8. Actividad enzimática MnP intracelulares de *Pleurotus ostreatus* en fermentación solida desarrollado sobre PUF como sustrato

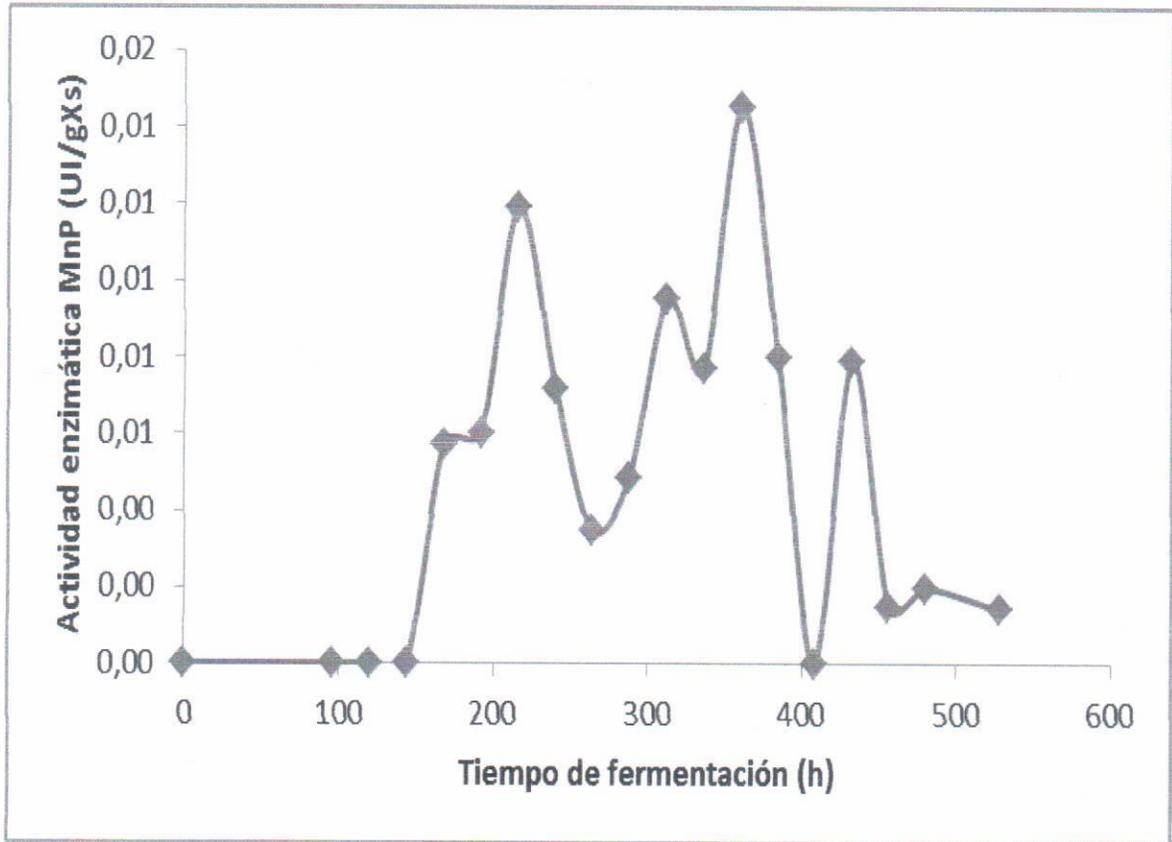


Figura 27. MnP intracelulares de *Pleurotus ostreatus* desarrollado sobre PUF como sustrato.

7.3.9. Actividad enzimática AVO intracelulares de *Pleurotus ostreatus* en fermentación solida sobre PUF como sustrato

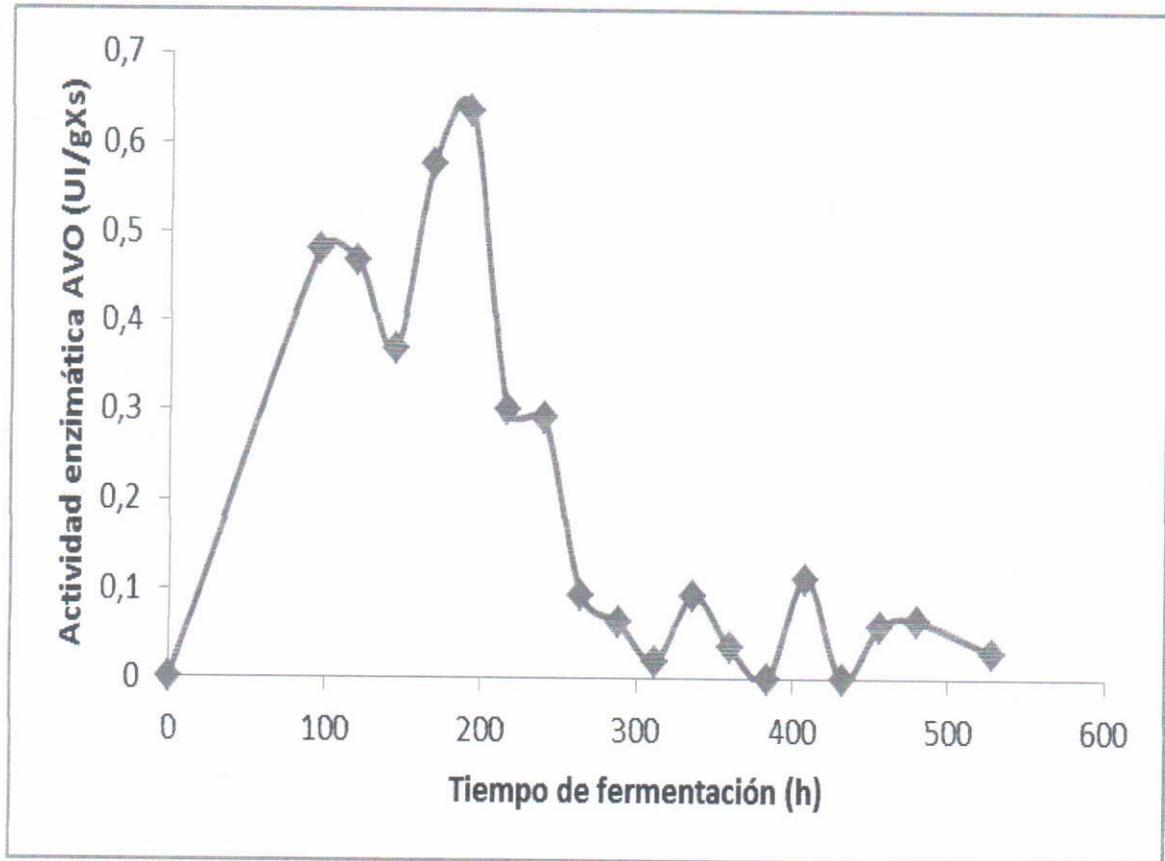


Figura 28. AVO intracelulares de *Pleurotus ostreatus* en fermentación solida sobre PUF como sustrato.

7.3.10. Actividad enzimática VP intracelulares de *Pleurotus ostreatus* en fermentación solida sobre PUF como sustrato

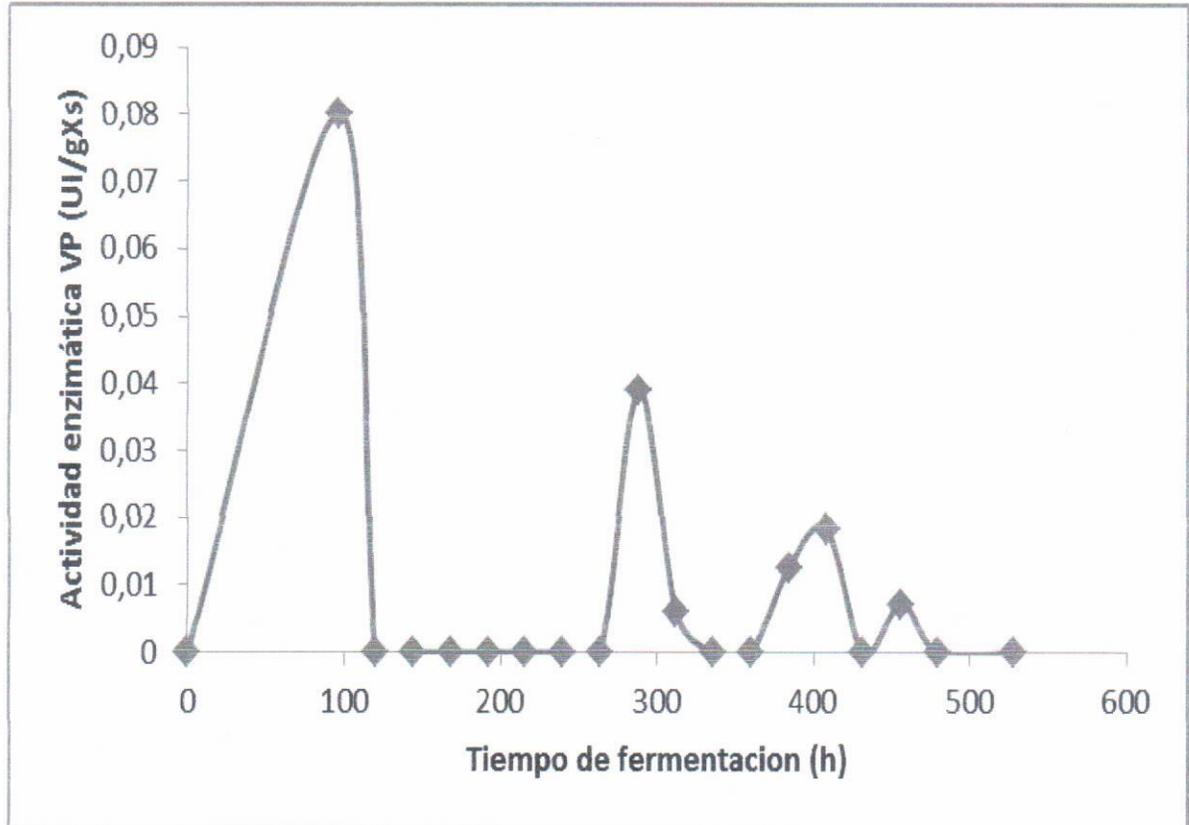


Figura 29. VP intracelulares de *Pleurotus ostreatus* en fermentación solida sobre PUF como sustrato

7.4. Zimogramas de *Pleurotus ostreatus*

7.4.1. Zimogramas de lacasas del cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus*

El Zimograma de cuerpo fructífero se muestra en la figura 14. Donde se observa una isoforma presente en todos los distintos extractos obtenidos del cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus*.



Figura 30. Zimograma de lacasas de cuerpo fructífero.

7.4.2. Zimogramas de lacasas extracelulares producidas en fermentación líquida

La imagen 31 muestra el número de isoformas de lacasas presentes en los distintos tiempos de fermentación; donde podemos observar dos isoformas presentes durante los distintos tiempos y como a partir del noveno día se encuentra una tercera isoforma.

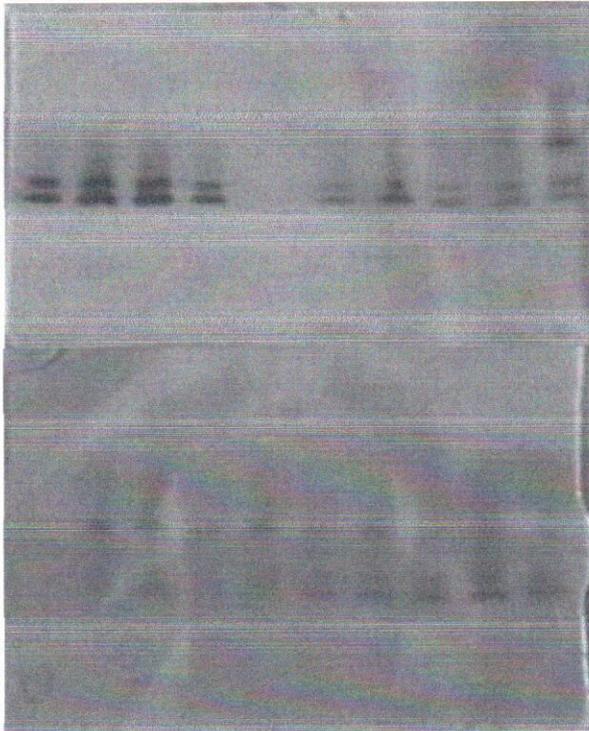


Figura 31. Zimograma de lacasas extracelulares producidas en fermentación líquida.

7.4.3. Zimogramas de lacasas intracelulares producidas en fermentación líquida

Las tres isoformas intracelulares se pueden observar en distintos tiempos de la fermentación como lo muestra la figura 32

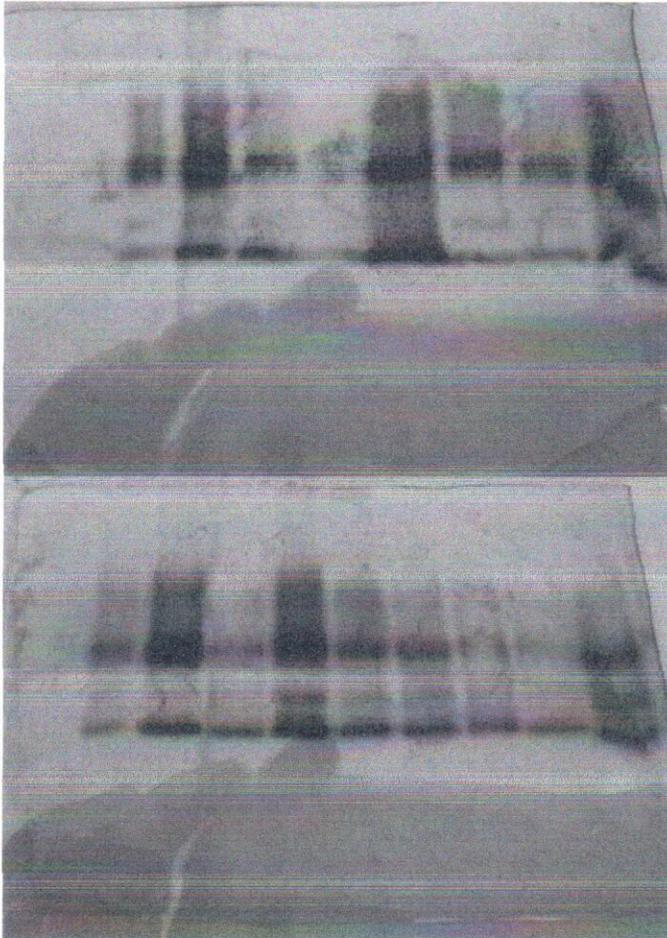


Figura 32. Zimograma de lacasas intracelulares producidas en fermentación líquida.

7.4.4. Zimogramas de lacasas extracelulares producidas en fermentación sólida

La figura 33 muestra las dos distintas isoformas de lacasas presentes durante el tiempo de fermentación.

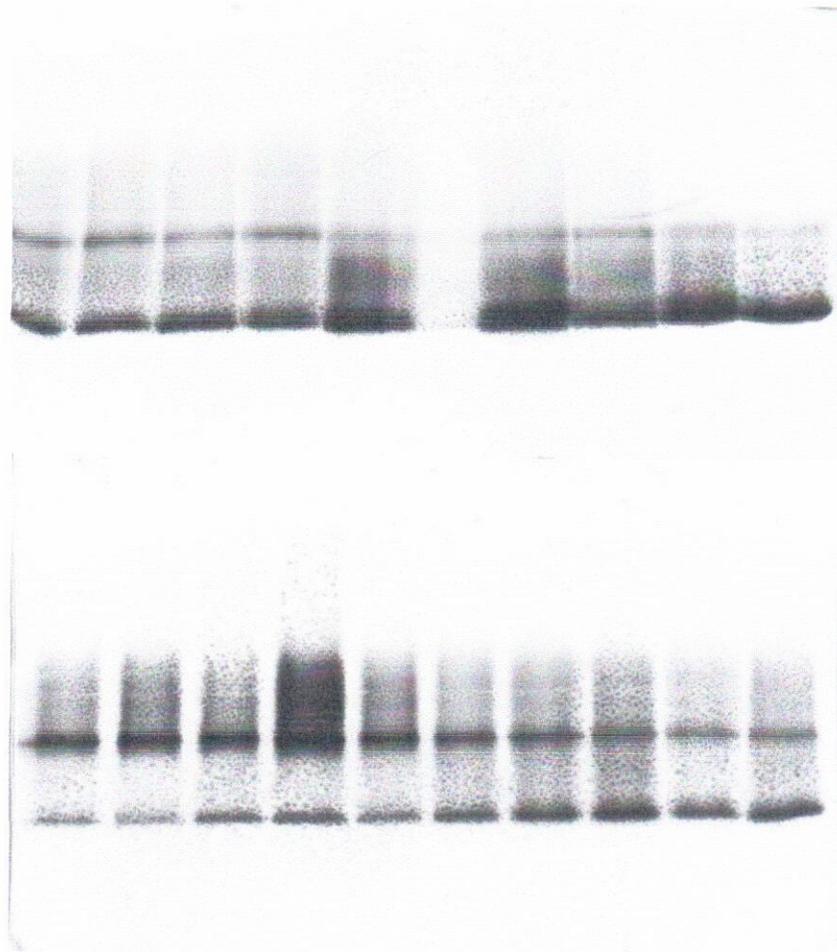


Figura 33. Zimogramas de lacasas extracelulares producidas en fermentación sólida.

7.4.5. Zimogramas de lacasas intracelulares producidas en fermentación sólida

La figura 34 muestra que a las 144 horas de fermentación se podrían observar hasta 4 isoformas diferentes mientras que en el resto de los días de fermentación se identifican dos diferentes pero constantes.



Figura 34. Zimogramas de lacasas intracelulares producidas en fermentación sólida.

7.4.6. Zimogramas de MnP extracelulares producidas en fermentación líquida

En la figura 16 podemos observar dos bandas presentes en la fermentación de *Pleurotus ostreatus* en medio líquido.



Figura 35. Manganeso Peroxidasas extracelulares de *Pleurotus ostreatus* obtenidas de fermentación líquida

7.4.7. Zimogramas de MnP intracelulares en fermentación sólida

En la figura 36 se observa una isoforma diferente esto a las 120, 312 y 336 h. de fermentación.

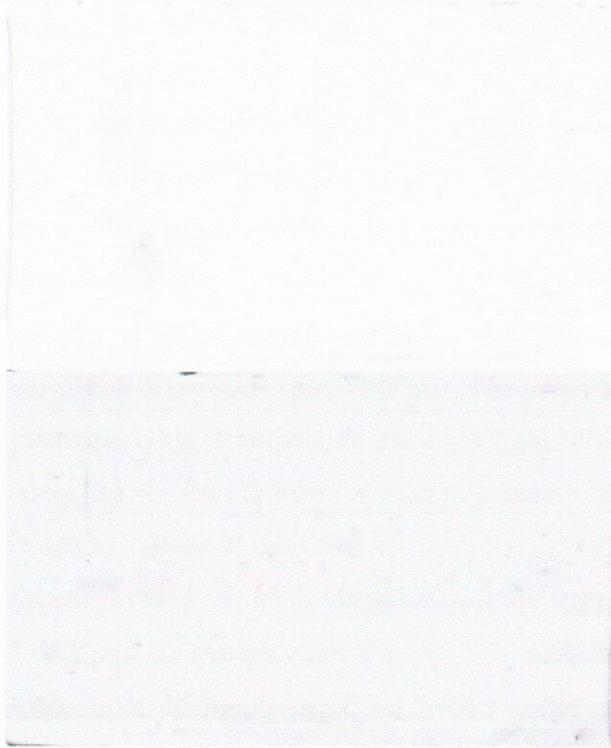


Figura 36. Manganeso Peroxidasas intracelulares de *Pleurotus ostreatus* obtenidas de FS

8. DISCUSIÓN

La producción de metabolitos tales como las enzimas se han evaluado en distintos sistemas de fermentación, presentando diferencias en la cinética enzimática, como lo describe Téllez-Téllez en 2008. Donde obtuvo una biomasa de 5.6 g/L para la fermentación sumergida (Fsm) mientras que en la fermentación sólida (FS) sobre espuma de poliuretano fue de 4.5 g/L. Los resultados obtenidos del presente trabajo de investigación mostraron diferencias, donde se obtuvo un rendimiento en biomasa de 7.3 g/L de la Fsm y de 5.1 g/L en la FS. La actividad enzimática de lacasa extracelulares obtenidas de los distintos sistemas de fermentación mostraron diferencias entre cada uno, siendo la FS la que presentó valores de hasta 13000 U/L, diferentes a los reportados en 2008 por Téllez-Téllez donde la actividad máxima obtenida fue de 2430 U/L. Para la Fsm los valores máximos obtenidos fueron de 2666 U/L, similares a los de Díaz Godínez R. en 2009.

En cuanto a la fermentación sobre paja de trigo, la concentración máxima reportada fue de 1.05 U/mL comparada con Cabrera y cols. quienes en 2011 desarrollaron a *Pleurotus ostreatus* sobre fibra de *Agave tequilana* Weber como sustrato se obtuvo una actividad enzimática máxima de 0.0454 U/mL a las 120 horas de cultivo. Las presentes diferencias y similitudes están ligadas a procesos idiofásicos, los cuales están determinados por la limitación de carbono y/o nitrógeno o sulfato en el medio y su síntesis particularmente activa con altas tensiones de oxígeno (Dosoretz y cols. 1990; Michel y cols. 1991; Rothschild y cols. 1995; Rothschild y cols. 1999; Schlosser y cols. 1997).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que la FS fueron 4.8 veces mayor a los resultados obtenidos de la Fsm. Estas diferencias podrían deberse, al proceso de reactivación de la cepa, al tipo de fermentación y que al desarrollar a *Pleurotus ostreatus* sobre espuma de poliuretano este comenzó el proceso de fructificación. Siendo esta última una condición atípica durante el desarrollo de este microorganismo. Mientras que la producción de enzimas extracelulares presentes en la paja de trigo presentó diferencia fue substancial con respecto a las producidas en la espuma de poliuretano ya que esta fue 3097.34 veces mayor.

En la producción de las enzimas extracelulares manganeso peroxidasas la mayor producción se observó en la fermentación en medio sólido ya que fue 6.5 veces mayor a la producción en medio líquido. Mientras que para las enzimas intracelulares la mayor producción fue en el medio líquido esto por una ligera diferencia de 0.06 unidades con respecto a las producidas en el medio sólido y 2.8 veces mayor a las producidas intracelularmente en el cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus*.

Mientras que para la enzima alcohol veratril oxidasa en los distintos métodos de producción se puede observar diferencias ya que en la fermentación sólida existen hasta 4 veces menor producción con respecto a la fermentación líquida, pero comparándola con la fermentación sobre paja de trigo fue de 217 veces mayor lo cual nos muestra que la producción en medio líquido es el medio idóneo para la producción de estos metabolitos. En el caso de las enzimas intracelulares los valores fueron muy similares aunque comparándolos con los obtenidos del cuerpo fructífero este fue mayor 1.4 veces con respecto a los anteriores.

Al evaluar la producción de la enzima versátil peroxidasa se observó que la mayor producción extracelular fue en la fermentación líquida con 1.7 veces más actividad que la fermentación sólida y mucho mayor con respecto a la obtenida en paja de trigo. En el caso de las enzimas intracelulares las diferencias entre la fermentación líquida y sólida sobre espuma de poliuretano no es muy grande dado que sólo es una unidad y con respecto a la producida en el cuerpo fructífero esta demostró ser mayor a las dos mencionadas anteriormente esto con un valor 1.7 veces mayor.

En el caso de la Zimografía las isoformas de lacasas presentes en los distintos sistemas de producción fueron múltiples y variadas dos en el caso de la fermentación sólida con respecto a la líquida que presentó hasta tres diferentes esto en el caso de las enzimas extracelulares. Más si comparamos las presentes de manera intracelular podemos observar que en el caso de la fermentación sólida existen hasta cuatro diferentes isoformas esto a las 120 horas de la

fermentación mientras que la fermentación líquida están presentes tres diferentes isoformas en los distintos tiempos de fermentación.

En el caso de la Zimografía de las enzimas manganeso peroxidasas en la fermentación líquida se pueden observar dos distintas isoformas esto en 504 y 528 horas de la fermentación.

Mientras que en el Zimograma de las enzimas intracelulares presentes en la fermentación sólida es posible observar una isoforma a las 96 264 y 288 horas.

9. CONCLUSIONES

La mayor actividad intracelular de lacasas fue en el desarrollo del cuerpo fructífero esto en comparación con el micelio.

La mayor actividad intracelular de manganeso peroxidasa fue en el desarrollo del cuerpo fructífero esto en comparación con el micelio.

La mayor actividad intracelular de alcohol veratril oxidasa fue en el desarrollo del cuerpo fructífero esto en comparación con el micelio.

La mayor actividad intracelular de versátil peroxidasa fue en el desarrollo del cuerpo fructífero esto en comparación con el micelio.

La actividad extracelular de las distintas enzimas está ligada al medio en el que se desarrolla el microorganismo.

Las enzimas lacasas presentaron diferente número de isoformas dependiendo del tipo de fermentación del que se obtuvo la enzima.

Las enzimas manganeso peroxidasa presentaron diferente número de isoformas dependiendo del tipo y origen de la enzima.

10. BIBLIOGRAFIA

- Aitken, M.D., Venkatadri, R., Irvine R.L. (1989). Oxidation of phenolic pollutants by a lignin degrading enzyme from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Water Research*. 23: 443-450.
- Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., Blackwell, M. (1996). Introductory mycology. 4^a edition, editorial John Wiley And Sons. New York. 869
- Archibald, F.S. y Fridovich, I. (1982). The scavenging of superoxide radical by manganous complexes: in vitro. *Archives Biochemistry and Biophysics*. 214: 452-463.
- Arias, G., Gutiérrez, C., Ospina, C. (2008). Propuesta del cultivo de hongo *Pleurotus* y *Lentinula edodes* a partir de la biomasa del café en las fincas cafeteras de manizales para el fortalecimiento de los programas de desarrollo alternativo. *Cuadernos Latinoamericanos De Administración*. 4(6):35-68.
- Backa, S., Gierer, J., Reitberger, T. y Nilsson, T. (1993) Hydroxyl radical activity associated with the growth of white-rot fungi. *Holzforschung* 47: 181-187.
- Banci, L., Bertini, I., Bini, T.Z., Tien, M. y Turano, P. (1993). Binding of horseradish, lignin, and manganese peroxidases to their respective substrates. *Biochemistry* 32: 5825-5831.
- Banci, L. (1997) Structural properties of peroxidases. *Journal Biotechnology*. 53: 253-263.
- Bao, W.L., Fukushima, Y., Jensen, K.A., Moen, M.A. y Hammel, LE. (1994). Oxidative degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase. *FEBS Letters*. 354: 297-300.

- Camarero, S., Bockle, B., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (1996). Manganese-mediated lignin degradation by *Pleurotus pulmonarius*. *Applied Environment Microbiology*. 62: 1070-1072.
- Cohen, R., Persky, L., Hadar, Y. (2002). Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 58: 582-594.
- Crawford, R.L. (1981). Lignin biodegradation and transformation. *Wiley Interscience, New York*
- Cullen, D., Kersten P. (2004). Enzymology and molecular biology of lignin degradation. *The mycota III, springer-Verlag*. 13: 249-273.
- D'Souza, T. M., Merritt, S. C. y Reddy, A. (1999). Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (12):5307-5313.
- Dávila, G., Vazquez, R. (2006). Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. *Mensaje bioquímico*, 30: 29-55.
- Degollado-Estrada A. 2008. Evaluación sobre diferentes sustratos de la actividad de lacasas de dos cepas de *Pleurotus ostreatus* producida por fermentación sumergida. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala. México.
- Díaz-Godínez G., Soriano J., Augur C., Viniestra-González G. (2001). Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 64: 271-275.
- Dosoretz, C., Chen, A., Grethlein, H. (1990). Effect of oxygenation conditions on submerged cultures of *phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34: 131-137.

- García Oduardo N., Bermúdez Savón R. C., Augur C., Roussos S., Perraud-Gaime I. (2007). Producción de lacasa extracelular, remoción de fenoles y cafeína por *Pleurotus* spp. Cultivado en pulpa de café. *Tecnología Química*. 27(3): 83-91.
- Gianfreda L, Xu F, Bollag JM. 1999. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal* 3: 1-25.
- Gómez-Dorado C., Martínez-Salgado M., Nieto- Mosquera D., Pedrosa- Rodríguez2, A., Rodríguez-Vázquez R., Rosas-Acosta J. (2005) estudio del efecto de dos inductores y un protector enzimático sobre la actividad de las enzimas mn-peroxidasa y lacasa producidas por *Trametes versicolor* y su efecto en la decoloración de efluentes de la industria papelera. *Universitas Scientiarum*. 10 (2): 37-45.
- Guillén, F. y Evans, C.S. (1994) Anisaldehyde and veratraldehyde acting as redox cycling agents for H₂O₂ production by *Pleurotus eryngii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 2811-2817.
- Guillén, F., Martínez, A.T., Martínez, M.J. y Evans, C.S. (1994) Hydrogen peroxide-producing system of *Pleurotus eryngii* involving the extracellular enzyme aryl-alcohol oxidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 41: 465-470.
- Guillén, F., Gómez-Toribio, V., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2000) Production of hydroxyl radical by the synergistic action of fungal laccase and aryl alcohol oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 383: 142-147.
- Gutiérrez, A., Caramelo, L., Prieto, A., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (1994) Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 1783-1788.
- Guzmán, G., Mata, G., Salmones, D., Soto-Velazco, C., Guzmán-Dávalos, L. (1993). El cultivo de los hongos comestibles. Instituto Politécnico Nacional. México. 245.

- Evans, C.S., Dutton, M.V., Guillén, F. y Veness, R.G. (1994) Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. *FEMS Microbiology. Reviews.* 13: 235-240.
- Faison, B.D. y Kirk, T.K. (1983) Relationship between lignin degradation and production of reduced oxygen species by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Environment Microbiology* 46: 1140-1145.
- Fan, L., Soc cols., Pandey A., Soccol C. R. (2003). Cultivation of *Pleurotus* Mushrooms on Brazilian coffee Husk and Effects of Caffeine and Tannic Acid. *Micologia Aplicada Internacional*, 15 (1): 15-21.
- Ferreira N. (2004). Estudios estructura-función sobre la enzima aril-alcohol oxidasa implicada en la biodegradación de la lignina. Tesis Doctoral Universidad de Alcalá, De España.
- Fritsche, W., Hofrichter, M. (1999). Aerobic degradation by microorganisms. *Advances in biochemical engineering biotechnology.* t. Scheper (Ed.), Springer-Verlag. 63. Biotransformations.
- Futoshi, S., Ichijo, N., Yamaguchi, H., Nakatsumi, H., Ando, A., Iijima, N., Oguri, S., Uehara, K., Nagata, Y. (2004). Molecular properties of mycelial aggregate specific ectin of *Pleurotus cornucopiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 98(4): 257-262.
- García, J. J., Pedraza, K. D., Silva, B. C., Andrade, M. R., Castillo, T. J. (1998). Hongos del estado de Querétaro. Universidad Autónoma De Querétaro. México. 11-15.
- García, Torres A. M., Y Torres Sáe R.G., (2003). Producción De Enzimas Lignolíticas Por Basidiomycetes Mediante La Técnica De Fermentación En Sustrato Sólido. *Revista Colombiana De Biotecnología*, V, 001: 56-64.
- Glenn, J.K., Akileswaran, L. y Goid, M.H. (1986). Mn(II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemical and Biophysical.* 251: 688-696.

- Hammel, K.E. Eds.: Cadisch, G. Y Giler, K.E. (1997). Fungal degradation of lignin. in: plant litter quality and decomposition. Centre for Agricultural Bioscience International International, London, 3: 3-45
- Have, R., Teunissen, P. J. M. (2001). Oxidative Mechanisms Involved In Lignin Degradation. *Whiterot fungi. Journal Chemical Reviews*, 101:3397-3413.
- 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.
- Henriksen, A., Sehuller, D.J., Meno, K., Welinder, K.G., Smith, A.T. y Gajhede, M. (1998). Structural interactions between horseradish peroxidase C and the substrate benzhydroxamic acid determined by X-ray crystallography. *Biochemistry* 37: 8054-8060.
- Herrera, T. Y Ulloa, M. (1998). El reino de los hongos: micología básica y aplicada. Fondo De Cultura Económica – UNAM. México, 552.
- Herrera-Mora, J.A., Rosas-Acosta, J.M., Mercado, M., Martínez, M.M., Pedroza, A.M. (2004). Efecto de las enzimas ligninolíticas de los hongos *Trametes versicolor* y *Phanerochaete chrysosporium* inmovilizados en espuma sobre la remoción de color, demanda química de oxígeno y clorofenoles en aguas residuales de industria papelera colombiana.
- Hüttermann, A., Mai, C., Kharazipour, A. (2001). Modification of lignin for the production of new compounded materials. *Applied Microbiology Biotechnology* 55:387-394.
- Ikehata, K., Buchanan, I., Smith, D. (2004). Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidase and laccases for waste treatment, *Journal of Environmental Engineering and Science*. 3: 1-19.

- Jiménez T, G. A., Mejía G. A. I., López O. B. L. (1999). Actividad de las enzimas ligninolíticas del *Phanerochaete chrysosporium* y su variación con la adición de Mn^{+2} . *Revista academia colombiana de ciencias*. 3 (89): 587-594.
- Juárez-Hernández J. (2006). Estudio de las condiciones de fermentación sumergida para la producción de lacasas de *Pleurotus ostreatus*. *Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas*. Universidad Autónoma de Tlaxcala. México.
- Kelley, R.L. y Reddy, C.A. (1986) Identification of glucose oxidase activity as the primary source of hydrogen peroxide production in ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Microbiology*. 144:248-253.
- Kersten, Pj. y Kirk, T.K. (1987) Involvement of a new enzyme, glioxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal Bacteriology*. 169: 2195-2201.
- Kirk, T. K. y Cullen, D. (1998). Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. En: Young, R. A. y Akhtar, M. (Eds). Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. TAPPI Press. Atlanta.
- Kirk, T. K., Farrelly, R. L. (1987). Enzymatic Combustion: The microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology*. 41:465-505
- Koenigs, J.W. (1974) Production of hydrogen peroxide by wood-rotting fungi in wood and its correlation with weight loss, depolymerization, and pH changes. *Archives of Microbiology* 99: 129-145.
- Koltin, Y., Stamberg, J., Lemke, P. A. (1972). Genetic structure and evolution of the incompatibility factors in higher fungi. *Bacteriological Reviews*. 36 (2): 156-171.
- Kuan, I.C. y Tien, M. (1993) Stimulation of Mn-peroxidase activity: A possible role for oxalate in lignin biodegradation. *Proceedings National Academy Sciences*. USA 90: 1242-1246.

- Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A., Gold, M.H., 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Federation of European Biochemical Societies*. 69: 247-250.
- Larraya, L. M., Peñas, M.M., Pérez, G., Santos, C., Ritter, E., Pisabarro, A. G., Ramírez, L. (1999). Identification of incompatibility alleles and characterisation of molecular
- Leonowicz, A. (2001). Fungal laccase: properties and activity on lignin, *Journal. Basic Microbiology*. 41: 185-227.
- Lin, S. Y., Dence, C. W. (1992). *Methods in lignin chemistry*. Springer-Verlag, Berlin.
- Li, H.Y. y Poulos, T.L. (1994). Structural variation in heme enzymes: A comparative analysis of peroxidase and P450 crystal structures. *Structure*. 2: 461-464.
- Litthauer D., van Vuuren M J., Tonder A., y Wolfaardt F W., 2007. Purification and kinetics of a thermostable laccase from *Pycnoporus sanguineus* (SCC 108). *Enzyme and Microbiol Technology* 40: 563-568.
- Maldonado Astudillo Y. I. (2007). Obtención de cepas híbridas de *pleurotus* spp. por apareamiento de neohaplontes compatibles. Maestría Unidad Profesional Interdisciplinaria De Biotecnología Instituto Politécnico Nacional. 142.
- Martínez-Salgado M, Pedrosa-Rodríguez A., Rodríguez-Vázquez R., Rosas-Acosta J. (2005). Efecto de la glucosa y nitrato de amonio sobre las enzimas ligninolíticas producidas por *Trametes versicolor* inmovilizado en espuma y la decoloración de un efluente papelerero en un biorreactor de lecho fluidizado. *Universitas Scientiarum* 10: 2, 27-36.
- Marzullo, L., Cannio, R., Giardina, P., Santini, M.T. y Sannia, G. (1995). Veratryl alcohol oxidase from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevents polymerization of laccase-oxidized substrates. *The Journal of Biological Chemistry*. 270: 3823-3827.

- Michel, F., Dass, S.B., Gruleke, E., Reddy, A. (1991). Role of manganese peroxidase and lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of kraft bleach plant effluent. *Applied and Environmental microbiology*, 57(8): 2368-2375.
- Moeller, G.E Y Garzon, M.A. (2003). Desarrollo de tecnologías no convencionales para el tratamiento de efluentes de la fabricación de colorantes del tipo azo. Anuarioimta.
- Moore-Landecker, E. (1996). Fundamentals of the fungi. 4a Edición. Editorial Prentice Hall. USA. 574.
- Morozova V, Shumakovich GP, Gorbacheva MA, Shleev SV, Yaropolov AI. 2007. Blue laccases. *Biochemistry-Moscow* 72:1136-1150.
- Mushworld. Mushroom Growers Handbook 1: Oyster mushroom cultivation. mushworld-heineart.inc. Corea. (2004). Translation: CERZOS . Argentina.
- Nishida, A. y Eriksson, K.-E. (1987) Formation, purification, and partial characterization of methanol oxidase, a H₂O₂-producing enzyme in *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 9: 325-338.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C, Scaloni A, Capasso A, Sanna G. (1997). A novel white lacasa from *Pleurotus ostreatus*. *Journal Biological Chemistry*; 272: 31301-30307.
- Pandey A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13: 81-84.
- Pant, D., Adholeya, A. (2007). Biological approaches for treatment of distillery wastewater: A Review. *Bioresource Technology*. 98: 2321-2334.
- Pelletier, H. y Kraut, J. (1992) Crystal structure of a complex between electron transfer partners, cytochrome *c* peroxidase and cytochrome *c*. *Science* 258: 1748-1755.
- Poulos, T.L., Edwards, S.L., Wariishi, H. y Gold, M.H. (1993) Crystallographic refinement of lignin peroxidase at 2 Å. *Journal Biological Chemistry*. 268: 4429-4440.

- Poulos, T.L., Patterson, W.R. y Sundaramoorthy, M. (1995) The crystal structure of ascorbate and manganese peroxidases: The role of non-haem metal in the catalytic mechanism. *Biochemical Society Trans.* 23: 228-232.
- Quintero, D., Gumersindo, J., Feijoo, C., Lema, R. (2006). Produccion De Enzimas Ligninolíticas Con Hongos Basidiomicetos Cultivados Sobre Materiales Lignocelulosicos. *Vitae.* 13(2): 61-67.
- Ramírez, L., Larraya, L. M., Pisabarro, A. G. (2000). Molecular tools for breeding basidiomycetes. *International Microbiology.* 3: 147–152.
- Esperanza Ramírez N., Carolina Vargas M, Ariza J. C., Martínez C. (2003). Caracterización de la lacasa obtenida por dos métodos de producción con *Pleurotus ostreatus*. *Revista Colombiana De Biotecnología* 2 (5): 64 – 72.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., Nigman, P. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology.* 77: 247-255.
- Rodríguez, S., Fernández, M., Bermúdez C. R., Morris, H (2003) “Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus* spp.” *Iberoam Micol* ; 20: 164-168.
- Rothschild, N.,Levkowitz, A.,Hadar, Y.,Dosoretz, C. (1999). Manganese deficiency can replace high oxygen levels needed for lignin peroxidase formation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (2): 483-488.
- Sarkar, S., Martínez A., Martinez M. 1997. Biochemical and molecular characterization of a manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Biochimica et biophysica Acta.* 1339: 23-30.
- Schlosser, D., Grey, R.,Fritsche, W. (1997). Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra- and intracellular enzymes activities during cultivation

- on glucose, wheat straw and beech wood. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47: 412-418.
- Schoemaker, H.E. (1990). On the chemistry of lignin degradation. *Recueil Des Travaux chimiques Des Pays-Bas*. 109: 255-272
- Schwarze F., Engels J., Mattheck C. (2000). Fundamental aspects. fungal strategies of wood decay in trees. Editorial Springer 1: 5-31
- Silva M. E, Martins F. S, Milagres F. M. A. (2007). Extraction of manganese peroxidase produced by *Lentinula edodes*. *Bioresource Technology*. 99: 2471-2475.
- Stajic M, Persky L, Friesem D, Hadar Y, Wasser S, Nevo E, Vukojevic J. (2006). Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme and Microbial Technology* 38: 65-73
- Stamets, P. (2003). Mycomedicinal: an information booklet on medicinal mushroom. Editorial Olimpia
- Sundaramoorthy, M., Kishi, K., Goid, M.II. y Poulos, T.L. (1994). The crystal structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporiwn* at 2.06-Å resolution. *Journal Biological Chemistry*. 269: 32759-32767.
- Téllez-Téllez M., Fernández J., Montiel A., Sánchez C., Díaz-Godínez G. (2008). Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81: 675-679.
- Tlecuítl-Beristain S., Sánchez C., Loera O., Robson G.D., Díaz-Godínez G. (2008). Laccase of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its grow the in submerged fermentation: production of a novel laccases isoform. *Mycological Research*, 112: 1080-1084.
- Ullah, M.A.,Kadhim, H.,Rastall, R.A. Evans, C.S. (2000). Evaluation of Solid Substrates for Enzymes Production by *Coliorus versicolor*, For Use in Bioremediation of

- Chlorophenols in aqueous Effluents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54: 832-837.
- Valencia-Del Toro, G., (2002). Estudios sobre la expresión del color de los esporóforos de *Pleurotus* spp. Por apareamiento de neohaplontes compatibles y progenies monospóricas. Tesis De Doctorado. UNAM. México, D.F.
- Varnero T. M., Quiroz S. M., Álvarez H. C. (2010) Utilización de Residuos Forestales Lignocelulósicos para Producción del Hongo Ostra (*Pleurotus ostreatus*). *Información Tecnológica* 21 (2): 13-20.
- Viniegra-González G, Favela-Torres E, Aguilar CN, Romero-Gómez S, Díaz-Godínez G, Augur C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biotechnology Engineering Journal*, 13: 157-167.
- Wariishi, H., Valli, K. y Gold, M.H. (1989). Oxidative cleavage of a phenolic diarylpropane lignin model dimer by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry* 28: 6017-6023.
- Wariishi, H., Valli, K., Gold, M.H., (1992). Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal Biological Chemistry*, 267: 23668-23695.
- Zadrazil, F. (1974). The Ecology and Industrial Production of *Pleurotus Ostreatus* Complex from the Continental United State and Adjacent Canada. *Can. Journal Botany*, 71: 113.