



---

---

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA

Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

Maestría en Ciencias Biológicas

“Evaluación en fermentación líquida de dos métodos de inoculación de *Pleurotus ostreatus* y su aplicación en fermentación sólida para la producción de lacasas”

Tesis  
para obtener el grado de  
Maestra en Ciencias Biológicas

Presenta

Brenda Sacnicté López Solano

Director  
Dr. Gerardo Díaz Godínez  
Dra. Alba Mónica Montiel González

Tutor  
Dr. Norberto Chavarría Hernández

Agradezco el apoyo brindado a los centros de investigación donde se realizó el estudio de investigación y a sus colaboradores que intervinieron en la formación del mismo, siendo estos el Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (CTBC) y al Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas (CICB).

Así también, al apoyo otorgado por el Proyecto No. 47396 de la Convocatoria SEP-CONACYT 2004. Además, parte del presente trabajo de investigación se realizó con el apoyo financiero otorgado por PROMEP al proyecto “Estudios de Expresión del gen de una lacasa altamente activa de *Pleurotus ostreatus* en fermentación líquida”, con folio UATLX-EXB-197.

Cabe mencionar la Maestría en Ciencias Biológicas está registrada en el Programa para el Fortalecimiento del Posgrado Nacional. Padrón Nacional de Posgrado (PNP) con No. de referencia 001869. Asimismo, agradezco a CONACyT por la beca No. 201531 otorgada durante el proceso de investigación.



Universidad Autónoma de Tlaxcala  
Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

Maestría en Ciencias Biológicas



COORDINACIÓN DE LA MAESTRÍA  
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA  
PRESENTE

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que Brenda Sacnicte López Solano realiza para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es: "Evaluación en fermentación líquida de dos métodos de inoculación de *Pleurotus ostreatus* y su aplicación en fermentación sólida para la producción de lacasas".

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
Tlaxcala, Tlax., Junio 11 de 2010

Dr. Norberto Chavarría Hernández

Dra. Alba Mónica Montiel González

Dr. Gerardo Díaz Godínez

Dra. María del Carmen Sánchez Hernández

M. en C. Saul Flecutit Beristain



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



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070 Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: posgrados@b.uat@gmail.com  
Tlaxcala, Tlax.

## RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se evaluó dos métodos de inoculación de *Pleurotus ostreatus* (ATCC 32783) en fermentación en medio líquido con el propósito de implementarse en fermentación en medio sólido para la producción de enzimas lacasas.

La fermentación en medio líquido se llevo a cabo durante 20 días. Se utilizaron dos tipos de inoculación: “pellets” y suspensión de micelio. Los parámetros evaluados fueron perfil de pH, concentración de proteína soluble, concentración de azúcar, biomasa y actividad de lacasas utilizando 2,6-dimetoxifenol (DMP) como sustrato.

Se observó poca variación al pH inicial del medio en ambos métodos de inoculación, la concentración de proteína total soluble fue mayor en suspensión de micelio (0.171 g/L) respecto al obtenido en “pellets” (0.071 g/L). También, se presentó mayor actividad enzimática lacasa en suspensión de micelio (14555 U/ L) que en “pellets” (12435 U/L). El consumo total de azúcar en ambos sistemas se observó a las 480 horas y el crecimiento cinético fue similar en los dos casos.

Una vez valorado el método de inoculación en fermentación líquida, se procedió a llevarlo a cabo en fermentación en medio sólido utilizando paja de trigo como sustrato biodegradable. Inicialmente, se evaluó viabilidad y crecimiento del micelio del hongo en el sustrato. Después se realizó la fermentación en medio sólido durante 30 días, en la que se caracterizó por medio de la valoración de rango de pH, concentración de proteína soluble y actividad enzimática con las metodologías utilizadas en fermentación líquida.

En la caracterización de la fermentación se observó: disminución del pH durante el proceso de fermentación, la mayor concentración de proteína total soluble fue de (0.196 g/L) a las 240 horas de fermentación y el valor máximo de actividad lacasa se presentó a las 432 horas (1880 U/L).

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 Fermentación .....	8
1.2 Fermentación en medio líquido .....	9
1.3 Fermentación en medio sólido.....	10
1.4 Género <i>Pleurotus</i> .....	15
1.5 Enzimas Lacasas.....	18
2. ANTECEDENTES .....	19
3. JUSTIFICACIÓN.....	24
4. HIPOTESIS .....	25
5. OBJETIVOS.....	26
5.1 Objetivo general .....	26
5.2 Objetivos específicos.....	26
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
Caracterización de la fermentación: .....	27
6.2 Fermentación en medio líquido .....	28
6.3 Inoculación .....	29
6.4 Obtención del extracto crudo enzimático .....	29
6.5 Determinación de pH.....	30
6.6 Determinación de la concentración de proteína soluble.....	30
6.7 Cuantificación de azúcares residuales. ....	30
6.8 Determinación de la actividad enzimática.....	30
6.9 Determinación de Biomasa por diferencia de peso seco. ....	31
6.12 Fermentación en medio sólido.....	32
6.13 Inoculación de la fermentación en medio sólido .....	32
6.14 Obtención del extracto enzimático .....	33
6.15 Caracterización de la fermentación en medio sólido.....	33
7. RESULTADOS .....	33
7.1 Caracterización de la fermentación líquida .....	33
7.1.1 Perfil de pH.....	33
7.1.2 Concentración de proteína soluble .....	34
7.1.3 Concentración de azúcar.....	35
7.1.4 Actividad Enzimática .....	36

7.1.5 Biomasa .....	38
7.1.6 Parámetros cinéticos de crecimiento .....	40
7.2 Caracterización del la fermentación en medio sólido.....	40
7.2.1 Viabilidad y Actividad Enzimática.....	40
7.2.2 Perfil de pH.....	42
7.2.3 Concentración de proteína soluble en fermentación sólida.....	43
7.2.4 Actividad Enzimática .....	44
8. DISCUSIONES .....	44
9. CONCLUSIONES.....	48
10. BIBLIOGRAFIA.....	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la lignina.....	17
Figura 2. Diagrama de la metodología .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 3. Perfil de pH obtenido de <i>P. ostreatus</i> inoculado por suspensión de micelio .....	34
Figura 4. Concentración de proteína soluble obtenida por fermentación líquida con inoculación por suspensión de micelio .....	35
Figura 5. Consumo de azúcar de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación líquida por suspensión de micelio .....	36
Figura 6. Actividad de lacasas de <i>P. ostreatus</i> inoculados por suspensión de micelio .....	37
Figura 7. Crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación líquida inoculada por suspensión de micelio .....	39
Figura 8. Crecimiento e invasión de micelio de <i>Pleurotus ostreatus</i> inoculado por suspensión de micelio en fermentación en medio sólido .....	41
Figura 9. Actividad de lacasas de <i>P. ostreatus</i> producida por fermentación sólida.....	41
Figura 10. Actividad de lacasas de <i>P. ostreatus</i> producida por fermentación sólida.....	42
Figura 11. Perfil de pH de <i>P. ostreatus</i> obtenido por fermentación en medio sólido. ....	43
Figura 12. Concentración de proteína soluble de <i>P. ostreatus</i> obtenida por fermentación en medio sólido .....	43
Figura 13. Actividad de lacasas de <i>P. ostreatus</i> producida por fermentación sólida.....	44

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del medio para la fermentación sumergida .....	28
---	----

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Fermentación

La fermentación en términos generales y desde el punto de vista bioquímico es definida como el proceso en donde según el organismo y sus condiciones de crecimiento la vía de la glucólisis puede cumplir distintas funciones. En aquellos organismos que viven en condiciones anaerobias sirve como la principal vía productora de energía por catabolismo de carbohidratos dando por resultado la formación de productos metabólicos específicos (etanol, ácido láctico y glicerol). En condiciones aerobias, la acción combinada de la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico provoca una oxidación completa de los carbonos de una hexosa para formar bióxido de carbono acompañado de energía. Existen otras vías de fermentación, de la cual cada una aporta un producto final específico, que en su mayoría son variantes de la vía glucolítica (Bohinsky 1991).

Desde el punto de vista biotecnológico la fermentación es el proceso biológico mediante el cual determinados sustratos que constituyen el medio de cultivo son transformados por acción microbiana por metabolitos y biomasa. Los metabolitos obtenidos mediante este proceso que incluyen a aminoácidos, nucleótidos, vitaminas, ácidos orgánicos, enzimas, antibióticos, toxinas, alcaloides (ácido lisérgico), pigmentos, entre otros, son de interés humano justificando su producción a nivel industrial (Fletcher 1984).

Para que se pueda llevar a cabo dicha transformación es precisa la intervención de organismos con capacidad biológica de metabolizar el medio enriquecido (constituido principalmente por carbohidratos, proteínas, sales minerales, etc.) quien a su vez funge como medio de crecimiento. La variación de concentración del microorganismo en el medio esta íntimamente relacionada con la formación de productos y el consumo de sustratos en el medio en donde se desarrolla (Fletcher 1984).

Existen factores intrínsecos y extrínsecos que repercuten en el crecimiento del microorganismo y la obtención de producto en el medio de cultivo. Los factores intrínsecos están relacionados a la dotación genética del organismo, así como los mecanismos de regulación metabólica del mismo. El agente extrínseco esta relacionado con los factores físicos y químicos involucrados en el proceso de fermentación (Fletcher 1984).

Así pues, los componentes químicos inmersos en los medios de fermentación representan los factores de naturaleza química encargados principalmente de proveer los requerimientos nutricionales para el desarrollo o crecimiento del organismo. También, participan factores físicos como la temperatura, pH, agitación, aireación y otras variables físicas de manipulación que permiten en conjunto la optimización y estandarización de medios de cultivo idóneos para llevar a cabo la fermentación (Fletcher 1984).

Las fermentaciones a escala industrial se llevan a cabo en un contenedor normalmente de forma cilíndrica y de estructura metálica conocido como fermentador o biorreactor. La función principal de un biorreactor diseñado apropiadamente es la de proveer un medio controlado para alcanzar el crecimiento y la formación de productos óptimos en el sistema empleado, este último, bajo las condiciones físicoquímicas del medio de cultivo, así como las de operación, deben ser tales que aseguren la productividad máxima del proceso y la calidad del producto (Scragg 1996).

Existen tres principales medios de cultivo en la industria de la fermentación para la obtención de productos, estos son conocidos como fermentación en medio líquido, fermentación en medio sólido y la última que involucra la combinación de las anteriores (Holker y cols. 2004)

## 1.2 Fermentación en medio líquido

Gran parte de las fermentaciones industriales, han utilizado y desarrollado la fermentación en medio líquido o sumergida. Esta ha sido ampliamente utilizada en las industrias para la

producción de antibióticos y otros metabolitos de origen microbiano, los aspectos fisiológicos y técnicos son bien entendidos debido a que estos sistemas son homogéneos desde el punto de vista de la concentración celular, nutrientes y productos (Holker y cols. 2004).

Los procesos de fermentación en medio líquido incluyen una gran variedad de procesos microbiológicos que proveen ventajas en la industria biotecnológica, entre los cuales se encuentra el factor de agitación, permitiendo que el microorganismo este en contacto directo con los requerimientos nutrimentales y a su vez la biomasa este rodeada completamente por el medio de cultivo líquido. Otras ventajas de este sistema de fermentación se destacan la fácil recuperación de los metabolitos (Viniestra-González 1997), mayor control de factores físicos como el pH, temperatura y actividad de agua (Viniestra-González 1997). También, permite cuantificar de forma directa la biomasa producida durante el proceso (Díaz-Godínez y cols. 2001; Viniestra-González y cols. 2003).

Sin embargo, en sistemas de fermentación sólida éstos aspectos se ven afectados dada por la heterogeneidad y consistencia del sistema (Doelle y cols. 1992).

### 1.3 Fermentación en medio sólido

La fermentación en medio sólido es uno de los procesos bioquímicos más antiguos, existen de manera natural desde el comienzo de la vida y ha sido empleada en algunos países del Sudeste Asiático, África y América Central desde hace siglos para la elaboración de alimentos. Ejemplos de estos productos son el Koji, obtenido por el cultivo del hongo *Aspergillus oryzae* sobre cereales cocidos, el Shoyu, el Miso y el Ontjom (Hesseltine 1972). En la actualidad, se utiliza para la producción de bebidas alcohólicas, pan, quesos, fármacos, antibióticos, hormonas, entre otros.

A finales del siglo XIX surgieron diversas concepciones de fermentación. Inicialmente se empleó el término de fermentación en estado sólido a todas las fermentaciones donde el sustrato no es líquido (Hesseltine 1972). Posteriormente, se propuso que en las fermentaciones en estado sólido el sustrato no se encuentra disuelto ni en suspensión en un gran volumen de

agua (Raimbault 1980), otros autores plantearon la definición de fermentación sólida como un método de cultivo de microorganismos sobre y/o dentro de partículas sólidas (Mudgett 1986, Durand y cols. 1988).

Así pues, la concepción que se apega a este trabajo de investigación es aquella en la cual la fermentación en estado sólido es un proceso microbiológico que ocurre comúnmente en la superficie de materiales sólidos que tienen la propiedad de absorber y contener agua, con nutrimentos solubles (Viniegra 1997).

También, ésta definición abarca a aquellos procesos donde el soporte o sustrato sólido puede ser biodegradable como el bagazo de caña (Trejo y cols. 1991, Solis y cols. 1993, Acuña y col.1995), la pulpa de café (Antier y cols. 1993) y celulosa, o inerte como el poliuretano (Romero y cols. 2000; Díaz-Godinez y cols. 2001; Téllez-Téllez y cols. 2008) y la amberlita (Christen y cols.1993)

Actualmente, se sabe que las aplicaciones biotecnológicas de la fermentación en medio sólido a escala de laboratorio proporcionan ciertas ventajas, tales como alta productividad, estabilidad de productos, baja represión catabólica, cultivo de microorganismos especializados para sustratos insolubles en agua o soportes sólidos, entre otros (Holker y cols. 2004).

Los siguientes aspectos se tienen considerados como ventajas de fermentación sólida (Doelle y cols. 1992):

- Los medios de cultivo son generalmente subproductos agrícolas que presentan un alto contenido de los nutrientes necesarios.
- La baja actividad del agua es de gran ayuda para evitar las contaminaciones, especialmente de bacterias y levaduras.
- La concentración natural del sustrato permite utilizar reactores más pequeños en comparación con los utilizados en otro tipo de fermentación. Tienen mayor productividad volumétrica.

- La aireación forzada es facilitada por la porosidad del soporte, lo que permite una alta transferencia de oxígeno al microorganismo.
- Pueden emplearse, frecuentemente conidios como inóculo en los procesos de crecimiento de hongos, lo cual disminuye los costos y las manipulaciones en la preparación del inóculo.
- Los procesos se consideran generalmente como tecnologías limpias.

Entre las principales desventajas se encuentran:

- Su aplicación se limita a microorganismos que crecen en bajos contenidos de humedad.
- La extracción del calor metabólico puede ser un problema, sobre todo cuando se trabaja a gran escala y no se controla el proceso.
- La naturaleza sólida del sustrato conlleva problemas al medir los parámetros de la fermentación tales como el pH, la temperatura, el contenido de humedad y la concentración de sustrato y productos.
- Aspectos como el diseño de reactores y el escalado están poco caracterizados.
- El tiempo de fermentación es mayor debido a que generalmente se utilizan microorganismos que presentan bajas velocidades específicas de crecimiento.

Otros aspectos importantes a considerar en la FMS son las condiciones ambientales, tales como la humedad, la actividad del agua, el pH, la temperatura, la concentración y disponibilidad del sustrato, la aireación, el tamaño de partículas y la forma de inoculación.

El porcentaje de humedad en la fermentación sólida varía entre 30 y 80% (Oriol y cols. 1988), que dependen básicamente del sustrato y del microorganismo a utilizar. Ésta variable generalmente se optimiza en los sistemas de fermentación sólida (Kim y cols. 1985, Rodríguez y cols. 1986) en la actualidad se sabe que no es sólo la cantidad de agua presente en el sistema la que ejerce influencia sobre la eficiencia del proceso, sino el carácter de las interacciones entre el agua y el medio sólido a utilizar.

Un parámetro que afecta el desarrollo en los procesos de fermentación en estado sólido, así como en los cultivos sumergidos, es el pH. Sin embargo, en el caso de la fermentación sólida, es complicado llevar un control debido a la ausencia de instrumentos capaces de medir el pH en la capa de líquido que rodea el sólido (Mitchell y cols. 2002).

Además, el mezclado de material sólido es un proceso complejo por lo que se dificulta el control de esta variable durante el desarrollo de la fermentación. Estos conocimientos han sido utilizados por algunos investigadores para formular un medio de cultivo que permita mantener, de manera natural, el pH en un intervalo deseado durante el proceso. Así por ejemplo, algunos investigadores propusieron para el crecimiento de *Aspergillus niger* en harina de yuca una mezcla de sulfato de amonio - urea de 3 a 2 (calculado en base al nitrógeno) y se logró mantener el pH durante el proceso en el intervalo de 5 a 6.2, favorable para el crecimiento del microorganismo (Raimbault y Alazard 1980).

La temperatura en la fermentación sólida, se considera una variable crítica debido a la alta concentración de sustrato por unidad de volumen y a la baja conductividad térmica del sistema heterogéneo sólido - líquido - gas, lo que favorece la acumulación del calor metabólico en el sistema sólido y aumento de la temperatura del cultivo (Bernard y cols. 1992).

De igual forma que en los cultivos sumergidos, la concentración de sustrato ejerce influencia sobre el desarrollo del microorganismo, se piensa que los efectos de limitación sean mayores en las fermentaciones sólidas, debido a la baja velocidad de difusión de los nutrientes en la fase líquida (Moore y cols. 1983).

En la mayoría de los procesos de fermentación sólida y sumergida participan microorganismos aerobios. La aireación es considerada un factor elemental para el desarrollo del proceso. La aireación en las fermentaciones sólidas se presenta de manera más accesible que las fermentaciones sumergidas, debido a que la superficie de contacto es mayor entre el aire y el líquido que se encuentra absorbido en las partículas (Viniegra y cols. 2003).

Asimismo, otro factor que interviene en los procesos de fermentación en medio sólido lo representa el tipo de inóculo y la forma de inoculación. En la literatura se reconoce el uso de dos tipos fundamentales de inóculo en la producción de hongos, tanto a nivel de laboratorio como industrial: micelio (Moore y Prior 1993, Jenkins y cols.1998) o esporas (Doménech 2000).

Las principales ventajas del uso de micelio como inóculo son una mejor competitividad del hongo, una reducción de la posible colonización del sustrato por microorganismos contaminantes y la colonización más rápida debido a que se reducen los tiempos de incubación. Además, en diferentes trabajos se reporta el uso de suspensiones de esporas (Bosch y cols. 1995, Dorta y cols. 1996, Booth y Shanks 1998), destacándose su principal ventaja en la reducción de los costos en la etapa de propagación del microorganismo.

Actualmente, existe un interés significativo por utilizar técnicas de fermentación en medio sólido para producir una variedad de metabolitos, como las enzimas, a pesar de que en su mayoría la producción de éstas se realice mediante fermentación líquida.

En el ámbito industrial se le da aplicación a la fermentación en medio sólido para la producción de enzimas de uso en la tecnología de alimentos, diagnóstico clínico, análisis químico y producción de metabolitos de interés industrial (Díaz 1997). Por ejemplo, aflatoxinas (González y Tomasini 1996), enzimas bacterianas (Babu y Satayanarayana 1996), enzimas celulósicas (Nigam y Singh 1996).

De manera particular, las enzimas lacasas se emplean en la industria biotecnológica, química, farmacéutica, entre otras. Estos metabolitos se excretan por diversos organismos, entre los cuales encontramos a los del reino fungi, entre ellos algunas especies de *Pleurotus*, esenciales para la degradación de lignina a través de un proceso oxidativo por medio de fenoloxidasas que son formadas y liberadas por la hifa (Schwarze y cols. 2000).

#### 1.4 Género *Pleurotus*

El género *Pleurotus* pertenece a un grupo cosmopolita de hongos con alto valor nutricional, propiedades terapéuticas y diversas aplicaciones medioambientales y biotecnológicas, comprende especies de tonalidades blancas, amarillas, rosadas, gris o de colores oscuros. Además, se puede encontrar en forma de embudo, pétalo de flor o concha de ostra (Martínez y cols. 1991).

El desarrollo o crecimiento de estas especies son sobre troncos, ramas o árboles muertos y algunas veces se encuentra en el suelo sobre raíces podridas, por lo que se consideran saprótrofos. También pueden crecer en sustratos que contienen lignina y celulosa para su cultivo, ya que posee un sistema selectivo de degradación de lignina y hemicelulosa (Cohen y cols. 2001).

El cultivo de *Pleurotus spp.* puede extenderse a diferentes regiones del país como una actividad económica, ya que cuenta con factores que favorecen su cultivo; entre los más importantes se encuentran el clima, la materia prima disponible e infraestructura y un amplio mercado. En la producción de este hongo se utilizan y reciclan más de 280,000 toneladas de subproductos agroindustriales, acelerando con esto su biodegradación y reciclaje en la naturaleza (Martínez 2000).

Así pues, puede ser cultivado sobre sustratos preparados con materiales celulósicos, como fragmentos de papel, aserrín de pino y encino, o con paja de gramíneas y harina de frijón, al que se le adicionan algunas sales minerales como carbonato y sulfato de calcio; también es cultivado en tocones o troncos de árboles muertos y en una variedad de desperdicios agrícolas ligninocelulósicos como paja de trigo, olotes y rastrojo de maíz, bagazo de caña de azúcar o de café, los cuales contienen aproximadamente 60-70% de celulosa y 15% de lignina. Esto sucede debido a que tienen la capacidad de desdoblar a la lignina y celulosa sin que sea necesario efectuar una fermentación previa u otro tipo complicado de preparación química o biológica (Herrera y Ulloa 1998).

Un aspecto importante de la mayoría de las especies de *Pleurotus* es la variada aplicación de las enzimas que participan en el sistema de degradación de la lignina, como en la bioconversión de desechos agrícolas para alimento de animales y otros productos alimenticios, así como una alternativa útil en procesos de biorremediación de organocontaminantes, compuestos xenobióticos e industriales.

De manera particular, *Pleurotus ostreatus* ha mostrado cierta habilidad en la degradación y mineralización de compuestos químicos tóxicos, tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), atrazina, organofosforos y desechos líquidos (Pointing 2001).

*P. ostreatus* es un hongo basidiomiceto, conocido comúnmente como ostra, de gran importancia económica, gastronómica y medicinal. Es industrialmente producido como alimento humano (el tercer hongo más cultivado a nivel mundial después de *Agaricus bisporus* y *Lentinula edodes*). Generalmente, se emplea en la bioconversión de desperdicios agrícolas, como fuente de enzimas y compuestos químicos para la industria y aplicaciones médicas, como un agente en la biorremediación y en la producción de fertilizantes orgánicos (Peñas y cols. 2002).

Los hongos basidiomicetos de pudrición blanca como *Pleurotus ostreatus* producen enzimas involucradas en la degradación de la lignina en su hábitat natural. La lignina es el segundo biopolímero mayormente abundante en la biosfera después de la celulosa, compuesto por subunidades de fenil-propano interconectados por diferentes enlaces carbono-carbono y carbono-oxígeno-carbono (Giardina y col. 1995). Además, confiere rigidez, impermeabilidad y protección a ataque microbiano en la madera y algunas plantas, por lo que involucra un sistema complejo para su degradación.

Leonowicz y cols. (1999) reportaron la estructura de la lignina basándose en estudios de resonancia magnética nuclear realizados en 1974 por Nimz y Glasser a partir de lignina de angiosperma (**Figura 1**).

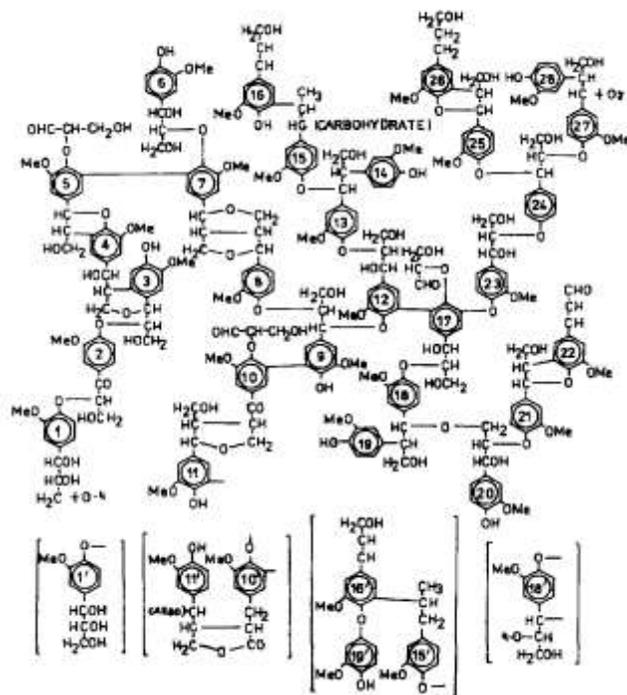


Figura 1. Estructura química de la lignina (Leonowicz y cols. 1999)

La degradación de la lignina depende de las condiciones ambientales (pH, temperatura, grado de humedad) y de la especie de hongo involucrado (Palmieri y cols. 1997).

Los hongos del género *Pleurotus* han sido estudiados en años recientes en donde se han identificado, descrito y caracterizado tres enzimas que participan en el sistema ligninolítico útil en proceso de biorremediación de contaminantes. A saber, Manganese peroxidasa (MnP), versatil peroxidasa (VP) y Lacasa (Sannia y cols. 1991, Hatakka 1994, Asada y cols. 1995, Tuor y cols. 1995, Giardina y cols. 1996, Camarero y cols. 1999, Cohen y cols. 2001).

La habilidad del micelio de *Pleurotus* para crecer sobre materiales ligninocelulósicos, como la paja de trigo, se ha atribuido a la secreción de enzimas, principalmente lacasas, de las cuales se producen isoenzimas citoplasmáticas o extracelulares, de vital importancia en el sistema ligninolítico de estos hongos (Rajarithnam 1989).

## 1.5 Enzimas Lacasas

Las enzimas lacasas forman parte del grupo de las fenoloxidasas, catalizan reacciones de degradación de la lignina, son producidas en su mayoría por hongos de pudrición blanca (Guillén y cols. 2000), aunque también son producidas por bacterias, insectos y plantas (Galhaup y cols. 2002). Se ha descrito que son glicoproteínas extracelulares que contienen cobre y un peso molecular de 60000 y 80000 (Gianfreda y cols. 1999).

Las lacasas (bencenodiol: oxígeno oxido-reductasas EC 1.10.3.2) pertenecen a un grupo de enzimas que catalizan la oxidación de un gran número de compuestos fenólicos y aminas aromáticas usando oxígeno como aceptor de electrones, que es reducido a agua (Muñoz-Guillén y cols. 1997) y simultáneamente trabajan en la oxidación de un electrón de diversos sustratos aromáticos (Thurston 1994), lo que le confiere la característica de oxidar un amplio rango de sustratos que incluye polifenoles, monofenoles metoxisustituidos, aminas aromáticas y otros compuestos aromáticos de fácil oxidación (Ramírez y cols. 2003).

Las lacasa fúngicas catalizan sobre una amplia gama de sustratos con características químicas similares al *p*-difenol y se conocen reacciones de polimerización, depolimerización, metilación y dimetilación de compuestos fenólicos. Algunos ejemplos de estos sustratos son los difenoles como la hidroquinona, catecol, guayacol, 2,6-dimetoxifenol, *p*-difenildiamina y siringaldazina (Harkin y cols.1974). Esta propiedad se aprovecha en procesos de biorremediación para las oxidación de contaminantes análogos a los sustratos de algunos principios activos de insecticidas, colorantes, herbicidas, fungicidas, entre otros (Eggert y cols. 1998).

Se han encontrado diversas aplicaciones de las lacasas en el área de la biotecnología, como el tratamiento de efluentes de fábricas de pulpa de papel o de otras industrias que contienen cloroligninas o compuestos fenólicos (Abadulla y cols. 2000), mejoramiento en la calidad nutritiva de alimento para rumiantes, degrada una amplia gamma de compuestos

xenobióticos empleados en los sectores agrícolas e industriales (Bumpus y Aust 1987, Bogan y Lamar 1996, Jolivald 1999, Chander 2004).

## 2. ANTECEDENTES

La actividad de las enzimas lacasas fue descrita por primera vez en la savia del árbol *Rhus vernicifera* (Yoshida 1883). El estudio de estas enzimas describe que se presentan en diversas isoformas con diferentes propiedades fisicoquímicas como peso molecular, puntos isoeléctricos y contenido de carbohidratos, que dependen de la especie de hongo y de las condiciones de desarrollo (Eggert y cols. 1998). Generalmente, han mostrado que son glicoproteínas, con punto isoeléctrico (pI) y pH ácidos. (Heinzkill y cols. 1998).

Las lacasas, se clasifican dentro del grupo de enzimas denominadas azul cobre oxidasas, las cuales se caracterizan por tener cuatro átomos cúpricos ( $\text{Cu}^{2+}$ /molécula) utilizando al cobre como cofactor (Giardina 1999). Así pues, dada esta característica, se ha descrito que pueden ser inducidas por medios ricos en nitrógeno (D'Souza y cols. 1999) y cobre (Palmieri y cols. 2000).

Gran parte de los estudios hechos sobre enzimas lacasas han identificado a organismos excretores, condiciones enzimáticas y fisicoquímicas óptimas, afinidad hacia sustratos e identificación de isoformas presentes, entre otras características, con la finalidad, en su mayoría de identificar las condiciones propicias para la obtención de estas enzimas. Tinoco y cols. (2001) purificaron y compararon ocho isoformas lacasas, de las cuales seis fueron de diferentes cepas de *Pleurotus ostreatus*, una de *Coriolopsis gallica* y otra de *Trametes versicolor*. En este estudio reportaron diferencias significativas entre las lacasas con respecto a la afinidad de la enzima ( $K_m$ ) por los sustratos (siringaldazina, ABTS y guayacol) independientemente de la cepa y la especie. Todas las cepas de *P. ostreatus* mostraron un pH óptimo de actividad de 5.0 empleando siringaldazina como sustrato, así como una temperatura de máxima actividad entre 30 y 40°C de *C. gallica* y *T. versicolor*.

Actualmente, el estudio de la producción de enzimas fúngicas se realizan tanto en fermentaciones líquidas como en fermentación en medio sólido ya sea en sustratos biodegradables como en sustratos inertes. *Panus tigrinus* fue estudiado utilizando un medio formulado con desecho de agua de los molinos que procesan la oliva, suplementado con 0.5 % de sucrosa y 0.1 % de extracto de levadura en fermentación en medio líquido bajo condiciones de agitación (250, 500 y 750 rpm) y aireación (0.5, 1.0 y 1.5 vvm). La fermentación en medio sólido se realizó empleando tallo de maíz picado y humedecido al 65% con el desecho acuoso de oliva, igualmente bajo condiciones de agitación y aireación. Se observó el efecto de la agitación altos niveles de actividad lacasa y manganeso peróxidasa en fermentación líquida  $4600 \pm 98$  U/L a los 13 días de fermentación a 250 rpm y  $410 \pm 22$  en el día 7, respectivamente. También, el efecto de aireación en fermentación líquida para actividad máxima de lacasa fue de  $3900 \pm 50$  U/L en el noveno día y de  $360 \pm 20$  U/L para manganeso peroxidasa a 1.0 vvm para ambas enzimas. En relación a la actividad lacasa obtenida bajo condiciones de fermentación sólida, la máxima observada fue de  $1309 \pm 20$  U/L en el noveno día con un índice del 5 % de CO<sub>2</sub> y 3% para manganeso peróxidasa y un valor máximo de  $292 \pm 12$  U/L el día 13 (Fenice y cols. 2002).

Asimismo, De Souza y cols. (2002) trabajaron con *P. pulmonarius* crecido sobre paja de trigo, como sustrato biodegradable, donde la máxima producción de lacasas del extracto crudo enzimático fue de 8600 U/g de sustrato a los cinco días de crecimiento. Posteriormente, purificaron la principal isoenzima que se presentó en estas condiciones de crecimiento de *P. pulmonarius*, y determinaron los parámetros cinéticos utilizando siringaldazina, ABTS y guayacol como sustratos (De Souza y Peralta 2003).

A su vez, Ramírez y cols. (2003) reportaron la producción de enzimas lacasas de *Pleurotus ostreatus* obtenida por fermentación en medio sólido y fermentación en medio líquido utilizando paja de trigo y vinaza como sustrato sólido. La actividad de lacasas en fermentación sólida (20 U/L) fue dos veces mayor comparada con la obtenida en medio

líquido (10 U/L). Además, se produjeron tres y dos isoformas por fermentación sólida y fermentación líquida respectivamente.

Además, hay reportes sobre enzimas puras de lacasas extracelulares producidas por hongos de pudrición blanca, en estudios realizados en fermentación sólida, en el que se mostró el efecto del extracto enzimático, de varias cepas del género *Pleurotus* que presentaron actividad intracelular y extracelular sobre diversos sustratos, encontrando diferente número de isoformas obtenidas en cada cepa, las diferencias encontradas en el valor de la actividad dependieron de la cantidad de enzima en cada extracto enzimático. Se observó que el ABTS fue el sustrato en el que se obtuvo mayor actividad de lacasas, seguido de o-tolidina, siringaldazina, 2,6 dimetoxifenol y sobre el sustrato que menor actividad se detectó fue p-anisidina (Téllez-Téllez y cols. 2005).

En otro estudio, la producción de lacasas fue comparado por dos cepas modificadas de *Aspergillus niger* (C28eco3 y C28eco3-13) con el gen IV de lacasas obtenida de *Trametes versicolors*, se llevó a cabo en fermentación en medio sólido y fermentación en medio líquido utilizando glucosa y maltodextrin en diferentes concentraciones. La producción enzimática fue mayor con glucosa como fuente de carbono. Sin embargo, la represión de lacasas fue evidente en fermentación sólida después de incremento de glucosa de 10 a 50g/L. En contraste, en fermentación líquida con glucosa a 50g/L permitió la producción de una elevada actividad lacasa para la cepa C28eco3 (362 U/L) y para C28eco3-13 (592 U/L) (Téllez-Jurado 2005).

También, Mirjana (2006) reportó que *Pleurotus eryngii*, *P. ostreatus* y *P. pulmonaris* produjeron lacasas bajo condiciones de fermentación en medio sólido y líquido. La inoculación en ambos sistemas de fermentación fue realizada con una suspensión de micelio homogeneizado en medio líquido, la suspensión se realizó mediante un homogeneizador a 10,000 rpm. Los altos niveles de actividad lacasa fueron encontrados en *P. eryngii* en fermentación sólida empleando cáscara de mandarina como sustrato, así como en *P. ostreatus* bajo fermentación líquida.

Hay estudios de producción de enzimas lacasas bajo la presencia de inductores en fermentación líquida y sólida. En un estudio, la inducción de cobre en los medios de cultivo, en condiciones de fermentación sólida utilizando mazorca de maíz como sustrato biodegradable, *Pleurotus pulmonarius* incrementó ampliamente la producción enzima lacasa y a su vez se identificó un efecto inverso a éste. Por un lado, se observó que de 270 U/L obtenidas en el control, fueron suficiente 2.5 mM de sulfato de cobre para que incrementara el nivel de lacasa a 1420 U/L. Por otro, la inhibición de crecimiento en el cultivo se presentó por la presencia de iones de cobre 15.0 mM  $\text{Cu}^{2+}$  (Kirst y cols. 2006).

Asimismo, *Phanerochaete chrysosporium* NCIM 1197 fue empleado para la producción de lacasas utilizando fermentación sólida con paja de trigo como sustrato. La máxima actividad de lacasa fue de  $48.89 \pm 1.82$  U/L en el quinto día de fermentación. Por otro lado en cultivo líquido estático (a escala de laboratorio) fue de  $30.21 \pm 1.66$  y de  $22.56 \pm 1.22$  U/L en el mismo tiempo de fermentación. También se obtuvo el peso molecular de una lacasa parcialmente purificada (62 KDa). La presencia de dos isoformas de lacasas en los casos mencionados se evidenció por medio de Native Page. La adición de inductores solo aceleró la producción de lacasas y no en todos los casos se expresó la isoforma purificada (Gnanamani y cols. 2006).

En otro estudio, se comprobó que *P. ostreatus* es capaz de producir lacasas en medio líquido, se utilizó al sulfato cúprico como inductor de lacasas y se observó que la presencia en pequeñas concentraciones de este compuesto es suficiente para la expresión y mayor actividad de la enzima. El complejo enzimático producido durante las fermentaciones en medio líquido, fue capaz de oxidar diversos sustratos característicos de las lacasas (p-nisidina, ABTS, siringaldazina, y o-tolidina), así como diversos colorantes de la industria, con lo cual se abren amplias posibilidades de estudio gracias al potencial de decoloración y detoxificación por los hongos de pudrición blanca, tal como lo muestran los estudios de la lacasa y que se han enfocado a su aplicabilidad en la industria (Juárez 2006).

Existen algunos estudios en relación a la degradación de compuestos fenólicos como los PAHs por *P. ostreatus*, donde se muestran la eficiencia metabólica del hongo para la degradación y en algunos casos la mineralización de diversos compuestos fenólicos pertenecientes a los PAHs o sus análogos a través de la oxidación del anillo fenólico en su estructura química (Bezaleel y cols 1996, Wolter y cols. 1997). También, se ha comparado la habilidad de degradación de PAHs y producción de enzimas ligninolíticas en aceite de algunos hongos como *P. chrisosporium*, *P. ostreatus* y *T. versicolor*. En este estudio se observó que la producción de MnP y Lacasa fue similar para *P. ostreatus* y *T. versicolor*, en comparación de *P. chrisosporium* la producción de éstas enzimas fue muy baja (Novotny y cols. 1999)

En otro estudio, se evaluó la actividad enzimática y actividad específica de xilanasas, celulasas y lacasas de *Trametes sp.* EUMI, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus niger* AD96.4 a los 14 y 19 días de fermentación sólida en bagazo de caña de azúcar. Se observó que *Trametes sp.* mostró mayor actividad xilanasas (141.77 UI.g<sup>-1</sup>MS) y celulasa (9.04 UI.g<sup>-1</sup>MS). La mayor actividad lacasa fue expresada por *P. ostreatus* (15.54 UI.g<sup>-1</sup>MS) a los 14 días de fermentación, mayor en comparación a los 19 días de fermentación (11.75 UI.g<sup>-1</sup>MS), *Aspergillus niger* mostró en este estudio menor actividad enzimática en ambos tiempos de fermentación para las tres enzimas evaluadas. (Márquez y cols. 2007).

Respecto al uso de soporte inerte en las fermentaciones sólidas para el estudio de enzimas ligninolíticas como las lacasas, (Téllez-Téllez y cols. 2008) estudiaron la producción de enzimas lacasas por *Pleurotus ostreatus* bajo condiciones de fermentación líquida y sólida empleando espuma de poliuretano como sustrato inerte. 13000 U/L de lacasa se obtuvo bajo cultivo en fermentación líquida con una producción de biomasa de 5.6 g/L. Por el contrario, bajo condiciones de fermentación sólida se observó menor actividad de enzima lacasa 2430 U/L y una máxima producción de biomasa de 4.5 g/L En relación a las isoformas identificadas en cada sistema, éstas fueron cuatro y tres respectivamente.

En relación a estudios realizados empleando micelio de hongo homogeneizado en sustrato sólido para la producción de enzimas ligninolíticas Ordaz (2008) estudió el efecto de la temperatura en la producción y productividad de celulasas, xilanasas y lacasas de *Trametes* sp EUM1 con rastrojo de maíz como sustrato, para la inoculación emplearon viales que contenían agua, perlas de ebullición y discos de agar con micelio del hongo, para obtener la suspensión homogénea, el contenido del vial se agitó a máxima velocidad en un agitador mecánico durante 1 minuto a temperatura ambiente y en condiciones de esterilidad. Respecto al efecto de temperatura se observó que los niveles y la productividad de enzimas ligninoceluloticas se incrementaron drásticamente al modificarse la temperatura de 30 a 40 °C. La temperatura de 40°C fue la idónea para la producción de celulasas y xilanasas, mientras que la temperatura de 35°C fue mejor para lacasas.

A pesar de que existen estudios en los que se establezca la presencia de lacasas producidas en sistemas de fermentación en medio líquido y medios sólido de origen natural o biodegradable como lo es la paja de trigo, utilizando a *P. ostreatus* como organismo productor, en su mayoría emplean procesos metodológicos que favorecen la caracterización del sistema utilizado, a través del enriquecimiento del sustrato, presencia de inductores, en algunos casos el factor de agitación, aireación, modificación genética y método de inoculación.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Mediante trabajos realizados en fermentación sólida se conoce que este sistema favorece el desarrollo de organismos fúngicos para la producción de enzimas, metabolitos y esporas. Los conocimientos biológicos obtenidos acerca de los organismos productores, así como los medios tecnológicos y científicos, ofrecen diversas opciones para obtener estos productos de manera más cercana al medio ambiente en el que se encuentran.

Las enzimas lacasas son excretadas por una variedad de hongos de pudrición blanca en los que se encuentra *Pleurotus ostreatus*. La información sobre los factores que estimulan la excreción de estas enzimas es limitado. Algunos trabajos sugieren que la presencia de inductores y las condiciones ambientales son determinantes en la biosíntesis de estos compuestos. Los factores que han mostrado importancia en el incremento de la producción de enzimas son el pH, temperatura de desarrollo del microorganismo, tipo y cantidad de nutrimentos, así como el tamaño y edad celular del inóculo.

En el caso de *Pleurotus ostreatus*, la propagación micelial sobre placa ha sido favorecida, por lo que en la mayoría de estudios con este hongo en fermentación sumergida la inoculación se realiza por adición de trozos de micelio o pellets, los cuales, gracias a la agitación del sistema existe en contacto persistente con todo el medio de cultivo.

Este tipo de inoculación sugiere una amplia heterogeneidad cuando se aplica en sistemas de fermentación sólida estimulando puntos de agregación micelial durante los tiempos de fermentación, lo cual no es representativo del fenómeno de producción de enzimas por fermentación sólida, por lo que para disminuir la heterogeneidad de invasión micelial, producción de biomasa y por consecuencia la degradación del sustrato y producción de enzimas se propone en este trabajo preparar una suspensión de micelio por fragmentación mecánica como método de inoculación en fermentación sólida, evaluando su viabilidad en fermentación sumergida comparando los parámetros cinéticos con una fermentación inoculada con trozos de micelio.

#### **4. HIPOTESIS**

La inoculación con “suspensión de micelio” de *Pleurotus ostreatus* obtenida por fragmentación mecánica presentará la misma viabilidad que el inóculo por “pellets”, teniendo como ventaja una mayor homogeneidad en la invasión micelial del sustrato sólido.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

- Evaluar la viabilidad de una suspensión de micelio de *Pleurotus ostreatus* obtenida por fragmentación mecánica como inóculo en fermentación para la producción de lacasas.

### 5.2 Objetivos específicos

1. Comparar los parámetros cinéticos de crecimiento de *P. ostreatus* en fermentación sumergida para la producción de lacasas utilizando dos tipos de inoculación.
2. Desarrollar una fermentación sólida para la producción de lacasas inoculando con suspensión de micelio obtenido por fragmentación mecánica.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

En la **figura 2** se muestra el diagrama para la producción de lacasas por fermentación líquida y sólida.

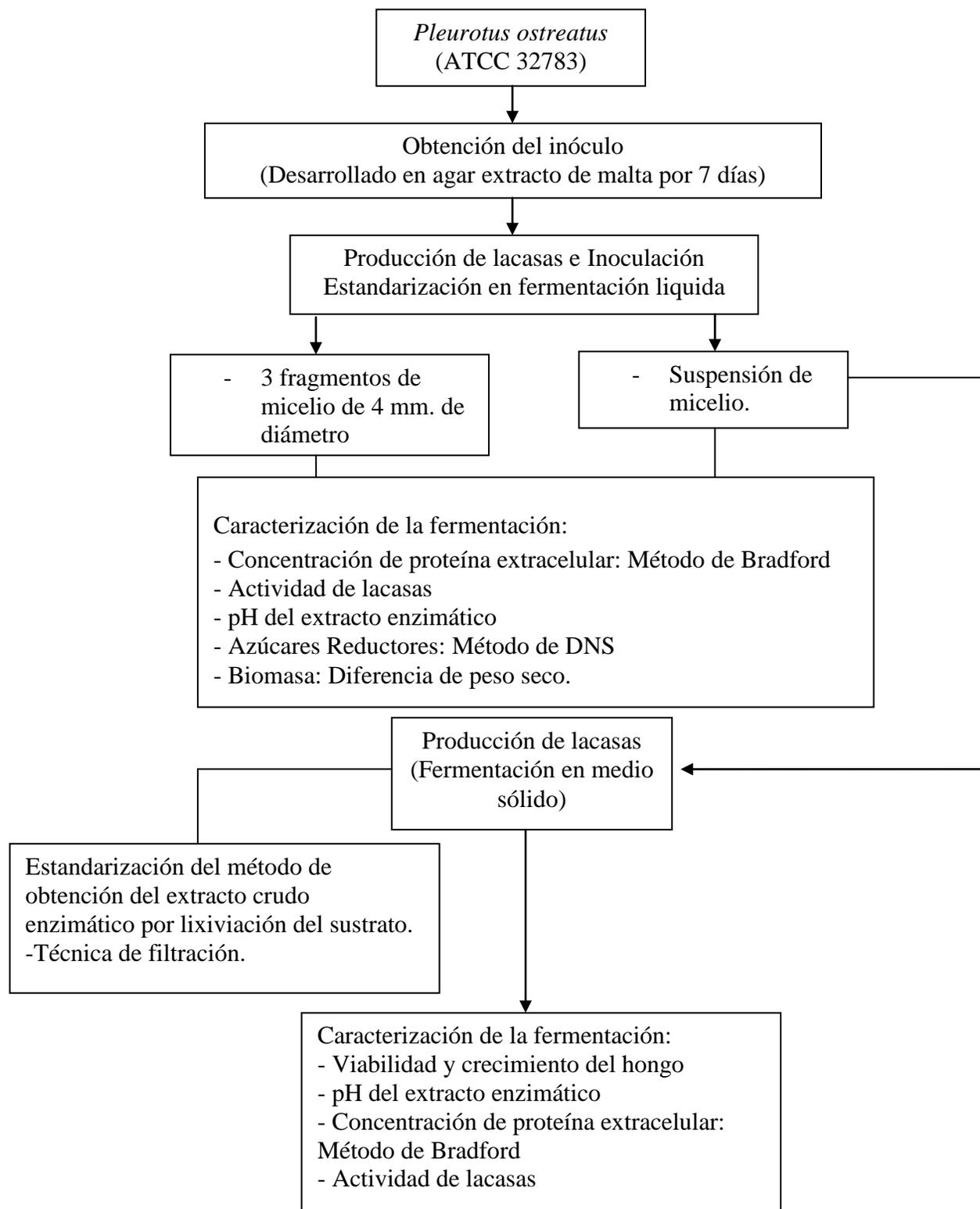


Figura 2. Diagrama de la metodología.

## 6.1 Cepa

Se utilizó la cepa de *Pleurotus ostreatus* 32783 de la American Type Culture Collection (ATCC Maryland, U.S.A). El inóculo para la fermentación se obtuvo mediante la propagación de la cepa a 25°C durante 7 días en agar extracto de malta (EMA) y extracto de paja. Éste se preparó con 100g de paja de trigo en un litro de agua, la mezcla se calentó a 80 °C durante una hora, el lixiviado se filtró con algodón y papel filtro Whatman número 1 y por último se empleó como solvente para la preparación del medio EMA. Una vez obtenida la cepa se mantuvo en almacenamiento a 4°C.

## 6.2 Fermentación en medio líquido

Con la finalidad de establecer una técnica de inoculación útil en fermentación en medio sólido, se llevaron a cabo simultáneamente dos sistemas de fermentación líquida (durante 20 días) empleando “pellets” y suspensión de micelio como métodos de inoculación.

Ambas fermentaciones se realizaron en matraces Erlenmeyer de 125 mL que contenían 50 mL de medio de cultivo, cuya composición se describe en la **tabla 1**. Se evaluó durante el proceso pH, contenido de proteína soluble, consumo de azúcares por el método de 3,5-dinitrosalicílico (DNS) y actividad enzimática del extracto crudo enzimático (ECE), así como biomasa por diferencia de peso seco.

Tabla 1. Composición del medio para la fermentación sumergida.

<b>Componente</b>	<b>Concentración en g/L</b>
Extracto de levadura	5
Glucosa	10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.4
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.001
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.05

MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0.05
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.5
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.25

El pH se ajustó a un valor de 6.0, con NaOH 0.1 M.

### 6.3 Inoculación

Se utilizaron dos técnicas de inoculación en fermentación líquida. En la primer técnica “pellets” se tomaron fragmentos de 4 mm de diámetro de micelio (con el mínimo contenido de agar) tomado de la periferia de la colonia de *P. ostreatus* y posteriormente se inocularon los matraces (3 fragmentos por cada matraz) que contenían el medio líquido.

Asimismo, en la segunda técnica “suspensión de micelio” se tomaron fragmentos de 4mm de diámetro de micelio tomado de la periferia de la colonia de *P. ostreatus* (el numero de fragmentos totales para la suspensión se determinó mediante del numero de matraces a inocular, por cada matraz se ocuparon 3 fragmentos) libres de agar, que se colocaron en una solución Twin al .02 % y con la ayuda de un agitador metálico se fragmentó el micelio hasta obtener una suspensión lo más homogénea posible. Posteriormente, se inocularon los matraces con 1 mL de la suspensión antes mencionada. La preparación de la suspensión y la inoculación en ambos casos se produjeron bajo condiciones de esterilidad.

La fermentación se llevó a cabo a 25°C, con agitación orbital de 120 rpm. Todas las operaciones se realizaron en condiciones estériles. Se tomaron muestras cada 24 horas.

### 6.4 Obtención del extracto crudo enzimático

El extracto crudo enzimático (ECE) se consideró al caldo de fermentación obtenido en cada muestreo de la fermentación líquida por filtración a través de papel Watman No. 1. Los extractos se mantuvieron en refrigeración a 4°C.

### 6.5 Determinación de pH

Se determinó el pH del extracto crudo enzimático por potenciometría. El análisis se realizó con un potenciómetro Conductronic Pc 45.

### 6.6 Determinación de la concentración de proteína soluble

La proteína total soluble se determinó en el extracto crudo enzimático, por el método de Bradford (1976) que se realizó de la siguiente manera: a 100  $\mu\text{L}$  de extracto crudo enzimático se le adicionaron 200  $\mu\text{L}$  del reactivo de Bradford, el volumen se ajustó a 1 mL con agua destilada y se leyó la absorbancia a 595 nm. Se utilizó albúmina sérica bovina como proteína estándar (Díaz y cols. 2001).

### 6.7 Cuantificación de azúcares residuales.

Para determinar la concentración de azúcares residuales a lo largo de la fermentación, se evaluaron los azúcares reductores de acuerdo con la técnica de DNS, se tomaron 50  $\mu\text{l}$  de ECE, posteriormente se adicionaron 2000  $\mu\text{l}$  o 2 ml del reactivo ácido dinitro salicílico, el volumen se ajustó a 3 ml con agua destilada y la absorbancia se leyó a 575 nm (Miller 1959).

### 6.8 Determinación de la actividad enzimática

La actividad enzimática de lacasas se determinó en el extracto crudo enzimático en cada punto de la fermentación siguiendo una cinética de reacción durante 1 minuto a 39°C en una Celda Peltier del espectrofotómetro Jemway 6405 Uv/Vis a una longitud de onda de 468 nm, utilizando 2,6-dimetoxifenol (DMP) [0.1M] como sustrato. La mezcla de reacción contiene 900  $\mu\text{L}$  de sustrato ([2mM] de DMP en buffer de fosfatos [0.1M] pH 6.5) y 100  $\mu\text{L}$  de ECE.

Para la cuantificación de enzimas lacasas se emplearon unidades arbitrarias de medición, en la que una unidad de actividad de lacasas (U) se consideró como la cantidad de enzima que provocó un incremento de una unidad de absorbancia por minuto en la mezcla de reacción.

### 6.9 Determinación de Biomasa por diferencia de peso seco.

La biomasa obtenida en el proceso de filtración se separó y se deshidrató en horno a 60°C durante 24 horas, posterior a este tiempo se pesó y se reportó el peso seco obtenido en cada punto de fermentación (Díaz-Godínez y cols. 2001, Tlecuitl-Beristain y cols. 2003).

### 6.10 Determinación de los parámetros de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* y producción de lacasa

La evolución de la biomasa  $X = X_{\max} \left[ 1 - \exp^{-\mu t} \right]$  fue ajustada por la ecuación logística (1) por la minimización del error cuadrático con la herramienta Solver de la hoja electrónica de Excel (Microsoft) (Díaz-Godínez y cols. 2001; Tlecuitl-Beristain y cols. 2003).

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

la solución de la ecuación logística es (2):

$$X = \frac{X_{\max}}{1 + C \exp^{-\mu t}} \dots\dots\dots (2)$$

donde  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento,  $X_{\max}$  es el valor de biomasa máxima o de equilibrio y  $C = \frac{X_{\max} - X_o}{X_o}$  con  $X=X_o$ .

También, se calculó la productividad observada en el pico máximo de actividad ( $P_{RO} = E_{\max}/$  tiempo de fermentación).

### 6.11 Análisis Estadístico

Se realizó una comparación de curvas de crecimiento de *P. ostreatus* por fermentación líquida inoculadas con suspensión de micelio y “pellets” a través de un análisis de  $\chi^2$ . Asimismo se compararon los parámetros cinéticos de crecimiento mediante la prueba de T-Student.

### 6.12 Fermentación en medio sólido

Primero, se llevó a cabo una fermentación de prueba en medio sólido, durante 20 días, empleando paja de trigo como sustrato, con la finalidad de observar viabilidad y crecimiento del hongo con la aplicación de la “suspensión de micelio” como método de inoculación.

Después, una vez realizada la fermentación de prueba, se realizó fermentación en medio sólido, durante 30 días, bajo las mismas condiciones de la fermentación antes mencionada y posteriormente caracterizarla.

Cada fermentación en medio sólido se efectuaron en cristalizadores de 340 mL que contenían 70 g de paja húmeda (aprox. 70 % de humedad). Para obtener el porcentaje de humedad, la paja que se utilizó se sumergió en agua durante 12 horas, se tomó una muestra de paja y se pesó, este dato fue considerado como el 100 % de humedad. Después, se eliminó el agua empleada y se procedió a escurrir la paja; continuando con el proceso de pesado hasta obtener mediante cálculos matemáticos el porcentaje de humedad requerido. Posteriormente se esterilizaron los cristalizadores con la paja húmeda a 121°C durante 20 minutos.

### 6.13 Inoculación de la fermentación en medio sólido

Para inocular los cristalizadores que contenían la paja de trigo, se empleó el método de inoculación por “suspensión de micelio” ensayado en fermentación líquida. A cada cristalizador se inoculó 1 mL de la suspensión de micelio bajo condiciones estériles y se

mantuvieron en incubación a 25°C. Las muestras se tomaron cada 24 horas y se hizo por triplicado en cada punto de la fermentación.

#### 6.14 Obtención del extracto enzimático

Para la obtención del Extracto Crudo Enzimático (ECE) a cada muestra se le adicionó 150 mL de agua destilada, se mantuvo durante 30 min. con agitación orbital a 230 rpm. Después, la solución se filtró en un embudo de porcelana empleando tela de gasa para recuperar el material sólido. El filtrado se centrifugó a 15000 rpm durante 5 min. a 4°C. El sobrenadante se decantó y este último fue considerado como extracto crudo enzimático, el cual se conservó en refrigeración a 4 °C.

#### 6.15 Caracterización de la fermentación en medio sólido

La caracterización de la fermentación en medio sólido se llevó a cabo mediante la obtención de pH, el análisis de concentración de proteína soluble y actividad enzimática lacasa con los métodos descritos en fermentación líquida.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Caracterización de la fermentación líquida

#### 7.1.1 Perfil de pH

Los rangos de pH obtenidos durante el proceso de fermentación líquida inoculada por ambos métodos (“pellets” y “suspensión de micelio”) es poco variable al pH inicial del medio de fermentación empleado, en el caso de inoculación por “pellets” los valores de pH se mostraron más estables que los inoculados por suspensión de micelio. En la **figura 3** se muestra el perfil de pH durante el proceso de fermentación líquida inoculada por “suspensión de micelio” (6.0 - 6.7) e inoculada por “pellets” (6.0 - 6.3).

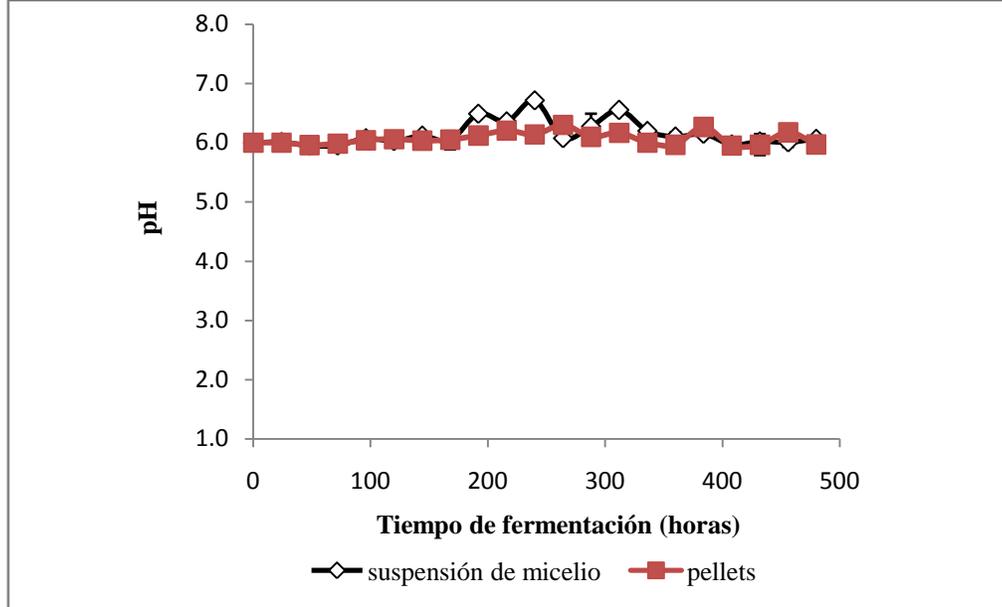


Figura 3. Perfil de pH obtenido de *P. ostreatus* inoculado por “suspensión de micelio” (-◇-) y “pellets” (-■-) en fermentación líquida.

#### 7.1.2 Concentración de proteína soluble

En relación a la determinación de concentración de proteína soluble, la fermentación en medio líquido inoculada por suspensión de micelio presentó mayor cantidad de proteína total soluble, observada en tiempos mas reducidos que en comparación de la fermentación inoculada por pellets.

La **figura 4** muestra la gráfica de concentración de proteína soluble obtenida por fermentación líquida, en la que se utilizaron ambos métodos de inoculación. Con el método de “suspensión de micelio” se observa la máxima concentración de proteína soluble a las 168 horas (0.171 g/L), posteriormente desciende la concentración hasta encontrar otro incremento a las 312 horas con un valor de (0.138 g/L) concentración de proteína soluble.

En relación a “pellets” como método de inoculación. Se observa que la concentración de proteína incrementa conforme avanza el tiempo de inoculación, encontrando la máxima concentración (0.071 g/L) a las 384 horas.

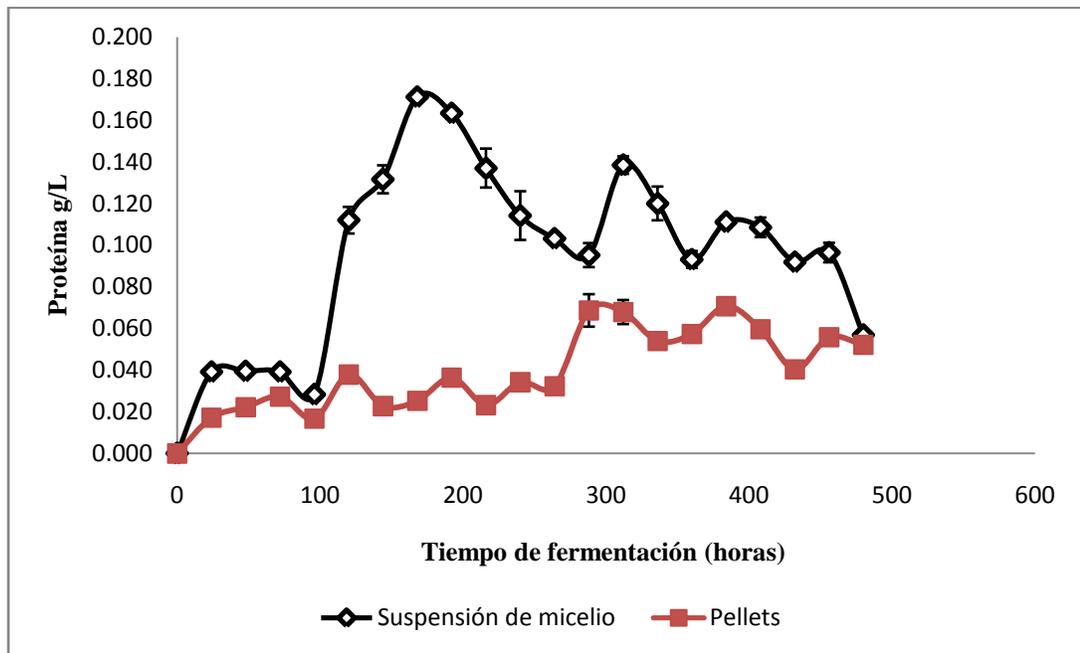


Figura 4. Concentración de proteína soluble obtenida por fermentación líquida con inoculación por “suspensión de micelio” (-◇-) y “pellets” (-■-).

### 7.1.3 Concentración de azúcar

El consumo de azúcar observado en ambas fermentaciones se presenta de manera análoga durante el proceso de fermentación, lo que sugiere que la fuente de carbono en el sistema esta siendo aprovechada por el organismo y lleve a cabo las funciones necesarias para su crecimiento y sobrevivencia. Este comportamiento se puede observar en la **figura 5** en donde se utilizó “suspensión de micelio” y “pellets” como método de inoculación.

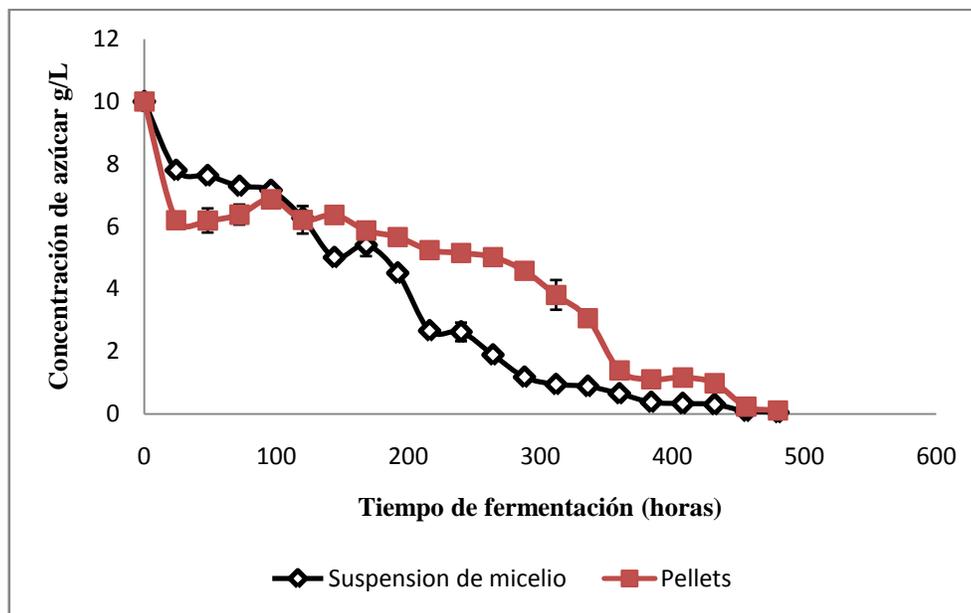


Figura 5. Consumo de azúcar de *Pleurotus ostreatus* en fermentación líquida por “suspensión de micelio” (-◇-) y “pellets” (-■-) como método de inoculación.

#### 7.1.4 Actividad Enzimática

La actividad volumétrica enzimática de lacasas obtenida por fermentación sumergida utilizando “suspensión” de micelio y “pellets” como método de inoculación se observa en la **figura 6**. Respecto al primer método mencionado, se observan dos puntos predominantes de actividad, una a las 240 horas con un valor de actividad de 14075 U/L y otro punto mayor de 14555 U/L a las 264 horas, posterior a este tiempo la actividad desciende en las siguientes horas de incubación.

Asimismo en la misma gráfica de actividad volumétrica enzimática de lacasas en el segundo método de inoculación, se distingue un máximo valor de 12435 U/L a las 312 horas, posterior a este punto la actividad disminuye y no se observan puntos cercanos al máximo obtenido.

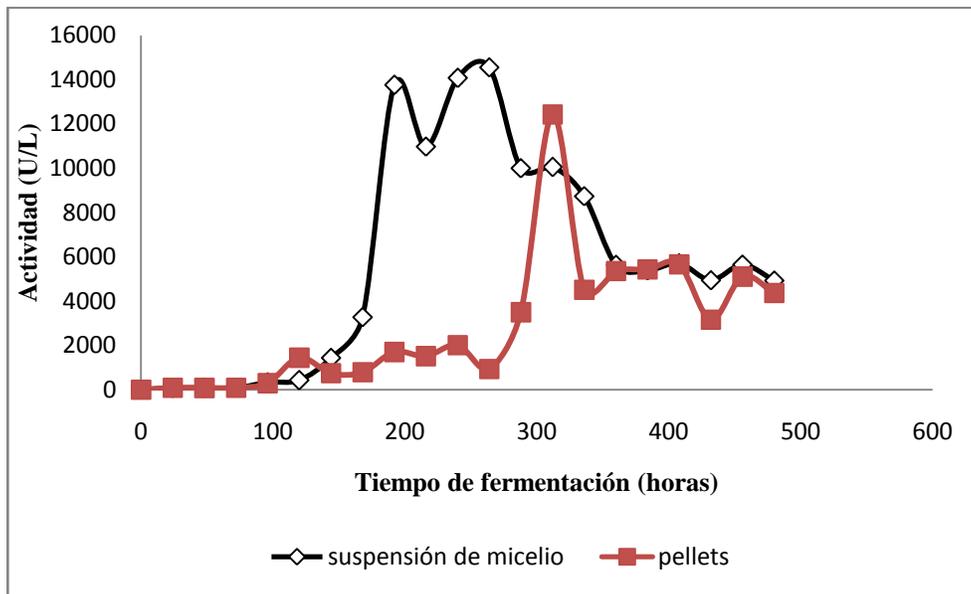
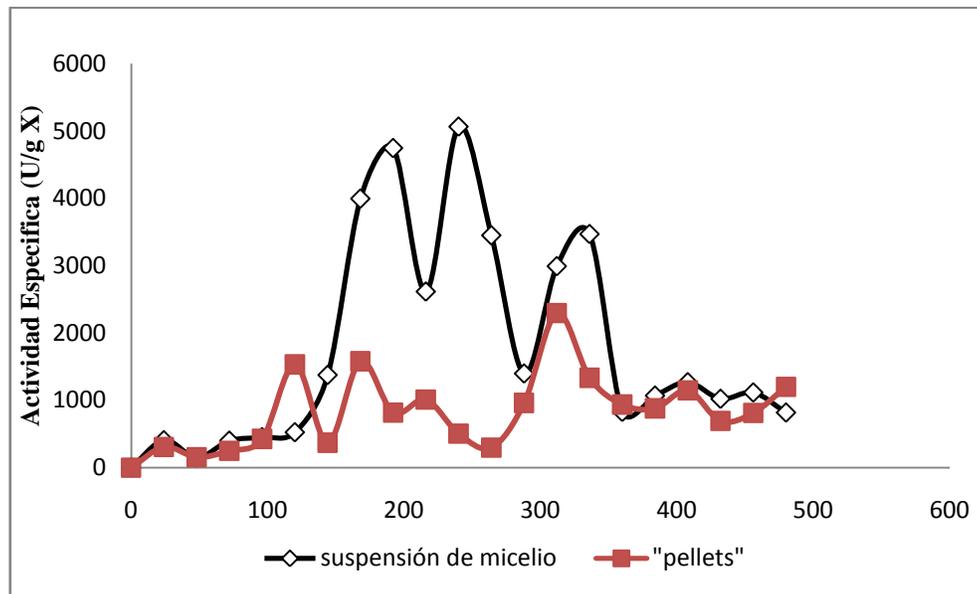


Figura 6. Actividad de lacasas de *P. ostreatus* inoculados por “suspensión de micelio” (-◇-) y “pellets” (-■-) en fermentación sumergida.

#### 7.1.4.1 Actividad Específica

Se determinó la actividad específica de biomasa (a) y proteína (b) **Fig. 7**, La actividad específica de biomasa en suspensión de micelio se mantuvo baja durante las primeras 96 h de fermentación. A partir de este tiempo los valores de actividad específica se incrementaron hasta encontrar la máxima actividad (5062.95 U/gX) a las 240 h. En la inoculación por “pellets” la máxima actividad fue de 2294.28 U/gX a las 312 h. En relación a la actividad específica de proteína el punto máximo de actividad (141081.46 U/g de proteína) en la inoculación por suspensión de micelio fue a las 264 h y en la inoculación por pellets se observó un punto mayor de actividad (183219.20 U/g de proteína) a las 312 horas.

a)



b)

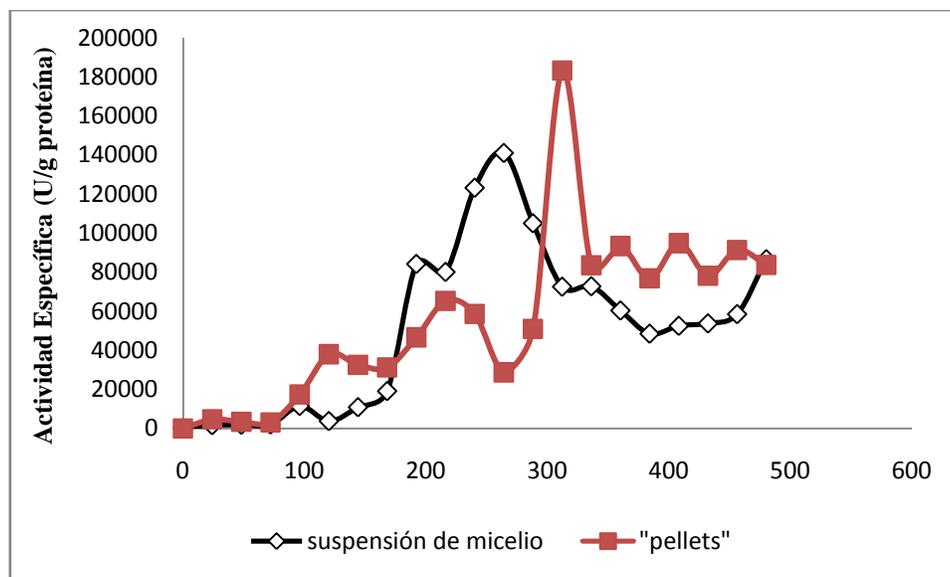


Figura 7. Actividad específica de lacasas con respecto a biomasa (a) y a proteína (b) de *P. ostreatus* inoculados por suspensión de micelio (-◇-) y "pellets" (-■-) en fermentación sumergida.

#### 7.1.5 Biomasa

Con respecto a la cinética de crecimiento, los resultados obtenidos de ambas fermentaciones demuestran que el organismo y las condiciones en las que se llevaron a cabo son adecuados

para su desarrollo, ya que ambos presentan fase de adaptación, así como de crecimiento exponencial en los tiempos observados durante el proceso.

La **figura 8** muestra las gráficas de producción de biomasa por fermentación líquida empleando “suspensión de micelio” (a) y “pellets” (b) como método de inoculación, se observa que en ambos casos la fase de adaptación transcurre desde el tiempo inicial de la fermentación hasta las 96 horas aproximadamente y a partir de este punto continúa la fase exponencial de crecimiento a las 384 horas.

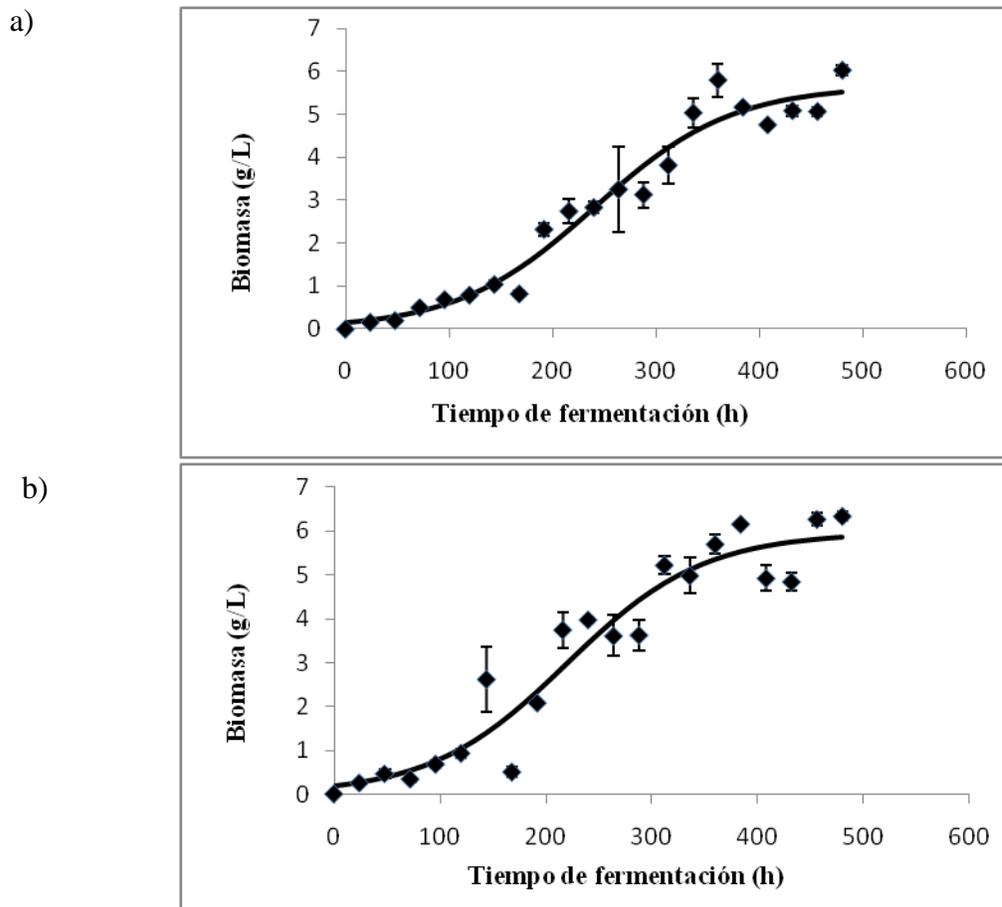


Figura 8. Curvas de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en fermentación líquida inoculada por suspensión de micelio (a) y “pellets” (b).

### 7.1.6 Parámetros cinéticos de crecimiento

La biomasa máxima obtenida en “suspensión de micelio” fue de  $5.87 \pm 0.13$  g/L a las 480 horas. La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) fue de  $0.015 \pm 0.001$  h<sup>-1</sup>. Se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.98 entre los datos experimentales y el modelo matemático. En relación a la fermentación inoculada por “pellets” la biomasa máxima fue de  $5.98 \pm 18$  g/L a las 480 horas. La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) fue de  $0.016 \pm 0.001$  h<sup>-1</sup>, con un coeficiente de correlación de 0.96 entre los datos experimentales y el modelo matemático. El crecimiento observado de *Pleurotus ostreatus* en fermentación líquida, bajo los parámetros de biomasa y ( $\mu$ ) no se encontraron diferencias significativas en los dos sistemas de inoculación utilizados ( $p > 0.05$ ), por lo que en ambos casos, el modelo permite describir el desarrollo de la biomasa bajo las condiciones experimentales con un alto grado de confianza.

Por otro lado, respecto a los resultados de Productividad de lacasas obtenidos en la inoculación por “suspensión de micelio” fue de  $7.2 \pm 0.2$  U/L h y por “pellets” de  $4.0 \pm 0.5$  U/L h, mostrando diferencia significativa entre ellas  $p < 0.05$ .

## 7.2 Caracterización del la fermentación en medio sólido

### 7.2.1 Viabilidad y Actividad Enzimática

En la fermentación de prueba llevada a cabo durante 20 días se pudo observar que el crecimiento del hongo en el sustrato fue viable durante el proceso, mismo que se observa En la **figura 9**, donde se observa crecimiento e invasión de micelio sobre la paja de trigo como sustrato biodegradable.



Figura 9. Crecimiento e invasión de micelio de *Pleurotus ostreatus* inoculado por suspensión de micelio en fermentación en medio sólido.

También se analizó actividad volumétrica enzimática en los extractos obtenidos de las muestras de esta fermentación. En la **figura 10** se muestra la actividad volumétrica enzimática de lacasas producida por fermentación sólida utilizando paja de trigo como sustrato. Se observa un notable incremento de actividad (1180 U/L) a partir de las 192 horas, hasta alcanzar un máximo de 1610 U/L a las 384 horas, los puntos de fermentación observados en los tiempos posteriores presentan menor actividad enzimática.

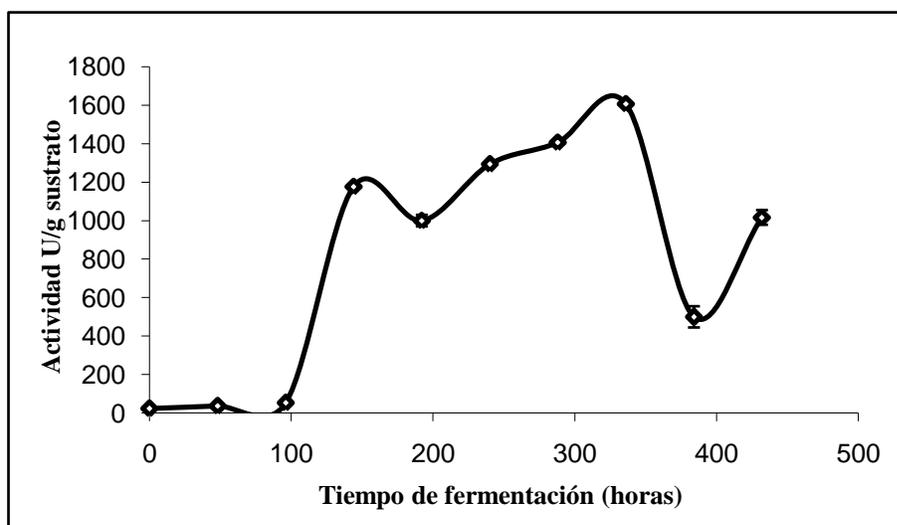


Figura 10. Actividad de lacasas de *P. ostreatus* producida por fermentación sólida.

En las muestras de las que se obtuvieron un primer extracto crudo enzimático, se repitió la operación de obtención del mismo con la finalidad de verificar si en la primer extracción se

logró hacer un arrastre efectivo de proteína extracelular presente, se evaluó nuevamente la actividad enzimática del extracto.

En la **figura 11** muestra la gráfica de la actividad volumétrica lacasa durante la fermentación, los puntos de actividad enzimática corresponden aproximadamente a la mitad de los observados en la primera extracción.

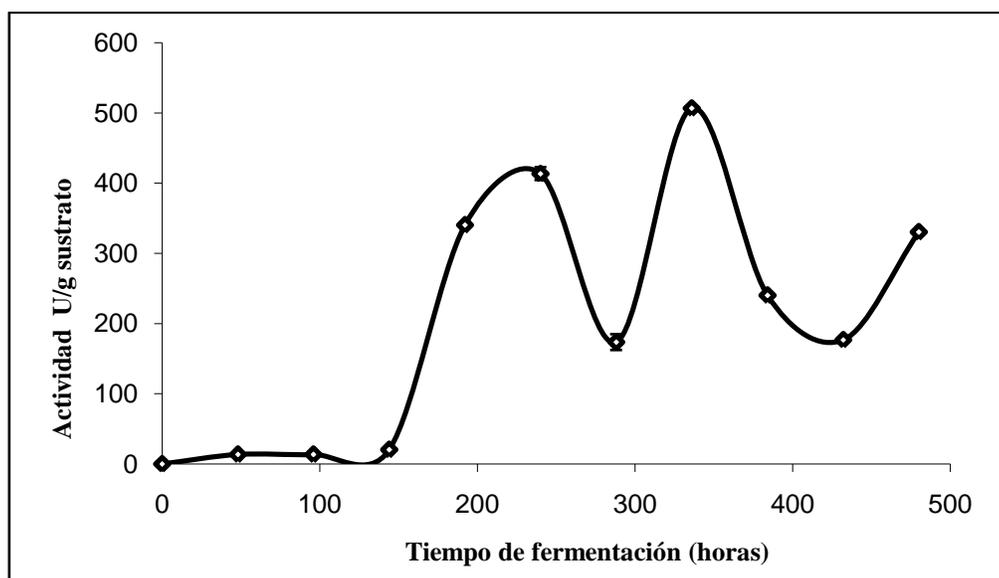


Figura 11. Actividad de lacasas de *P. ostreatus* producida por fermentación sólida.

A continuación se muestran los resultados obtenidos de la fermentación en medio sólido llevados a cabo durante 30 días utilizando paja de trigo como sustrato y “suspensión de micelio” como método de inoculación.

### 7.2.2 Perfil de pH

La **figura 12** muestra el rango de pH dado durante el proceso de fermentación en medio sólido, se puede observar que el pH disminuye durante el proceso de fermentación partiendo de un valor de pH de 7.3 hasta finalizar con un pH de 4.7 a las 720 horas.

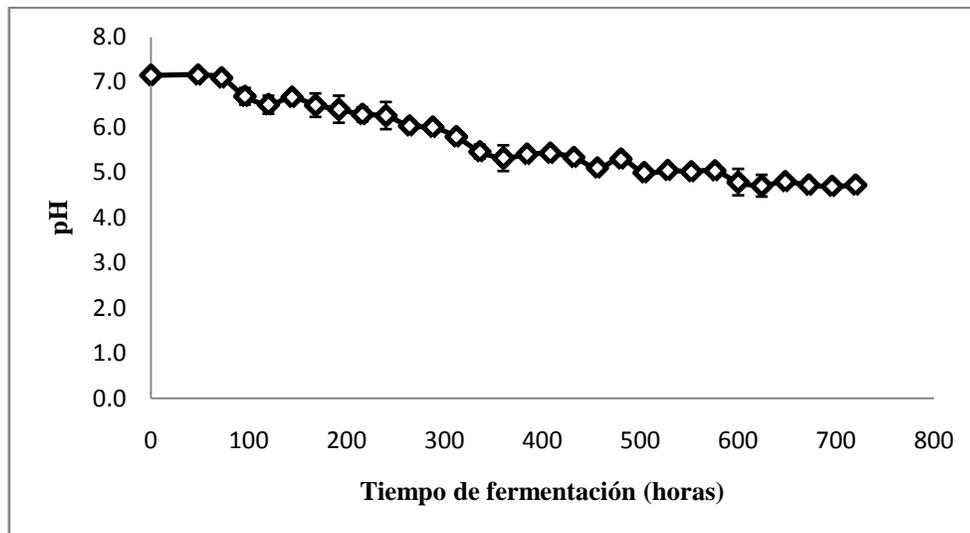


Figura 12. Perfil de pH de *P. ostreatus* obtenido por fermentación en medio sólido.

### 7.2.3 Concentración de proteína soluble en fermentación sólida

La **figura 13** muestra la grafica que representa la concentración de proteína soluble obtenida por fermentación sólida, se observa que hay un incremento de proteína soluble en los primeros tiempos de fermentación hasta alcanzar una máxima concentración de 0.196 g/L a las 240 horas.

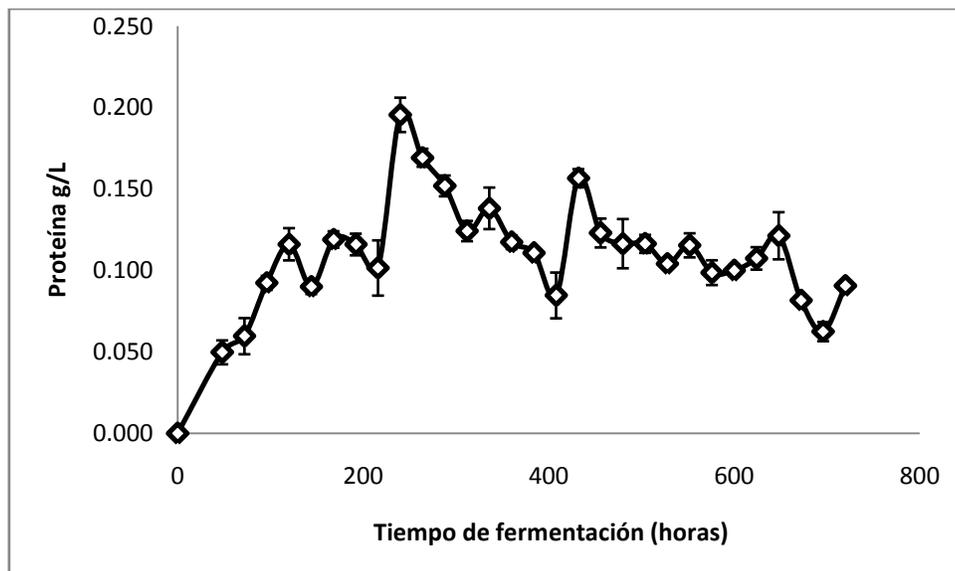


Figura 13. Concentración de proteína soluble de *P. ostreatus* obtenida por fermentación en medio sólido.

#### 7.2.4 Actividad Enzimática

En relación a la actividad enzimática, en la **figura 14** se muestra los valores de actividad volumétrica de lacasa durante la fermentación, en el que se distingue un punto máximo de actividad de 1880 U/L a las 432 horas de incubación.

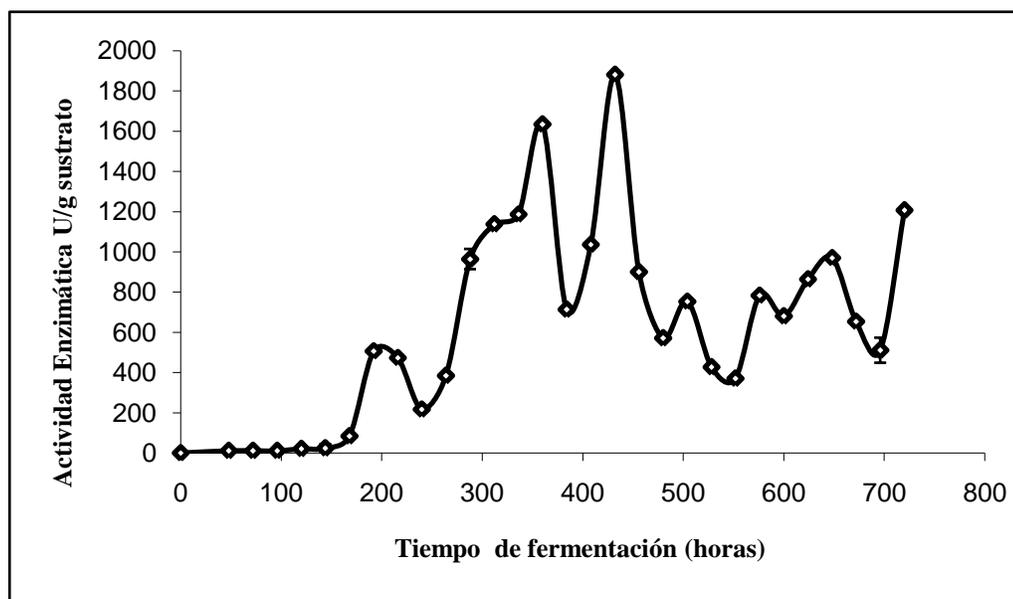


Figura 14. Actividad de lacasas de *P. ostreatus* producida por fermentación sólida.

## 8. DISCUSIONES

Dada la heterogeneidad que presenta la fermentación en medio sólido originada por la naturaleza del sustrato y en la búsqueda de un método de inoculación diferente al empleado en sistemas líquidos, generalmente realizado por “pellets”, se trabajó en la implementación de un método de inoculación por fracción mecánica de micelio “suspensión de micelio” ensayados ambos métodos en fermentación líquida y “suspensión de micelio en fermentación sólida.

En la caracterización de la fermentación líquida del sistema inoculado por ambos métodos el rango obtenido de pH tuvo poca variación, lo que sugiere que la fragmentación de micelio no causa efecto en relación al pH inicial durante el proceso. En relación a la cantidad de proteína total soluble se destaca la fermentación inoculada por “suspensión de micelio” con respecto al inoculado por “pellets”, además de que se obtuvo en tiempo más cercano. Por otro

lado, el consumo total de azúcar observado en ambos sistemas coinciden en el tiempo (480 horas), con la particularidad de que en el sistema inoculado por “suspensión de micelio” existe mayor consumo respecto al tiempo en relación al inoculado por “pellets” durante el proceso. También, la actividad enzimática obtenida en “suspensión de micelio” se observaron varios puntos de actividad encontrando la máxima (14555U/L) en tiempos mas cercanos (264 horas) a la de inoculación por “pellets”, de la cual esta última se encontró en un solo un punto de fermentación, con un valor de 12435 U/L a las 312 horas. En comparación con el trabajo realizado por Téllez y cols. (2008) en donde se utilizó al mismo organismo productor de enzima bajo condiciones de fermentación líquida e inoculación mediante discos de micelio la actividad enzimática observada fue de 13000 U/L, valor menor en relación al inoculado por “suspensión de micelio”.

Con respecto a la cinética de crecimiento, tanto el sistema de inoculación por “pellets” como el de “suspensión de micelio” presentaron fase de adaptación y fase exponencial en tiempos similares, la biomasa máxima en “suspensión de micelio” fue de  $5.87 \pm 0.13$  g/L y en pellets de  $5.98 \pm 0.18$  g/L, la tasa específica de crecimiento fueron de  $0.015 \pm 0.001$  y  $0.016 \pm 0.001$  respectivamente, en ambos sistemas no se encontraron diferencias significativas en los parámetros de crecimiento, en relación a la productividad se encontró que el sistema de inoculación por “suspensión de micelio” en fermentación líquida es mayor que en la inoculación por “pellets”.

Cabe mencionar que la fermentación en medio líquido se llevó a cabo en base a una parte de la metodología, y condiciones propuestas por Juárez-Hernández (2006) por lo que se consideran algunos aspectos en relación a los resultados (de la fermentación líquida empleando suspensión de micelio como inóculo) y los obtenidos por dicho autor (el cual utilizó “pellets” como método de inoculación), además de que también utilizó la cepa de *Pleurotus ostreatus* 32783.

En cuanto a la cinética de crecimiento, ambas fermentaciones mostraron que la fase de adaptación duró aproximadamente hasta las 96 horas y de crecimiento exponencial hasta las 384 horas, encontrando una diferencia en cuanto a la producción de biomasa máxima 10.43g/L en el trabajo del autor antes mencionado y de 5.87 g/L en el presente trabajo. Asimismo se

observó que el rango de pH en las fermentaciones realizadas fue de 6.0-6.2 y 6.0-6.7, respectivamente. En relación al consumo de azúcar en el proceso de fermentación se pudo observar que en este trabajo el consumo total de glucosa se presenta a las 480 horas de fermentación, y para el caso del trabajo de Juárez-Hernández (2006) el tiempo de consumo total fue a las 300 horas de fermentación. Tanto en la concentración de proteína soluble y actividad enzimática se muestran diferencias de valores y tiempos dados durante las fermentaciones mencionadas.

Respecto a la implementación del método de inoculación en fermentación en medio sólido con sustrato biodegradable los resultados obtenidos en cuanto a la viabilidad y crecimiento se presentaron de manera favorable durante el proceso, observando que la invasión micelial es uniforme en la mayoría de la superficie del sustrato y no genera puntos o focos de crecimiento en los sitios donde se colocan los discos o fragmentos de micelio en la inoculación por “pellets”. Lo que implica que el micelio del hongo a pesar de ser fragmentado por manipulación mecánica conserva la funcionalidad biológica suficiente para poder desarrollarse en un medio en el cual impera heterogeneidad dada por la naturaleza del sustrato. A su vez, en esta fermentación de prueba, se evaluó la presencia de actividad enzimática lacasa, mediante dos extracciones enzimáticas secuentes. Los resultados obtenidos muestran actividad enzimática en ambos extractos, la primera con mayor concentración que la segunda, lo que demuestra que no es suficiente una sola extracción para el arrastre total de metabolitos solubles en el sistema.

La caracterización del sistema de fermentación, mediante la valoración del rango de pH evaluado en los extractos crudos enzimáticos mostró disminución de este parámetro durante el proceso, en donde no se descarta la producción de otros metabolitos que en este caso particular acidifiquen el extracto obtenido. Asimismo, los datos aportados de la concentración de proteína total soluble involucran la producción de moléculas de origen proteico en el sistema, considerando la presencia de enzimas ligninolíticas como las lacasas, las cuales fueron valoradas y se determinó el valor máximo de actividad (1880 U/L) a las 432 horas (18 días), que en tiempos de fermentación, coincide en picos de actividad observado en

el estudio realizado por Márquez y cols. (2007) en donde se observa que la máxima producción de enzimas lacasas por *P. ostreatus* a los 14 días (15,54 UI g<sup>-1</sup>) y a los 19 días (11,75 UI g<sup>-1</sup>) con la diferencia que en este trabajo se empleó a bagazo de caña de azúcar como sustrato biodegradable, inoculación por discos de micelio y ABTS (2,2' Azino-bis 3 etilvenz-thiazoline-6-sulfonic acid). A diferencia del sistema de fermentación líquida, la cuantificación de biomasa, como parámetro fundamental de la cinética de crecimiento, es difícil de realizar en fermentación en medio sólido, debido a la fuerte unión que existe entre el micelio y el sustrato biodegradable. Para este tipo de dificultades se han propuesto diversos métodos de cuantificación de biomasa de manera indirecta ya sea por actividad metabólica, determinación de ácido desoxirribonucleico, índice de respiración, consumo de nutrientes o análisis de constituyentes celulares como la glucosamina (Marcial y cols. 2006).

Hasta el momento son escasos los trabajos en fermentación sólida que utilicen suspensión de micelio como método de inoculación. En su mayoría aquellos que utilizan a *P. ostreatus* como organismo productor de enzimas ligninolíticas lo hacen mediante discos de micelio o “pellets” (Membrillo y cols. 2008), o con solución de esporas cuando el organismo conserva esta característica como *Aspergillus niger* (Márquez y cols. 2007). Por lo tanto, se considera que el método de inoculación por suspensión de micelio ofrece una alternativa en sistemas de fermentación sólida de origen natural o biodegradable con la perspectiva de implementar las metodologías que favorezcan la producción de metabolitos de interés biotecnológico.

## 9. CONCLUSIONES

Con el propósito de implementar un sistema alternativo de inoculación al de “pellets”, comúnmente utilizado en sistemas de fermentación, para la producción de enzimas lacasas por *P. ostreatus*, se valoró la inoculación de micelio fragmentado como método de inoculación en fermentación en medio líquido y medio sólido.

En el sistema de fermentación en medio líquido el método de inoculación por “suspensión de micelio”, obtenida mediante fragmentación mecánica, los parámetros de cinética de crecimiento y resultados obtenidos al caracterizar la fermentación, se encontró que este procedimiento al igual que el inoculado por “pellets” provee viabilidad y crecimiento al organismo empleado para la obtención de metabolitos como las enzimas lacasas.

Asimismo, la implementación de inoculación de *P. ostreatus* por “suspensión de micelio” bajo condiciones de fermentación en medio sólido con paja de trigo como sustrato biodegradable presentó crecimiento de la misma manera que el inóculo por “pellets”, obteniendo como ventaja, mayor homogeneidad en la invasión del micelio sobre el sustrato sólido, por lo que el micelio conservó propiedades biológicas para desarrollarse bajo las condiciones de fermentación utilizadas, además de que no se observaron puntos de crecimiento en los sitios de inoculación que se presentan en la inoculación por discos o “pellets”.

Así pues, el método de inoculación por “suspensión de micelio” implementado en ambos sistemas de fermentación permitió en primer instancia el crecimiento del organismo empleado, conservar la viabilidad del mismo bajo las condiciones empleadas en cada sistema y finalmente la obtención del metabolito de interés biotecnológico mencionado en el presente trabajo de investigación, la enzima lacasa.

## 10. BIBLIOGRAFIA.

Acuña-Arguelles ME, Gutiérrez-Rojas M, Viniegra-González G, Favela-Torres E. 1995. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 43:808-814.

Antier P, Minjares CA, Roussos S, Raimbault M y Viniegra-González G. 1993. Pectinase-hiperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid-state fermentation of coffee pulp. *J Ind Microbiol Biotechnol* 15:254-260.

Bajpai P. (1999). Application of enzymes en the pulp and paper industry. *Biotechnology Progress* 15: 147-157.

Bohinski. C. R. 1991. Bioquímica. Quinta edición. Addison Wesley Iberoamericana. México. pp 491-492.

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitative of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dry binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Bezalel L, Hadar Y, Fu PP, Freeman JP, Cerniglia CE. 1996c. Initial oxidation products in the metabolism of pyrene anthracene, fluorine, and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* 62:2554-2559.

D'Annibale A, Crestini C, Vinciguerra V, Giovannozzi SG. 1998. The biodegradation of recalcitrant effluents from olive oil mil by a White-rot fungus. *J.Biotechnol.* 61

Díaz-Godinez G, Soriano-Santos J, Augur C, Viniegra-Gonzalez.2001.Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. *J Ind Microbiol Biotechnol* 26:271-275

Doelle HW, Mitchell DA y Rolz CE.1992.Solid Substrate Cultivation. Elsevier Applied Science, London, N. York, Chapter 3, 35.

D'Souza T M, Merritt SC y Reddy A.1999. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. Appl Environ Microbiol 65(12):5307-5313.

Eggen T, Majcherczyk A.1998. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in contaminated soil by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*.Int Biodeterior Biodegrad 41:11-117.

Fletcher A. 1984. Physical and Chemical Parameters of Microbial Growth. Advances in Biochemical Engineering Vol. 30, 7-60. Springer-Verlag.

Fenice M, Sermanni GG, Federicci F, D'Annibale A.2002.Submerged and solid-state production of laccase an Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. Journal of Biotechnology

Gianfreda L, Xu F, Bollang JM.1999. Laccases. A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes. Bioremediation Journal, 3(1), 1-25.

Gnanamani A, Jayaprakashvel M, Arulmani M, Sadulla S. 2006. Effect of inducers and culturing processes on lacasse synthesis in *Phanerochaete chrysosporium* NCIM 1197 and the constitutive expression of laccase isozymes. J Ind Microbiol Biotechnol 38: 1017-1021.

Gonzalez J y Tomassini A. 1996. Production of aflatoxines of high penicillin producing strains for solid state fermentation. Biotechnol Adv 11:525-537.

Guzmán G, Mata G, Salmones D, Soto-Velasco C y Guzmán-Dávalos L. 1993.El cultivo de hongos comestibles. México D.F: IPN, pp 1-13.

Harkin JM, Larsen MJ & Obst JR. 1974. Use of syringaldazine for detection of laccase in sporophores of wood rotting fungi. *Mycologia* 66, 469-476.

Hesseltine CW.1972. Solid State Fermentations. *Biotechnol and Bioeng.* 14: 517 – 532.

Heinzkill M, Bech L, Hlakier T, Schneider P y Anke T. 1998. Characterization of laccases and peroxidases from wood rotting fungi family *Coprinaceae*. *Appl. Microbial Biotechnol* 64(5):1601-606.

Holker U, Hofer M, Lenz J.2004. Biotechnological Advantage of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl. Microbial Biotechnol.*

Juárez-Hernández J. 2006. Optimización del medio de cultivo líquido para la producción de lacasas de *Pleurotus ostreatus*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Kim JH, Hosobuchi M, Ryu D D Y.1985. Cellulase Production by a Solid State Culture System. *Biotechn. Bioeng.*, 27, 1445-1450.

Kirst TG, De Souza FD, Souza GMC, Kimiko KM, Peralta RM.2006. Copper Improves the Production of Laccase by the White-Rot Fungus *Pleurotus pulmonarius* in Solid State Fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology.*

Leonowicz A, Matuszewska A, Luterek J, y Ziegenhagen D.1999. Review: Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology* 27: 175-185.

Marquez A, Mendoza GD, González SS, Buntix SE, Loera O. 2007. Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes* sp EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus Niger* AD96.4 en fermentación sólida. *INTERCIENCIA*

Mirjana S, Limor P, Dana F, Yitzhak H, Solomon WP, Eviatar N, Jelena V .2006. Effect of different carbon sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme Microb Technol.* 38: 65-73.

Mitchell DA, Berovic M, y Krieger N.2002. Overview of solid state bioprocessing. *Biotechnology Annual Review.*

Moore D y Prior C. 1993. The potential of mycoinsecticides. *Biocontrol News and Information.* 14 (2): 31-40.

Moo-Young M, Moreira AR, Tengerty RP.1983. Principles of the Solid Substrate Fermentation in Filamentous Fungi. 4. Ed. J. E. Smith, D. R. Berry and B. Kristianse, Edward Arnold, 117 – 144.

Nigam P, Singh D.1996a.Processing of agricultural wastes in solid state fermentation for cellulolytic enzymes production. *J Sci Ind Res.* 55:457-463.

Novotny C, Erbanova P, Sasek V, Kubatova A, Cajthaml T, Lang E, Krahl J, Zadrazil F.1999. Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory mycelium of white rot fungi. *Biodegradation* 10:159-168.

Oriol E, Raimbault M, Roussos S, Viniestra G. 1988. Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*27: 498-503.

Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Scoloni A, Capasso A y Sannia G. 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (50): 31301-31307.

Pointing SB.200.Feasibility of bioremediation by white rot fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 57: 20-33.

Raimbault M y Alazard D.1980a. Culture Method to study fungal growth in solid state fermentation. Appl. Microbiol. Biotechn. 9: 199-209.

Ramírez NE, Vargas MC, Ariza JC, Martínez C.2003. Caracterización de la lacasa obtenida por dos métodos de producción con *Pleurotus ostreatus*. Revista Colombiana de Biotecnología 2: 64-72.

Romero-Gómez SJ, Augur C y Viniegra-González G.2000. Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. Biotechnology Letters 22:1255-1258.

Saucedo-Castañeda, G.; Gutiérrez-Rojas, M.; Bacquet, G.; Raimbault, M. y Viniegra-González, G. (1990). Heat Transfer Simulation in Solid Substrate Fermentation. Biotechnol. Bioeng. 35: 802-808.

Scragg A.1996. Biotecnología para ingenieros. Sistemas Biológicos en Procesos Tecnológicos. Editorial Limusa.

Téllez-Jurado A, Arana-Cuenca A, González- Becerra AE, Viniegra-González G, Loera O.2005. Expresión of a heterologous laccase by *Aspergillus niger* culture by solid-state and submerged fermentations. Enzyme Microb Technol. 38: 6665-669.

Téllez-Téllez M, Sánchez C, Loera O y Díaz-Godínez G. 2005. Differential patterns of constitutive intracellular laccases of the vegetative phase of *Pleurotus* species. Biotechnology Letters 27: 1391-1394.

Téllez-Téllez M, Fernández FJ, Montiel-Gonzalez AM, Sanchez C, Díaz-Godínez G.2008. Appl. Microbial Biotechnol.

Tinoco R, Pickard AM y Vazquez-Duhalt R.2001. Kinetics differences of purified laccases from a six *Pleurotus ostreatus* strains. Letters in Applied Microbiology 32:331-335.

Tlecuitl-Beristain S, Díaz-Godínez G, Soriano-Santos J, Romero-Gómez S y Sánchez C. 2005. Effect of the initial concentration of glucose or sucrose on exopolysaccharide production by *Aspergillus Niger* in solid-state fermentation.

Tomaselli C, Vergoignan C, Feron G, Durand A. 2000. Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* grown in solid state cultivation conditions. *Biochemical Engineering Journal*.

Viniegra-González G. 1997. Solid State Fermentation: Definition, Characteristics, limitations and monitoring. In Roussos S, Lonsane BK, Raimbault M and Viniegra-González G. Eds. *Advances in Solid State Fermentation*, Kluwer Acad. Publ. Dordrecht, Chapter 2: pp. 5-22.

Viniegra-González G, Favela-Torrez E, Aguilar C, Romero-Gómez S, Díaz-Godínez G y Augur C. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid-state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal* 13, 157,167, 2003.

Wolter M, Zadrazil F, Martens R, Bahadir M. 1997. Degradation of eight highly condensed polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus sp. Florida* in solid wheat straw substrate. *Appl Microbiol Biotechnol* 48:398-404.