



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA
CIBA-IPN TLAXCALA

EFFECTO DEL pH INICIAL DE DESARROLLO DE
***Pleurotus ostreatus* EN FERMENTACIÓN SUMERGIDA**
SOBRE SU ACTIVIDAD DE LACASAS

TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA

PRESENTA:

IA. RUBÉN DÍAZ GODÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. GERARDO DÍAZ GODÍNEZ
DRA. MARTHA DOLORES BIBBINS MARTÍNEZ

Tepetitla de Lardizábal Tlaxcala, octubre 2009.



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

SIP-14

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetitla, Tlax Siendo las 10:00 horas del día 31 del mes de julio del 2009 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA-TLAXCALA para examinar la tesis de titulada:
"Efecto del pH inicial de desarrollo de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida sobre su actividad de lacasa"

Presentada por el alumno:

DÍAZ
Apellido paterno

GODÍNEZ
Apellido materno

RUBÉN
Nombre(s)

Con registro:

B	0	7	1	1	3	9
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis

DRA. MARTHA D. BIBBINS
MARTÍNEZ



Centro de Investigación
en Biotecnología
Aplicada

Director de tesis

DR. GERARDO DÍAZ GODÍNEZ

Dr. Marlon Rojas López

Dra. María Myrna Solís Oba

Dr. Victor Eric López y López

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

DRA. ALMA LETICIA MARTÍNEZ AYALA



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Tepetitla de Lardizábal, Tlax el día 20 del mes Agosto del año 2009, el (la) que suscribe RUBÉN DÍAZ GODÍNEZ alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología Aplicada con número de registro B071139, adscrito al Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Martha Dolores Bibbins Martínez y cede los derechos del trabajo intitulado "Efecto del pH inicial de desarrollo de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida sobre su actividad de lacasa", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección rdiazgod@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Ing. Rubén Díaz Godínez

Nombre y firma

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and lines, positioned to the right of the printed name.

El presente trabajo se desarrolló en el Centro de Investigación de Ciencias Biológicas (CICB) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala y en el Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA) del Instituto Politécnico Nacional, con apoyo financiero del CONACYT con el proyecto No. 47396 otorgado en la convocatoria SEP-CONACYT, CIENCIA BÁSICA 2004. El IPN otorgó una beca institucional durante el desarrollo de los estudios de maestría.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Tlaxcala, por permitirme formar parte de su grupo de profesores-investigadores y a la MTF. Dora Juárez Ortiz, Secretaria de Investigación Científica y Posgrado de la UAT por el apoyo que me ha brindado desde mi incorporación como profesor-investigador de la UAT.

Al Dr. Armando García Téllez, Coordinador General del CICB, por su apoyo, mostrando su gran calidad humana dándome consejos y aliento para lograr parte de mis objetivos.

Al Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, por permitirme continuar con mi formación académica.

Al Instituto politécnico Nacional por la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría.

Al Dr. Gerardo Díaz Godínez y a la Dra. Martha Dolores Bibbins Martínez por el apoyo brindado para la elaboración de este trabajo de tesis, quienes depositaron su confianza y apoyo incondicional.

A los asesores de tesis que con sus consejos y observaciones enriquecieron el trabajo experimental y escrito; Dra. María Myrna Solís Oba, Dr. Víctor Eric López y López, Dr. Marlon Rojas López.

DEDICATORIA

A Dios, por darme la oportunidad de continuar con mi preparación académica y que día a día muestra su grandeza y misericordia en mi familia.

A mi esposa, que es parte de lo mejor de mi vida y ha tenido confianza en que juntos lograremos las metas que nos hemos propuesto.

A mis hijos Yrving Daniel y Lizeth Daniela, que han sido una gran inspiración; que me han enseñado grandes lecciones de la vida y aprender a ser una persona con calidad humana, dándome la fuerza necesaria para salir adelante, siendo la parte más importante de mi vida junto con mi esposa.

A mi hermano, el Dr. Gerardo Díaz Godínez que ha brindado su apoyo y consejos que me han hecho crecer académicamente.

A mi padre, Daniel Díaz Sánchez que ha sido una persona que influyó para la toma de decisión y continuar con mi preparación académica.

RESUMEN

Se evaluó el efecto del pH de desarrollo del hongo *Pleurotus ostreatus* sobre su actividad de lacasas. Los valores de pH evaluados fueron 3.5, 4.5, 6.5 y 8.5, se utilizó un medio de cultivo líquido previamente utilizado para producir lacasas que contenía glucosa como fuente de carbono, extracto de levadura como fuente de nitrógeno, sulfato de cobre como inductor de lacasas y otras sales minerales. Las fermentaciones fueron caracterizadas parcialmente, reportando los parámetros cinéticos de desarrollo del hongo (μ , X_{\max} , $Y_{X/S}$, q_s) y de producción de lacasas (Productividad, $Y_{E/X}$, q_p y E_{\max}). La actividad de las lacasas se determinó usando 2,6-dimetoxifenol como sustrato. Se observó que los valores máximos de μ se obtuvieron a pH 3.5 sin extracto de levadura y a pH 4.5 con valores de 0.037 y 0.034 h⁻¹ respectivamente. Por otro lado, los valores máximos de biomasa se observaron a pH de 6.5 y 8.5 con valores de 6.7 g/L y 8.3 g/L respectivamente. La máxima actividad de lacasas observada fue cuando el hongo se desarrollo a pH de 6.5 alcanzando 36500 U/L a las 432 h de fermentación evaluada al mismo pH. Sin embargo, en las fermentaciones a pH inicial de 4.5 y 8.5 se obtuvieron valores de actividad de 33500 U/L y 21000 U/L respectivamente; por su parte la fermentación de pH 3.5 con extracto de levadura mostró una actividad máxima de lacasa de 4030 U/L, en la fermentación de 3.5 sin extracto de levadura se observaron valores máximos de actividad de 462 U/L. Los zimogramas se revelaron a diferentes pH's, mostraron hasta 6 diferentes isoformas en la fermentación a pH 8.5 revelado con DMP a pH 4.5, por otro lado se observaron hasta 3 isoformas en la fermentación de pH 6.5 revelado a pH 4.5 y cuando menos dos isoformas distintas en las demás fermentaciones de pH 3.5 con y sin extracto de levadura y pH 4.5 en todos los pH's de actividad evaluados.

Se observó que el pH de desarrollo del hongo es un factor que modifica el patrón de producción de las lacasas, además de que algunas enzimas producidas a un pH dado presentaron actividad en pH diferente, se obtuvieron valores de actividad y mayor número de isoenzimas en pH de producción diferentes al pH óptimo de desarrollo del hongo.

ABSTRACT

The effect of initial pH of development of *Pleurotus ostreatus* on the laccases activity was evaluated. A liquid medium previously used to produce laccases containing glucose as carbon source, yeast extract as nitrogen source, copper sulfate as inducer of laccases and other minerals at four different pH values (3.5, 4.5, 6.5 and 8.5) was tested. Were reported the kinetic parameters of development of the fungus (μ , X_{\max} , $Y_{X/S}$, q_s) and the laccases production (Productividad, $Y_{E/X}$, q_p y E_{\max}) for all submerged fermentations. The laccases activity was determined using 2.6-dimethoxyphenol as substrate.

High values of μ were obtained at pH 3.5 without yeast extract and pH 4.5 (0.037 and 0.034 h⁻¹ respectively). On the other hand, high X_{\max} values were observed at pH 6.5 and 8.5 (6.7 g/L and 8.3 g/L respectively). The maximal laccases activity value was observed in the fermentation developed at pH 6.5 (36500 U/L) at 432 h and evaluated at the same pH. However, in fermentations at initial pH 4.5 and 8.5 were obtained values of laccases activity of 33500 U/L and 21000 U/L, respectively. The lower laccases activity values were observed in the fermentation at pH 3.5 with and without yeast extract (4030 U/L and 462 U/L, respectively). The zymograms were revealed at different pH values (3.5, 4.5, 6.5 and 8.5), were observed up to 6 different isoforms during fermentation at pH 8.5 revealed at pH 4.5; on the other hand, 3 isoforms were observed in the fermentation at pH 6.5 revealed a pH 4.5 and two different isoforms in the other fermentations in all pH values of activity evaluated.

It was observed that the pH of development of the fungus is a factor that modifies the pattern of production of laccases, as well as some enzymes has not the same optimal pH for production and activity. Different laccases activities and number of isoforms were dependent of pH of development of the fungus.

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	18
2.0 ANTECEDENTES GENERALES.....	19
2.1 Hongos de pudrición de la madera.....	19
2.1.1 Hongos de pudrición blanda.....	19
2.1.2 Hongos de pudrición oscura.....	20
2.1.3 Hongos de pudrición blanca.....	20
2.2 Descripción del género <i>Pleurotus</i>	22
2.3 Lignina.....	24
2.4 Enzimas ligninolíticas.....	27
2.4.1 Enzimas lacasas.....	27
2.4.2 Lignina peroxidasa.....	29
2.4.3 Manganeso peroxidasa.....	29
3. ANTECEDENTES PARTICULARES.....	31
3.1 Producción y características de las lacasas.....	31
3.2 Estudios de producción de isoformas de lacasa en <i>Pleurotus ostreatus</i>	39
3.3 Efecto del PH en la producción de isoformas de lacasa.....	42
3.4 Las lacasas en biorremediación.....	43
4. JUSTIFICACIÓN.....	47
5. HIPÓTESIS.....	48
6. OBJETIVOS.....	48
6.1 Objetivo general.....	48
6.2 Objetivos específicos.....	48
7. METODOLOGÍA.....	49
7.1 Cepa e inóculo.....	50
7.2 Condiciones de cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i>	50
7.3 Obtención del extracto enzimático.....	51
7.4 Biomasa y parámetros cinéticos de crecimiento del hongo.....	51
7.5 Determinación de la concentración de proteína soluble.....	52
7.6 Determinación de la actividad enzimática.....	52
7.7 Determinación del pH de los extractos crudos enzimáticos.....	52
7.8 Identificación de isoformas con actividad de lacasa.....	52
7.9 Cuantificación de azúcares residuales.....	53
8. RESULTADOS.....	54
8.1 Fermentación a pH de desarrollo de 3.5 sin extracto de levadura.....	54
8.1.1 Biomasa.....	54
8.1.2 Concentración de proteína soluble.....	55
8.1.3 Actividad de lacasa.....	55
8.1.4 Perfil de pH.....	56
8.1.5 Determinación del número de isoformas de lacasas.....	57
8.1.6 Cuantificación de azúcares residuales.....	58
8.2 Fermentación a pH de desarrollo de 3.5 con extracto de levadura.....	59
8.2.1 Biomasa.....	59
8.2.2 Concentración de proteína soluble.....	60
8.2.3 Actividad de lacasa.....	61
8.2.4 Perfil de pH.....	62

	11
8.2.5 Determinación del número de isoformas de lacasas	63
8.2.6 Cuantificación de azúcares residuales	66
8.3 Fermentación a pH de desarrollo de 4.5	67
8.3.1. Biomasa	67
8.3.2 Concentración de proteína soluble	68
8.3.3 Actividad de lacasa.....	69
8.3.4 Perfil de pH.....	70
8.3.5 Determinación de número de isoformas de lacasa.....	71
8.3.6 Cuantificación de azúcares residuales	74
8.4 Fermentación a pH de desarrollo de 6.5	75
8.4.1 Biomasa	75
8.4.2 Concentración de proteína soluble	75
8.4.3 Actividad de lacasa.....	76
8.4.4 Perfil de pH.....	77
8.4.5 Determinación de número de isoformas de lacasas.....	78
8.4.6 Cuantificación de azúcares residuales	81
8.5 Fermentación a pH de desarrollo de 8.5	82
8.5.1 Biomasa	82
8.5.2 Concentración de proteína soluble	83
8.5.3 Actividad de lacasas.....	83
8.5.4 Perfil de pH.....	84
8.5.5 Determinación de número de isoformas de lacasas.....	85
8.5.6 Cuantificación de azúcares residuales	88
8.6 Parámetros cinéticos de crecimiento y producción de lacasas de <i>Pleurotus</i> <i>ostreatus</i>	89
9. DISCUSIONES.....	92
10. CONCLUSIONES	99
11. BIBLIOGRAFÍA.....	100

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida del género <i>Pleurotus</i>	23
Figura 2. Partes fundamentales de <i>Pleurotus</i>	24
Figura 3. Estructura química de la lignina, mostrando el enlace de la estructura de la lignina el éter arilglicerol- β -aril.	26
Figura 4. Oxidación de compuestos fenólicos de lignina por acción de lacasas.....	28
Figura 5. Reacción catalítica de lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa.....	30
Figura 6. Oxidación del ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA) a ácido cinabárico en presencia de lacasas de <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> y celobiosa dehidrogenasa.	33
Figura 7. Diagrama de flujo que describe la metodología para el desarrollo de esta investigación.....	49
Figura 8. Cinética de crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación con pH inicial de desarrollo de 3.5 sin extracto de levadura.....	54
Figura 9. Proteína soluble en el EE de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 3.5 sin extracto de levadura.	55
Figura 10. Actividad de lacasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> obtenidas por fermentación a pH inicial de desarrollo de 3.5 sin extracto de levadura evaluada a pH 6.5.....	56
Figura 12. Perfil de pH durante la fermentación de <i>Pleurotus ostreatus</i> con pH inicial de desarrollo de 3.5 sin extracto de levadura.....	57
Figura 13. Zimografía de lacasas de la fermentación a pH inicial de 3.5 de desarrollo sin extracto de levadura de <i>Pleurotus ostreatus</i> revelado en buffer de fosfatos a pH 6.5... ..	58
Figura 14. Consumo de glucosa de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación a pH 3.5 inicial de desarrollo sin extracto de levadura.....	59
Figura 15. Cinética de crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación a pH 3.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura.....	60
Figura 16. Proteína soluble en el caldo de fermentación a pH 3.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura.	61
Figura 17. Actividad de lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> obtenidas por fermentación a pH de 3.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura, evaluada a pH de 3.5 (●), 4.5 (▲), 6.5 (◆) y 8.5 (■).	62
Figura 18. Perfil de pH durante la fermentación de <i>Pleurotus ostreatus</i> con pH 3.5 inicial de desarrollo utilizando extracto de levadura.	63
Figura 19. Zimografía de lacasa durante la fermentación a pH inicial de 3.5 de desarrollo con extracto de levadura de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Revelado a pH 3.5.	64
Figura 20. Zimografía de lacasa durante la fermentación a pH inicial de 3.5 de desarrollo con extracto de levadura de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Revelado a pH 4.5.	64
Figura 21. Zimografía de lacasas durante la fermentación a pH inicial de 3.5 de desarrollo con extracto de levadura de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Revelado a pH 6.5.	65
Figura 22. Zimografía de lacasas durante la fermentación a pH inicial de 3.5 con extracto de levadura de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Revelado a pH 8.5.....	66
Figura 23. Consumo de glucosa de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación a pH de 3.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura.....	67
Figura 24. Cinética de crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación a pH 4.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura.....	68
Figura 25. Proteína soluble en el caldo de fermentación a pH 4.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura.	69

Figura 26. Actividad de lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> obtenidas por fermentación a pH de 4.5 inicial de desarrollo, evaluada a pH de 3.5 (●), 4.5 (▲), 6.5 (◆) y 8.5 (■).....	70
Figura 27. Perfil de pH durante la fermentación de <i>Pleurotus ostreatus</i> a pH 4.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura.....	71
Figura 28. Zimografía de lacasas durante la fermentación de <i>Pleurotus ostreatus</i> a pH inicial de 4.5 de desarrollo, revelado a pH 3.5.....	72
Figura 29. Zimografía de lacasas durante la fermentación a pH de 4.5 inicial de desarrollo de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Revelado a pH 4.5.	72
Figura 30. Zimografía de lacasas durante la fermentación a pH 4.5 inicial de desarrollo de <i>Pleurotus ostreatus</i> , revelado a pH 6.5.	73
Figura 31. Zimografía de lacasas durante la fermentación a pH 4.5 inicial de desarrollo de <i>Pleurotus ostreatus</i> , revelado a pH 8.5.	74
Figura 32. Consumo de glucosa de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación a pH inicial de 4.5 de desarrollo con extracto de levadura.....	74
Figura 33. Cinética de crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación a pH 6.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura.....	75
Figura 34. Proteína soluble en el caldo de fermentación a pH 6.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura.	76
Figura 35. Actividad de lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> obtenidas por fermentación a pH de 6.5 inicial de desarrollo, evaluada a pH de 3.5 (●), 4.5 (▲), 6.5 (◆) y 8.5 (■).	77
Figura 36. Perfil de pH durante la fermentación de <i>Pleurotus ostreatus</i> a pH 6.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura.....	77
Figura 37. Zimografía de lacasas durante la fermentación a pH 6.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura de <i>Pleurotus ostreatus</i> , revelada a pH 3.5.	78
Figura 38. Zimografía de lacasas durante la fermentación de <i>Pleurotus ostreatus</i> de fermentación a pH inicial de con extracto de levadura, revelado a pH de 4.5.	79
Figura 39. Zimografía de lacasas durante la fermentación de <i>Pleurotus ostreatus</i> a pH 6.5 inicial de desarrollo, revelado a pH de 6.5.....	80
Figura 40. Zimografía de lacasas durante la fermentación de <i>Pleurotus ostreatus</i> a pH 6.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura, revelado a pH 8.5.....	81
Figura 41. Consumo de glucosa de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación a pH 6.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura.....	81
Figura 42. Cinética de crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación a pH 8.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura.....	82
Figura 43. Proteína soluble en el caldo de fermentación a pH 8.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura.	83
Figura 44. Actividad de lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> obtenidas por fermentación a pH de 8.5, evaluada a pH de 3.5 (●), 4.5 (▲), 6.5 (◆) y 8.5 (■).....	84
Figura 45. Perfiles de pH durante la fermentación de <i>Pleurotus ostreatus</i> a pH 8.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura.....	85
Figura 46. Zimografía de lacasa durante la fermentación a pH 8.5 inicial de desarrollo de <i>Pleurotus ostreatus</i> , revelado a pH 3.5.	86
Figura 47. Zimografía de lacasas durante la fermentación a pH inicial de 8.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> , revelado a pH 4.5.	86
Figura 48. Zimografía de lacasas durante la fermentación a pH 8.5 inicial de desarrollo de <i>Pleurotus ostreatus</i> , revelado a pH 6.5.	87
Figura 49. Zimografía de lacasas durante la fermentación a pH inicial 8.5 de desarrollo de <i>Pleurotus ostreatus</i> , revelado a pH 8.5.	88

Figura 50. Consumo de glucosa de *Pleurotus ostreatus* en fermentación a pH 8.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura..... 89

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Isoformas de lacasas purificadas en diversos organismos.....	37
Tabla 2. Composición del medio de cultivo	50
Tabla 3. Comparativo de datos cinéticos de las fermentaciones a diferente pH inicial de desarrollo de <i>Pleurotus ostreatus</i>	90
Tabla 4. Comparativo de isoformas con actividad enzimática de lacasa obtenidas por fermentación sumergida de <i>Pleurotus ostreatus</i> a diferente pH de desarrollo	91

ABREVIATURAS

CONACYT- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

pH- Potencial de hidrógeno

pI- Punto isoeléctrico

Lip-Lignina peroxidasa

MnP-Manganeso peroxidasa

kDa- Kilo Dalton

mM- mili Molar

μM- micro Molar

μmol- mico mol

ABTS- 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)

DMP- 2,6-dimetoxifenol

3-HAA- ácido 3-hidroxiantranílico

UI- Unidad enzimática internacional

Vmax- Velocidad máxima

Km- Constante de Michaelis-Mentel

nkat- nanokatal

nm- nanómetro

sp.- Especie

col.- Colaboradores

rpm- Revoluciones por minuto

EPA- Environmental Pollution Administration

PAHs- Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Xmax- Biomasa máxima

μ- Velocidad específica de crecimiento

Yx/s- Rendimiento de Biomasa con respecto a sustrato

Yp/x- Rendimiento de producto con respecto a biomasa

mm- milímetros

μl- micro litro

h- hora

°C- Grado Celcius

FS- Fermentación Sumergida

EE- Extracto Enzimática

E- Actividad enzimática de lacasa

X- Biomasa

SDS- Dodecil Sulfato de Sodio

DNS- Ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrosalicílico

PM- Peso Molecular

1. INTRODUCCIÓN

La industria textil, química, de papel, entre otras, generan una gran cantidad de desechos químicos, principalmente colorantes y compuestos de tipo fenólicos, que son liberados a los cauces de ríos y lagos, por lo que poseen una gran cantidad de sustancias contaminantes, mismos que son recalcitrantes y su degradación es lenta cuando se utilizan procesos biológicos y fisicoquímicos convencionales, generando un impacto ambiental negativo. La capacidad de los hongos para degradar una amplia gama de sustratos abre un área interesante de investigación, debido a la necesidad de desarrollar un método eficaz de biotratamiento de los mencionados efluentes.

Se han realizado experimentos de degradación de estos contaminantes utilizando el sistema ligninolítico de los hongos. Como el sistema de degradación de lignina de estos hongos no tiene sustratos específicos, son capaces de transformar y algunas veces mineralizar completamente una gran variedad de contaminantes ambientales (Wilkolazka y col., 2002). La biorremediación de efluentes mediada por hongos puede clasificarse de acuerdo con su estado de vida; células vivas que biodegradan y absorben los contaminantes y las células muertas que los adsorben (Knapp y col. 1995).

Dentro de las enzimas ligninolíticas con potencial uso en procesos de biorremediación están las lacasas. Estas enzimas catalizan la oxidación de sustratos fenólicos, así como la polimerización, depolimerización y metilación y/o dimetilación de compuestos fenólicos (Edens y col. 1999), reduciendo el oxígeno en agua. Se ha reportado que estas enzimas, en los hongos, están implicadas en la pigmentación, formación de cuerpos fructíferos, además de jugar un papel importante en la patogenicidad en plantas y degradación de lignina (Galhaup y col. 2002). Los hongos del género *Pleurotus* son basidiomicetos de pudrición blanca, con elevadas capacidades de producción de enzimas lacasas y con un alto valor nutricional, propiedades terapéuticas y variadas aplicaciones biotecnológicas. La producción de carpóforos de estos hongos se pueden producir con relativa facilidad sobre sustratos ligninocelulósicos como es la paja de trigo, de cebada, de sorgo, zacate de maíz, etc, (Sánchez 2004); sin embargo,

para producir metabolitos como es el caso de enzimas, el mejor sistema es por fermentación.

Dado que las lacasas son enzimas de interés tanto en la industria como en procesos de biorremediación, se han realizado diversos estudios tratando de caracterizar sus actividades, de purificarlas y de encontrar mecanismos que incrementen su producción. Es por eso que en este trabajo se estudia el efecto del pH de desarrollo del hongo sobre la actividad y número de isoformas de lacasas de *Pleurotus ostreatus* obtenida por fermentación sumergida.

2.0 ANTECEDENTES GENERALES

2.1 Hongos de pudrición de la madera

Los hongos presentan gran variedad de formas de vida, entre las que se encuentran los de pudrición, que se dividen dependiendo de los cambios químicos y estructurales que ocasionan a la madera. Se han distinguido tres grupos: de pudrición blanda, de pudrición oscura y de pudrición blanca (Schwarze y col. 2000).

2.1.1 Hongos de pudrición blanda

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

Estos causan dos tipos de degradación: el tipo 1 se caracteriza por la formación de una serie de cavidades sucesivas de forma cónica, después de un periodo de incremento longitudinal de la hifa, el crecimiento se detiene y forma una cavidad alrededor de la hifa. Este mecanismo degradativo podría ser una forma de suministro de nutrientes. En el tipo 2 la degradación se lleva a cabo en el exterior del lumen, formando pequeñas

erosiones en V. Tienen importancia en el ecosistema porque quizá acelera la caída natural de las ramas en árboles vivos (Schwarze y col. 2000).

2.1.2 Hongos de pudrición oscura

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

Otra característica importante de estos hongos es que se asocian principalmente con coníferas, la razón de esto es probablemente debido a que estos hongos están adaptados a la estructura de la madera blanda de las coníferas, están restringidos en su habilidad de degradar lignina, por lo que se han considerado como hongos muy específicos comparados con los hongos de pudrición blanca, los cuales se pueden encontrar en una gran variedad de árboles (Schwarze y col. 2000).

2.1.3 Hongos de pudrición blanca

La pudrición blanca es ocasionada principalmente por Basidiomicetes y Ascomicetos. El nombre de pudrición blanca se deriva de la apariencia blanquecina en la madera al remover la lignina, celulosa y hemicelulosa (Schwarze y col. 2000). Estos son aerobios obligados, su nutrición es por medio de la combustión biológica de la madera y

materiales asociados, usando oxígeno molecular como aceptor terminal de electrones. La vía metabólica de producción de energía interna es 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 depolimerización 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 delignificación, 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 fenoloxidasas que son formadas y liberadas por la hifa, tales como las lacasas, manganeso peroxidasas, Lignina peroxidasas, tirosinasas y peroxidasas (Schwarze y col. 2000).

Algunos hongos pueden causar pudrición simultánea en alguna parte de la madera y en otra parte se lleva a cabo la delignificación. El factor responsable de la ocurrencia de uno u otro tipo de pudrición todavía es incierto (Kirk y Cullen 1998). La degradación de la lignina con respecto a otros componentes depende mucho de las condiciones ambientales (pH, temperatura, grado de humedad) y de la especie de hongo involucrado (Palmieri y col. 1997). Los hongos de pudrición blanca producen varias isoformas de oxidasas y peroxidasas, involucradas en la degradación de la lignina en su hábitat natural (Palmieri y col. 2000).

Los hongos del género *Pleurotus* son basidiomicetos de pudrición blanca, presentan un alto valor nutricional, tienen propiedades terapéuticas y variadas aplicaciones biotecnológicas, principalmente en procesos de biodegradación, ya que produce lacasas, manganeso peroxidasas y veratril alcohol oxidasas, aunque no produce lignina peroxidasas (Palmieri y col. 1997).

2.2 Descripción del género *Pleurotus*

El género *Pleurotus* comprende especies generalmente de color blanco, amarillento o rosado a veces grisáceo o de color oscuro. Su forma puede ser de embudo, pétalo de flor o concha de ostra. Con relación al estípite puede carecer de éste o puede ser lateral o excéntrico y puede ser corto, mediano o largo. Las laminillas son longitudinalmente decurrentes sobre la base del estípite, con frecuencia anastomosadas transversalmente al nivel de la inserción del pie. Las esporas son de color blanco, crema o lila pálido, presentan una forma cilíndrica (raramente elipsoides) y son lisas. El género es cosmopolita, está distribuido en Europa, Asia, África, Australia, Estados Unidos, Canadá y Latinoamérica (Guinberteau, 1990). Es un hongo saprótrofo, crece sobre troncos, ramas o árboles muertos y algunas veces se encuentra en el suelo sobre raíces podridas. La temperatura óptima de desarrollo de las especies de este género variable, *Pleurotus ostreatus* se desarrolla en climas templados, con una temperatura óptima de crecimiento de 25°C, mientras que *Pleurotus pulmonarius* se desarrolla en climas semi-tropicales (15-28°C).

En los Basidiomicetes existen dos modelos sexuales: 1) En el homotalismo los hongos son autocompatibles, es decir la unión sexual puede efectuarse entre elementos de un mismo micelio y 2) el heterotalismo en el que son necesarios dos micelios para llevar a cabo la reproducción. El género *Pleurotus* está dentro de este último modelo. En la Figura 1 se muestra el ciclo de vida del género *Pleurotus* propuesto por Guinberteau 1990. En éste hongo las basidiosporas con un núcleo germinan (micelio primario monocariótico) (**A**) y se fusionan dos micelios primarios compatibles, en los cuales hay un intercambio nucleico recíproco (plasmogamia) (**B**) formando el micelio secundario dicariótico con la presencia de fíbulas (**C**), la fusión nuclear (cariogamia) ocurre en los basidios que se encuentran en las laminillas del cuerpo fructífero (**D**), posteriormente ocurre la meiosis, dando origen a células haploides (basidiosporas) que son expulsadas hacia el ambiente (**E**) (Figura 1).

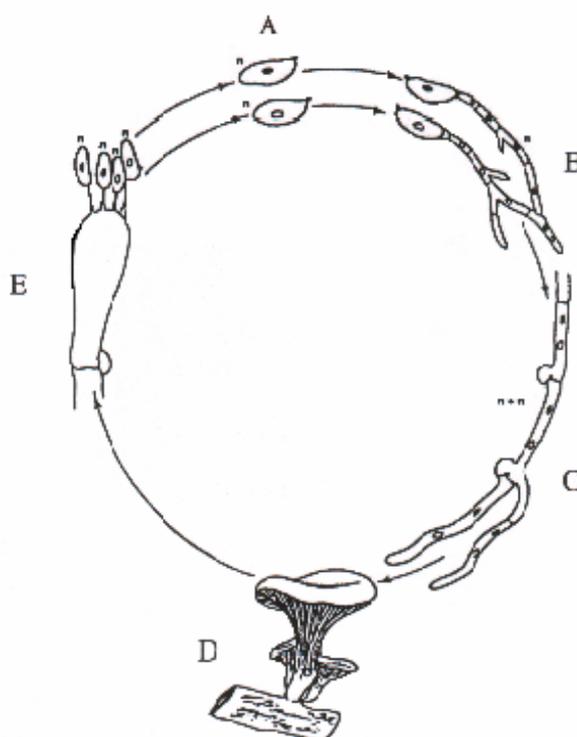


Figura 1. Ciclo de vida del género *Pleurotus*

En la Figura 2 se muestran las partes fundamentales de *Pleurotus*, las cuales son el sombrero o píleo, que protege a las laminillas o el himenio, este último es la parte fértil del hongo en donde se producen las esporas (Sánchez, 1996). El sombrero es sostenido por el tallo o estípote (Guzmán y col. 1993).

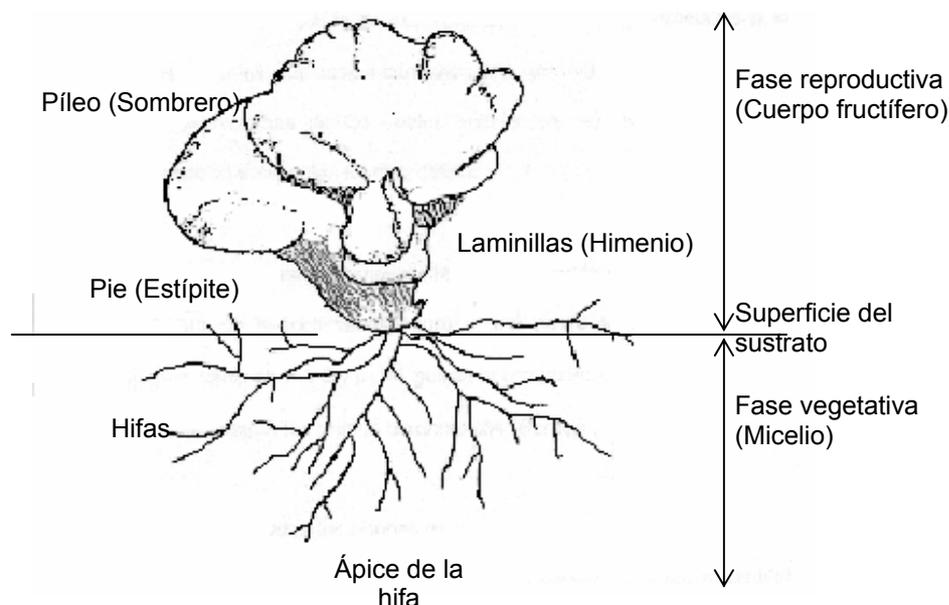


Figura 2. Partes fundamentales de *Pleurotus*.

2.3 Lignina

El término lignina se deriva de la palabra latina “lignum” que significa madera. Fue introducido por Anselme Payen en dos publicaciones en 1838 para representar las incrustaciones de celulosa en la pared celular de plantas (Leonowicz y col. 1999). Es un heteropolímero aromático complejo que se deriva del metabolismo de fenilpropanoides. Representa el 30% de la madera y se considera que ha tenido un papel crucial en la adaptación de las plantas en el hábitat terrestre (Ranocha y col. 1999).

La lignina es el principal componente del tejido vascular de las plantas leñosas, donde está entremezclada con la hemicelulosa y celulosa para formar la ligninocelulosa. Tiene peso molecular elevado, por su estructura confiere rigidez a la planta y permite la unión entre sus células. La función principal de la lignina consiste en proteger a los polisacáridos vegetales contra el ataque microbiano, en la madera le confiere una protección física a la celulosa y hemicelulosa contra el ataque enzimático, por tal motivo limita la utilización de la celulosa y hemicelulosa (Leonowicz y col. 1999).

Por otra parte es responsable del almacenamiento de alrededor del 40% de la energía solar captada por las plantas. Presenta grupos hidroxilos y un 15-20% de grupos

metilados (Eggert y col. 1996). Es recalcitrante y se mineraliza en un proceso oxidativo aerobio. La degradación de la lignina no provee de una fuente primaria de carbono y energía para el desarrollo del hongo, pero es un paso necesario probablemente en la utilización de los polisacáridos de la pared celular de las plantas (Griffin 1994).

La presencia de la lignina es un inconveniente para la utilización de celulosa y hemicelulosa en los procesos industriales y biotecnológicos, por lo que el estudio de su biodegradación tiene gran importancia. Existen una gran cantidad de organismos (bacterias y hongos) con las enzimas hidrolíticas necesarias para degradar la celulosa y hemicelulosa, pero en lo referente al ataque y mineralización de lignina el número de organismos es limitado. Los organismos descritos con la capacidad de degradar y mineralizar a la lignina son un grupo de hongos denominados de pudrición blanca (Dedeyan y col. 2000).

La lignina está compuesta de subunidades de fenilpropano interconectadas por diferentes enlaces carbono-carbono y carbono-oxígeno-carbono (Pointing 2001). El principal enlace de la estructura de la lignina es el éter arilglicerol- β -aril, enlace que comprende la mitad de los enlaces de la estructura. En la figura 3 se muestra el enlace de las unidades de fenilpropano de la lignina de la madera blanda, con un ejemplo del principal enlace. La lignina de la madera dura es similar, pero depende de las unidades de fenilpropano, ya que contiene dos grupo *o*-metoxil en lugar de un *p*-oxígeno (Kirk y Cullen 1998).

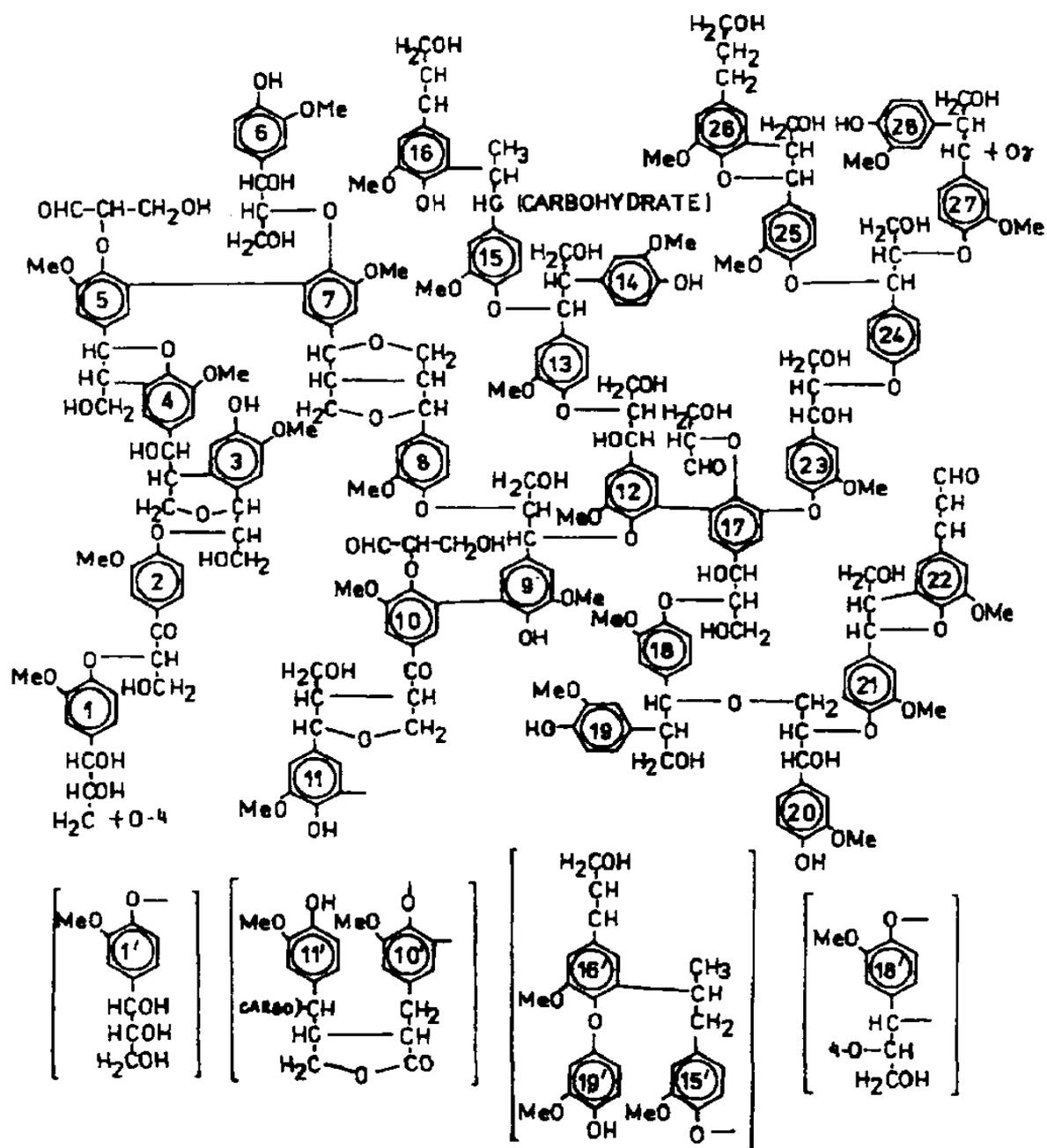


Figura 3. Estructura química de la lignina, mostrando el enlace de la estructura de la lignina el éter arilglicerol-β-aril.

2.4 Enzimas ligninolíticas

Los hongos de pudrición blanca producen cambios en la lignina (polímero estereoirregular) mediante mecanismos oxidativos. El sistema enzimático ligninolítico es poco específico, ya que las peroxidadas y oxidadas actúan al azar sobre la molécula de lignina, generando radicales libres que son inestables y tienden a polimerizarse. Las principales enzimas que actúan directa o indirectamente sobre la lignina son: lignina peroxidadas (LiP), manganeso peroxidadas (MnP) y lacasas. Ciertos hongos de pudrición blanca producen las tres enzimas, algunos sólo dos y pocos producen una (Kirk y Cullen 1998).

2.4.1 Enzimas lacasas

Las enzimas lacasas (p -difeno: oxígeno oxido-reductasas E.C. 1.10.3.2) son glicoproteínas (Heinzkill y col. 1998), su punto isoeléctrico (pI) y su pH óptimo son ácidos (Kirk y Cullen 1998); se han clasificado dentro del grupo de enzimas denominadas azul cobre oxidadas. Estas enzimas requieren cobre y oxígeno para oxidar fenoles, polifenoles, aminos aromáticas y diferentes sustratos no fenólicos mediante la transferencia de un electrón resultando la formación de radicales libres (Claus 2003) lo que permite que se lleve a cabo la polimerización, depolimerización, metilación y/o dimetilación de compuestos fenólicos (Edens y col. 1999). Las lacasas son de las pocas enzimas que han sido estudiadas desde el siglo XIX. Inicialmente se obtuvieron del exudado del árbol Japanese lacquer (*Rhus vernicifera*) y descritas por Yoshida (1883). Posteriormente Bertrand (1896) y Laborde (1896) demostraron por primera vez la actividad de lacasas en hongos. La función fisiológica de estas enzimas no ha sido comprendida totalmente; se ha reportado que en plantas, las lacasas participan en la lignificación y en hongos en la morfogénesis (formación de esporas, de pigmentos de los cuerpos fructíferos), patogénesis, virulencia y degradación de lignina o eliminación de fenoles tóxicos que surgen durante esta degradación (Mansur y col. 1997), pero también se ha reportado actividad de lacasas en algunos insectos y bacterias, en los cuales todavía no es clara su función (Galhaup y col. 2002). La estructura molecular de las lacasas se ha establecido a partir de las enzimas aisladas

de hongos. Estas enzimas forman parte de las enzimas ligninolíticas que presentan los hongos de pudrición blanca para degradar a la lignina y son secretadas en múltiples isoformas dependiendo de la especie de hongo y de las condiciones de desarrollo (Giardina y col. 1999). Las lacasas fúngicas no tienen un sustrato específico, por lo que pueden transformar y algunas veces mineralizar por completo gran variedad de contaminantes ambientales (Wilkolazka y col. 2002), así como degradar compuestos no fenólicos en presencia de mediadores redox apropiados (Li y col. 1999). Las lacasas tienen muchas aplicaciones como son: clarificación del vino (remueve compuestos fenólicos), análisis de drogas (distinguir morfina de codeína), delignificación y procesos de biorremediación (decoloración de efluentes, blanqueamiento y delignificación de la pulpa de papel, degradación de herbicidas, etc.) (Moreira y col. 1999).

En la oxidación de la lignina reacciona un electrón generando radicales libres, la oxidación de un electrón del sustrato se acopla a la reducción de cuatro electrones de oxígeno. El producto inicial es inestable y puede sufrir una segunda oxidación enzimática o de lo contrario una reacción no enzimática tal como la hidratación o polimerización. El enlace del sustrato natural (lignina) se rompe por la acción de las lacasas, incluyendo la oxidación del C_{α} , la separación del C_{α} - C_{β} y el aril-alkil (Archibald y col. 1997) (Figura 4).

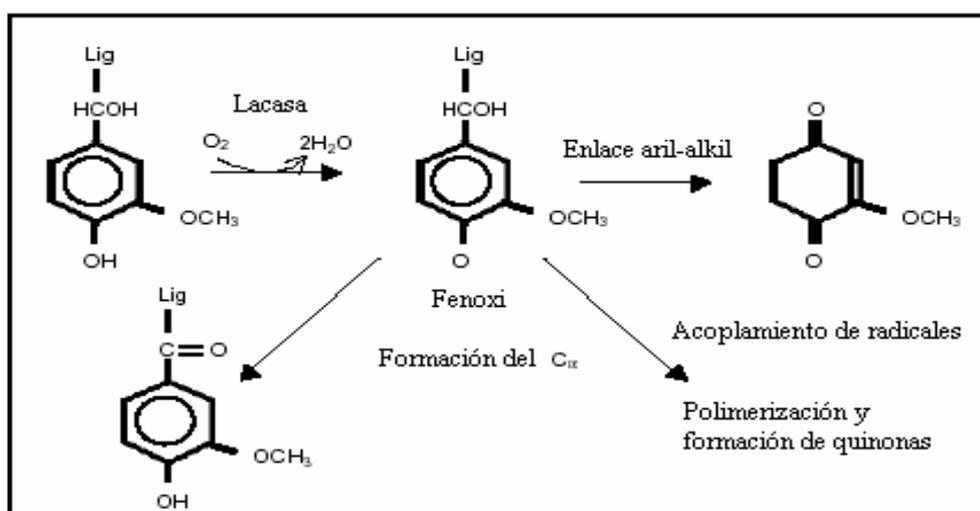


Figura 4. Oxidación de compuestos fenólicos de lignina por acción de lacasas.

2.4.2 Lignina peroxidasa

La lignina peroxidasa (LiP) (EC 1.11.1.14) se ha aislado de varios hongos de pudrición blanca. Esta enzima cataliza la oxidación de la lignina como sustrato, pero en presencia de H_2O_2 . El peso molecular de LiP de aproximadamente 40 kDa, es glucosilada y su pI y pH óptimos son ácidos. La oxidación por parte de LiP a compuestos fenólicos, inicia con la abstracción de un electrón del anillo aromático del sustrato donador (lignina), resultando un catión radical aril que entonces reacciona como radical y como catión, formando una amplia variedad de fragmentos degradados (Kirk y Cullen 1998) (Figura 5).

La LiP no entra por los poros de la pared celular por lo que actúa directamente sobre el polímero de la lignina, sobre la porción expuesta de la superficie del lumen. A este tipo de degradación se le denomina pudrición simultánea, pero este modelo no se aplica a los degradadores selectivos de lignina. En el modelo selectivo los hongos remueven la lignina del interior de la pared celular, pero antes ya la han degradado lo suficiente para que las enzimas puedan penetrar. Se ha propuesto que LiP podría actuar indirectamente por oxidación de sustratos de bajo peso molecular, que a su vez penetra a la pared y oxida el polímero (Kirk y Cullen 1998).

2.4.3 Manganeso peroxidadas

La manganeso peroxidasa (MnP) (EC 1.11.1. 13) cataliza la oxidación de la lignina y provee de oxidantes de bajo peso molecular. Estas enzimas son de peso molecular aproximado a 50-60 kDa, son glicosiladas, su pI y pH óptimos son ácidos. Tienen un ciclo catalítico de peroxidadas convencional, pero con Mn (II) como cofactor. La MnP no está presente en muchos hongos de pudrición blanca, actúa sobre unidades fenólicas de lignina transformándolas a radicales fenólicos y puede producir una depolimerización extensa. Los hongos de pudrición blanca que no producen LiP, pero presentan a la MnP pueden degradar estructuras no fenólicas de lignina. Se ha mostrado que la producción de oxirradicales formados por MnP puede ocurrir por otros mecanismos de la vía de quelatos de Mn (III). En la presencia de Mn (II), MnP promueve la peroxidación de lípidos insaturados, generando lipo-radicales transitorios intermediarios: esto se ha mostrado en un modelo de oxidación de compuestos no fenólicos de lignina. La MnP y

el sistema de peroxidación de lípidos (Figura 5) depolimeriza compuestos fenólicos y fenoles metilados en lignina sintética, lo que indica que este sistema podría ser el que se presenta en la depolimerización de lignina *in vivo*. Sin embargo falta mucho por investigar al respecto (Kirk y Cullen 1998).

Aún no es clara la relación entre la distribución de enzimas ligninolíticas y la degradación de la lignina, puesto que los hongos de pudrición blanca con una de estas enzimas tienen la capacidad de degradar lignina al igual que los hongos que presentan una combinación de dos y los de tres enzimas ligninolíticas (Dedeyan y col. 2000).

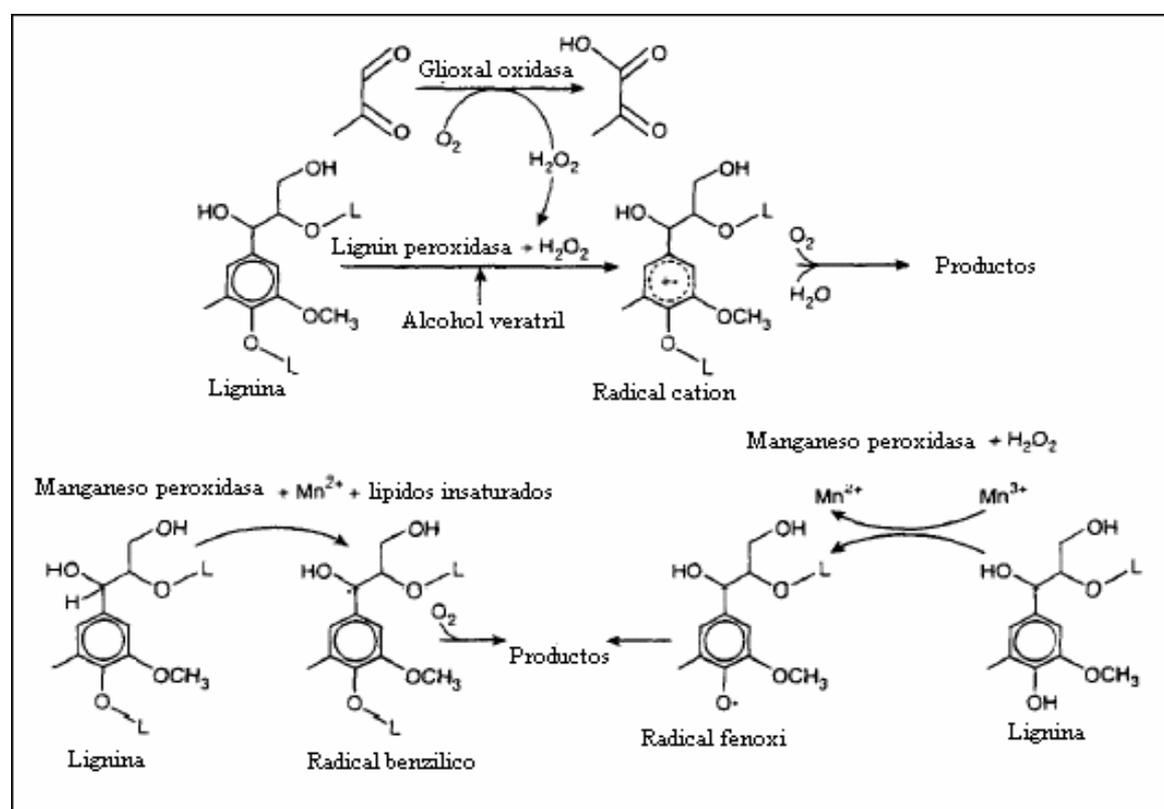


Figura 5. Reacción catalítica de lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa.

3. ANTECEDENTES PARTICULARES

3.1 Producción y características de las lacasas

Los hongos de pudrición blanca son los principales productores de las enzimas lacasas. Se sabe que la producción de las lacasas está influenciada por un gran número de factores ambientales tales como el pH, temperatura, tipo de cultivo y composición del medio (Giardina y col. 1999; Téllez-Téllez y col. 2008). Así mismo la actividad enzimática depende de las condiciones del medio de cultivo. También se ha reportado que la mayoría de las especies de hongos estudiadas secretan más de una isoforma de lacasa dependiendo de las condiciones de crecimiento que se utilicen, ya que estas enzimas pueden ser constitutivas o inducibles.

El estudio de las lacasas se ha realizado para conocer a los organismos productores, el número de isoformas intra y extracelulares, sus propiedades fisicoquímicas, con fines de caracterización, para utilizarlas en procesos como la biorremediación, síntesis de compuestos de interés entre muchos otros.

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

Por otra parte, también existen reportes de inducción de lacasas por cobre (Palmieri y col 2000) o medios ricos en nitrógeno (D'Souza y col 1999). Éstas se presentan en diversas isoformas con diferentes propiedades fisicoquímicas como: peso molecular, puntos isoeléctricos y contenido de carbohidratos. En algunas especies la adición de inductores al medio de cultivo resulta en la biosíntesis de nuevas isoformas extracelulares (Durán y col. 2002). Varias isoenzimas de lacasas se han descubierto en muchas especies fúngicas. Más de una isoenzima se produce en hongos de pudrición blanca (Blaich y Esser, 1975) y se ha determinado la actividad de lacasas en hongos de pudrición de madera usando como sustrato p -fenilendiamina. Las especies probadas fueron, *Coprinus plicatilis*, *Fomes fomentarius*, *Heterobasidion annosum*, *Hypholoma fasciculare*, *Kuehneromyces mutabilis*, *Leptoporus litschaueri*, *Panus stipticus*, *Phellinus igniarius*, *Pleurotus corticatus*, *Pleurotus ostreatus*, *Polyporus brumalis*, *Stereum hirsutum*, *Trametes gibbosa*, *Trametes hirsuta* y *Trametes versicolor*, exhibió la producción de más de una isoenzima (Baldrian 2005).

Edens y col. (1999) evaluaron la catálisis sobre varios sustratos de las lacasas puras de un ascomiceto patógeno denominado *Gaeumannomyces graminis* variedad *tritici* que causa varias infecciones en la raíz del trigo y la cebada. El sustrato que presentó la menor K_m fue el 2,6-dimetoxifenol (DMP) (K_m de 3.1^{-4} M) y la K_m más alta fue de 5.1^{-4} M al oxidar guayacol, por lo que la enzima presentó más afinidad por el DMP. Kiiskinen y col. (2002) mostraron que la actividad de *Melanocarpus albomyces* fue más grande en presencia de ABTS (836 nkat/mg) como ha sido reportado para muchas lacasas de hongos, seguido de siringaldazina (382 nkat/mg), DMP (290 nkat/mg) y guayacol (90 nkat/mg). Palonen y col. (2003) reportaron la actividad específica de lacasas de *Mauginiella* sp., la cual fue más alta con ABTS como sustrato, con 2870 nkat/mg, posteriormente guayacol (440 nkat/mg), DMP (360 nkat/mg) y siringaldazina (283 nkat/mg).

Eggert y col. (1996) incrementaron la actividad de lacasa en *Pycnoporus cinnabarinus* utilizando inductores. Con lignosulfonato y alcohol veratrílico la actividad de las lacasas se incrementó 2.8 y 2.0 veces más, respectivamente, mientras que con guayacol no se estimuló la producción de enzimas y con 2,5-xilidina mostró alta actividad de lacasas;

principalmente en las concentraciones 10-19 μM . La lacasa purificada presentó un peso molecular de aproximadamente 81 kDa con un pl de 3.7. Las lacasas son inducidas por la presencia de algunos compuestos aromáticos o fenólicos relacionados con la lignina o derivados de lignina tales como ácido ferúlico, 2,5-xilidina, p-anisidina o alcohol veratrílico. Este efecto inductor se ha encontrado especialmente en varias especies de *Trametes*, y al añadir cobre durante la fase de crecimiento exponencial se obtuvo un aumento considerable de actividad (Galhaup y col. 2002).

Hublik y Schinner (2000) purificaron una isoforma lacasa de *Pleurotus ostreatus* cepa RK 36 que fue inducida por la adición de ácido ferúlico al medio de cultivo. La enzima presentó un peso molecular de 67 kDa y un pl de 3.6. Los centros de cobre fueron identificados por espectrometría encontrando T1 que mostró un pico de absorbancia a 604 nm, responsable del color azul de la enzima. También reportó un pico de absorbancia a 324 nm que sugiere la presencia de T3 que forma un centro binucleado. La actividad de la enzima fue estable en un rango de pH de 5-9 con siringaldazina como sustrato y una temperatura óptima de actividad de 50°C. Por otra parte Eggert y Temp (1999) encuentran una relación entre las lacasas y las celobiosa deshidrogenasa para la formación de pigmentos en hongos de pudrición blanca en presencia de un precursor, el ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA) el cual es oxidado a ácido cinabárico durante la fructificación (Figura 6) por lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* en un medio que contenía celulosa y celobiosa.

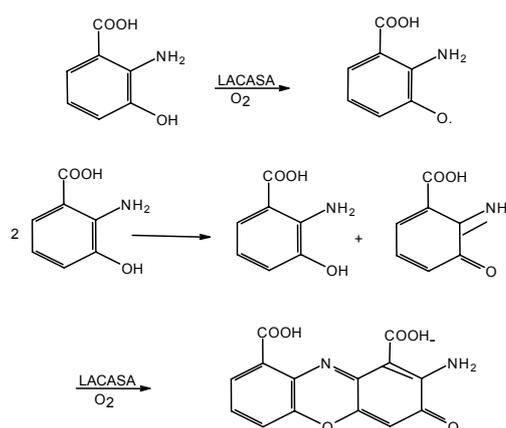


Figura 6. Oxidación del ácido 3-HAA a ácido cinabárico en presencia de lacasas de *Pycnoporus cinnabarinus* y celobiosa deshidrogenasa.

En otro estudio realizado por Palmieri y col., (1997), muestran la producción de múltiples isoenzimas lacasa de hongos basidiomicetes de pudrición blanca, siendo el

principal *Pleurotus ostreatus* (cepa Florida). En este trabajo se encuentran dos isoenzimas lacasa, denominadas POXA1 y POXA2 y determinan sus propiedades físicas y químicas. El peso molecular fue determinada por el análisis SDS-PAGE, los valores encontrados para POXA1 y POXA2 fueron de 61 kDa y 67 kDa respectivamente y los valores de peso molecular obtenidos por cromatografía de filtración en gel muestran valores de 54 kDa y 59 kDa respectivamente. Estos resultados confirman la estructura monomérica de estas proteínas. Los puntos isoeléctricos para POXA1 y POXA2 fueron de 6.7 que es cercano a la neutralidad y 4.0 en el pH ácido respectivamente. El contenido de cobre fue determinado por absorción atómica y muestran valores para POXA2 de 3.0 ± 0.1 y para POXA1 se observaron valores de 0.7 ± 0.2 , sin embargo esta enzima además de cobre posee cadmio, mercurio, níquel, hierro y zinc. La actividad de lacasa fue estudiada en función de la temperatura utilizando ABTS, guayacol, DMP y siringaldazina como sustratos. La isoenzima POXA1 mostró la máxima actividad en un intervalo de 45-65 °C. Posteriormente Palmieri y col. (2000) reportaron que el agregarle CuSO_4 al caldo de cultivo se incrementó en la actividad de lacasas y se produjeron tres isoenzimas denominadas POXA1b, POXA2, y POXC. Durante el estudio probaron diversos tipos de inductores como el MnSO_4 , FeCl_3 , ZnSO_4 , alcohol veratrílico, veratraldehído, ácido vinílico y ácido ferúlico, los cuales no tuvieron un efecto significativo en la actividad de lacasa. La actividad de lacasa se determinó a 25°C usando ABTS como sustrato. El mayor incremento en la actividad de lacasa se obtuvo en el cultivo suplementado por cobre (10 UI/ml).

Cabe mencionar que las lacasas de basidiomicetes han sido muy estudiadas, como es el caso de *Ceriporiopsis subvermispota* (hongo de pudrición blanca) que presentó dos isoenzimas, L1 y L2 con un peso molecular de 71 y 68 kDa respectivamente. Este estudio mostró evidencias de que la afinidad de las isoformas y el pH óptimo de actividad es dependiente del tipo de sustrato utilizado; con ABTS como sustrato la K_m de ambas isoenzimas fue la más baja (0.03 y 0.02 mM), con DMP presentaron una K_m de 2.9 y 7.7, pero los valores más altos de la K_m (6.3 y 9.0) se obtuvieron al utilizar vainillina (Fukushima y Kirk 1995). Sethuraman y col. (1999) evaluaron la actividad de las lacasas de *Cyathus stercoreus* con diferentes sustratos, obteniendo la mayor actividad con ABTS (3.5 U/ml), DMP (3.06 U/ml) en tanto la menor actividad se mostró

con pirogallol (0.36 U/ml). Klonowska y col. (2002) compararon dos isoenzimas de lacasas (LAC1 y LAC2) que produce el hongo C30, el cual es un hongo de pudrición blanca que coloniza las hojas perennes del roble (*Quercus ilex*), donde encontraron claras diferencias entre las dos isoformas en los parámetros cinéticos utilizando como sustratos compuestos fenólicos (siringaldazina y guayacol) y el ABTS (no fenólico), aunque la afinidad de las enzimas por los tres sustratos es baja como lo reflejan los grandes valores de K_m . LAC2 mostró ser más eficiente en la oxidación de los sustratos. Las diferencias observadas en la cinética enzimática pueden ser consecuencia de la variabilidad de ciertos aminoácidos involucrados en la especificidad de la enzima, dependiendo del sustrato. También *Trametes pubescens* secreta varias isoformas de lacasas, pero Galhaup y col. (2002) sólo caracterizaron una, la cual presentó un peso molecular de 65 kDa. De esta enzima se determinó el valor de K_m sobre diferentes sustratos. Con siringaldazina la K_m fue de 6.0 μM (valor más bajo), posteriormente con ABTS la K_m fue de 43 μM a un pH de 4.5, con DMP presentó una K_m de 72 μM , con guayacol la K_m fue de 360 μM y con p -anisidina la K_m fue de 1,600 μM que fue el valor más alto. El valor bajo de la K_m en presencia de siringaldazina también ha sido reportado para otras lacasas de hongos en un hongo de la familia *Chaetomiaceae*, el valor de la K_m fue de 9 μM comparado con 10,000 μM al utilizar como sustrato un contaminante con actividad estrogénica. Las lacasas del hongo *Chaetomium thermophilium* presentó un valor de K_m fue de 34 μM , en tanto en *Rigidoporus lignosus* fue de 40 μM y en *Coriolus hirsutus* de 142.7 μM (Saito y col. 2003).

Se han realizado trabajos de purificación de lacasas provenientes de hongos comestibles, en los cuales sus enzimas son más seguras para ser utilizadas por los humanos. En el caso de *Lentinula edodes* (shiitake), el segundo hongo comestible más importante a nivel mundial, Nagai y col. (2002) aislaron una enzima lacasa con un peso molecular de 72.2 kDa, y determinaron su sustrato específico, utilizando ABTS, pirogallol, guayacol, ácido ferúlico, DMP y catecol. La lacasa de este hongo presentó más afinidad por ABTS (K_m 0.108 mM) en comparación con DMP donde la K_m fue de 0.557 mM. Savoie y Mata (2003) reportaron que hongos del género *Lentinula* y *Pleurotus* presentan una sobreproducción de enzimas lacasas al estar en contacto con un organismo antagonista como es el caso de *Trichoderma sp.* Sin embargo Mata y col.

(2004) reportan que la presencia del antagonista induce la sobre producción de las enzimas oxidasas, no sólo de lacasas en *Pleurotus*.

Múltiples isoformas de lacasas con diversas características fisicoquímicas han sido purificadas. En la Tabla 1 se resumen las características más importantes de las enzimas lacasas de diversos ascomicetos y basidiomicetos. Se han identificado isoformas de pesos moleculares desde 55 hasta 190 kDa; así como puntos isoeléctricos desde 3.0 hasta 6.4; temperaturas óptimas de actividad para diversos sustratos que van desde 22 °C hasta 50 °C; y pH's óptimos para diversos sustratos desde 2.5 hasta 8.0. También se ha reportado la capacidad de una isoforma de *Lentinula edodes* para transformar algunos colorantes como el azul brillante R, Azul de bromofenol, Rojo de metilo, Negro azul naftol, entre otros (Nagai y col. 2002).

Tabla 1. Isoformas de lacasas purificadas en diversos organismos

Organismo	Clasificación	Isoformas	Peso molecular	Sustrato	Km (μ M)	V _{max}	pH óptimo	Temp. Óptima	Características	Referencia
<i>Trametes sp. cepa AH28-2</i>	Basidiomiceto	una	62kDa	Guayacol ABTS DMP	420 25 25.5	66.8 μ M/min mg 670 μ M/min mg 79 μ M/min mg	4.5	50 °C	Estable a pH de 4.2-8.0	Xiao y col. 2003
<i>Mauginiella sp.</i>	Ascomiceto	una	67kDa	ABTS Guayacol DMP Siringaldazina	-- -- -- --	no determinada no determinada no determinada no determinada	2.5 4.0 3.5 --	40°C -- -- --	-----	Palonen y col. 2003
<i>Melanocarpus Albomyces</i>	Ascomiceto	una	80kDa	Guayacol Siringaldazina ABTS	-- -- --	no determinada no determinada no determinada	5-7.5 6-7 3-5	-- -- --	Estable de 60-70 °C	Kiiskinen y col. 2002
<i>Lentinula edades</i>	Basidiomiceto	una Lcc 1	72.2kDa	ABTS P- fenilendiamina DMP Guayacol Ac. ferúlico	108 256 557 917 2860	604 μ M/min mg 0.71 μ M/min mg 0.55 μ M/min mg 2.14 μ M/min mg 0.10 μ M/min mg	4.0 5.0 4.0 4.0 5.0	40°C 40°C 40°C 40°C 40°C	Capaz de decolorar : azul brillante R, azul de bromofenol, rojo de metilo, negro azul de naftol, entre otros	Nagai y col. 2002
<i>Corioloopsis Rigida</i>	Basidiomiceto	dos Lac I Lac II	55 kDa 66kDa	ABTS DMP ABTS DMP	12 328 11 348	no determinada no determinada no determinada no determinada	2.5 3.0 2.5 3.0	de 22 a 25°C	Inducida con cobre y estable a pH de 6-10	Saparrat y col. 2002
<i>Ganoderma lucidum</i>	Basidiomiceto	tres GaLc 1 GaLc 2 GaLc 3	de 65-68 kDa	----- ----- O-toluidina ABTS	-- -- 401.6 3.7	no determinada no determinada 0.019OD/minU 0.0142OD/minU	3.5 3.5 3.5	20°C 20°C 20°C	-----	Ko y col. 2001
<i>Gaumannomyces graminis</i>	Ascomiceto	una	190kDa	DMP	2.6X10 ⁻²	no determinada	4.5	23°C		Edens y col. 1999
<i>Chaetomium thermophilum</i>	Ascomiceto	una	77kDa	Siringaldazina	--	no determinada	6.0	---	Estable a 70°C	Chefetz y col. 1998
<i>Panaeolus Sphinctrinus</i>	Basidiomiceto	una	60 kDa	ABTS DMP	32.4	no determinada no determinada	3.0 7.0	22°C	-----	Heinzkill y col. 1998

Tabla 1. Isoformas de lacasas purificadas en diversos organismos (continuación)

Organismo	Clasificación	Isoformas	Peso molecular	Sustrato	Km (μ M)	V _{max}	pH óptimo	Temp óptima	Otros	Autor
<i>Panaeolus papilionaceus</i>	Basidiomiceto	una	60 kDa	ABTS DMP	50.6	No determinada	3.0 8.0	22°C	-----	Heinzkill y col. 1998
<i>Coprinus Friessi</i>	Basidiomiceto	una	60 kDa	ABTS DMP	41.4	no determinada	5.0 8.0	22°C	-----	Heinzkill y col. 1998
<i>Polyborus pinsistus</i>	Basidiomiceto	una	60 kDa	ABTS DMP	22.3	No determinada	3.0 5.0	22°C	-----	Heinzkill y col. 1998
<i>Coriolus Hirsutus</i>	Basidiomiceto	una	55 kDa	K ₄ Fe(CN) ₆ Catecol Guayacol Hidroquinona Eugenol Ac Sinapínico	167.6 145.6 62.9 61.1 44.9 24.0	No determinada	3.5 4.5 -- -- -- --	25°C 25°C 25°C 25°C 25°C	Inducida con siringaldazina	Koroljova-Skorobogat'ko y col. 1998
<i>Phanerochaete flavida-alba</i> FP106507	Basidiomiceto	una	94 kDa	ABTS DMP Siringaldazina	740	15.4nmol/min μ g	3.0	30°C	Confusión entre <i>P flavido alba</i> y <i>P. chrysosporium</i>	Pérez y col. 1996
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Basidiomiceto	tres	70 kDa 50 kDa 30 kDa	ABTS DMP Siringaldazina Guayacol	--	No determinada	6.5	25 °C	Inducida con cobre	Téllez-Téllez y col. 2005

ABTS: 2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)

DMP: 2,6 dimetoxifenol

P.I.: Punto isoeléctrico

Km: Constante de Michaelis-Menten

V_{max}: Velocidad máxima

Por otra parte, Dekker y col. (2002) utilizaron cultivo sumergido para desarrollar al ascomiceto *Botryosphaeria* sp. para producir lacasas, el medio basal que utilizaron contenía concentraciones de 1mM de ácido benzoico, catecol, ácido 2,6-dimetoxibenzoico, DMP, ácido ferúlico, guayacol, alcoholes veratraldehído y vinílico. Establecieron que en estos sustratos se produjeron lacasas con actividades mayores que las obtenidas por los niveles constitutivos al crecer el mencionado microorganismo solamente en el medio basal. La mayor actividad se obtuvo en el medio que contenía veratraldehído (8 U/ml aproximadamente). La actividad se evaluó utilizando ABTS como sustrato. Así mismo, Shicheng y col. (2003) estudiaron la inducción de actividad de lacasa en *Volvariella volvacea*, creciéndola en un cultivo sumergido en un medio con glucosa como única fuente de carbono, con alta y baja concentración de de nitrógeno (adicionado como NH_4NO_3 a una concentración de 2.6 y 26 μM respectivamente) y con adición de cobre (50-300 μM CuSO_4). Indujeron dos isoformas de lacasas y la mayor actividad se mostró en una concentración de 200 μM CuSO_4 a concentraciones altas de nitrógeno (30 UI/L). La actividad de lacasa fue determinada a 32°C usando ABTS.

3.2 Estudios de producción de isoformas de lacasa en *Pleurotus ostreatus*.

Con el fin de estudiar la producción de lacasas al modificar los medios de cultivo, en estudios recientes realizados por Tlecuítl-Beristain (2005) purificó una enzima lacasa con altos valores de actividad y afinidad por el sustrato utilizado, observaron una actividad máxima de 12 196 U/L a las 432 h, usando para ello un medio de cultivo con glucosa, extracto de levadura y alta concentración de cobre; por otro lado, Téllez-Téllez y col. (2005) evaluaron la actividad de lacasas intra y extracelular de varias cepas del género *Pleurotus*, utilizaron diversos sustratos y observaron diferencias en los niveles de actividad asociado al poder oxido-reducción de los sustratos pero el mismo patrón de isoformas en zimogramas con los diferentes sustratos empleados, sin embargo también observaron que el perfil de isoenzimas es dependiente de la especie de *Pleurotus*. Juárez-Hernández (2006) logró caracterizar un medio de cultivo para la producción de lacasas por fermentación sumergida, utilizando *Pleurotus ostreatus*; en la fase estacionaria se detectó la mayor actividad enzimática, observando tres isoformas por

zimografía durante la fermentación en medio basal y cuatro en la fermentación sin adición de cobre como inductor. Téllez-Téllez y col. (2008), realizaron una comparación entre la producción de lacasas de *Pleurotus ostreatus* por fermentación sólida y fermentación sumergida y contrario a lo que muchos autores han reportado sobre las ventajas de la fermentación sólida sobre la líquida en la producción de enzimas, en este estudio se obtuvo mayor actividad de lacasas y mayor producción de lacasas en fermentación sumergida sin producción de proteasas.

Las cepas de *Pleurotus ostreatus* que han sido estudiadas han mostrado que este organismo produce varias isoformas de lacasa. Palmieri y col. (1997) caracterizaron dos isoenzimas de este hongo, POXA1 y POXA2. Ambas isoenzimas oxidan siringaldazina, aunque POXA1 presenta la K_m más baja con este sustrato (1.3 mM), en tanto con DMP la K_m fue de 2.1 mM y con ABTS fue de K_m 9.0⁻². La isoenzima POXA2 fue la que presentó el valor más bajo ($K_m=1.2^{-1}$ mM) con ABTS, seguida de siringaldazina donde la K_m fue de 1.4⁻¹ mM. La POXC presentó más afinidad por siringaldazina ($K_m= 2.0^{-2}$ mM), seguida de DMP ($K_m= 2.3^{-1}$ mM) y la K_m en presencia de ABTS fue de 2.8⁻¹mM.

En estudios realizados por Pert y Jira (2001), encontraron que la adición de cobre (0.5-5 mM) al hongo de pudrición blanca *Pleurotus ostreatus*, cultivado en un medio líquido limitado por nitrógeno incrementó la actividad de lacasa hasta ocho veces. Palmieri y col. (2003) reportaron un fuerte incremento de la actividad de lacasa y la producción de una nueva isoenzima, POXA1b, en un cultivo suplementado con cobre de *Pleurotus ostreatus*.

Al agregarle CuSO₄ al medio de cultivo de *Pleurotus ostreatus*, Giardina y col. (1999) indujeron otra isoforma de lacasas a la cual denominaron POXA1b, que es casi idéntica a POXA1. La oxidación de POXA1b, usando los sustratos comunes para lacasas, ABTS, siringaldazina y DMP, presentó la K_m más baja en presencia de siringaldazina (0.22 mM), seguida de DMP (0.26 mM) y el valor más alto fue en presencia de ABTS (0.37 mM). Al igual que las otras isoenzimas identificadas en este hongo, POXA1 fue incapaz de oxidar guayacol, sustrato muy común para las lacasas, por lo que estas

isoenzimas tienen una peculiaridad con respecto a la especificidad del sustrato con respecto a otras lacasas caracterizadas. Palmieri y col. (2003) purificaron y caracterizaron otras dos isoenzimas de *Pleurotus ostreatus*, las cuales presentaron la misma característica que las anteriores: no detectaron actividad al utilizar guayacol como sustrato. No se observaron diferencias entre POXA3a y POXA3b en los parámetros cinéticos, con ABTS y DMP como sustratos presentó mayor afinidad POXA3a, pero con siringaldazina fue la POXA3b.

Das y col. (1997) en *Pleurotus ostreatus* (cepa *florida*) hallaron dos lacasas L₁ y L₂. Utilizaron diferentes sustratos para determinar la afinidad de ambas isoenzimas. Para L₁ la K_m fue de 28.5 mM con guayacol y para L₂ fue de 3.13 mM, con o-dianisidina para la isoforma L₁ los resultados fueron K_m= 0.33 mM y L₂ K_m= 0.29 mM. La catálisis sobre guayacol fue más eficiente en la L₂ que en la L₁. Muñoz y col. (1997) encontraron dos isoenzimas de lacasas I y II en el medio de cultivo de *Pleurotus eryngii*. La afinidad de ambas isoenzimas por los sustratos utilizados fue similar excepto para DMP, ρ -hidroquinona (QH₂) y metil- ρ -hidroquinona (MeQH₂), con los cuales presentó alta afinidad la lacasa II y catecol en el caso de la lacasa I. Comparando las constantes cinéticas obtenidas con ρ -metoxifenol y ρ -anisidina, se observó que la afinidad de ambas isoenzimas fue más alta para compuestos fenólicos que para aminas aromáticas, aunque la proporción de oxidación de ρ -metoxifenol fue baja en ambos casos, la lacasa I oxidó más eficientemente los fenoles y la lacasa II las aminas.

De Souza y col. (2002) trabajaron con *Pleurotus pulmonarius* crecido sobre paja de trigo, donde la máxima producción de lacasas del extracto crudo enzimático fue de 8600 U/g de sustrato a los cinco días de crecimiento. La enzima lacasa fue la única fenoloxidasa producida por este hongo en el medio sólido, por lo que parece ser que la paja de trigo es un excelente medio para producción de lacasas, probablemente por su composición ligninocelulósica. De Souza y Peralta (2003) purificaron la principal isoenzima que se presentó en estas condiciones de crecimiento de *Pleurotus pulmonarius*, y determinaron los parámetros cinéticos utilizando siringaldazina, ABTS y

guayacol como sustratos. La enzima Lcc2 presentó un bajo valor de K_m (12 μM con siringaldazina, 210 μM con ABTS y 550 μM con guayacol).

Tinoco y col. (2001) purificaron y compararon ocho isoformas lacasas producidas por fermentación sólida bajo las mismas condiciones del medio de cultivo, de las cuales seis fueron de diferentes cepas de *Pleurotus ostreatus*, una de *Coriolopsis gallica* y otra de *Trametes versicolor*. 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 *Pleurotus ostreatus* mostraron un pH óptimo de actividad de 5.0 utilizando siringaldazina como sustrato, así como una temperatura de máxima actividad entre 30 y 40°C. En contraste, las lacasas de *C. gallica* y *T. versicolor* mostraron alta sensibilidad al pH y la temperatura máxima de actividad fue de 70 y 50°C, respectivamente. Los autores atribuyen las variaciones a las diferencias en los niveles moleculares que afectan significativamente a la catálisis.

3.3 Efecto del pH en la producción de isoformas de lacasa

Hasta el momento pocos autores han relacionado el efecto del pH sobre la producción de metabolitos en organismos cultivados por fermentación sólida o sumergida, además, hasta el momento no existe ningún reporte relacionado con la producción de lacasas obtenidas por fermentación sumergida de *Pleurotus ostreatus* que dependa del pH inicial de desarrollo. Pereira y col. (2007) reportaron el efecto del pH del medio de crecimiento sobre el desarrollo de tres especies de hongos ectomicorrícicos *Rhizopogon luteolus*, *Suillus bellinii* y *Suillus luteus* recolectados en plantaciones de *Pinus radiata*. El medio de cultivo sólido se ajustó a 4.8, 5.8, 6.8 y 7.8 e incubados a 24 °C durante 32 días, donde evaluó el crecimiento radial de cada organismo y el cambio en el pH del medio. Se observó una variación de pH entre 4,8 y 7,8 el cual se relacionó sobre la velocidad y área final de crecimiento de las especies *R. luteolus* y *S. luteus*. *Rhizopogon luteolus* alcanzó los mayores crecimientos, en velocidad y área, en los valores de pH 5,8 y 6,8. Para *S. luteus* la mayor velocidad y área de crecimiento fueron observadas a pH 4,8 y 5,8, respectivamente. En los medios nutritivos, las tres especies

disminuyeron el pH de los medios, siendo esto más evidente en los tratamientos de mayor pH inicial. Los resultados indicaron que el pH del medio de cultivo es determinante en el comportamiento de las especies de hongos ectomicorrícicos *in vitro*.

Por otro lado, Zawadi y col. (2008) evaluaron el efecto del pH y velocidad de agitación sobre el crecimiento y producción de xilanasas por *Aspergillus oryzae*, se observó que la producción de la enzima fue afectado, observando que a pH de 7.5 la velocidad de crecimiento y producción de xilanasas es mayor con respecto a lo que observó a pH de 4.0; así mismo, evaluaron la producción de isoformas encontradas en fermentación sólida encontrando hasta tres isoenzimas distintas de bajo peso molecular en la gama de pH de 4 a 8.

Tavares y col. (2006) reportaron el efecto que tienen la concentración de glucosa (0 y 9 g/L), agitación (100 y 180 rpm) y pH (3.0 y 5.0) sobre la producción de lacasas obtenidas por *Trametes versicolor*, observaron que el pH del medio de desarrollo juega un papel muy importante en la producción de lacasas encontrando que a una concentración de 11 g/L de glucosa y un pH de 5.2 fueron las condiciones óptimas para la producción de lacasas alcanzando actividades de 11403 U/L.

3.4 Las lacasas en biorremediación

Con el paso del tiempo se ha incrementado la aplicación de los microorganismos en diversos procesos de recuperación de ambientes contaminados. La biorremediación fue definida por la EPA (Environmental Pollution Administration) de los Estados Unidos de Norteamérica en 1991, como un proceso que utiliza microorganismos para transformar sustancias tóxicas o peligrosas, en sustancias menos tóxicas o no tóxicas. Los microorganismos pueden ser bacterias u hongos. Algunos hongos de pudrición blanca se están utilizando en la biorremediación debido a su complejo sistema para depolimerización y mineralización de la lignina.

Algunos hongos de pudrición blanca son capaces de transformar el 2,4,6-trinitrotolueno a dinitrotolueno, y también lo llevan hasta mineralización a CO₂ (Pointing 2001). Collins y col. en 1996 reportaron que durante la oxidación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) hay incorporación directa del oxígeno dentro del anillo aromático. Los PAHs son altamente tóxicos, están distribuidos en ambientes terrestres y acuáticos, son un grupo de compuestos aromáticos que contienen dos o más anillos bencénicos fusionados en arreglos angulares, lineales o agrupados y se forman principalmente como producto de la combustión incompleta. Por otra parte *Phanerochaete chrysosporium*, *Bjerkandera adusta*, *Trametes versicolor* y *Phlebia radiata*, tienen la habilidad de degradar diversos colorantes los cuales pueden ser parcialmente mineralizados por el sistema enzimático de estos hongos (Wilkolazka y col. 2002). Las lacasas producidas por estos hongos pueden ser usadas para el tratamiento de efluentes de fábricas de pulpa de papel o de otras industrias que contienen cloroligninas o compuestos fenólicos (Abadulla y col. 2000).

En varios estudios se ha mostrado que la eficiencia de decoloración de colorantes sintéticos, depende del tipo de microorganismo a emplear y de la estructura del colorante (Nyanhongo y col. 2002, Doralice y col. 2001, Kim y Shoda 1999, Wong y Yu 1999). Jaroz y col. (2002), compararon 115 cepas de hongos de diferentes grupos fisiológicos, para evaluar sus capacidades de degradar los colorantes azo (rojo ácido 183) y antraquinona (azul básico 22), estos autores encontraron que el colorante azo fue el más resistente a la degradación y que sólo 16 cepas de las 115 evaluadas, fueron capaces de degradar dicho colorante, por otro lado, 69 cepas pudieron degradar el colorante antraquinona. Havtani y Méés (2002) estudiaron el efecto de la fuente de nitrógeno y la concentración de la misma, sobre la producción de lacasas y MnP por *Lentinus edodes*, así como la habilidad de éste hongo para degradar los colorantes; poly R-478, azul brillante remazol y naranja II, y encontrando que *Lentinus edodes* era capaz de decolorar los tres colorantes estudiados y que la concentración de nitrógeno en un rango de 1-3 mM era óptima para la producción enzimática y la eficiencia de decoloración. Existe gran dificultad para poder definir a las lacasas de acuerdo a su sustrato específico, porque las lacasas oxidan sustratos sobre los cuales también

actúan las tirosinasas. Las catecol oxidasas o tirosinasas oxidan sobre *o*-difenoles y las lacasas sobre *o*-difenoles y *p*-difenoles, aunque se ha reportado que tienen más afinidad hacia el segundo grupo y es la única enzima que oxida a la siringaldazina (Eggert y col. 1996). Otra dificultad para definir a las lacasas de acuerdo a su especificidad por el sustrato es que no son específicas, ya que ésta varía de un organismo a otro. Las lacasas oxidan polifenoles, metoxifenoles y amidas, por mencionar algunos. Thurston (1994) reportó que las hidroquinonas y el catecol son sustratos muy utilizados para determinar actividad de lacasas, no obstante que el guayacol y el DMP son considerados los mejores sustratos, pero la siringaldazina es el único sustrato que puede ser oxidado únicamente por las lacasas.

Las lacasas de *Neurospora crassa* sólo oxidan orto y para-difenoles con excepción de cloroglucinol (Germann y col. 1988), pero las lacasas de *Pyricularia oryzae* prefieren el cloroglucinol como sustrato sobre otros fenoles mono-sustituídos (Alsubaey y col. 1996). Las lacasas de *Cerrena unicolor* y *Trametes versicolor* oxidan fenoles meta-sustituídos en diferentes grados, pero la enzima de *Cerrena unicolor* oxida principalmente fenoles para-sustituídos mientras que la de *Trametes versicolor* oxida fenoles orto-sustituídos (Jolivalt y col. 1999).

Se han reportado muchas reacciones catalizadas por las lacasas de diferentes hongos. Un estudio comparativo de lacasas obtenidas de diferentes hongos mostró que tienen la habilidad de oxidar ácidos metoxifenólicos, pero el grado de oxidación es variable y depende del pH (Bollag y Leonowicz 1984). Guillén y col. (2000) reportaron que *Pleurotus eryngii* oxidó dos derivados de hidroquinonas llamadas 2-metoxi-1,4-benzohidroquinina y 2,6-dimetoxi-1,4-benzohidroquinona y que la auto-oxidación de las semiquinonas producidas por la reacción catalítica de lacasas indujo la activación del oxígeno. El compuesto 2,6-dimetoxi-1,4-benzohidroquinona fue oxidado más eficientemente que el 2-metoxi-1,4-benzohidroquinina, lo que se puede correlacionar con la alta afinidad de las lacasas por DMP.

En los procesos industriales tales como el blanqueamiento del papel se producen compuestos organoclorados que incluyen clorofenoles, catecol y guayacol. La enzima lacasa de *Coriolus versicolor* mostró dechlorinar el tetracloroguayacol y liberar iones cloro. Las lacasas de *Trametes villosa* y *Trametes hirsuta* tienen la habilidad de modificar ácidos grasos y resinas. La cantidad de ácido linoleico, oleico y linolénico, se redujo en los ácidos grasos y la cantidad de resinas conjugadas también disminuyó (Karlsson y col. 2001). La presencia de compuestos fenólicos en aguas residuales es un problema, ya que estos compuestos son tóxicos y se originan por la utilización de herbicidas fenólicos en la agricultura o actividades industriales (Abadulla y col. 2000). Actualmente se utilizan las lacasas para oxidar estos compuestos. Las enzimas lacasas producidas por *Pycnoporus sanguineus* se utilizan en la oxidación de colorantes presentes en aguas residuales. *Pycnoporus cinnabarinus* ha mostrado que degrada una amplia gama de colorantes (Hardin y col. 2000).

4. JUSTIFICACIÓN

Los potenciales usos biotecnológicos que tienen las enzimas lacasas para degradación de compuestos recalcitrantes y su posible uso en biorremediación, particularmente de la contaminación causada por compuestos fenólicos derivados del uso de pesticidas y del desarrollo de la industria textil, han hecho que esta enzima sea ampliamente estudiada. Se tienen antecedentes sobre la utilización de diversas especies de hongos de pudrición blanca capaces de degradar compuestos ligninocelulósicos, los cuales pueden ayudar a resolver los problemas de contaminación, haciendo uso de mecanismos enzimáticos en donde participan las lacasas, enzimas capaces oxidar y polimerizar compuestos fenólicos (Abadulla y col. 2000).

Por lo anterior, se puede decir que el éxito de la utilización de enzimas lacasa en procesos de biorremediación, así como su gran variedad de usos biotecnológicos se basa principalmente en contar con organismos altamente productores de enzimas con las mejores características catalíticas, así como las condiciones de desarrollo del hongo en las cuales se obtenga la mayor cantidad de estas enzimas.

A la fecha se han realizado pocos estudios para evaluar el efecto del pH sobre el desarrollo de organismos y producción de metabolitos, así mismo no se han reportado trabajos realizados con *Pleurotus ostreatus* para evaluar el efecto del pH sobre el crecimiento del organismo, la producción de lacasas y en particular, la generación de isoformas de la esta enzima mismas que se generan influenciados por el medio de desarrollo. Dado lo anterior, el objetivo general este trabajo fue, evaluar el efecto del pH sobre el desarrollo y producción de lacasas en fermentación sumergida del hongo basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* tratando de contribuir en la búsqueda de las mejores condiciones de producción de lacasas con actividad catalítica que puedan degradar compuestos recalcitrantes o tener usos en la industria farmacéutica, alimentaria, química, entre otras.

5. HIPÓTESIS

La actividad y producción de isoformas de enzimas lacasa producidas por *Pleurotus ostreatus* así como el crecimiento del hongo, depende del pH inicial del medio de desarrollo del hongo en fermentación sumergida.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del pH inicial del medio de desarrollo de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida sobre su producción de lacasas y desarrollo del hongo.

6.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar la fermentación sumergida para producción de enzimas lacasa de *Pleurotus ostreatus* en diferentes condiciones de pH inicial del medio de desarrollo del hongo.
2. Determinar a través de zimografía el número de isoformas de lacasas producidas en cada una de las condiciones evaluadas de pH inicial del medio de cultivo de desarrollo del hongo.

7. METODOLOGÍA

En la Figura 7 se muestra el diagrama de flujo de la metodología seguida para evaluar el efecto del pH inicial del medio de cultivo de desarrollo de *Pleurotus ostreatus* sobre la producción de enzimas lacasa, parámetros cinéticos de crecimiento y producción de isoformas determinadas por zimografía en fermentación sumergida con temperatura constante.

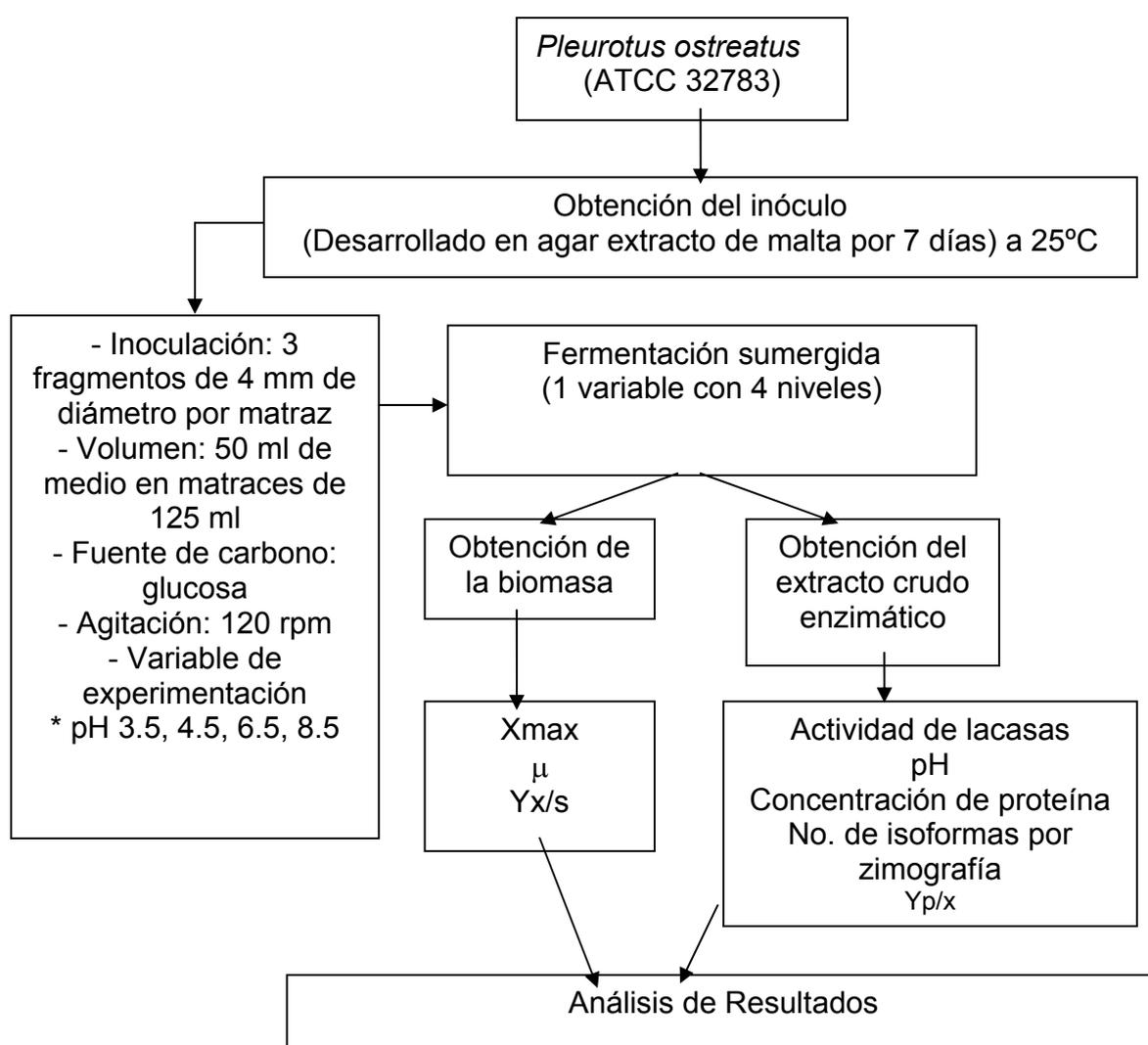


Figura 7. Diagrama de flujo que describe la metodología para el desarrollo de esta investigación.

7.1 Cepa e inóculo

Se utilizó la cepa de *Pleurotus ostreatus* 32783, de la American Type Culture Collection (Maryland, USA). La cepa stock se desarrolló en agar extracto de malta a 25°C por 7 días y se mantuvo a una temperatura de 4°C, resemebrándose cada mes. El inóculo para las fermentaciones fue, para cada matraz, 3 fragmentos de micelio de 4 mm de diámetro cortados de la periferia de la colonia, la cual fue desarrollada en las mismas condiciones que la cepa stock.

7.2 Condiciones de cultivo de *Pleurotus ostreatus*

La fermentación sumergida (FS) se hizo por triplicado en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 50 ml de medio, a pH inicial del cultivo de 3.5, 4.5, 6.5 y 8.5, se ajustaron con HCl 1 N. La composición del medio de cultivo fue en todos los casos la que se muestra en la Tabla 2 (excepto en una primer fermentación en la que se utilizó el medio sin extracto de levadura). Los matraces se incubaron con agitación orbital a 120 rpm a 25°C. Se tomaron muestras cada 24 h hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento del hongo.

Tabla 2. Composición del medio de cultivo

Componente	Cantidades (g/l)
Glucosa	10.5
Extracto de levadura	5.0
Sulfato de amonio	2.0
Fosfato de potasio	0.5
Sulfato de magnesio	0.5
Fosfato de calcio	0.3
Sulfato ferroso	0.02
Sulfato de zinc	0.02
Sulfato de manganeso	0.02
Sulfato cúprico	0.25

7.3 Obtención del extracto enzimático

El extracto enzimático (EE) se consideró 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.

7.4 Biomasa y parámetros cinéticos de crecimiento del hongo

La biomasa (X) producida se separó por filtración y se secó en horno a 60°C durante 24 h; y se reportó el peso seco (Díaz-Godínez y col. 2001; Tlecuítl-Beristain y col. 2003).

Para determinar los parámetros de crecimiento se consideró que la evolución de la biomasa $X = X(t)$ 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 col. 2001; Viniegra-González y col. 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 μ 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 $X=X_o$.

El rendimiento teórico de la enzima con respecto a la biomasa ($Y_{E/X}$) se estimó como la relación entre la E_{\max} (U/L) y X_{\max} (g/L). Se calculó la productividad en el pico máximo de actividad ($P_{RO} = E_{\max}/$ tiempo de fermentación), además de la tasa específica de formación de la enzima ($q_p = \mu Y_{E/X}$).

7.5 Determinación de la concentración de proteína soluble

La proteína total excretada se determinó en el EE libres de células por el método de Bradford (1976). A 100 μl de EE se le adicionó 200 μl del reactivo de Bradford, el volumen se ajustó a 1 ml con agua destilada y la absorbancia se leyó a 595 nm. Se usó albúmina sérica bovina como proteína estándar.

7.6 Determinación de la actividad enzimática

La actividad enzimática de lacasa (E) se determinó en el EE obtenido en diferentes tiempos de la fermentación utilizando DMP como sustrato. La mezcla de reacción se preparó con 900 μl de DMP 2mM en buffer's a diferentes pH (citratos pH 3.5, acetatos pH 4.5, fosfatos pH 6.5, y tris pH 8.5 todos a 0.1 M) y 100 μl de EE. La absorbancia se leyó en un equipo Jenway 6405 UV/Vis spectrophotometer a una longitud de onda de 468 nm después de 1 min de incubación a 40 °C en la celda Peltier. Una unidad de actividad de lacasa (U) se consideró como la cantidad de enzima que provoque un incremento de una unidad de absorbancia por minuto.

7.7 Determinación del pH de los extractos crudos enzimáticos

Se determinó el pH de cada uno de los extractos crudos enzimáticos por potenciometría.

7.8 Identificación de isoformas con actividad de lacasa

En cada muestreo de la fermentación se determinó el número de isoformas presentes en el EE a través de zimografía. Ésta se realizó usando la técnica modificada de Leammli (1970) usando dodecil sulfato de sodio en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). El gel de separación y de empaquetamiento contenía 12 y 4% de acrilamida, respectivamente. La concentración de SDS fue de 0.1% en el gel. El buffer de la muestra contuvo: 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 35% de glicerol, 0.01% de azul de bromofenol y 10% de SDS. Las muestras del EE se separaron en geles de 0.75 mm de espesor en un sistema de electroforesis Mini Protean III (Bio-Rad) a 150 voltios durante un tiempo

de 1 a 1.25 h. Después de la corrida, los geles se lavaron con agua destilada y desionizada con ayuda de un agitador orbital (20-30 rpm) durante 1 h, con un cambio de agua cada 15 min para eliminar el SDS. Posteriormente, los geles se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente en DMP 2mM. Se realizó un gel para cada combinación de pH de desarrollo y de actividad de lacasas.

7.9 Cuantificación de azúcares residuales

La determinación de los azúcares residuales se realizó por medio de la técnica de DNS (Miller 1959). La mezcla de reacción contenía 950 μ l de agua destilada, 50 μ l de EE y 2 ml del reactivo de DNS, se pusieron en baño María a temperatura de ebullición durante 5 minutos deteniendo la reacción sumergiendo los tubos en agua fría. Se leyó la absorbancia a 575 nm. Se preparó una curva con concentraciones conocidas de glucosa.

8. RESULTADOS

8.1 Fermentación a pH de desarrollo de 3.5 sin extracto de levadura

8.1.1 Biomasa

La producción de X durante la fermentación se muestra en la Figura 8, en esta fermentación se empleó el medio de cultivo con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, para observar si se producían cambios de pH a lo largo de la fermentación, para después probar extracto de levadura y usar en los demás estudios el medio que presentara el menor cambio de pH del medio a lo largo del cultivo. Se observó que la fase de adaptación duró aproximadamente 120 h, después de este tiempo inició la fase exponencial de crecimiento que terminó aproximadamente a las 288 h, iniciando la fase estacionaria del crecimiento del hongo. La X_{\max} fue de 5.2 g/L y se observó a las 300 h. La μ fue de 0.037 h^{-1} .

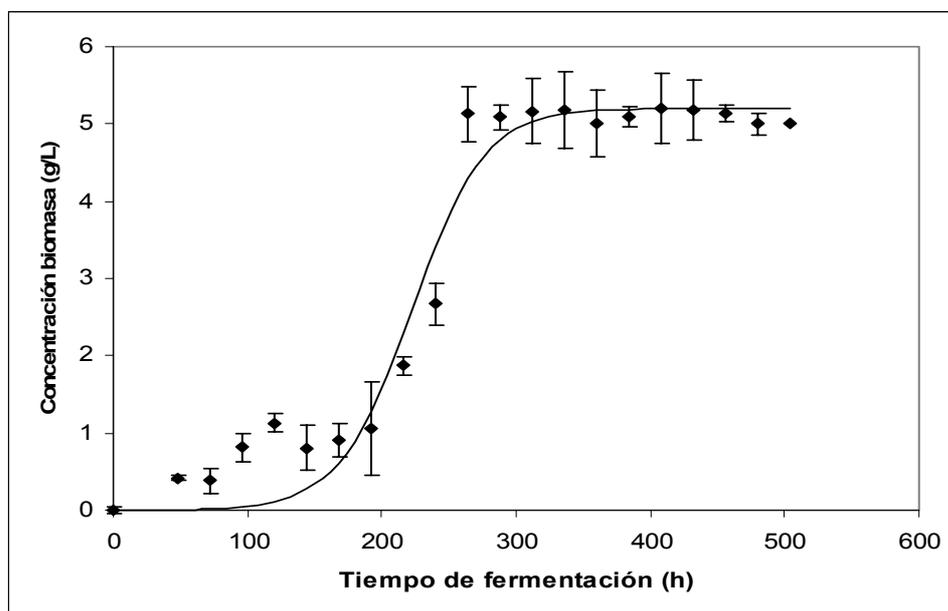


Figura 8. Cinética de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en fermentación con pH inicial de desarrollo de 3.5 sin extracto de levadura.

8.1.2 Concentración de proteína soluble

La concentración de proteína soluble se muestra en la Figura 9. Se observó un incremento en el contenido de proteína soluble empezando cuando el hongo se encontraba en la fase exponencial de crecimiento y siendo el valor mas alto en la fase estacionaria de crecimiento (0.17 g/L). Se sugiere que en los primeros tiempos de la fermentación el hongo produce proteínas solubles de las cuales una parte de estas son lacasas, con el fin de adaptarse a las nuevas condiciones de crecimiento y con la finalidad de obtener fuentes de carbono.

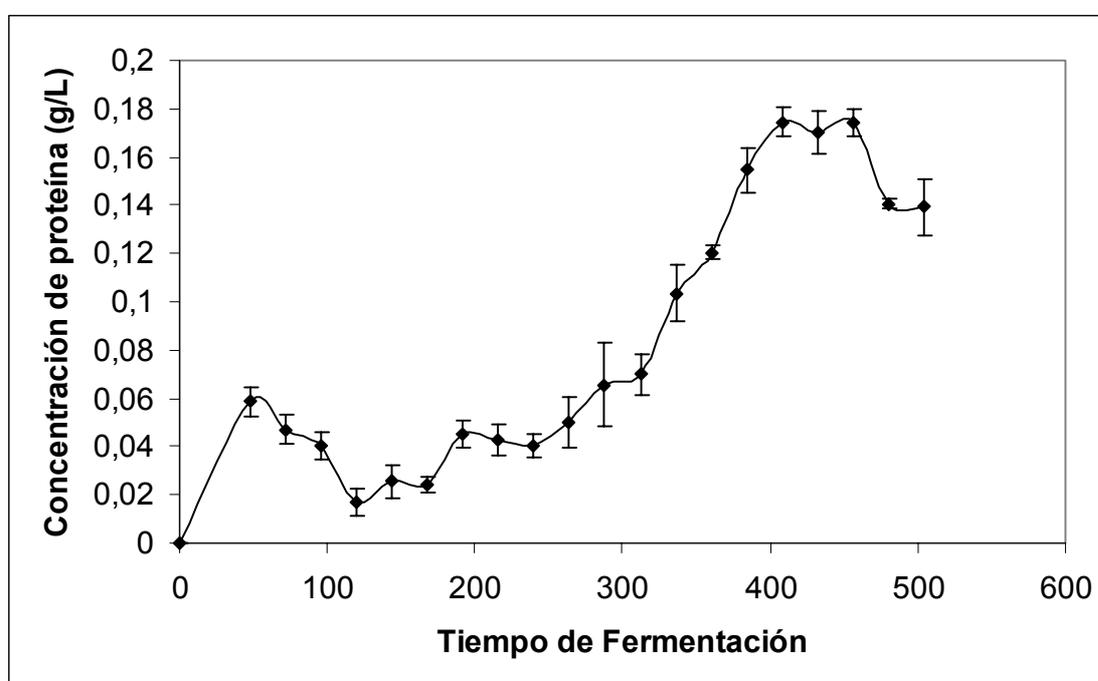


Figura 9. Proteína soluble en el EE de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 3.5 sin extracto de levadura.

8.1.3 Actividad de lacasa

La actividad de lacasa se muestra en la Figura 10, se evaluó a pH 6.5. Se observan dos picos de actividad, ambos con valor aproximado de 470 U/L, uno al inicio de la fase exponencial y otro en la fase estacionaria.

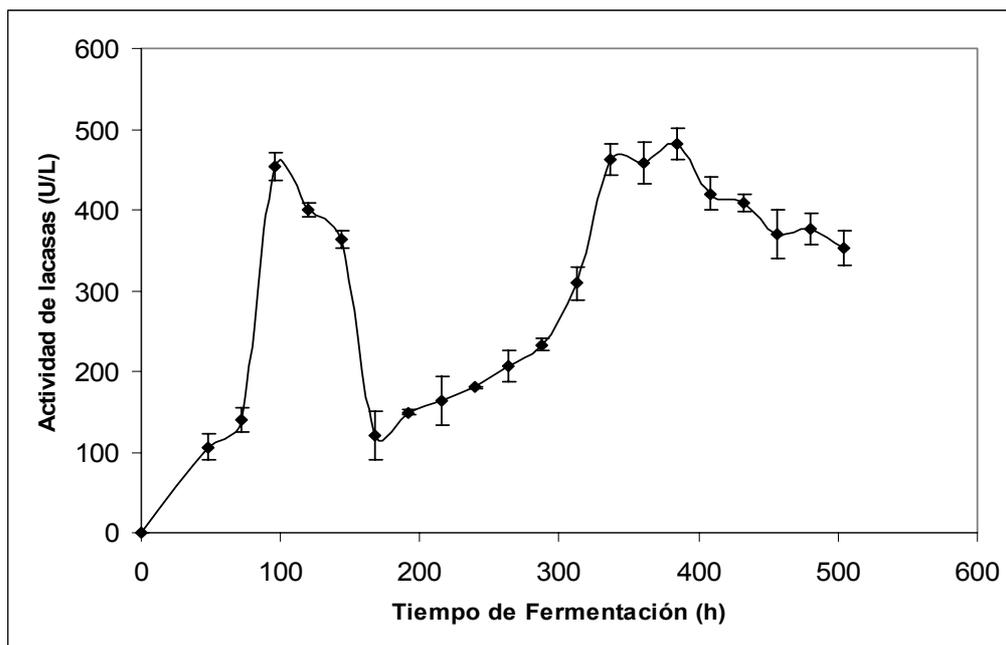


Figura 10. Actividad de lacasa de *Pleurotus ostreatus* obtenidas por fermentación a pH inicial de desarrollo de 3.5 sin extracto de levadura evaluada a pH 6.5.

8.1.4 Perfil de pH

Los valores de pH se muestran en la Figura 12, se observó que el perfil se mantuvo más o menos constante hasta las 240 h de fermentación, posteriormente se incremento a valores aproximados de 7.0-8.0, lo cual sugiere que el medio de cultivo fue incapaz de mantener constante el pH durante toda la fermentación.

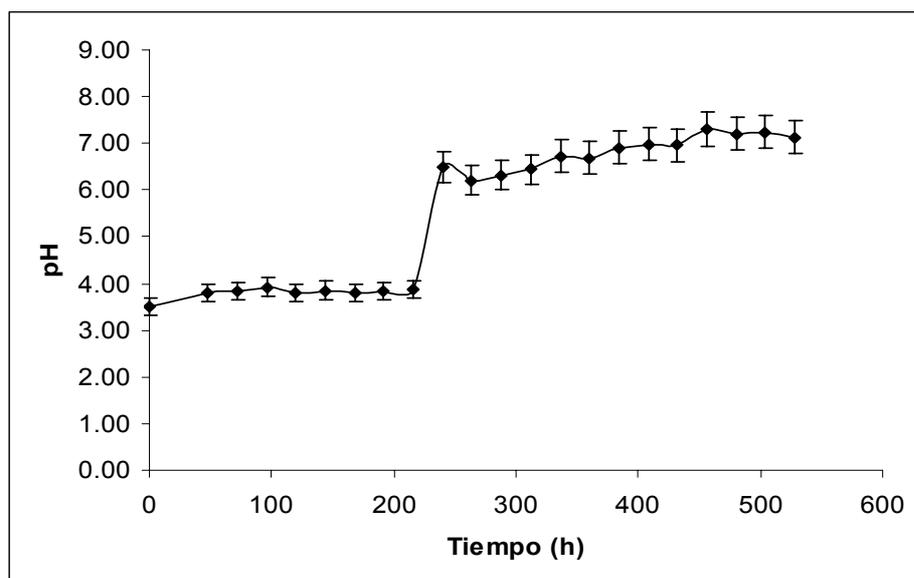


Figura 12. Perfil de pH durante la fermentación de *Pleurotus ostreatus* con pH inicial de desarrollo de 3.5 sin extracto de levadura.

8.1.5 Determinación del número de isoformas de lacasas

En las Figura 13 se muestran las bandas con actividad de lacasa encontradas a diferentes tiempos de la fermentación. Se observó que durante toda la fermentación, se presentó una isoforma y aproximadamente a las 120 h se observó otra isoforma de menor peso molecular. Las bandas con mayor intensidad se observaron en los tiempos en que la actividad fue mayor.

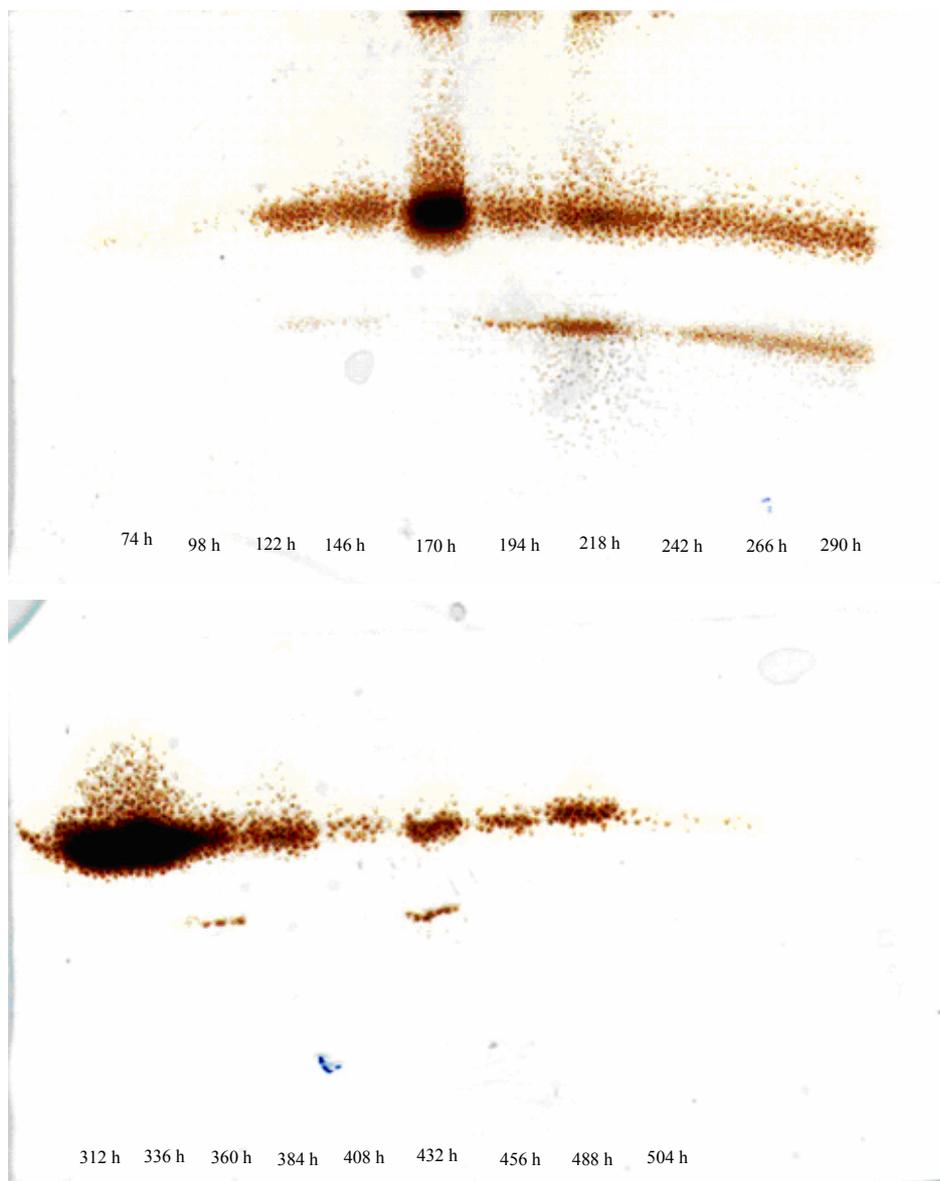


Figura 13. Zimografía de lacasas de la fermentación a pH inicial de 3.5 de desarrollo sin extracto de levadura de *Pleurotus ostreatus* revelado en buffer de fosfatos a pH 6.5.

8.1.6 Cuantificación de azúcares residuales

En la Figura 14 se observa que la concentración de glucosa disminuyó a casi cero aproximadamente a las 310 h, este tiempo coincide con la transición de fase exponencial a fase estacionaria del crecimiento del hongo.

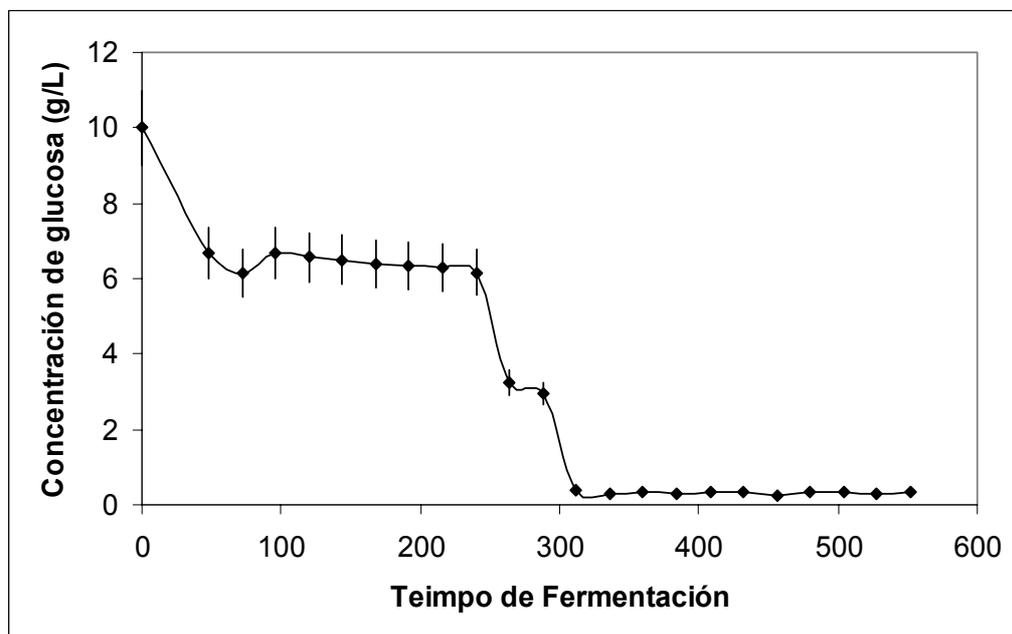


Figura 14. Consumo de glucosa de *Pleurotus ostreatus* en fermentación a pH 3.5 inicial de desarrollo sin extracto de levadura.

8.2 Fermentación a pH de desarrollo de 3.5 con extracto de levadura

8.2.1 Biomasa

La producción de X durante la fermentación se muestra en la Figura 15, se empleó el medio de cultivo con extracto de levadura que proporciona fuente de nitrógeno y estabiliza el pH por la presencia de aminoácidos que aportan un efecto anfotérico, recibiendo o donando electrones. Se observó que la fase de adaptación del crecimiento del hongo duró aproximadamente 216 h, después de este tiempo inició la fase exponencial de crecimiento, que terminó aproximadamente a las 528 h. Después de este tiempo inició la fase estacionaria del crecimiento del hongo, sin embargo, dadas las condiciones extremas de pH, no se observó claramente la continuidad de la fase estacionaria y los parámetros cinéticos fueron, para la X_{\max} fue de 4.7 g/L a las 528 h y la μ fue de 0.012 h^{-1} .

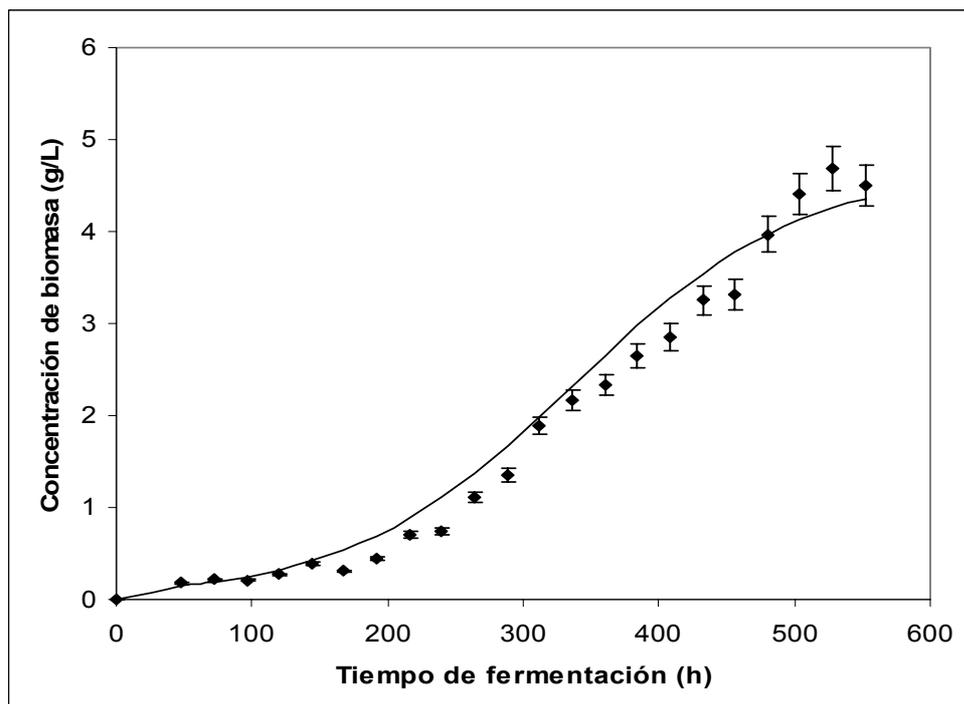


Figura 15. Cinética de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en fermentación a pH 3.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura.

8.2.2 Concentración de proteína soluble

La concentración de proteína soluble producida durante la fermentación, se muestra en la Figura 16. Se observó una concentración constante de proteína en los primeros tiempos de fermentación, teniendo dos picos máximos de proteína soluble, uno a las 336 h y otro a las 430 h aproximadamente alcanzando un máximo de 0.17 g/L, esto sugiere que a esos tiempos de fermentación se excreta mayor cantidad de proteína al caldo de cultivo.

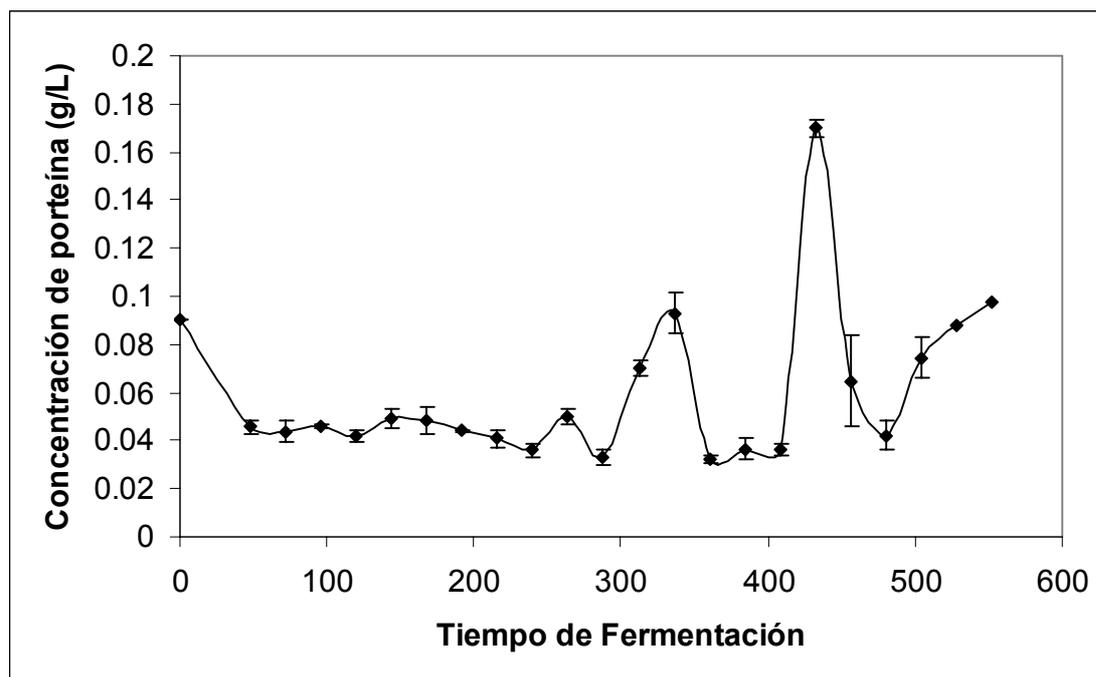


Figura 16. Proteína soluble en el caldo de fermentación a pH 3.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura.

8.2.3 Actividad de lacasa

En la Figura 17 se muestra la actividad de lacasas evaluada a diferentes valores de pH, (3.5, 4.5, 6.5 y 8.5); Se observó que a pH de 8.5 se detectó actividad prácticamente en todos los tiempos de fermentación evaluados; en los primeros tiempos la actividad fue de aproximadamente de 2000 U/L alcanzando al final aproximadamente 4030 U/L. En los demás pH evaluados se observó un comportamiento similar con valores muy bajos al inicio de la fermentación (100-300 U/L), alcanzando valores cercanos a las 3000 U/L a las 500 h de fermentación aproximadamente.; esto sugiere que las isoenzimas producidas bajo estas condiciones tienen pH óptimo de actividad alcalino y no ácido que fueron las condiciones del medio de cultivo.

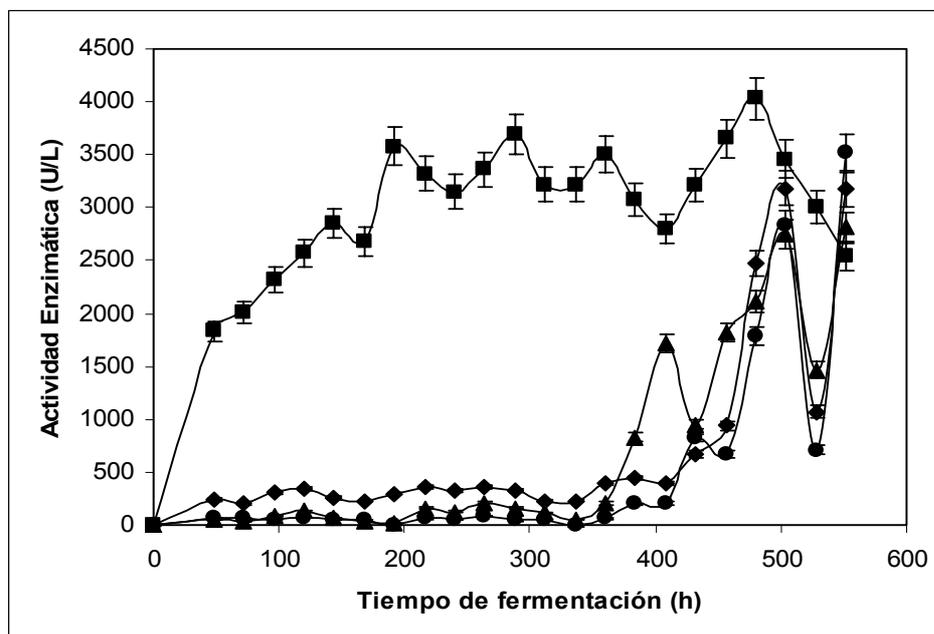


Figura 17. Actividad de lacasas de *Pleurotus ostreatus* obtenidas por fermentación a pH de 3.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura, evaluada a pH de 3.5 (●), 4.5 (▲), 6.5 (◆) y 8.5 (■).

8.2.4 Perfil de pH

Los valores de pH durante la fermentación de *Pleurotus ostreatus* con pH inicial de desarrollo de 3.5 con extracto de levadura se muestran en la Figura 18, donde se observó que durante toda la fermentación el pH se mantuvo cercano a pH 3.5, mostrando el efecto de amortiguador de pH por el extracto de levadura, ya que por sus propiedades anfotéricas.

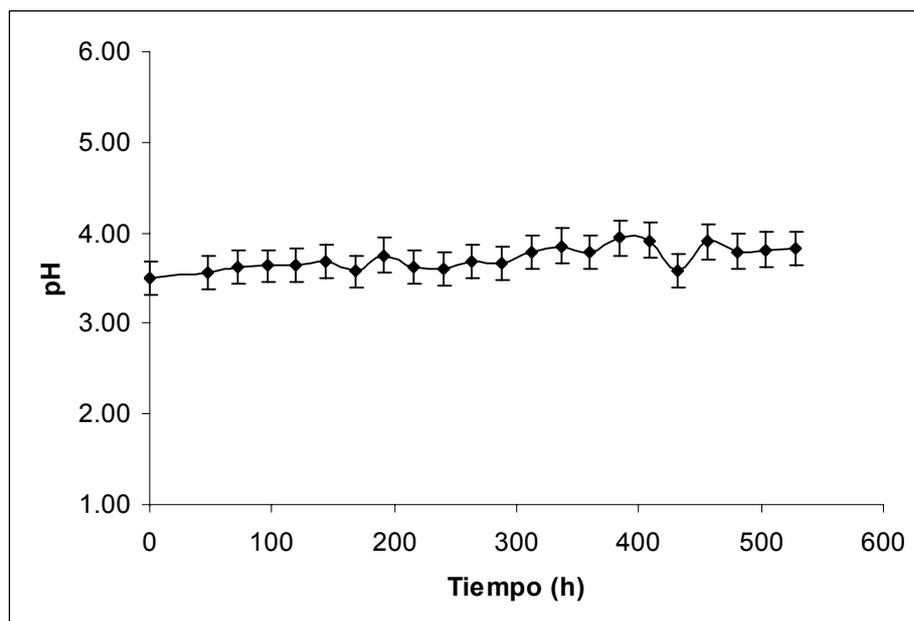


Figura 18. Perfil de pH durante la fermentación de *Pleurotus ostreatus* con pH 3.5 inicial de desarrollo utilizando extracto de levadura.

8.2.5 Determinación del número de isoformas de lacasas

En la Figura 19 se muestran las bandas con actividad de lacasa. En un principio se muestra un gel revelado a pH de 3.5, coincidiendo con los valores de actividad de lacasas, las bandas se observaron en los tiempos correspondientes a la fase de crecimiento exponencial y fase estacionaria del crecimiento del hongo. Se observó que estas bandas corresponden a un peso molecular de aproximadamente 100 kDa, siendo apreciables en el gel a partir de las 300 h de fermentación aproximadamente.

Posteriormente se reveló el gel a pH 4.5 como se observa en la Figura 20. La presencia de actividad de lacasa relacionada con la oxidación del sustrato, mostrando bandas de diferente peso molecular con respecto a lo que se observó en la misma fermentación pero revelado en buffer de citratos a pH 3.5, teniendo que la isoforma que se observó tiene un peso molecular de aproximadamente 50 kDa.

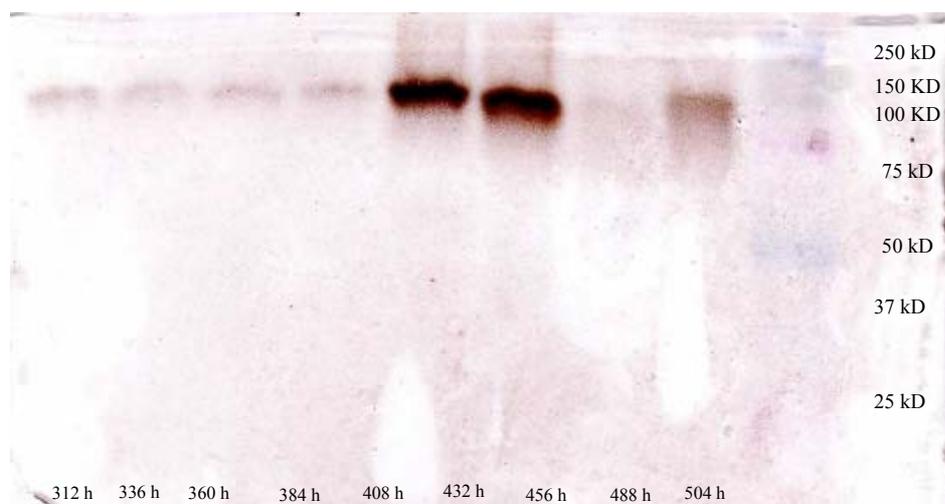


Figura 19. Zimografía de lacasa durante la fermentación a pH inicial de 3.5 de desarrollo con extracto de levadura de *Pleurotus ostreatus*. Revelado a pH 3.5.

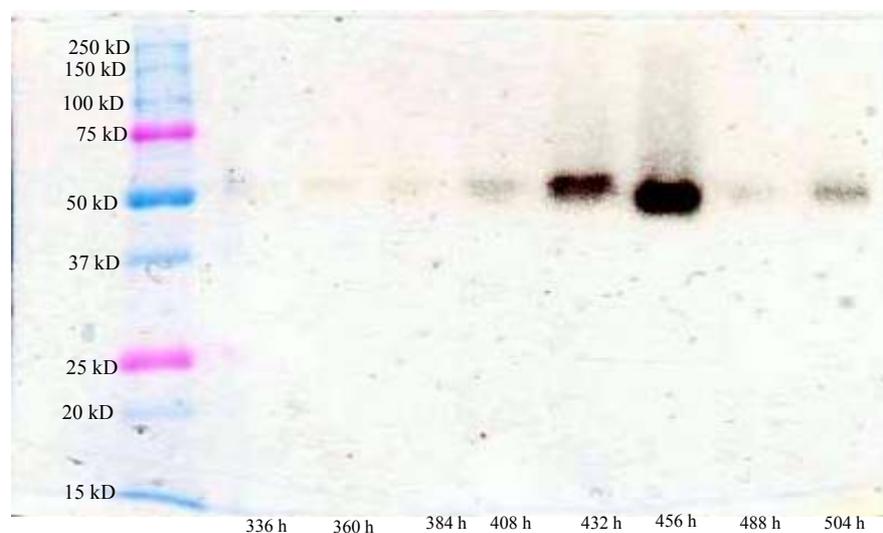


Figura 20. Zimografía de lacasa durante la fermentación a pH inicial de 3.5 de desarrollo con extracto de levadura de *Pleurotus ostreatus*. Revelado a pH 4.5.

En la Figura 21 se muestran las bandas que se revelaron a pH de 6.5, en donde se observa la presencia de la banda de PM aproximado de 50 kDa, sin embargo, se

observa la presencia muy tenue de otra isoforma de mayor PM que aparece a partir de las 300 h de fermentación con PM aproximado de 80 kDa.

Comparando con la fermentación de pH 3.5 inicial del medio de cultivo de desarrollo sin extracto de levadura se mostró diferencia en la cantidad de bandas con actividad catalítica, ya que en la fermentación donde no se utilizó extracto de levadura presenta cuando menos dos bandas con actividad enzimática durante toda la fermentación y para este caso únicamente se revelaron bandas con actividad enzimática en parte de la fase de crecimiento exponencial y fase estacionaria del hongo.

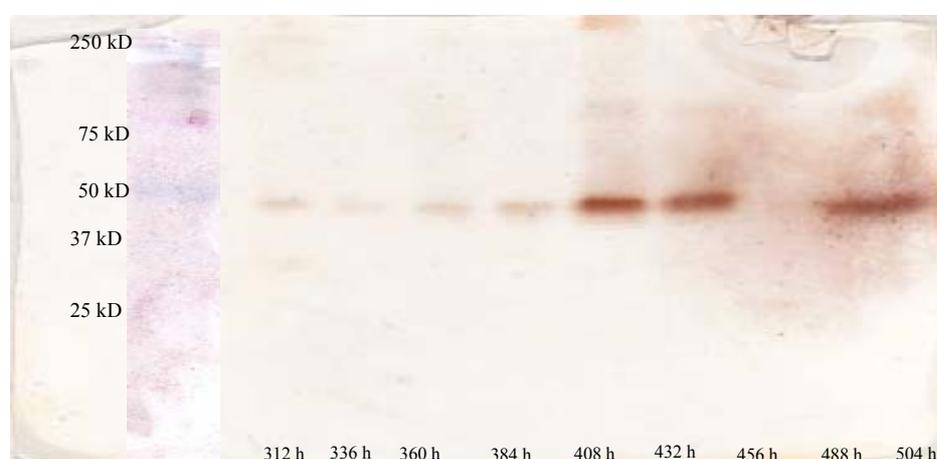


Figura 21. Zimografía de lacasas durante la fermentación a pH inicial de 3.5 de desarrollo con extracto de levadura de *Pleurotus ostreatus*. Revelado a pH 6.5.

En la Figura 22 se observan cuando menos dos bandas con actividad de lacasa. En este caso la fermentación con pH de 3.5 inicial del medio de cultivo de desarrollo se reveló a pH 8.5; para este gel se puede observar que las bandas son más intensas en comparación de las observadas a otro pH de actividad, aun cuando la cantidad de EE fue el mismo en todos los casos y que corresponden con la mayor actividad enzimática que se observó al medir por espectrofotometría. Los PM que presentaron estas bandas son aproximadamente 50 kDa y 37 kDa; se observaron en los tiempos finales de la fermentación, a partir de la fase de crecimiento exponencial y estacionaria del hongo.

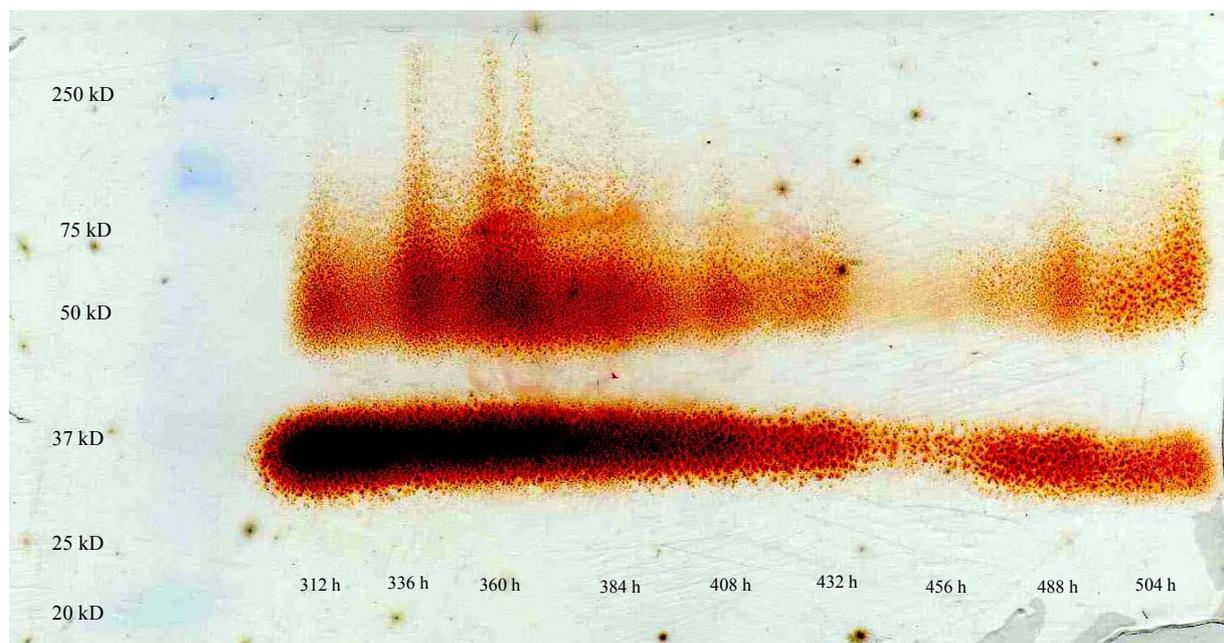


Figura 22. Zimografía de lacasas durante la fermentación a pH inicial de 3.5 con extracto de levadura de *Pleurotus ostreatus*. Revelado a pH 8.5.

8.2.6 Cuantificación de azúcares residuales

En la Figura 23 se observa que la concentración de glucosa disminuye a cero aproximadamente a las 510 h que es prácticamente al término de la fermentación, caso que no se observó en la fermentación de 3.5 sin extracto de levadura; Este comportamiento se correlaciona con el crecimiento del hongo, mostrando retardo en el consumo de azúcares y en el desarrollo del hongo por las condiciones extremas de pH del medio de cultivo.

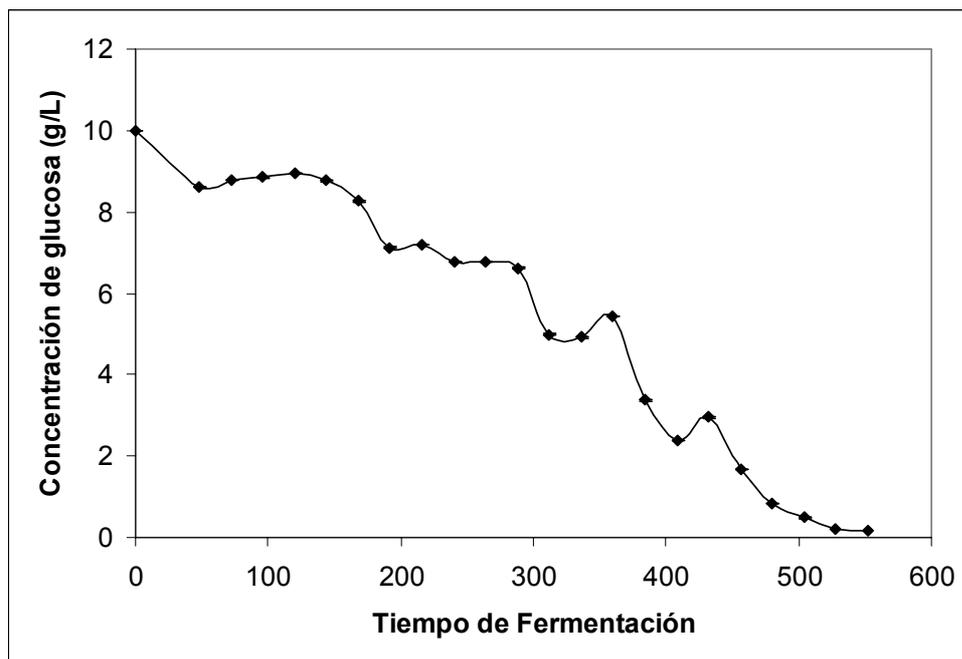


Figura 23. Consumo de glucosa de *Pleurotus ostreatus* en fermentación a pH de 3.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura.

8.3 Fermentación a pH de desarrollo de 4.5

8.3.1. Biomasa

La producción de X durante la fermentación se muestra en la Figura 24. Se observó que la fase de adaptación en estas condiciones de crecimiento son cortas de aproximadamente 100 h, después de este tiempo inició la fase exponencial que terminó aproximadamente a las 336 h. Después de este tiempo inició la fase estacionaria. La biomasa máxima fue de 5.533 g/L y se observó a las 408 h. La μ fue de 0.034 h^{-1} .

Se puede observar que el efecto del pH inicial del medio de cultivo de desarrollo del organismo influye en la velocidad de crecimiento, ya que en la fermentación a pH inicial de 3.5 con sulfato de amonio mostró un comportamiento similar con esta fermentación, teniendo en la fase de crecimiento exponencial y estacionaria un incremento de pH cercanos a 7.0. Por otro lado, en la fermentación a pH inicial de 3.5 con extracto de

lavadura, el pH se mantuvo más o menos constante durante toda la fermentación con valores menores de μ y X_{\max} ; lo que sugiere que el pH de 4.5 favorece al desarrollo del hongo.

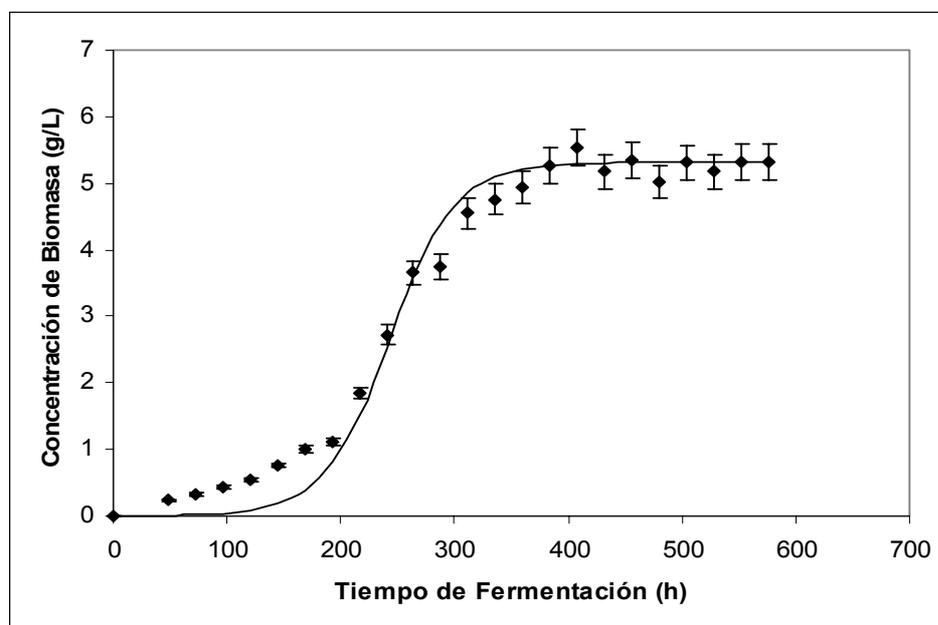


Figura 24. Cinética de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en fermentación a pH 4.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura.

8.3.2 Concentración de proteína soluble

La concentración de proteína soluble se muestra en la Figura 25. Se observó que la proteína soluble a través de la fermentación se mantuvo constante y se muestra un pico máximo de producción de proteína soluble en la fase estacionaria alcanzando un máximo de 0.17 g/L a las 432 h, posterior a estos tiempos de fermentación, la cantidad de proteína disminuyó.

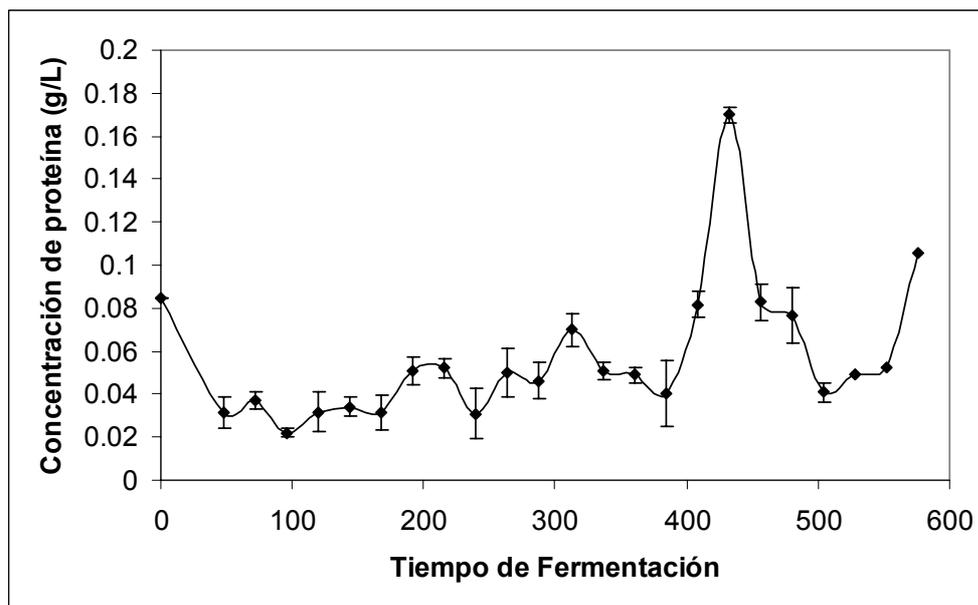


Figura 25. Proteína soluble en el caldo de fermentación a pH 4.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura.

8.3.3 Actividad de lacasa

La actividad de lacasa se muestra en la Figura 26. Se observó un perfil similar de la actividad de lacasas evaluada a pH de 3.5, 4.5 y 6.5. En las primeras horas de fermentación se observó una baja actividad enzimática, sin embargo, al entrar a la fase de crecimiento exponencial y estacionaria, aproximadamente a las 400 h, se observa un incremento en la actividad enzimática, teniendo 2 picos con valores aproximadamente de 33500 U/L. A pH de 8.5 se alcanzaron valores muy bajos, siendo el valor más alto al final de la fermentación con 8000 U/L aproximadamente. Estos valores sugieren que las enzimas producidas a pH de 4.5 pueden mostrar actividad a pH ácidos y cercanos a la neutralidad sin perder considerablemente su capacidad catalítica.

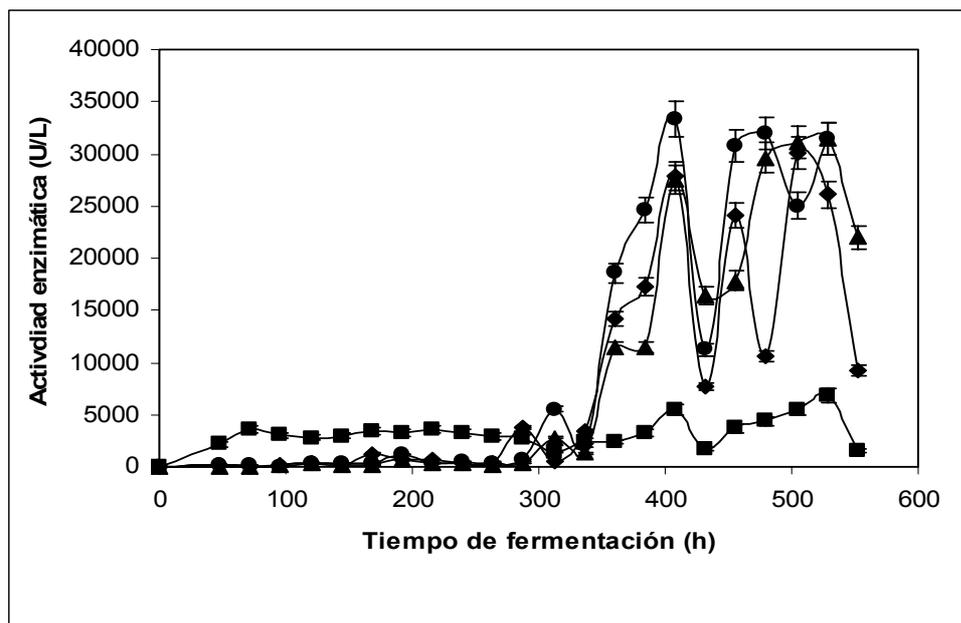


Figura 26. Actividad de lacasas de *Pleurotus ostreatus* obtenidas por fermentación a pH de 4.5 inicial de desarrollo, evaluada a pH de 3.5 (●), 4.5 (▲), 6.5 (◆) y 8.5 (■).

8.3.4 Perfil de pH

Los valores de pH de la fermentación sumergida a pH inicial del medio de cultivo de 4.5 se muestran en la Figura 27, donde se observó el efecto amortiguador del extracto de levadura contenido en el medio de cultivo por su propiedad anfotérica que proporcionan los aminoácidos. Se observó que el pH se mantuvo y no se observaron cambios drásticos durante toda la fermentación.

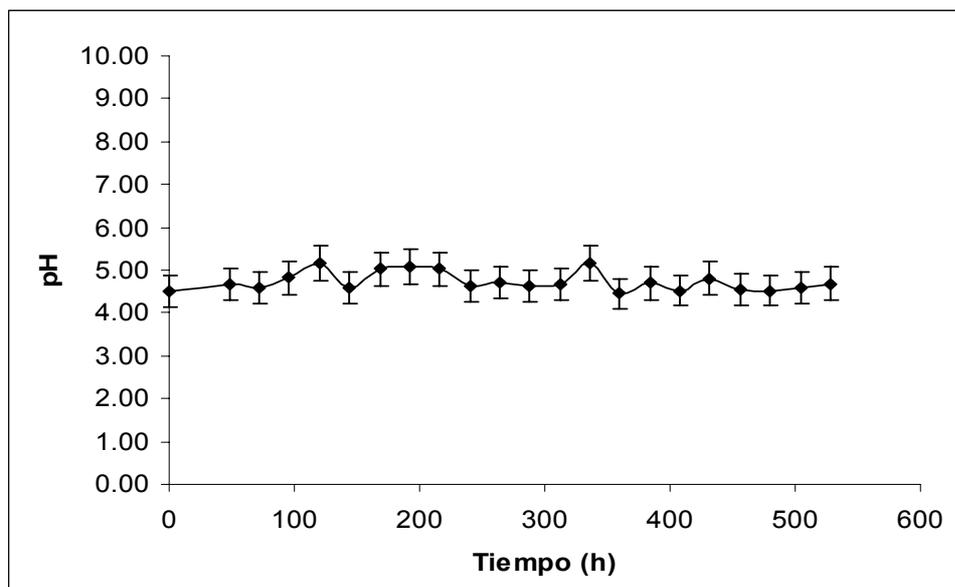


Figura 27. Perfil de pH durante la fermentación de *Pleurotus ostreatus* a pH 4.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura.

8.3.5 Determinación de número de isoformas de lacasa

El número de isoformas en la fermentación sumergida de pH 4.5 inicial del medio de cultivo de desarrollo con extracto de levadura se determinó a diferentes pH (3.5, 4.5, 6.5 y 8.5), se observaron múltiples isoformas. En la Figura 28 se muestran las bandas que se revelaron a pH 3.5, se observaron al menos dos bandas; una de 50 kDa y otra de 30 kDa aproximadamente, siendo esta última la de mayor intensidad. Las bandas se mostraron principalmente en los tiempos que corresponden a la fase estacionaria de crecimiento del hongo; en los primeros tiempos de la fermentación no se lograron observar bandas con actividad enzimática.

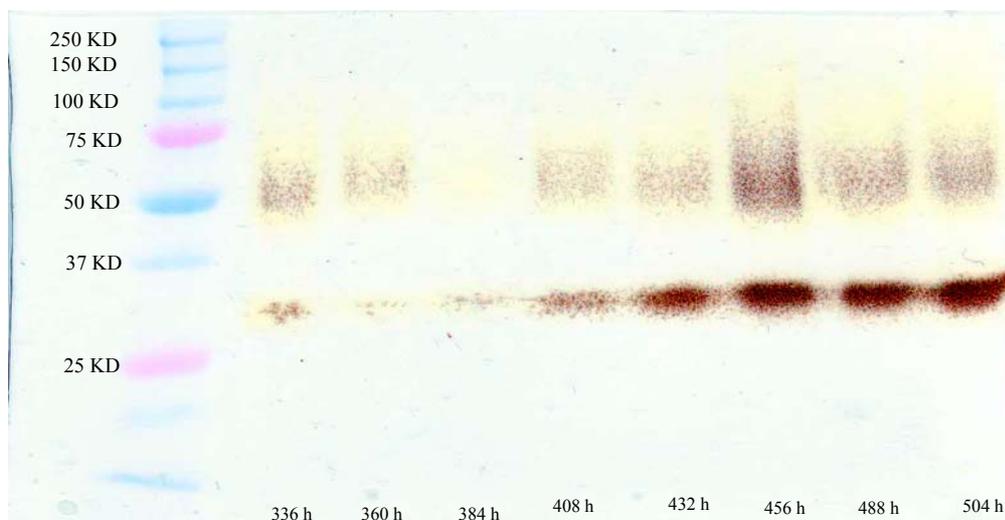


Figura 28. Zimografía de lacasas durante la fermentación de *Pleurotus ostreatus* a pH inicial de 4.5 de desarrollo, revelado a pH 3.5.

En la Figura 29 se observó la presencia de bandas con actividad enzimática de lacasa revelado en buffer a pH de 4.5, se observó un patrón similar al obtenido por revelado a pH 3.5, es decir, dos isoformas de 50 kDa y 30 kDa aproximadamente, en la fase estacionaria del crecimiento del hongo.

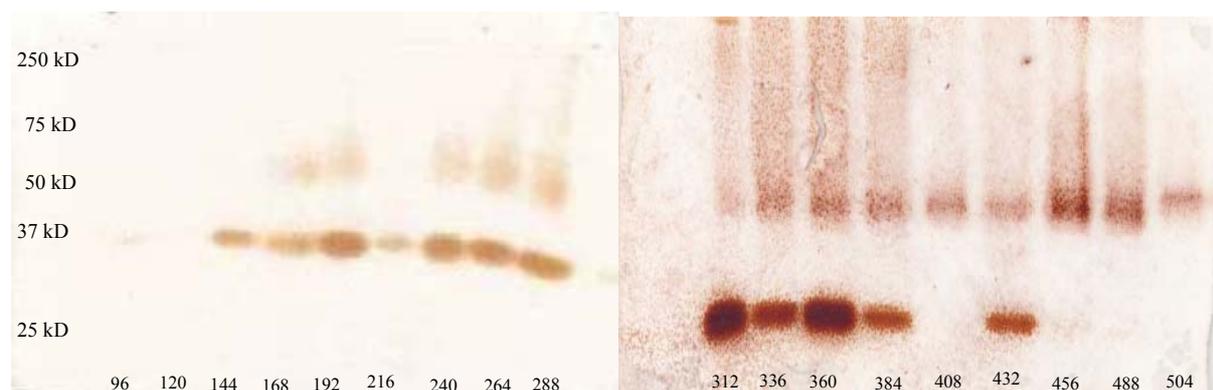


Figura 29. Zimografía de lacasas durante la fermentación a pH de 4.5 inicial de desarrollo de *Pleurotus ostreatus*. Revelado a pH 4.5.

En la Figura 30 se muestran las bandas con actividad de lacasas reveladas a pH 6.5, se observó un perfil similar de isoformas al que se presentó en los geles revelados a pH de 3.5 y 4.5 (dos isoformas de 50 kDa y 30 kDa aproximadamente).

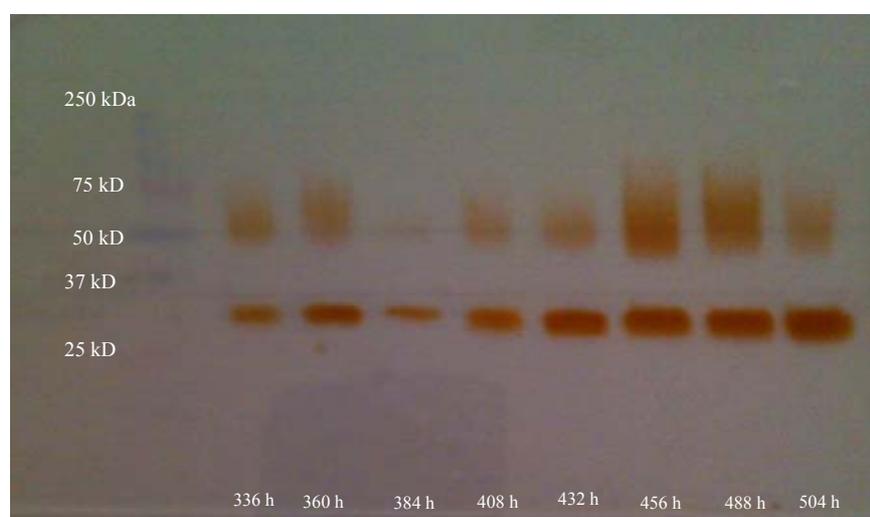
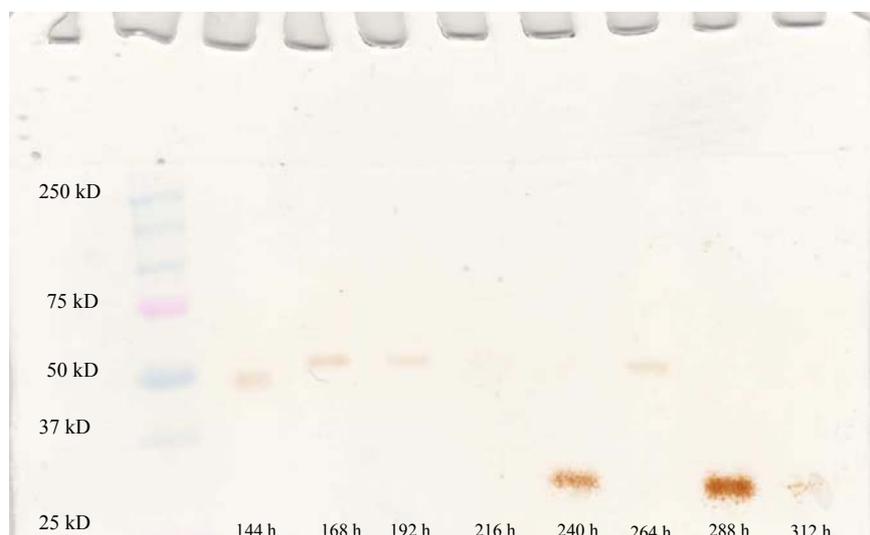


Figura 30. Zimografía de lacasas durante la fermentación a pH 4.5 inicial de desarrollo de *Pleurotus ostreatus*, revelado a pH 6.5.

En la Figura 31 se muestran el zimograma con los EE de la fermentación desarrollada a pH inicial de 4.5 revelado a pH de 8.5. Se observó una sola isoforma en la fase estacionaria con PM aproximado de 30 kDa.

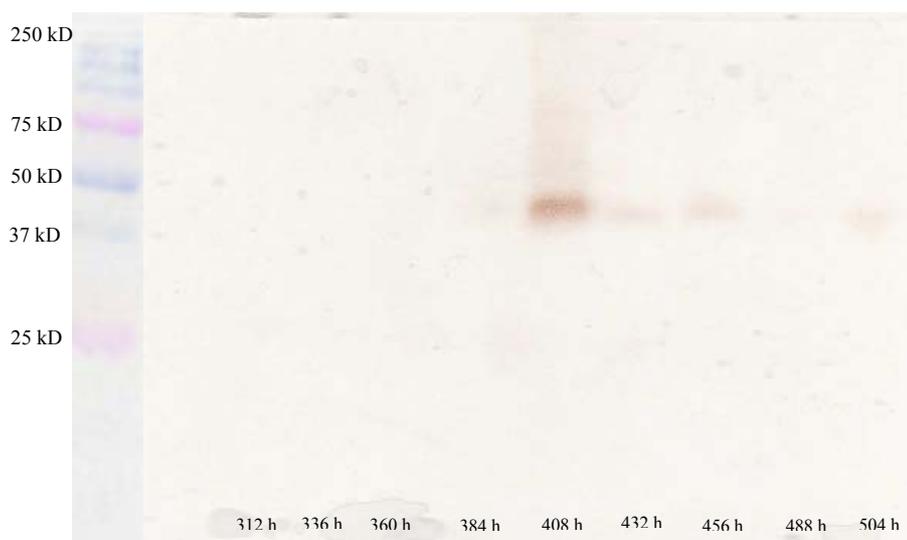


Figura 31. Zimografía de lacasas durante la fermentación a pH 4.5 inicial de desarrollo de *Pleurotus ostreatus*, revelado a pH 8.5.

8.3.6 Cuantificación de azúcares residuales

En la Figura 32 se observa que la concentración de glucosa agotó aproximadamente a las 290 h que coincide con la transición de fase exponencial a fase estacionaria.

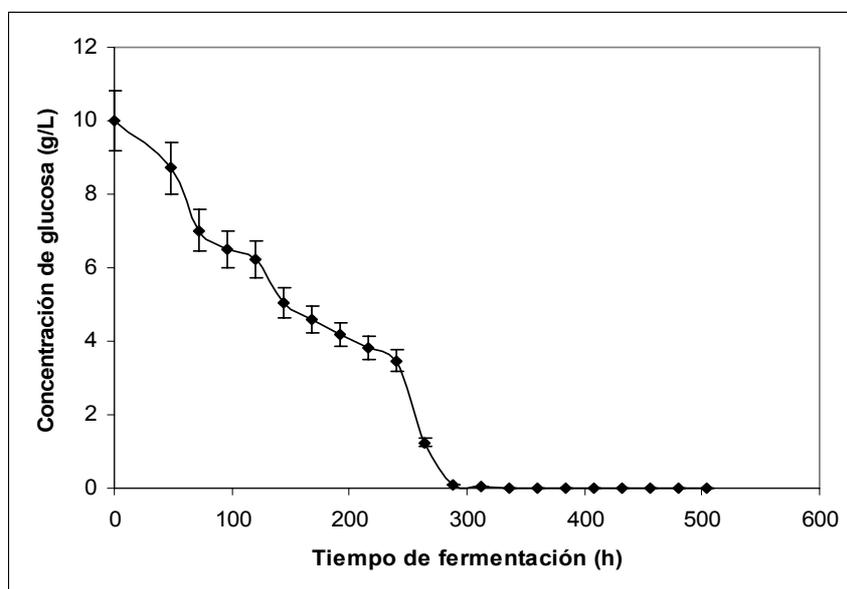


Figura 32. Consumo de glucosa de *Pleurotus ostreatus* en fermentación a pH inicial de 4.5 de desarrollo con extracto de levadura.

8.4 Fermentación a pH de desarrollo de 6.5

8.4.1 Biomasa

La producción de X durante la fermentación se muestra en la Figura 33. Se observó que la fase de adaptación duró aproximadamente 200 h, después de este tiempo inició la fase exponencial que terminó aproximadamente a las 430 h. Después de este tiempo inició la fase estacionaria. La X_{\max} fue de 6.74 g/L y se observó a las 528 h. La μ fue de 0.015 h^{-1} .

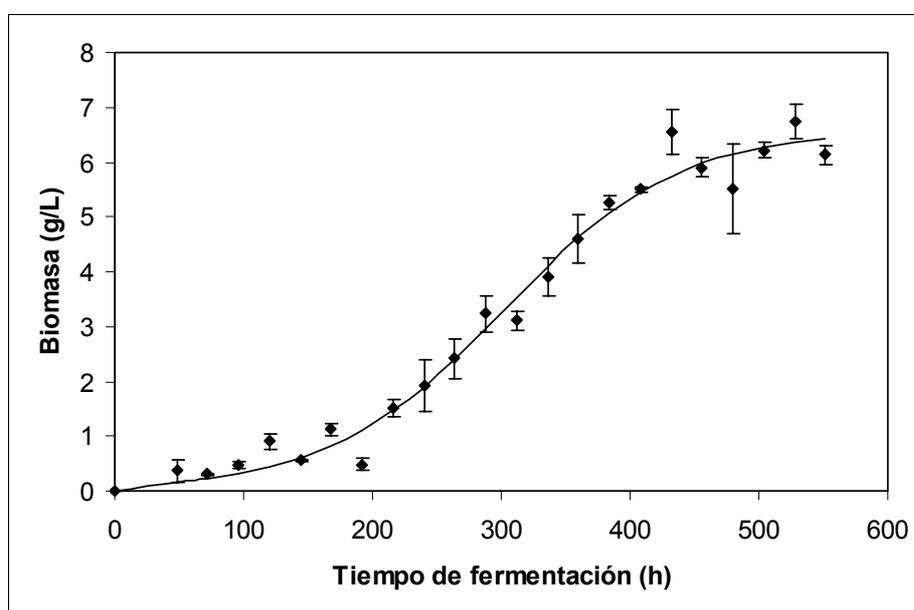


Figura 33. Cinética de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en fermentación a pH 6.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura.

8.4.2 Concentración de proteína soluble

La concentración de proteína soluble se muestra en la Figura 34. Se observó que la concentración de proteína a través de la fermentación se mantuvo constante y se muestra un pico en la fase exponencial alcanzando un máximo de 0.081 g/L a las 216 h, siendo aproximadamente la mitad de lo observado en las fermentaciones anteriores.

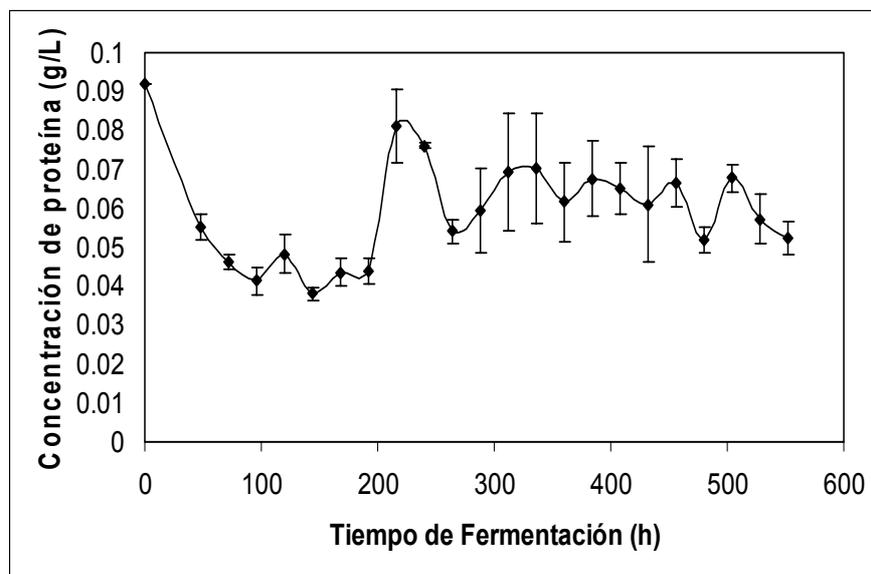


Figura 34. Proteína soluble en el caldo de fermentación a pH 6.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura.

8.4.3 Actividad de lacasa

En la Figura 35 se muestra la actividad de lacasas de *Pleurotus ostreatus*, obtenida por fermentación a pH inicial de 6.5 y evaluada a diferentes pH (3.5, 4.5, 6.5 y 8.5). En este caso, se observó un comportamiento de la actividad diferente a lo observado en las fermentaciones anteriores, ya que en los pH de 3.5, 4.5 y 8.5 se obtuvieron valores de actividad muy baja (a lo largo de la fermentación de aproximadamente 2500 U/L), mientras que a pH de 6.5 se obtuvo la mayor actividad de todos los casos estudiados con un valor de aproximadamente 36500 U/L en la fase estacionaria de crecimiento, mientras que en la fase de adaptación se observaron valores de hasta 5000 U/L, incrementándose en la fase de crecimiento exponencial.

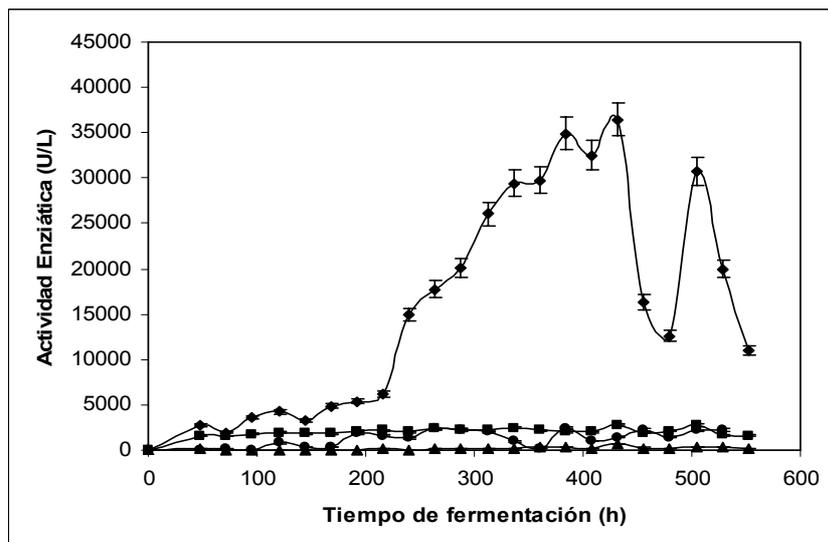


Figura 35. Actividad de lacasas de *Pleurotus ostreatus* obtenidas por fermentación a pH de 6.5 inicial de desarrollo, evaluada a pH de 3.5 (●), 4.5 (▲), 6.5 (◆) y 8.5 (■).

8.4.4 Perfil de pH

Los valores de pH durante la fermentación a pH inicial de 6.5 se muestran en la Figura 36, se observaron cambios mínimos.

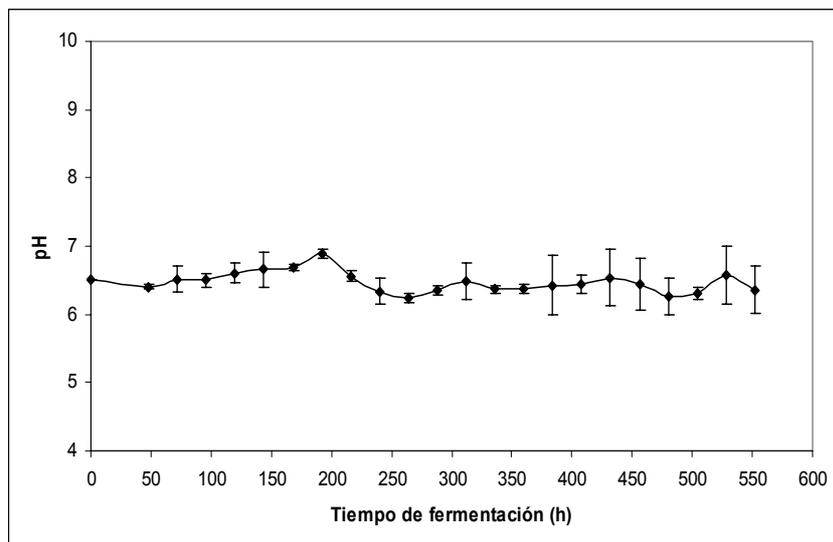


Figura 36. Perfil de pH durante la fermentación de *Pleurotus ostreatus* a pH 6.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura.

8.4.5 Determinación de número de isoformas de lacasas

En la Figura 37 se muestra el gel revelado a pH 3.5. Se observó la presencia de una isoforma con actividad de lacasa con un PM aproximado de 50 kDa durante la fase estacionaria de crecimiento del hongo.

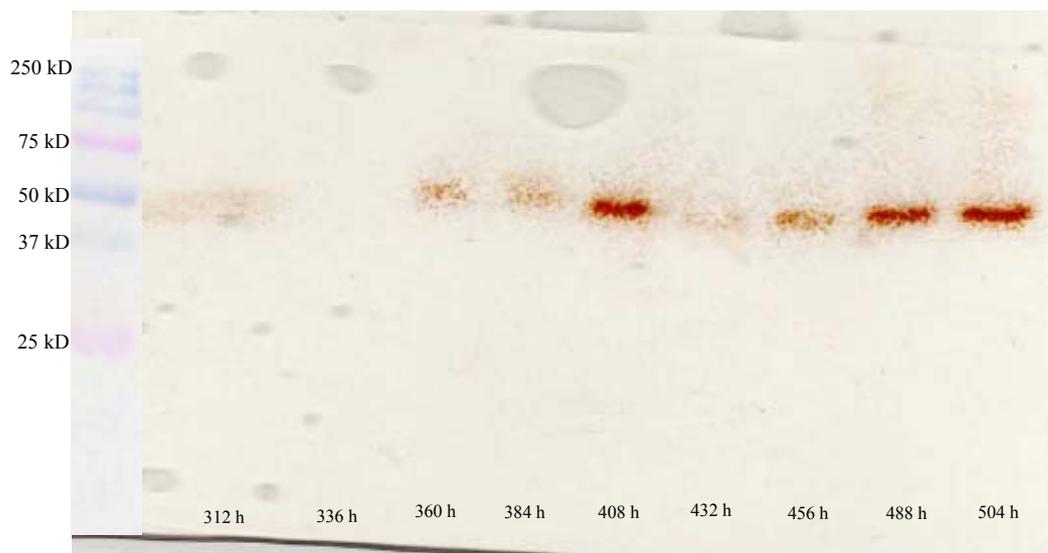


Figura 37. Zimografía de lacasas durante la fermentación a pH 6.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura de *Pleurotus ostreatus*, revelada a pH 3.5.

En la Figura 38 se muestran las isoformas encontradas por zimografía a diferentes tiempos de la fermentación a pH inicial de 6.5 revelado a pH de 4.5. A partir de las 120 h se muestran cuando menos dos bandas, posteriormente a las 168 h de fermentación que corresponde a tiempos del crecimiento exponencial, se muestran 3 bandas. Los PM aproximados son 50, 30 y 25 kDa. Al inicio de la fase estacionaria sólo aparecen dos bandas de 50 y 37 kDa aproximadamente.

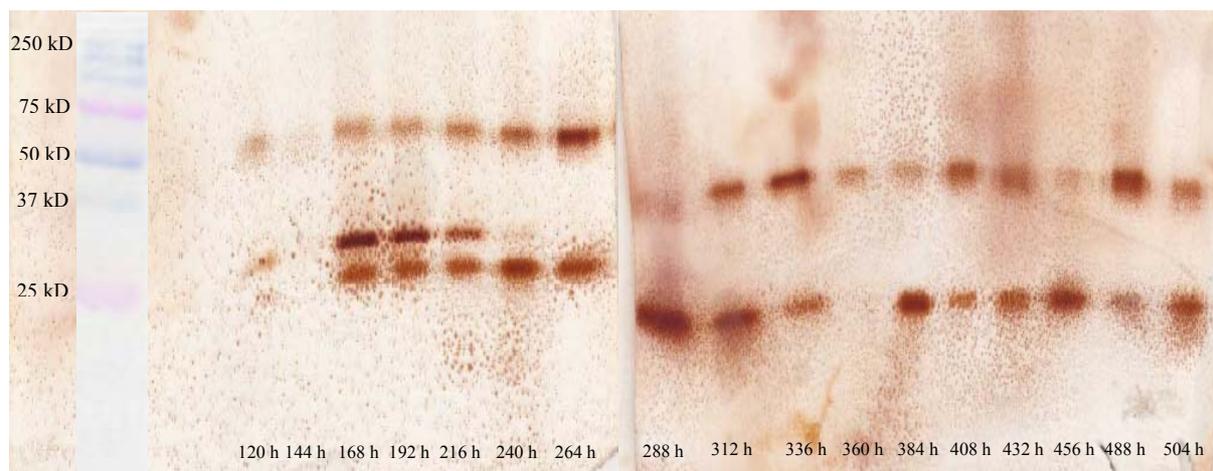
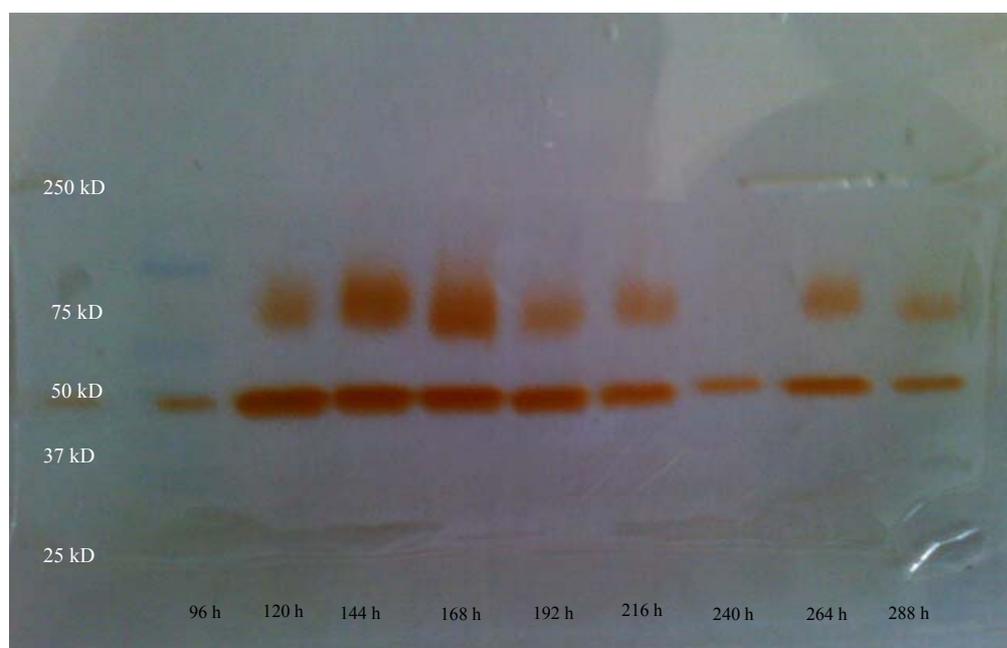


Figura 38. Zimografía de lacasas durante la fermentación de *Pleurotus ostreatus* de fermentación a pH inicial de con extracto de levadura, revelado a pH de 4.5.

En la Figura 39 se muestra el revelado de los zimogramas del EE obtenido por fermentación a pH 6.5 inicial de desarrollo, revelado a pH de 6.5, se observó que a diferentes tiempos de la fermentación se tiene actividad catalítica de lacasa mostrando cuando menos dos isoenzimas de PM aproximados de 75 y 50 kDa respectivamente.



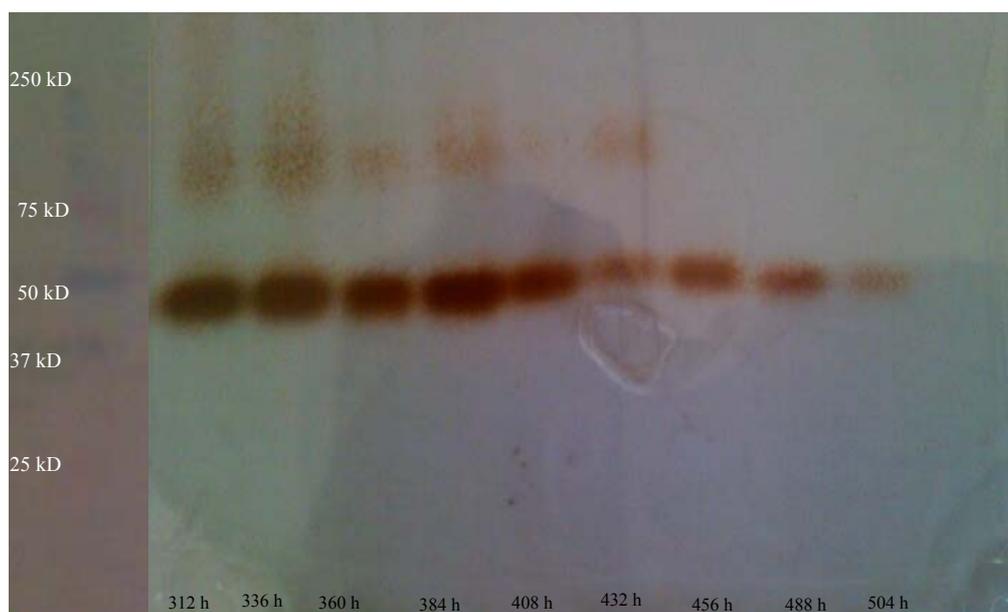
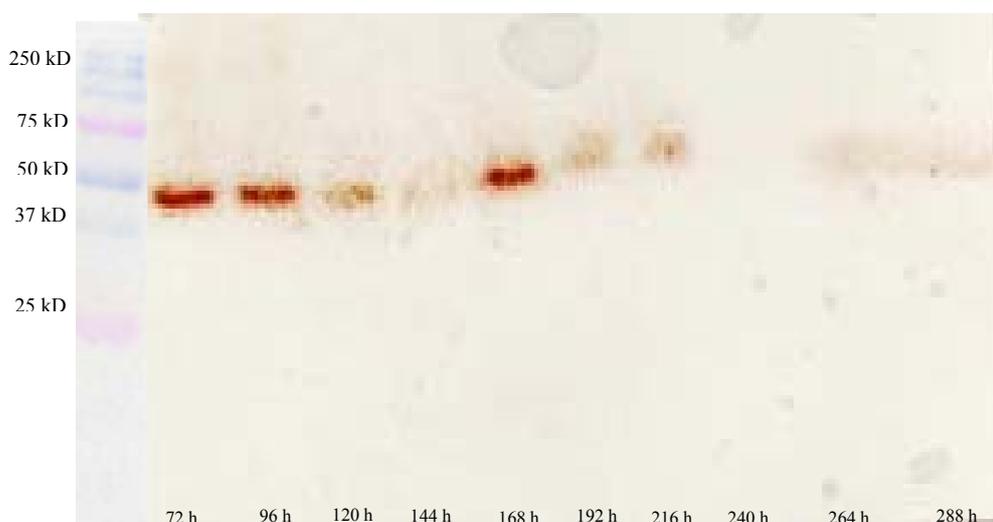


Figura 39. Zimografía de lacasas durante la fermentación de *Pleurotus ostreatus* a pH 6.5 inicial de desarrollo, revelado a pH de 6.5.

En la Figura 40 se muestran las bandas con actividad de lacasa obtenidas de la fermentación de pH 6.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura, revelado a pH 8.5, se observó un patrón constante en las diferentes etapas de crecimiento del hongo, mostrando cuando menos dos bandas con actividad enzimática de pesos moleculares de 50 y 30 kDa aproximadamente.



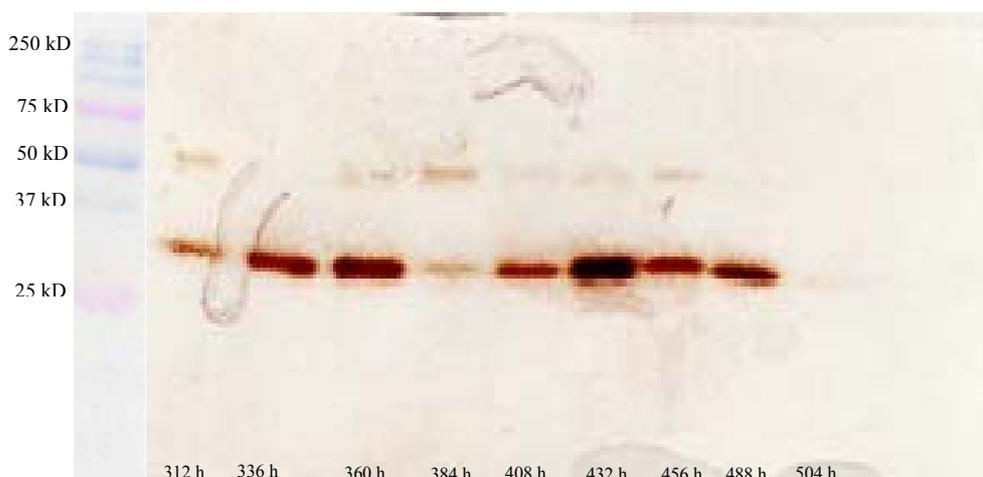


Figura 40. Zimografía de lacasas durante la fermentación de *Pleurotus ostreatus* a pH 6.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura, revelado a pH 8.5.

8.4.6 Cuantificación de azúcares residuales

En la Figura 41 se observa que la glucosa del medio de cultivo se agotó a las 310 h aproximadamente, que coincide con la transición de fase exponencial a fase estacionaria.

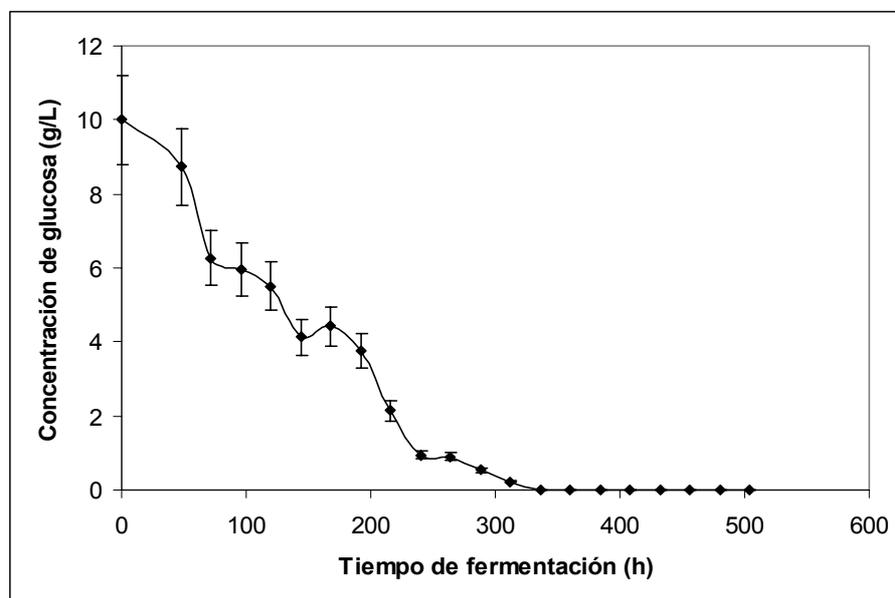


Figura 41. Consumo de glucosa de *Pleurotus ostreatus* en fermentación a pH 6.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura.

8.5 Fermentación a pH de desarrollo de 8.5

8.5.1 Biomasa

La producción de X durante la fermentación se muestra en la Figura 42. Se observó que la fase de adaptación duró aproximadamente 180 h, después de este tiempo inició la fase exponencial que terminó aproximadamente a las 400 h. Después de este tiempo inició la fase estacionaria. La biomasa máxima fue de 8.31 g/L y se observó a las 504 h. La μ fue de 0.017 h^{-1} .

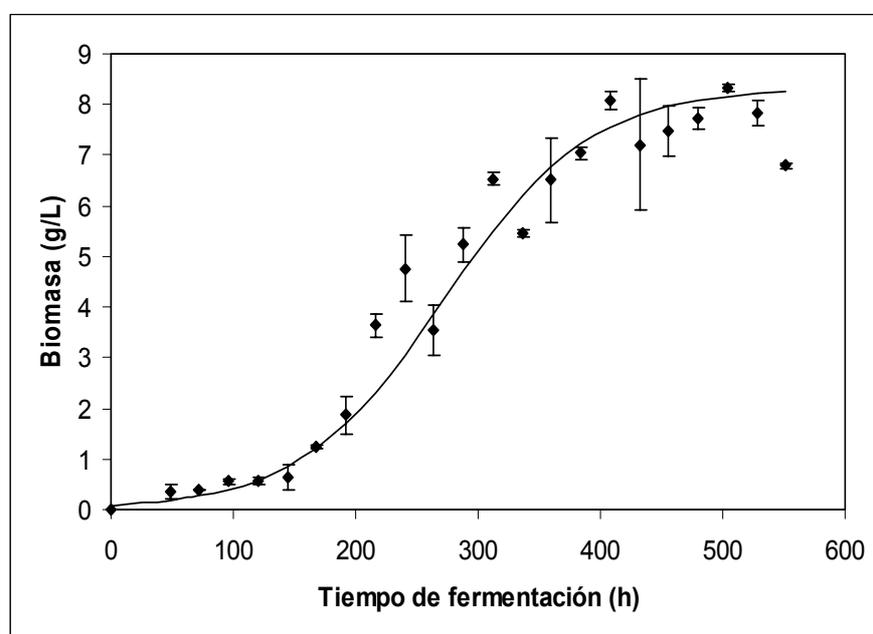


Figura 42. Cinética de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en fermentación a pH 8.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura.

8.5.2 Concentración de proteína soluble

La concentración de proteína soluble se muestra en la Figura 43. Se observó que la proteína en el caldo de fermentación se mantuvo constante a lo largo de la fermentación, alcanzando valores de hasta 0.208 g/L.

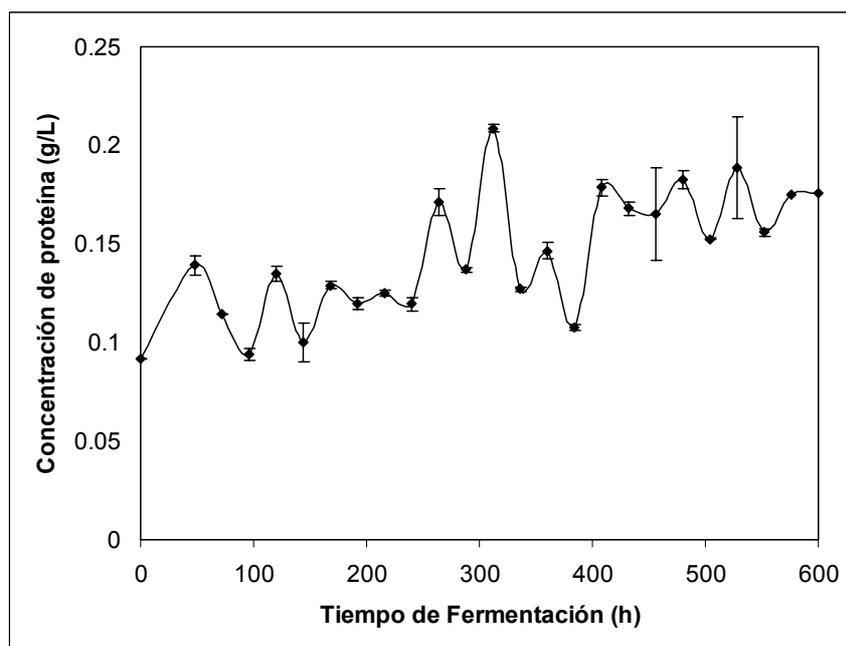


Figura 43. Proteína soluble en el caldo de fermentación a pH 8.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura.

8.5.3 Actividad de lacasas

La actividad de lacasas se muestra en la Figura 44. Se observó un perfil de actividad similar a pH 3.4 y 4.5. En las primeras horas de fermentación se observó una baja actividad enzimática, sin embargo, al inicio de la fase de crecimiento exponencial (aproximadamente a las 230 h) y en la fase estacionaria se observó un incremento, alcanzando valores de aproximadamente 21000 U/L, a las 360 h aproximadamente. Posteriormente a ese tiempo la actividad descendió hasta aproximadamente 5500 U/L, posteriormente se incrementó llegando a 14500 U/L. La actividad evaluada a pH de 6.5

mostró valores de aproximadamente 14000 U/L en la fase estacionaria. A pH de 8.5, la actividad fue mínima con valores cercanos de 5000 U/L.

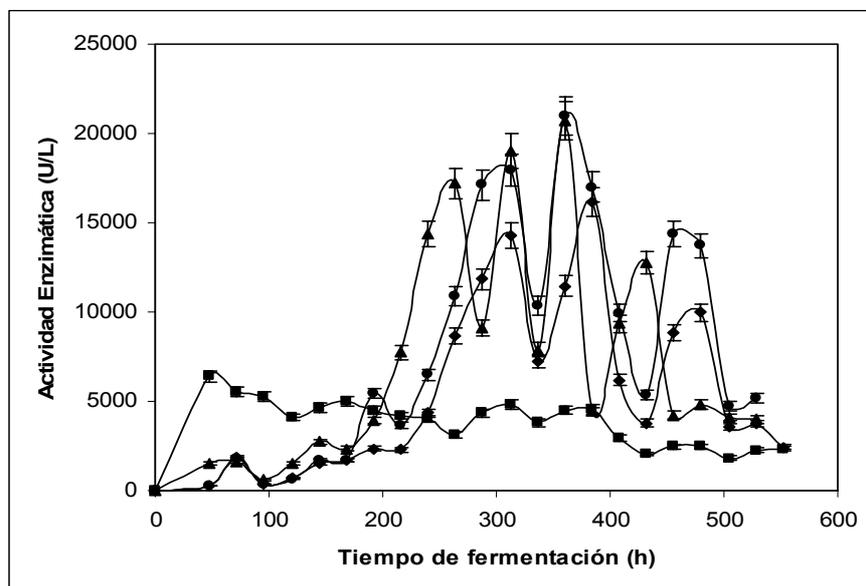


Figura 44. Actividad de lacasas de *Pleurotus ostreatus* obtenidas por fermentación a pH de 8.5, evaluada a pH de 3.5 (●), 4.5 (▲), 6.5 (◆) y 8.5 (■).

8.5.4 Perfil de pH

Los valores de pH se muestran en la Figura 45. Se observó que el pH se mantiene y no tiene cambios drásticos durante toda la fermentación.

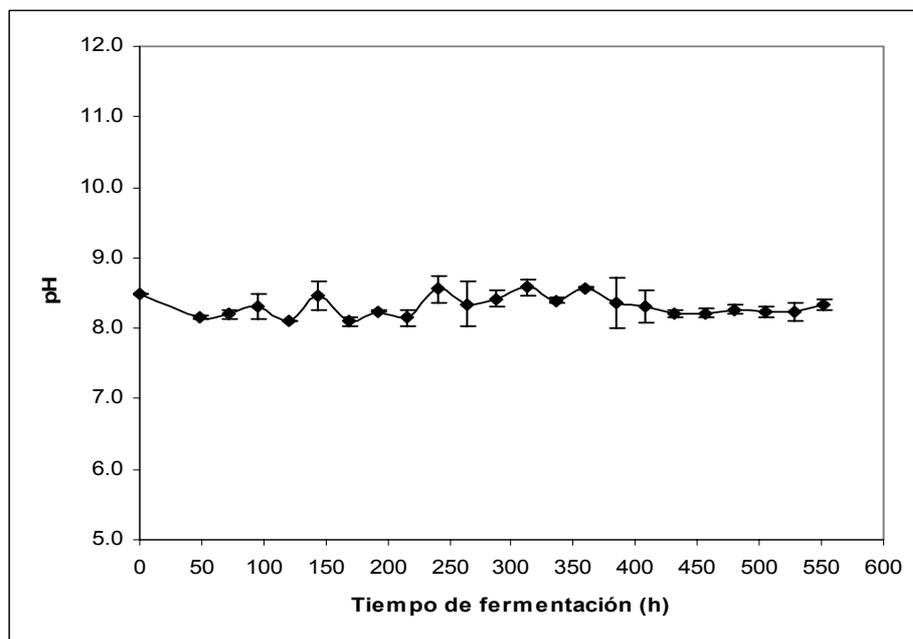


Figura 45. Perfiles de pH durante la fermentación de *Pleurotus ostreatus* a pH 8.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura.

8.5.5 Determinación de número de isoformas de lacasas

En la Figura 46 se muestran las bandas con actividad enzimática de lacasa encontradas a diferentes tiempos de la fermentación de pH inicial de 8.5 reveladas a pH 3.5. Se observaron bandas con actividad de lacasa en los tiempos de la fase estacionaria de crecimiento del hongo. Se observó claramente una isoforma de aproximadamente 25 kDa, y dos isoformas tenues de 37 y 50 kDa aproximadamente.

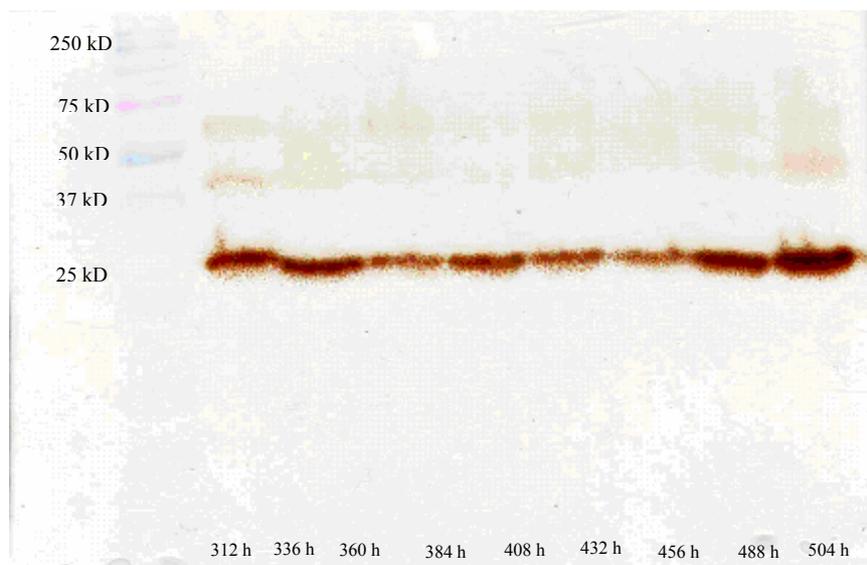


Figura 46. Zimografía de lacasa durante la fermentación a pH 8.5 inicial de desarrollo de *Pleurotus ostreatus*, revelado a pH 3.5.

En la Figura 47 se observa el patrón de isoformas de lacasa evaluada a pH 4.5 mostrando hasta 6 diferentes bandas de diferente peso molecular, de aproximadamente 100, 75, 50, 37, 30 y 25 kDa aproximadamente. Estas bandas se observaron durante los tiempos de la fase exponencial y estacionaria de crecimiento del hongo.

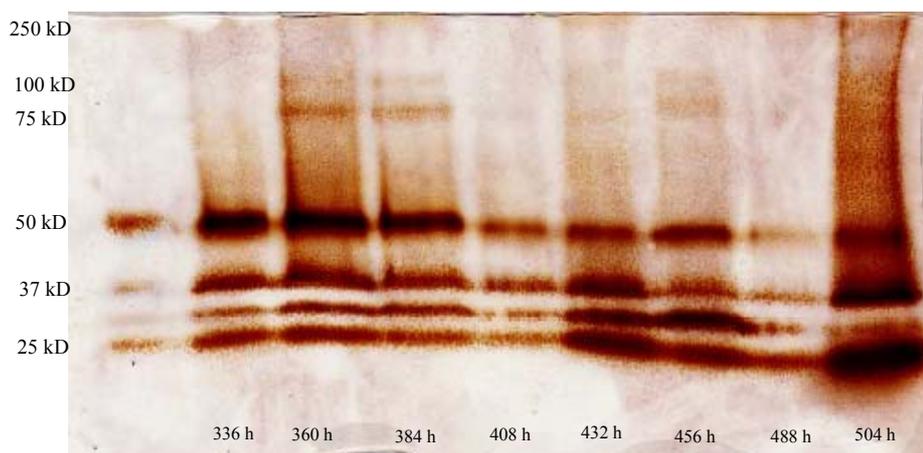


Figura 47. Zimografía de lacasas durante la fermentación a pH inicial de 8.5 de *Pleurotus ostreatus*, revelado a pH 4.5.

En la Figura 48 se muestran el perfil zimográfico de los EE obtenidos en la fermentación a pH inicial de 8.5 revelado a pH de 6.5. Se observó que en durante toda la fermentación tanto en tiempos del crecimiento exponencial como en la fase estacionaria del hongo aparecen bandas con peso molecular aproximado de 75 kDa y 50 kDa.

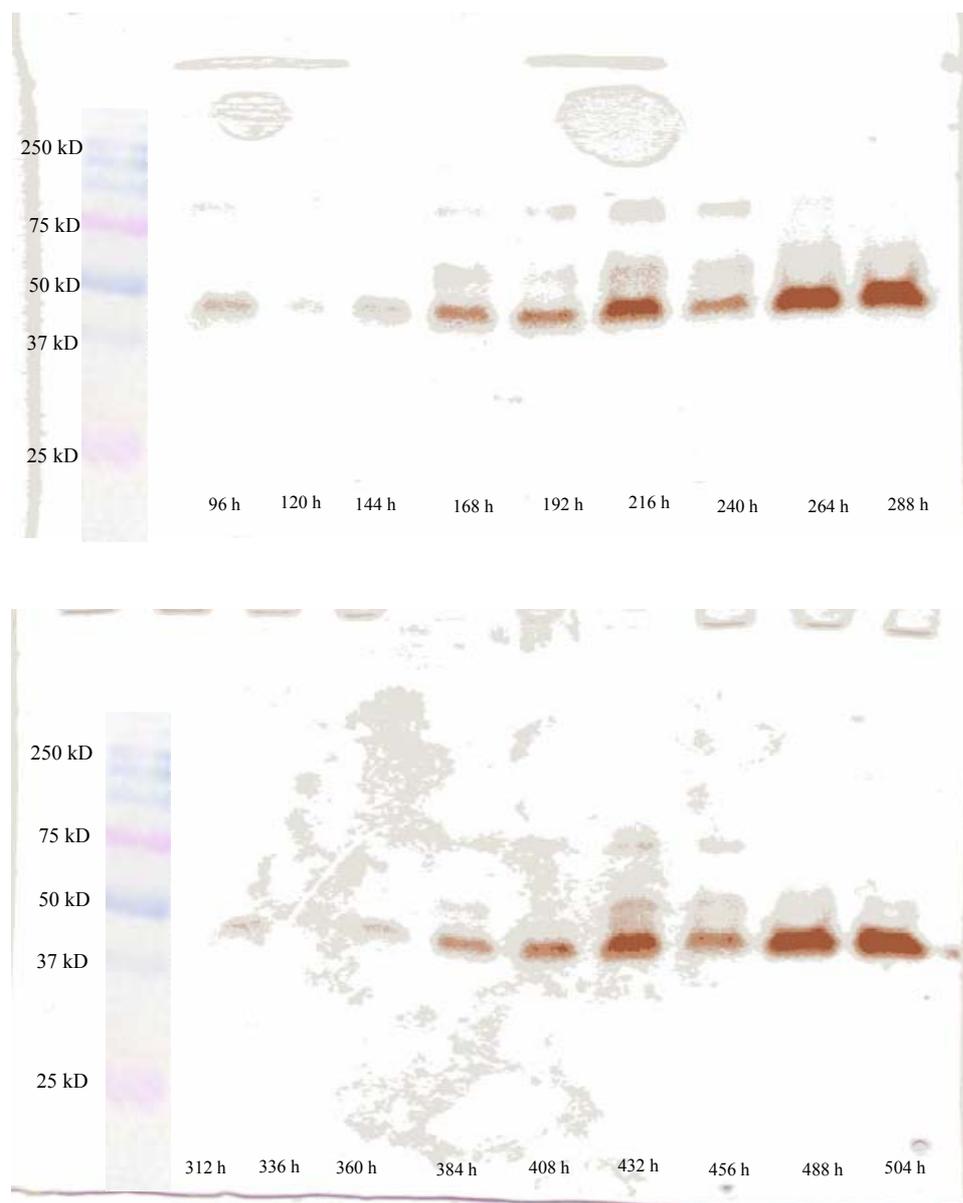


Figura 48. Zimografía de lacasas durante la fermentación a pH 8.5 inicial de desarrollo de *Pleurotus ostreatus*, revelado a pH 6.5.

En la Figura 49 se muestra el perfil de isoformas con actividad de lacasa de la fermentación a pH inicial de 8.5 revelado a pH de 8.5. Los PM corresponden aproximadamente a 37 kDa y 25 kDa. Estas bandas se mostraron en la transición de la fase de crecimiento exponencial a la fase estacionaria.

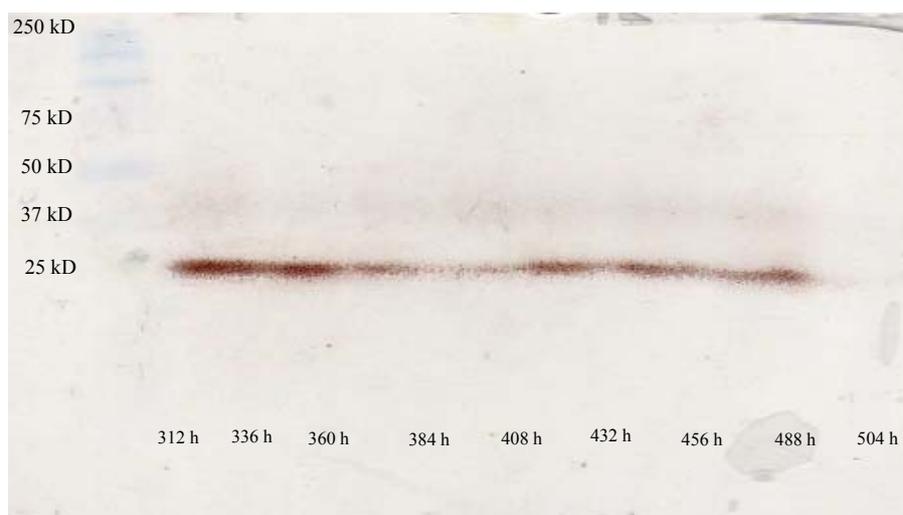


Figura 49. Zimografía de lacasas durante la fermentación a pH inicial 8.5 de desarrollo de *Pleurotus ostreatus*, revelado a pH 8.5.

8.5.6 Cuantificación de azúcares residuales

En la Figura 50 se observa que la concentración de glucosa se agotó aproximadamente a las 300 h, efecto que se observó de igual manera en las otras fermentaciones coincidiendo en los tiempos de la fase estacionaria.

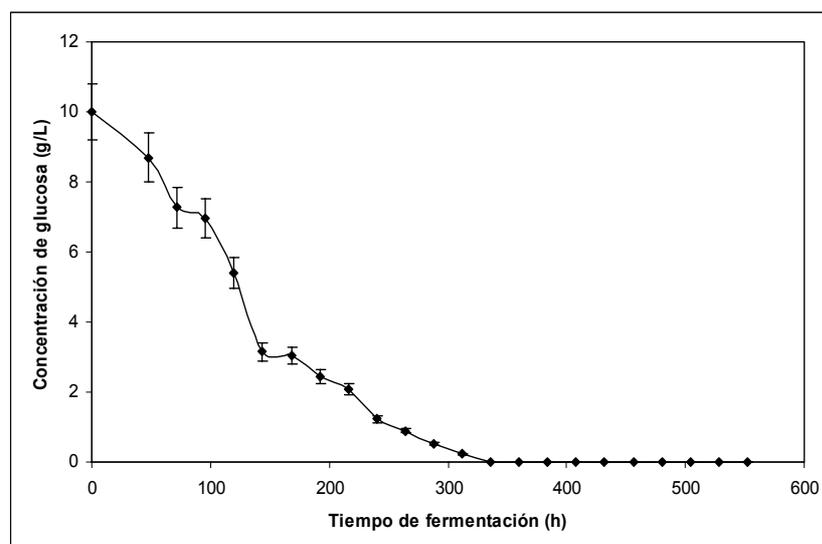


Figura 50. Consumo de glucosa de *Pleurotus ostreatus* en fermentación a pH 8.5 inicial de desarrollo con extracto de levadura.

8.6 Parámetros cinéticos de crecimiento y producción de lacasas de *Pleurotus ostreatus*

En la Tabla 3 se muestran los parámetros cinéticos de crecimiento y producción de lacasas de *Pleurotus ostreatus* obtenidos de todas las fermentaciones evaluadas. En la Tabla 4 se muestra el número y peso molecular de las isoformas observadas en cada fermentación.

Tabla 3. Comparativo de datos cinéticos de las fermentaciones a diferente pH inicial de desarrollo de *Pleurotus ostreatus*

Parámetro	pH inicial de desarrollo del hongo				
	Medio de cultivo sin extracto de levadura	Medio de cultivo con extracto de levadura			
		3.5	3.5	4.5	6.5
X _{max} (g/L)	5.2	4.7	5.5	6.7	8.3
E _{max} (U/L)	470	4030	33500	36500	21000
μ (h ⁻¹)	0.037	0.012	0.034	0.015	0.017
Y _{X/S} (gX/gS)	0.43	0.40	0.46	0.55	0.69
Y _{E/X} (U/gX)	90	858	6091	5530	2530
P _{RO} (UL ⁻¹ h ⁻¹)	0.88	7.30	60.41	66.10	38.02
q _p (U/h gX)	3.28	10.31	204.93	82.88	42.93

Tabla 4. Comparativo de isoformas con actividad enzimática de lacasa obtenidas por fermentación sumergida de *Pleurotus ostreatus* a diferente pH de desarrollo

pH de desarrollo del hongo en medio de cultivo con extracto de levaduras	Peso molecular de isoformas observadas a diferentes pH de actividad de lacasas (kDa)			
	3.5	4.5	6.5	8.5
3.5	100	50	75 50	50 37
4.5	50 30	50 30	50 30	37
6.5	50	50 37 25	75 50	50 30
8.5	50 37 25	100 75 50 37 30 25	75 50	37 25

9. DISCUSIONES

La fermentación líquida es el sistema de producción de metabolitos más estudiada y controlada, y también lo es en el caso de las lacasas (Palmieri y col. 1997), sin embargo existen pocos estudios que describan la fermentación y se reporten los parámetros cinéticos del crecimiento del hongo así como de su producción de lacasas. En esta investigación se utilizó el modelo matemático de la ecuación logística para obtener los parámetros cinéticos de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* a diferentes valores de pH de desarrollo, observando en todos los casos una $R^2 > 98$, lo cual indica que es un buen modelo para describir el comportamiento de este hongo bajo las condiciones de fermentación evaluadas. En estudios recientes realizados con el mismo hongo de este estudio pero con un medio de cultivo suplementado con sulfato de amonio y pH inicial de 6.0, se obtuvieron valores de μ de 0.02 h^{-1} y de X_{max} de 7.8 g/L (Tlecuitl-Beristain y col. 2008), en otro estudio realizado en fermentación líquida y sólida con un medio de cultivo suplementado con extracto de levadura a pH 6.5 y el mismo hongo utilizado en esta investigación se observaron valores de μ de 0.022 y 0.033 h^{-1} para la fermentación líquida y sólida respectivamente. La X_{max} fue de 5.5 y 4.5 g/L para la fermentación líquida y sólida respectivamente (Téllez-Téllez y col. 2008). Los parámetros obtenidos en este estudio muestran la μ cercana a los valores anteriormente reportada para este hongo en fermentación líquida a pH de 6.5 y 8.5 (0.015 y 0.017 h^{-1}), sin embargo, a pH de 4.5 se observó un valor aproximadamente del doble (0.034 h^{-1}), mientras que a pH de 3.5, considerado estresante, redujo el valor hasta 0.012 h^{-1} . En el caso de la fermentación a pH inicial de 3.5 con sulfato de amonio la μ mostró un valor relativamente alto en comparación con lo reportado en otros estudios y en comparación de las demás fermentaciones de esta investigación, lo cual podría deberse a que no existió un efecto amortiguador del pH del medio y en los primeros tiempos de la fase exponencial el pH se elevó a valores cercanos de 7, favoreciendo su metabolismo con una fuente de nitrógeno que no requiere de síntesis de proteasas para asimilar aminoácidos presentes en el extracto de levadura que si existieron en las demás fermentaciones. De los valores de pH evaluados, se podría considerar que el óptimo estaría entre 4.5 y 6.5, sin embargo el pH de 8.5 mostró una μ muy cercana a la que se

ha reportado en otros estudios y siendo la segunda mejor en este estudio, pero con los valores de X_{max} más alto (8.3 g/L). En las fermentaciones suplementadas con extracto de levadura se observó un efecto positivo de la X_{max} con respecto al pH, ya que a pH inicial de 3.5 se obtuvo el valor menor y fue incrementando al subir el valor del pH inicial de desarrollo del hongo, también es importante mencionar que en la fermentación a pH inicial de 3.5 con sulfato de amonio se observó un valor de X_{max} similar al que se obtuvo a pH de 4.5 y superior al que se mostró a pH de 3.5, ambas con extracto de levadura. Dado que el modelo logístico de crecimiento considera los tiempos de la fase de adaptación y estacionaria, el valor de μ refleja de manera integral los tiempos de retardo y del crecimiento exponencial, por lo que se podría mencionar que el pH de 8.5 reportó mejores resultados en el caso de producción de X en tiempos mas cortos. Si bien el pH interno de las células es neutro, los microorganismos poseen mecanismos de control de entrada y salida de protones y cationes a nivel de la membrana y pueden desarrollarse en amplios rangos de concentración hidrogeniónica. En el caso de los hongos que como grupo son neutrófilos, se favorece su crecimiento en medios ácidos por falta de competencia con bacterias (Frioni 1999). Este hongo ha mostrado respuestas fisiológicas en condiciones estresantes no esperadas, ya que parece ser que las condiciones que se consideran óptimas de un organismo mesófilo, heterótrofo y adaptado a crecer sobre madera no son las mejores en cultivo líquido. Los valores reportados de $Y_{X/S}$ de 0.5 gX/gS se consideran como ideales, sin embargo, al realizar los cálculos en las fermentaciones desarrolladas a pH de 6.5 y 8.5 se observan valores de 0.55 y 0.69, lo cual sugiere que bajo estas condiciones el hongo no sólo utiliza los carbohidratos como fuente de carbono, es posible que metabolice otras estructuras carbonatadas provenientes de proteínas o lípidos presentes en el extracto de levadura. En el caso de las fermentaciones a pH de 3.5 con y sin extracto de levadura y a pH de 4.5 se observaron valores de $Y_{X/S}$ de 4.0-4.6 gX/gS.

Los valores de actividad de lacasas observados en las fermentaciones realizadas en esta investigación, fueron también relacionados con el pH inicial de desarrollo del hongo hasta 6.5. En las fermentaciones realizadas a pH de 3.5 sin extracto de levadura se observó el valor mas bajo de actividad de lacasas con 470 U/L, el cual fue casi 78 veces

menor al máximo valor observado en la fermentación a pH inicial de 6.5. En la fermentación a pH inicial de 3.5 con extracto de levadura se obtuvieron casi 10 veces más actividad que en la misma fermentación pero sin extracto de levadura, por lo que se puede sugerir que las fuentes de nitrógeno más elaboradas como es el caso de los aminoácidos promueven la producción de lacasas. Existen reportes de actividad de lacasas obtenida por fermentación líquida producida por el mismo hongo usado en este estudio, reportando 13000 U/L en un medio de cultivo suplementado con extracto de levadura (Téllez-Téllez y col. 2008) y 12200 U/L en un medio de cultivo con sulfato de amonio (Tlecuítl-Beristain y col. 2008), mientras que en este estudio se obtuvieron 33500 U/L en la fermentación a pH de 4.5 y de 36500 U/L a pH de 6.5, sin embargo, en la fermentación a pH de 8.5 se observaron valores cercanos a 21000 U/L. Estos resultados muestran que valores de pH de 4.5 y 6.5 se obtienen los valores más altos de actividad, los cuales no corresponden con el pH de mayor producción de X; las condiciones extremas de pH por el lado alcalino afectó menos la producción de lacasas que los pH ácidos, además que a pH de 8.5 se obtuvo la mayor cantidad de X. Los valores de actividad de lacasas obtenidos en este estudio en las fermentaciones a pH de 4.5 y 6.5 se consideran elevados en comparación con otros reportes, pero además porque en tiempos cercanos a 60 s, las enzimas han mostrado capacidad de oxidar por completo y polimerizar el sustrato utilizado hasta precipitarlo. Con respecto a los valores de $Y_{E/X}$, se observó un valor muy bajo en la fermentación a pH inicial de 3.5 con sulfato de amonio (90 U/gX) y aproximadamente 10 veces más en la fermentación a pH inicial de 3.5 con extracto de levadura; los valores más altos fueron en la fermentaciones a pH de 4.5 y 6.5 (6091 y 5530 U/gX respectivamente), mientras que en la fermentación a pH inicial de 8.5 el valor observado fue de 2530 U/gX. La P_{RO} es un parámetro importante que muestra la eficiencia del sistema de producción de enzimas, pues relaciona la actividad de lacasas con respecto al tiempo en que se producen, siendo en este estudio las fermentaciones a pH inicial de 4.5 y 6.5 las que presentaron los valores mayores (60-66 U/L h aproximadamente), mientras que a pH inicial de 8.5 el valor fue de aproximadamente de 38 U/L h, sin embargo, la q_p fue muy superior en la fermentación a pH inicial de 4.5 (205 U/gX h aproximadamente), ya que en la fermentación a pH inicial de 6.5 el valor fue 2.5 veces menor aproximadamente. En las fermentaciones a

pH inicial de 8.5, 3.5 con y sin extracto de levadura se obtuvieron los valores mas bajos (43, 10 y 3 U/gX h aproximadamente).

Mouso, N., y col. (2003), reportaron que para el hongo de pudrición blanca *Stereum hirsutum*, la regulación del pH inicial del medio es muy importante no sólo por el factor *per se* sino por posibles interacciones con otros compuestos. Estos autores encontraron que la producción de lacasas bajo las condiciones estudiadas, fue máxima a un pH de cultivo alrededor de 5.5 y que a valores de pH más alcalinos la producción de lacasa se ve afectada negativamente. Lo cual coincide con lo reportado en esta investigación.

En diferentes familias de hongos, las lacasas se producen en isoformas que son codificadas por familias de genes. Los zimogramas son una herramienta de gran utilidad, esta técnica permite identificar el número de isoformas presentes en cada uno de los EE obtenidos en las fermentaciones a diferente pH de desarrollo del hongo. Existen diferentes reportes sobre factores que afectan la producción de lacasas, entre ellos, la composición del medio de cultivo, el pH, la temperatura, entre otros. Con respecto a la regulación de la expresión de los genes de lacasa, Palmieri y col. (2000) estudiaron el efecto del cobre como inductor, encontrando que en un medio suplementado con cobre la producción de isoformas de lacasas se ve incrementada sustancialmente. Por otra parte, mediante estudios de northern blot lograron definir que la regulación de la expresión de estos genes es a nivel transcripcional.

En los patrones zimográficos se observan diferentes perfiles, encontrándose hasta 6 isoformas de las 8 que se han reportado para *Pleurotus ostreatus* (Palmieri y col. 2003), sin embargo, el mayor número de isoformas que se habían observado en un sistema de producción fue de 4. Rigling y Van Alfen (1993) reportaron que en *Cryphonectria parasitica* encontraron dos isoformas de lacasa extracelular y que una de estas isoenzimas coincide con una banda intracelular en la movilidad sobre el gel del mismo organismo, por lo que sugieren que probablemente una de estas lacasas extracelulares es sintetizada y posteriormente secretada al medio de cultivo por un rompimiento de una secuencia específica. Arana y col. (2004) utilizaron el patrón de isoenzimas de

lacasas extracelulares para diferenciar especies de *Trametes*, donde reportan la cercanía filogenéticas entre las especies. En nuestra investigación se encontró información que no ha sido reportada en ningún estudio relacionado a la producción de lacasas por hongos del género *Pleurotus*, ya que el hongo utilizado en este estudio logró crecer a valores de pH extremos como son 3.5 y 8.5 pero además en éste último valor de pH mostró valores de X_{max} y μ más altos con actividades de lacasas elevados cercanos a los más altos obtenidos, pero lo mas sobresaliente fue que a este pH se producen hasta 6 isoformas con actividad de lacasas observadas a pH de 4.5, ya que a pH de 8.5 (igual al pH en el que se produjeron) solo se observaron 2 isoformas de bajo peso molecular y a pH de 6.5 también se presentaron solo 2 isoformas pero de pesos moleculares diferentes a las de las isoformas observadas a pH de 8.5. En esta misma fermentación se observaron 3 isoformas cuando se reveló el gel a pH de 3.5. En las otras fermentaciones también se observaron diferentes perfiles de isoformas de lacasas siendo en general a pH de actividad de lacasas de 4.5 donde se presentaron el mayor número de lacasas. En la fermentación a pH inicial de 3.5 con extracto de levadura se observaron hasta 2 isoformas a pH de 6.5 y 8.5, compartiendo solo una de ellas, a pH de actividad de 3.5 y 4.5 se mostraron solo una isoforma en cada caso, pero a pH de 3.5 se mostró una isoforma de alto peso molecular diferente a las observadas a los demás pH de actividad, por lo que en total se producen 4 isoformas pero con pH de actividad diferente. En la fermentación desarrollada a pH inicial de 4.5 se observó un perfil de lacasas igual con 2 isoformas a los pH de actividad de 3.5, 4.5 y 6.5, pero a pH de 8.5 se presentó solo una isoforma de peso molecular diferente, por lo que en esta fermentación se produjeron 3 isoformas. En la fermentación desarrollada a pH de 6.5 se produjeron en total 5 isoformas, pero con actividad a diferentes pH, siendo a pH de 4.5 donde se observaron al menos 3 isoformas, dos a pH de 6.5 y 8.5, pero solo una en el pH de 3.5.

Los pesos moleculares para las diversas isoformas purificadas son muy variables (por SDS PAGE). Podemos encontrar desde las isoformas más pesadas como la de *Gaumanomyces graminis* de 190 kDa (Edens y col. 1999) hasta isoformas más ligeras como las de *Coriolus hirsutus* de 55 kDa (Koroljova-Skorbogat'ko y col. 1998) y una

isoforma (Lac I) de *Corioloopsis rigida* del mismo valor (Saparrat y col. 2002). Una isoforma de *Pleurotus ostreatus* purificada presentó un peso molecular menor de 43.7 kDa (Tlecuítl-Beristain y col. 2008). Saloheimo y col. (1991) reportaron una isoforma de lacasa de *Phlebia radiata* con un peso molecular aparente de 64 kDa (estimado por SDS/PAGE). Heinzkill y col. (1998) reportaron lacasas en la familia Coprinaceae: la de *Polyborus pinsitus* presentó un peso molecular de 66 kDa, el peso molecular de las lacasas de *Panaeolus sphinctrinus*, *P. papilionaceus* y *Coprinus friesii* fue de 60 kDa. Fukushima y Kirk (1995) encontraron dos isoformas de lacasa en *Ceriporiopsis subvermispora*, con pesos moleculares de 71 y 68 kDa, respectivamente. *Trametes pubescens* secreta varias isoformas de lacasas, pero Galhaup y col. (2002) sólo caracterizaron una, la cual presentó un peso molecular de 65 kDa. Chefetz y col. (1998) reportaron una lacasa en *Chaetomium thermophilium* que presentó un peso molecular de 77 kDa. También se han reportado isoformas de alto peso molecular, como el caso de las lacasas producidas por *Monocillium indicum* (100 kDa), *Aspergillus nidulans* (110 kDa) y *Agaricus bisporus* (100 kDa) (Thurston 1994). Actualmente se están realizando varios trabajos de este tipo con hongos comestibles, debido a que sus enzimas son más seguras para ser utilizadas por los humanos. Éste es el caso de *Lentinula edodes* (shiitake, segundo hongo comestible más importante a nivel mundial) (Sánchez 2004). Kofujita y col. (1991) reportaron una lacasa de este hongo con un peso molecular de 66 kDa. Posteriormente, en 2002 Nagai y col. aislaron una lacasa con un peso molecular de 72.2 kDa. Palmieri y col. (1997) reportaron dos isoformas de lacasas de *Pleurotus ostreatus*: POXA1 presentó un peso molecular de 61 kDa, una alta estabilidad a diferentes valores de pH y temperatura y contuvo un átomo de cobre, dos de zinc y uno de hierro por molécula. El peso molecular de POXA2 fue de 67 kDa, esta isoforma mostró baja estabilidad a la temperatura (25-35 °C) y presentó cuatro átomos de cobre por molécula. Giardina y col. (1999) purificaron otra isoforma de lacasa de *Pleurotus ostreatus*, en un cultivo suplementado con sulfato de cobre, denominada POXA1b, con un peso molecular de 62 kDa, además mostró un alta estabilidad al pH alcalino. Hublik y Schinner (2000) purificaron otra isoforma de *Pleurotus ostreatus* (cepa RK 36) en un cultivo en presencia de ácido ferúlico; esta isoforma presentó un peso molecular de 67 kDa. Palmieri y col. (2003) encontraron otras dos isoformas de lacasa en un cultivo

suplementado con cobre, denominadas POXA3a y POXA3b. Ambas isoenzimas están constituidas por una subunidad grande de 67 kDa y una subunidad pequeña de 18 ó 16 kDa. La presencia de diferentes isoformas en *Pleurotus ostreatus* y en otros organismos se debe a la existencia de múltiples genes que codifican para diferentes isoenzimas de lacasas. Por otra parte, la expresión de los genes depende de las condiciones del cultivo, habiéndose reportado un sistema regulado diferencialmente para controlar la producción de lacasas (Faraco y col. 2003). Para comprender la función de estas enzimas, se han aislado y caracterizado varios genes de lacasa de diferentes organismos: *Trametes versicolor* (Hunolstein y col. 1986), *Aspergillus nidulans* (Aramayo y Timberlake 1990), *Coriolus hirsutus* y *Phlebia radiata* (Saloheimo y col. 1991), *Trametes villosa* y *Neurospora crassa* (Germann y col. 1998). Estos genes presentan un alto grado de identidad entre si (Faraco y col., 2003). Se ha encontrado que una cisteína y diez histidinas están involucradas en la unión de los cuatro átomos de cobre encontrados en la mayoría de las moléculas de lacasas, aminoácidos que se conservan alrededor de las cuatro regiones en las cuales el cobre se encuentra agrupado (Thurston 1994). En esta investigación, bajo las condiciones ensayadas se obtuvieron hasta 6 isoformas con pesos moleculares de 100, 75, 50, 37, 30 y 25 kDa. Las de 75, 50, 30 y 25 kDa pudieran corresponder con alguna de las reportadas anteriormente para esta especie de hongos, sin embargo, los métodos cromatográficos pueden reportar ligeras diferencias, por lo que la prueba confirmativa sería al tener la secuencia de aminoácidos de cada isoforma.

10. CONCLUSIONES

1. El pH de desarrollo de *Pleurotus ostreatus* afecta la velocidad específica de crecimiento y la producción de biomasa
2. A pH de 4.5, se observó una velocidad específica de crecimiento mayor en comparación con la observada a los pHs de desarrollo de 6.5 y 8.5.
3. A pH 6.5 y 8.5 se obtuvieron los valores máximos de producción de biomasa, siendo 6.6 y 8.3 g/L respectivamente.
4. Se observó que el pH de desarrollo del hongo promueve diferentes patrones de producción de lacasas.
5. El pH de producción de lacasas no es el mismo que el pH óptimo de crecimiento del hongo, ni de la actividad de lacasas.
6. La actividad de lacasas fue más importante en todos los casos en la fase estacionaria del hongo.
7. En este estudio se logró producir hasta 6 isoformas de lacasa a un pH de desarrollo de 8.5
8. La máxima actividad de lacasa se observó a un pH de desarrollo de 6.5 a las 432 h de fermentación.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abadulla E, Tzanov T, Costa S, Robra K-H, Covaco-Paulo A y Gübitz. 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsute*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3357-3362.
- Alsubaey A, Sisler HD y Matthews BF. 1996. Purification and characterization of an extracellular phenoloxidase from culture filtrates of *Pyricularia oryzae*. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 437-445.
- Aramayo R. y Timberlake WE. 1990. Sequence and molecular structure of *Aspergillus nidulans* yA (laccase I) gene. *Nucleic Acids Research* 18: 3415-3418.
- Arana-Cuenca A, Roda A, Téllez A, Loera O, Carbajo JM, Terrón MC y González AE. 2004. Comparative analysis of laccase-isozymes patterns of several related Polyporaceae species under different culture conditions. *Journal Basic Microbiology* 44: 79-67
- Archibald FS, Bourbonnais R, Jurasek L, Paice MG y Reid ID. 1997. Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. *Journal of Biotechnology* 53: 215-336.
- Baldrian P. 2005. Fungal Laccases-ocurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 30 Issue 2: 215-242.
- Bertrand G. 1896. Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. *CR Hebd Seances Acad Sci* 9: 463-465.
- Blaich R, Esser K. 1975 Function of enzymes in wood destroying fungi. *Archives of Microbiology*, vol. 103, No. 1: 271-277.
- Bollag J. y Leonowicz A. 1984. Comparatives studies of extracellular fungal laccases. *Applied and Environmental Microbiology* 48:849-854.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Chefetz B, Chen Y y Hadar Y. 1998. Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3175-3179.

- Claus H. 2003. Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives Microbiology* 179: 145-150.
- Collins PJ, Kotterman MJ, Field JA y Dobson AD. 1996. Oxidation of anthracene and benzo(a)pyrene by laccase from *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (12): 4563-4567.
- Das S, Sengupta S y Mukherjee M. 1997. Importance of laccase in vegetative growth of *Pleurotus florida*. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4120-4122.
- De Souza C, Zilly A y Peralta R. 2002. Production of laccase as the sole phenoloxidase by a Brazilian strain of *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation. *Journal of Basic Microbiology* 42: 83-90.
- De Souza C y Peralta R. 2003. Purification and characterization of main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. *Journal of Basic Microbiology* 43: 278-286.
- Dedeyan B, Klonowska A, Tagger S, Tron T, Iacazio G, Gil G y Le Petit J. 2000. Biochemical and molecular characterization of a laccase from *Marasmius quercophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 925-929.
- Dekker FH, Barbosa M y Sargent K. 2002. The effect of lignin-related compounds on the growth and production of laccases by the ascomycete, *Botryosphaeria sp.* *Enzyme and Microbial Technology* 30: 374-380.
- Díaz-Godínez G, Soriano-Santos J, Augur C, Viniegra-González G. 2001. Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid state and submerged fermentation: a comparative study. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology* 26: 271-275.
- 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.
- Durán N, Rosa AM, D'Ammnibale A y Giafreda L. 2002. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology*. 31: 907-931.
- Doralice SL, Balan y Regina TR. 2001. Monteiro Decolorization of textile indigo dye by lignolytic fungi. *Journal of Biotechnology* 89: 141-145.

- Edens W, Goins T, Dooley D y Henson J. 1999. Purification and characterization of secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3071-3074.
- Eggert C, Temp U y Eriksson K-E. 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1151-1158.
- Eggert C, LaFayette PR, Temp U, Eriksson K-E y Dean J. 1999. Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1766-1772.
- Faraco V, Giardina P. y Sannia G. 2003. Metal-responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters. *Microbiology* 149:2155-2162.
- Frioni L. 1999 *Procesos microbianos Editoriales Universitarias Nacionales*. Argentina: 24-26.
- Fukushima y Kirk K. 1995. Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispora* lignin degrading system. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 872-876.
- Galhaup C, Goller S, Peterbauer C, Strauss J y Haltrich D. 2002. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology* 148: 2159-2169.
- Germann UA, Muller G, Hunziker PE y Lerch K. 1988. Characterization of two allelic forms of *Neurospora crassa* laccase. *The Journal of Biological Chemistry* 263 (2): 885-896.
- Giardina P, Palmieri G, Scaloni A, Fontanella B, Faraco V, Cennamo G y Sannia G. 1999. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Journal* 341: 655-663.
- Griffin H. 1994. *Fungal Physiology*. Wiley-Liss. New York.
- Guillén F, Muñoz C, Gómez-Torbio V, Martínez AT y Martínez MJ. 2000. Oxygen activation during oxidation of methoxyhydroquinones by laccase from *Pleurotus eryngii*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 170-175.
- Guinberteau J. 1990. Definition and taxonomical place of the genus *Pleurotus* in the mushrooms classification. *Bulletin de la Federation Nationale des Syndicats Agricoles de Cultivateurs de Champignons* (Francia) 48: 261-264.

- Guzmán, G., G. Mata., Salmones, D., Soto-Velasco, C y Guzmán-Dávalos, L. (1993). El cultivo de hongos comestibles. México D.F: IPN, 1-13.
- Havtani N. y Méés I. (2002). Effects of the nutrient composition on dye decoloration, and extracelular enzyme production by *Lentinula edodes* on solid medium. *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 381-386.
- Hardin IR, Cao H, Wilson SS y Akin DE. 2000. Decolourisation of textile wastewater by selective fungi. *AATCC Review* 32 (11): 38-42.
- 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.
- Hublik G. y Schinner F. 2000. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. *Enzyme and Microbial Technology* 27: 330-336.
- Hunolstein CV, Valenti P, Visca P, Antonini G, Nicolini L. y Orsi N. 1986. Production of laccase A ad B by a mutant strain of *Trametes versicolor*. *Journal of Genetic and Applied Microbiology* 32:185-191.
- Jaroz-Wilkolazka A, Kochmanska-Rdest J, Malaerczyk E, Wardas W, y Leonowicz A. 2002. Fungi and their ability to decolorize azo and antraquinonic dyes. *Enzyme and Mycrobial Technology* 30: 556-572.
- Jolivalt C, Raynal A, Caminade E, Kokel B, Le Goffic F. y Mougin C. 1999. Transformation of N',N'-dimethyl-N=(hydroxyphenyl)ureas by laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51: 676-681.
- 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.
- Karlsson S, Holmbom B, Spetz P, Mustranta A y Buchert J. 2001. Reactivity of *Trametes* laccases with fatty and resin acids. *Applied Microbial and Biotechnology* 55: 317-320.

- Kiiskinen L-L, Viikari L y Kruus K. 2002. Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. *Applied Microbiology Biotechnology* 59: 198-204.
- Kim SJ y Shoda M. 1999. Purification and characterization of a novel peroxidase from *Geotrichum candidum*. Dec. Involved in decolourization of dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1029-1035.
- Kirk-Kent T y Cullen D. 1998. Enzymology and molecular genetic of wood degradation by white-rot fungi. En Environmentally Friendly Technologies for Pulp and Paper Industry. Young A y Akhtar M (eds.). John Wiley y Sons, Inc. New York. 273-307.
- Klonowska A, Gaudin C, Fournel A, Asso M, Le Petit J, Giorgi M y Tron T. 2002. Characterization of a low redox potential laccase from the basidiomycete C30. *European Journal Biochemical* 269: 6119-6125.
- Knapp JS, Newby PS y Reece LP. 1995. Decoloration of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 17: 664-668.
- Kofujita H, Ohta T, Asada Y y Kuwahara M. 1991. Purification and characterization of laccase from *Lentinus edodes*. *Mokuzai Gakkaishi* 37: 562-569.
- Koroljova- Skorobogat'ko VO, Stepanova VE, Gavrilova PV, Morozova VO, Lubimova V. N, Dzchafarova NA, Jarapolov IA y Makower A. 1998. Purification y characterization of the constitutive form of a laccase from the basidiomycete *Coriolus hirsutus* and effect of inducers on laccase synthesis. *Biotechnology Applied Biochemistry* 28: 47-54.
- Laborde J. 1896. Sur lacasse des vins. *CR Hebd Seances Acad Sci* 123: 1074-1075.
- Leammli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Leonowicz A, Matuszawska A, Luterek J, Ziegenhagen D, Wojtaś- Wasilewska M, Cho N, Hofricter M y Rogalski J. 1999. Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology* 27: 175-185.
- Li K, Xu F y Eriksson LK. 1999. Comparison of fungal laccase and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2654-2660.

- Mansur M, Suárez T, Fernández-Larrea J, Brisuela M y González A. 1997. Identification of a laccase gene family in the new lignin-degrading basidiomycete CECT 20197. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2637-2646.
- Mata G y Salmones. 2003. Edible mushroom cultivation at the Institute of Ecology in Mexico. *Micología Aplicada International* 15:23-29.
- Mata G, Murrieta-Hernández DM e Iglesias-Andreu LG. 2004. Changes in lignocellulolytic enzymes activities in six *Pleurotus* spp. Strain cultivated on coffee pulp in confrontation with *Trichoderma* spp. *World Journal of Microbiology y Biotechnology* 00: 1-8.
- Miller G. 1959. Use of Dinitrosalicilic acid for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31(3): 426-428.
- Moreira M.T, Feijoo G, Sierra-Alvarez R y Field J.A. 1999. Reevaluation of the manganese requirement for the biobleaching of kraft pulp by white rot fungi. *Bioresource Technology* 70: 255-260.
- Mouso N, Papinutti L, Forchiassin F. 2003. Efecto combinado del cobre y pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de lacasa y manganeso peroxidasa por *Stereum hirsutum* (Wild) Pers. *Rev.Iberoam Micol* 20;176-178.
- Muñoz C, Guillén F, Martínez AT y Martínez MJ. 1997. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mg^{2+} oxidation. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2166-2174.
- Nagai M, Sato T, Watanabe H, Saito K, Kawata M y Enei H. 2002. Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60: 327-335.
- Nyanhongo G. S., Gomes J., Gübitz G. M., Zvauya R. y Steiner W. (2002). Decoloration of textile dyes by laccase from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Water Research* 36: 1449-1456.
- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Scaloni A, Capasso A y Sannia G. 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biological Chemistry* 272: 31301-31307.

- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Fontanella B y Sannia G. 2000. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 920-924.
- Palmieri G, Cennamo G, Faraco V, Amoresano A, Sannia G y Giardina P. 2003. Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 220-230.
- Palonen H, Saloheimo M, Viikari L y Kruus K. 2003. Purification, characterization and sequence analysis of a laccase from the ascomycete *Mauginiella* sp. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 854-862.
- Pereira G, Herrera J, Machuca A, Sánchez M. 2007 Effect of pH on the in vitro growth of ectomycorrhizal fungi collected from *Pinus radiata* plantations *Applied and Environmental Microbiology* 28(3): 215-219
- Pert B y Jira G. 2001. Cooper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiology Letters* 206: 69-74.
- Pointing SB. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology Biotechnology* 57: 20-33.
- Ranocha P, McDougall G, Hawkins S, Sterjiades R, Borderies G, Stewart D, Cabanes-Macheteau M., Boudet AM y Goffner D. 1999. Biochemical characterization molecular cloning and expression of laccase –a divergent gene family- in poplar. *European Journal Biochemical* 259: 485-495.
- Rigling D y Van Alfen N. 1993. Extra-intracellular laccase of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 3634-3639.
- Saito T, Hong P, Kato K, Okazaki M, Inagaki H, Maeda S y Yokogawa Y. 2003. Purification and characterization of an extracellular laccase of a fungus (family Chaetomiaceae) isolated from soil. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 520-526.
- Saloheimo M, Niku-Paavola ML y Knowlws JKC. 1991. Isolation and structural analysis of the laccase gene lignin-degrading fungus *Phlebia radiate*. *Journal of General Microbiology* 137:1537-1544.

- Sánchez C. y Viniegra-González G. 1996. Detection of highly productive strains of *Pleurotus ostreatus* by their tolerance to 2-deoxy-D-glucose in starch-based media. *Mycological Research*. 100: 455-461.
- Sánchez C. 2004. Modern aspects of mushroom culture technology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64:756-762.
- Saparrat CNM, Guillén F, Arambarri MA, Martínez T y Martínez MJ. 2002. Induction, isolation and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. *Applied and Environmental Microbiology* 68(4):1534-1540.
- Savoie JM y Mata G. 2003. *Trichoderma harzianum* metabolites preadapt mushrooms to *Trichoderma aggressivum* antagonism. *Mycologia* 95: 191-199.
- Schwarze F, Engels J y Mattheck C. 2000. Fundamental aspects. En *Fungal strategies of wood decay in trees*. Springer. 5-31.
- Sethuraman A, Akin D y Eroksson E. 1999. Production of ligninolytic enzymes and synthetic lignin mineralization by the bird's nest fungus *Cyathus stercoreus*. *Applied Microbiology Biotechnology* 52: 689-697.
- Shicheng C, Dengbo M, Wei G y Buswell J. 2003. Induction of laccase activity in the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *FEMS Microbiology Letters* 218: 143-148.
- Tavares A, Cohelo M, Agapito M, Coutinho J and Xavier A. 2006. Optimization and modeling of laccase production by *Trametes versicolor* in a bioreactor using statistical experimental design. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 134 (3): 233-248.
- Tellez-Tellez M, Sanchez C, Loera O and Diaz-Godinez G. 2005 Differential patterns of constitutive intracellular laccases of the vegetative phase of *Pleurotus* species. *Biotechnology Letters* 27(18):1391-1394.
- Téllez-Téllez M, Fernández FJ, Montiel-González AM, Sánchez C y Díaz-Godínez G. 2008. Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81:675-679.
- Thurston CF. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140: 19-26.

- Tinoco, R., Pickard, A. M. 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. (2003). Effect of the initial concentration of glucose or sucrose on exopolygalacturonase production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. *Chimica Oggi/Chemistry Today*.
- Tlecuitl-Beristain S. 2005. Purificación y caracterización parcial de una enzima lacasa extracelular de *Pleurotus ostreatus*. *Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas*. Universidad Autónoma de Tlaxcala. México.
- Tlecuitl-Beristain S, Sánchez C, Loera O, Robson GD y Díaz-Godínez G. 2008. Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: production of a novel laccase isoform. *Mycological Research* 112:1080-1084.
- Viniegra-González, G., Favela-Torres. E., Aguilar, N.C., Romero-Gómez, SJ, 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.
- Wilkolazka AJ, Kochmanska-Rdest J, Malarczyk E, Wardas W y Leonowicz A. 2002. Fungi and their ability to decolourize azo and anthraquinonic dyes. *Enzyme and Microbial Technology* 30:566-572.
- Wong Y y Yu J. 1999. Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Elsevier Science*, vol. 33, No. 16: 3512-3520
- Yoshida, H. (1883) *J. Chem. Soc. (Tokyo)* 43, 472-486
- Zawadi A. Chipeta, James C. du Preez and Lew Christopher. 2008. Effect of cultivation pH and agitation rate on growth and xylanase production by *Aspergillus oryzae* in spent sulphite liquor *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology Official Journal of the Society for Industrial Microbiology*. Original paper.