



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

PATRONES DE LACASAS DE *Pleurotus ostreatus* DESARROLLADO EN FERMENTACIÓN SUMERGIDA A DIFERENTES pH DEL MEDIO DE CULTIVO

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

M. en B. Rubén Díaz Godínez

Director de tesis:

Dr. Jorge Soriano Santos

Dr. Gerardo Díaz Godínez

Asesores:

Dra. María del Carmen Sánchez Hernández

Dra. Martha Dolores Bibbins Martínez

Septiembre 2013

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466”

RUBÉN DÍAZ GODÍNEZ recibió una beca para estudios de Doctorado por CONACYT con número de registro 240848.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Planta Piloto No. 1 “Nutracéuticos y Alimentos Funcionales” del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, en el laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada IPN y en el laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

México D.F. a 04 de septiembre del 2013

**El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis**

**PATRONES DE LACASAS DE *Pleurotus ostreatus* DESARROLLADO EN
FERMENTACIÓN SUMERGIDA A DIFERENTES pH DEL MEDIO DE CULTIVO**

Que presentó

RUBÉN DÍAZ GODÍNEZ

Comité Tutorial:

Director: Dr. Jorge Soriano Santos
Dr. Gerardo Díaz Godínez
Asesor: Dra. María del Carmen Sánchez Hernández
Asesor: Dra. Martha Dolores Bibbins Martínez

Jurado:

Presidente: Dr. Octavio Loera Corral

Secretario: Dra. Martha Dolores Bibbins Martínez

Vocal: Dra. María del Carmen Sánchez Hernández

Vocal: Dra. Maura Téllez Téllez



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 0024
México 20080111

PATRONES DE LACARAS III
Pleurotus ostreatus
DESARROLLADO EN FERMENTACION
SUBMERGIDA A DIFERENTES pH
DEL MEDIO DE CULTIVO

En México, D.F., se presentaron a las 11:00 horas del día 4 del mes de septiembre del año 2011 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana. Los suscritos miembros del jurado:

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL
DRA. MARIA DEL CARMEN SANCHEZ HERNANDEZ
DRA. MAURA TELLEZ TELLEZ
DRA. MARTHA DOLORES BIBBINS MARTINEZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Aceptación Pública, se recibió a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

DR. RUBEN DIAZ GODINEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue reada la protesta.



RUBEN DIAZ GODINEZ
ALUMNO



LIC. JULIO CESAR DE LANZA SASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES



DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS

DR. RUBEN ROMAN RAMOS



PRESIDENTE

DR. ULISES TUERK LUJAN



VOCAL

DRA. MARIA DEL CARMEN SANCHEZ
HERNANDEZ



VOCAL

DRA. MAURA TELLEZ TELLEZ



SECRETARIA

DRA. MARTHA DOLORES BIBBINS
MARTINEZ

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de tesis es resultado de un esfuerzo de varias personas que colaboraron leyendo, opinando, corrigiendo y dándome su apoyo en todo momento.

De manera especial a los directores del presente trabajo, por su apoyo, paciencia y sus grandes conocimientos que fortalecieron los resultados y que cada uno me dio, Dr. Jorge Soriano Santos gracias por confiar en mi durante todo el tiempo que duró el posgrado y sus aportaciones. Al Dr. Gerardo Díaz Godínez por su invaluable ayuda como hermano y gran investigador que me alentó durante todo este tiempo y hasta hoy.

A la Dra. Martha Dolores Bibbins Martínez y la Dra. María del Carmen Sánchez Hernández, quienes con sus siempre acertados comentarios y aportaciones, se logró obtener los resultados de este trabajo.

A la Dra. Maura Téllez Téllez quien tuvo la paciencia al momento de transmitirme sus grandes conocimientos en la parte molecular.

A la Universidad Autónoma Metropolitana que me permitió realizar en sus instalaciones parte de la investigación de esta tesis.

Al Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA-IPN), lugar donde realicé parte de la investigación de este trabajo y donde siempre he recibido una excelente disposición y apoyo.

A la Universidad Autónoma de Tlaxcala, institución que me ha permitido un crecimiento profesional y académico integral y que espero retribuir con dignidad y excelente calidad como académico e investigador.

Al Dr. Serafín Ortiz Ortiz, quien en su momento como Rector de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, autorizó mi ingreso a esta máxima casa de estudios y quien dio la todas las facilidades para que cumpliera con mis actividades académicas y emprendiera mi travesía en el posgrado.

Al Dr. Víctor Job Paredes Cuahquentzi, actual Rector de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, quien ha dado toda la apertura para el crecimiento profesional de los investigadores y de quien siempre se ha recibido un gran apoyo.

A la Mtra. Dora Juárez Ortiz, quien en su calidad de Secretaria de Investigación y posgrado, me brindó su apoyo todo este tiempo y quien depositó su confianza en mí.

Al Dr. Armando García Téllez, que en su momento como Coordinador general del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas me permitió continuar con mi preparación académica y que además me ha brindado su amistad y apoyo en momentos difíciles de índole personal.

Al Dr. Arturo Estrada Torres, quien en calidad de Coordinador general del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas ha tenido la apertura mostrando apoyo a los integrantes de dicho centro laboral y me permitió concluir esta etapa de mi desarrollo personal.

RESUMEN

Se evaluó el efecto del pH (3.5, 4.5, 6.5 y 8.5) del medio de cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus* sobre la actividad y el perfil zimográfico (intra- y extra-celular) de lacasas, así como sobre los perfiles de expresión de cinco genes de lacasas (*lacc* 1, 4, 6, 9 y 10). Se utilizó un medio de cultivo líquido con glucosa, extracto de levadura y sales minerales (cobre como inductor). Se usó 2,6-dimetoxifenol como sustrato y se incubó en soluciones buffer a los diferentes pH para determinar la actividad de las lacasas por espectrofotometría y por zimografía de cada fermentación. La máxima actividad de lacasas extracelular fue de 77550 U/L a pH de 4.5 cuando el hongo se desarrolló a ese pH. En las fermentaciones a pH de 3.5 y 6.5 se obtuvieron valores de 29490 U/L y 25000 U/L a pH de 4.5 y 3.5, respectivamente. La actividad intracelular mostró los valores máximos en las fermentaciones de pH de 4.5 y 6.5 (4800 y 1741 U/g de biomasa seca, respectivamente) incubados a pH de 4.5 y 6.5 respectivamente. En los zimogramas, la fermentación de pH de 3.5 mostró 3 isoenzimas cuando se incubó a pH de 6.5, y 2 isoenzimas en los otros pH; se observaron 3 isoenzimas en la fermentación de pH 4.5 cuando el zimograma se incubó a pH 4.5, 6.5 y 8.5. Cuatro isoenzimas se observaron en la fermentación a pH 6.5 incubado al mismo pH, 3 isoenzimas en esta misma fermentación cuando se incubó a pH de 4.5 y 8.5. A pH de 8.5 se observó una isoenzima cuando se incubó en todos los pH evaluados. En los extractos intracelulares, se observaron 3 isoenzimas en las fermentaciones de 3.5 y 4.5 cuando se incubaron a pH de 8.5, 6.5 y 8.5 y 2 isoenzimas en la fermentación de pH de 6.5 en todos los pH de incubación. En relación al patrón de expresión de los genes de lacasa analizados, se observaron diferencias en el tiempo y nivel de expresión de los 5 genes (*lacc* 1, 4, 6, 9 y 10). *lacc* 9 no se expresó en ninguna condición. En la fermentación de pH de 3.5, *lacc* 4, 6 y 10 se expresaron con mayor intensidad. En la fermentación de pH de 4.5 fueron *lacc* 6 y 10. En la fermentación de pH de 6.5, todos los genes mostraron el mismo nivel de expresión aproximadamente. Para la fermentación de pH inicial de desarrollo de 8.5,

lacc 1, 4 y 6 tuvieron mayor expresión. Se observó que el pH de desarrollo del hongo es un factor que modifica el patrón de producción y expresión de las lacasas.

ABSTRACT

The effect of pH (3.5, 4.5, 6.5 and 8.5) of the culture medium of *Pleurotus ostreatus* on laccases activity and zymogram profile (intra-and extra-cellular), as well as on the expression profiles of five laccase genes (lacc 1, 4, 6, 9 and 10) was evaluated. A liquid culture medium containing glucose, yeast extract and mineral salts (including copper inductor) was used. Laccase activity was evaluated at different pH (3.5, 4.5, 6.5 and 8.5) using 2,6-dimethoxyphenol as substrate. The maximum extracellular laccase activity was 77550 U/L at pH 4.5 when the fungus was developed at pH mentioned above. In fermentations at pH 3.5 and 6.5, the laccases activities incubated at pH 4.5 and 3.5 were 29490 and 25000 U/L, respectively. Intracellular activity showed the maximum values in fermentation of 4.5 and 6.5 when were incubated at pH 4.5 and 6.5 (4800 and 1741 U/g dry biomass, respectively). In zymograms, fermentation at pH 3.5 showed three isoforms when was incubated at pH 6.5, and 2 isoforms in the others pH evaluated, three isoforms were observed in fermentation at pH 4.5 when was incubated at pH 4.5, 6.5 and 8.5. Four isoforms were observed in the fermentation at pH 6.5 incubated at the same pH, and 3 isoforms in above fermentation when was incubated at pH 4.5 and 8.5. Only one isoform was observed at pH of 8.5 when was incubated at all pH tested. In intracellular extracts were observed three isoforms in fermentations at 3.5 and 4.5 when were incubated at pH 8.5, 6.5 and 8.5 and two isoforms in the fermentation at pH of 6.5 in all pH of incubation. Differences were observed at level and time of expression of 5 genes (lacc 1, 4, 6, 9 and 10) evaluated. *lacc 9* was not expressed in any condition. In the fermentation at pH 3.5, *lacc 4*, 6 and 10 were expressed with greater intensity. In the fermentation at pH 4.5, *lacc 6* and 10 were expressed with greater intensity. In the fermentation at pH 6.5, all genes showed approximately the same level of expression. For fermentation at pH 8.5, *lacc 1*, 4 and 6 showed the higher expression. In this study, was observed that the pH of development of the fungus is a factor that modifies the patterns of expression and production of the laccases.

ABREVIATURAS

%	Porcentaje
μ	Velocidad específica de crecimiento
μg	Microgramo
μM	Micromolar
ABTS	2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfúrico)
Ala	Alanina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
ATCC	American Type Culture Collection
pb	Pares de bases
CHEF	electroforesis de campo eléctrico homogéneo
Col	Colaboradores
cDNA	ADN complementario
DMP	2,6-dimetoxifenol
DNA	ácido desoxirribonucleico
dT	Oligonucleótidos desoxitimina
DTT	Di-tiotreitol
E	Actividad enzimática de lacasa
EE	Extracto crudo enzimático
E_{max}	Actividad enzimática de lacasas máxima
FL	Fermentación en medio líquido
FS	Fermentación en medio sólido
Fw	Forward
g	Gramo
g/L	Gramos con respecto a litros
g/mL	Gramos con respecto a mililitros
Glu	Ácido glutámico
<i>gpd</i>	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
gX	Gramos de biomasa
h	Hora
h^{-1}	Hora a la menos 1

kDa	Kilo Dalton
Kg	Kilogramo
m ²	Metro cuadrado
Km	Constante de Michaelis-Mentel
L	Litros
Lip	Lignina peroxidasas
M	Molar
MCO	Multicobre azul oxidasas
min	Minutos
ml	Mililitros
μl	Micro litro
mM	Milimolar
mm	Milímetros
mmol	Milimol
Mn(II)	Manganeso II
Mn(III)	Manganeso III
MnP	Manganeso peroxidasas
Mpb	Mega pares de bases
M-MuLV	Moloney murine Leukemia virus
mRNA	ARN mensajero
N	Normalidad
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanómetro
°C	Grados Celsius
OD	Densidad óptica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis de campo pulsado
pH	Potencial de hidrogeno
pI	Punto isoeléctrico
PM	Peso Molecular
P _{RO}	Máximo de actividad
PUF	Espuma de poliuretano

q_p	tasa específica de formación de la enzima
Rbbr	Remazol brillant blue R
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RT	transcriptasa inversa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida y Dodecil Sulfato de Sodio
sp	Especie
U	Unidad de actividad de lacasa
UI	Unidad Enzimática Internacional
mL	Mililitros
V_{max}	Velocidad máxima de la enzima
X	Biomasa
X_{max}	Biomasa máxima
$Y_{E/X}$	Rendimiento de lacasa con respecto a biomasa
$Y_{X/S}$	Rendimiento de biomasa con respecto a sustrato
$\Delta Abs/min$	Absorbencia por minuto

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	20
1.1.	Género <i>Pleurotus</i>	21
1.2.	Enzimas lacasas	23
1.2.1.	Usos de las enzimas lacasa	25
1.3.	Fermentación	26
1.3.1	Fermentación sólida y sumergida	27
1.4.	Genoma en basidiomicetes	28
1.4.1.	Secuencia de lacasas	29
2.	ANTECEDENTES	31
3.	JUSTIFICACIÓN	43
4.	HIPÓTESIS	43
5.	OBJETIVOS	44
5.1.	OBJETIVO GENERAL	44
5.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
6.	METODOLOGÍA	45
6.1.	Cepa e inóculo	46
6.2.	Condiciones de cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i>	46
6.3.	Obtención del extracto enzimático	46
6.4.	Biomasa y parámetros cinéticos de crecimiento del hongo	47
6.5.	Determinación de proteína soluble	47
6.6.	Determinación de la actividad enzimática	48
6.7.	Identificación de isoenzimas de lacasa	48
6.8.	Expresión de genes de lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> desarrollado en diferentes pH por RT-PCR	48
6.8.1.	Diseño de cebadores	48

6.9.	Expresión de genes de lacasas en diferentes tiempos de fermentación sumergida	49
6.10.	Electroforesis en geles con formaldehído	49
7.	RESULTADOS	50
7.1.	Fermentación sumergida a pH inicial de desarrollo de 3.5	50
6.1.2.	Biomasa	50
6.1.3.	Actividad de lacasa extracelular de la fermentación sumergida a pH inicial de 3.5	51
6.1.4.	Actividad de lacasa Intracelular de la fermentación sumergida a pH inicial de 3.5	51
6.1.5.	Perfil de pH de la fermentación sumergida a pH inicial de 3.5 de desarrollo.	52
6.1.6.	Isoenzimas de lacasas extracelulares de <i>Pleurotus ostreatus</i> obtenidas por fermentación sumergida a pH inicial de desarrollo de 3.5	53
6.1.7.	Isoenzimas de lacasas intracelulares de <i>Pleurotus ostreatus</i> obtenidas por fermentación sumergida a pH inicial de desarrollo de 3.5	56
7.2.	Fermentación sumergida a pH inicial de desarrollo de 4.5	61
7.2.1.	Biomasa	61
7.2.2.	Actividad de lacasa extracelular de la fermentación sumergida de pH inicial de desarrollo de 4.5	61
7.2.3.	Actividad de lacasa intracelular de la fermentación sumergida de pH inicial de desarrollo de 4.5	62
7.2.4.	Perfil de pH de la fermentación sumergida a pH inicial de 4.5 de desarrollo.	63
7.2.5.	Isoenzimas de lacasas extracelulares de <i>Pleurotus ostreatus</i> obtenidas por fermentación sumergida a pH inicial de desarrollo de 4.5	64
7.2.6.	Isoenzimas de lacasas intracelulares de <i>Pleurotus ostreatus</i> obtenidas por fermentación sumergida a pH inicial de desarrollo de 4.5	68
7.3.	Fermentación a pH de desarrollo de 6.5	73
7.3.1.	Biomasa	73
7.3.2.	Actividad de lacasa extracelular	74
7.3.3.	Actividad de lacasa intracelular	75
7.3.4.	Perfil de pH de la fermentación sumergida a pH inicial de 6.5 de desarrollo.	76
7.3.5.	Determinación de número de isoenzimas de lacasas extracelulares de la fermentación sumergida de <i>Pleurotus ostreatus</i> desarrollado a pH inicial de 6.5	77
7.3.6.	Determinación de número de isoenzimas intracelulares de lacasas de la fermentación sumergida a pH inicial de desarrollo de 6.5	80
7.4.	Fermentación a pH de desarrollo de 8.5	85

7.4.1.	Biomasa	85
7.4.2.	Actividad de lacasa extracelular	85
7.4.3.	Actividad de lacasa intracelular	86
7.4.4.	Perfil de pH de la fermentación sumergida a pH inicial de 8.5 de desarrollo.	87
7.4.5.	Determinación de número de isoenzimas de lacasas extracelulares de la fermentación sumergida de <i>Pleurotus ostreatus</i> desarrollado a pH inicial de 8.5	88
7.4.6.	Determinación de número de isoenzimas intracelulares de lacasas de la fermentación sumergida a pH inicial de desarrollo de 8.5	91
7.5.	Perfiles de expresión de genes de lacasas	95
7.5.1	Diseño de cebadores	95
7.5.2	Perfil de expresión la lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> desarrollado en fermentación sumergida a pH inicial de 3.5, 4.5, 6.5 y 8.5	96
7.6.	Parámetros cinéticos de crecimiento y producción de lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i>	100
8.	DISCUSION	102
9.	CONCLUSIÓN	111
10.	BIBLIOGRAFÍA	112

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Centros de cobre de lacasas de <i>B. subtilis</i>	24
Figura 2. Comparación de las secuencias de lacasas y de loops de unión del sustrato de las lacasas con estructura tridimensional disponible.	30
Figura 3. Ciclo catalítico de lacasas mostrando el mecanismo de reducción y oxidación de los sitios de cobre.	30
Figura 4. Metodología para el desarrollo de esta investigación.	45
Figura 5. Cinética de crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación a pH 3.5 inicial de desarrollo.	50
Figura 6. Actividad extracelular de lacasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> obtenidas por fermentación a pH de 3.5 inicial de desarrollo, evaluada en solución buffer a pH de 3.5, 4.5, 6.5 y 8.5 .	51
Figura 7. Actividad intracelular de lacasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> obtenidas por fermentación sumergida a pH de 3.5 inicial de desarrollo, evaluada en solución buffer a pH de 3.5 (◆), 4.5 (■), 6.5 (▲) y 8.5 (●).	52
Figura 8. Perfil de pH de la fermentación sumergida de <i>Pleurotus ostreatus</i> a pH inicial de desarrollo de 3.5	53
Figura 9. Zimograma de lacasas extracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 3.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> Incubado en solución buffer a pH 3.5.	54
Figura 10. Zimograma de lacasa extracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 3.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 4.5.	54
Figura 11. Zimograma de lacasas extracelulares de la fermentación de pH inicial de 3.5 de desarrollo de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 6.5.	55
Figura 12. Zimograma de lacasas extracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 3.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 8.5.	56
Figura 13. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de 3.5 de desarrollo de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 3.5.	57
Figura 14. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 3.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 3.5.	57
Figura 15. Zimograma de lacasa intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 3.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 4.5.	58
Figura 16. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 3.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 4.5.	58
Figura 17. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 3.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 6.5.	59
Figura 18. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 3.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 6.5.	59

Figura 19. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 3.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 8.5.	60
Figura 20. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 3.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 8.5.	60
Figura 21. Cinética de crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación sumergida a pH inicial de desarrollo de 4.5.	61
Figura 22. Actividad de lacasas extracelular de <i>Pleurotus ostreatus</i> obtenidas por fermentación a pH inicial de desarrollo de 4.5, incubada en solución buffer a pH de 3.5, 4.5, 6.5 y 8.5.	62
Figura 23. Actividad intracelular 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.	63
Figura 24. Perfil de pH de la fermentación sumergida de <i>Pleurotus ostreatus</i> a pH inicial de desarrollo de 4.5	64
Figura 25. Zimograma de lacasas extracelulares de la fermentación de <i>Pleurotus ostreatus</i> a pH inicial de desarrollo de 4.5. Incubado en solución buffer a pH 3.5.	65
Figura 26. Zimograma de lacasas extracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 4.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 4.5.	66
Figura 27. Zimograma de lacasas extracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 4.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 6.5.	67
Figura 28. Zimograma de lacasas extracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 4.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 8.5.	68
Figura 29. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 4.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 3.5.	69
Figura 30. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 4.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 3.5.	69
Figura 31. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 4.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 4.5.	70
Figura 32. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 4.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 4.5.	70
Figura 33. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 4.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 6.5.	71
Figura 34. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 4.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 6.5.	72
Figura 35. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 4.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 8.5.	72
Figura 36. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 4.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 8.5.	73

Figura 37. Cinética de crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación a pH inicial de desarrollo de 6.5.	74
Figura 38. 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.	75
Figura 39. Actividad intracelular 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.	76
Figura 40. Perfil de pH de la fermentación sumergida de <i>Pleurotus ostreatus</i> a pH inicial de desarrollo de 6.5	77
Figura 41. Zimograma de lacasas extracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 6.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 3.5.	78
Figura 42. Zimograma de lacasas extracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 6.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubada en solución buffer a pH 4.5.	78
Figura 43. Zimograma de lacasas extracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 6.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH de 6.5.	79
Figura 44. Zimograma de lacasas extracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 6.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH de 8.5.	80
Figura 45. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 6.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 3.5.	81
Figura 46. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 6.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 3.5.	81
Figura 47. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 6.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 4.5.	82
Figura 48. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 6.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 4.5.	83
Figura 49. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 6.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 6.5.	83
Figura 50. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 6.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 6.5.	84
Figura 51. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 6.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 8.5.	84
Figura 52. Cinética de crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación a pH inicial de desarrollo de 8.5.	85
Figura 53. Actividad de lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> obtenidas por fermentación a pH de 8.5 inicial de desarrollo, evaluada a pH de 3.5, 4.5, 6.5 y 8.5.	86
Figura 54. Actividad intracelular de lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> obtenidas por fermentación a pH de 8.5 inicial de desarrollo, evaluada a pH de 3.5, 4.5, 6.5 y 8.5.	87

Figura 55. Perfil de pH de la fermentación sumergida de <i>Pleurotus ostreatus</i> a pH inicial de desarrollo de 8.5	88
Figura 56. Zimograma de lacasas extracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 8.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 3.5.	89
Figura 57. Zimograma de lacasas extracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 8.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 4.5.	89
Figura 58. Zimograma de lacasas extracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 8.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 6.5.	90
Figura 59. Zimograma de lacasas extracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 8.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 8.5.	91
Figura 60. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 8.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 3.5.	92
Figura 61. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 8.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 3.5.	92
Figura 62. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 8.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 4.5.	93
Figura 63. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 8.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 6.5.	94
Figura 64. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 8.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 6.5.	94
Figura 65. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 8.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Incubado en solución buffer a pH 8.5.	95
Figura 66. Perfil de expresión de genes de lacasa y <i>gpd</i> durante la fermentación sumergida de pH inicial de desarrollo de 3.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	97
Figura 67. Perfil de expresión de genes de lacasa y <i>gpd</i> de la fermentación sumergida de pH inicial de desarrollo de 4.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	98
Figura 68. Perfil de expresión de genes de lacasa y <i>gpd</i> de la fermentación sumergida de pH inicial de desarrollo de 6.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	99
Figura 69. Perfil de expresión de genes de lacasa y <i>gpd</i> de la fermentación sumergida de pH inicial de desarrollo de 8.5 de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características del cariotipo de <i>Pleurotus</i> spp.	29
Tabla 2. Genes de lacasas reportadas en el Gene bank (nombres de genes previamente reportados por otros autores en paréntesis).	42
Tabla 3. Composición del medio de cultivo.....	46
Tabla 4. Cebadores de genes de lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i>	96
Tabla 5. Concentración de RNA obtenido del micelio de <i>Pleurotus ostreatus</i> de cada fermentación.....	96
Tabla 6. Comparativo de datos cinéticos de las fermentaciones a diferente pH inicial de desarrollo de <i>Pleurotus ostreatus</i>	100
Tabla 7. Comparativo de isoenzimas extracelulares de lacasa obtenidas por fermentación sumergida de <i>Pleurotus ostreatus</i>	101
Tabla 8. Comparativo de isoenzimas intracelulares de lacasa obtenidas por fermentación sumergida de <i>Pleurotus ostreatus</i>	101

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos se han considerado como el alimento ideal, debido a su contenido de nutrientes para humanos y animales. *Pleurotus* spp. es un hongo comestible de gran importancia y el cultivo de este hongos presenta grandes ventajas, como son el rápido crecimiento micelial, gran capacidad de colonización saprófita, técnica de cultivo sencillo y económico, pudiendo crecer en diferentes condiciones climáticas. Se desarrolla sobre desechos agroindustriales por lo que es una alternativa de conservación del ambiente (mediante el cultivo de hongos se reciclan desechos de tipo lignocelulósico). Este hongo es apreciado por sus características organolépticas y por su calidad nutrimental; el porcentaje de proteína en peso seco se ha reportado entre 10-30%, el de carbohidratos entre 14-57%, el contenido de lípidos, principalmente insaturados, es del 3-5%. También se ha reportado que contienen zinc, cobre, magnesio y fósforo, y se ha encontrado hierro, manganeso, potasio, calcio, aluminio y sodio, en pequeñas cantidades (Breene, 1990).

Se ha reportado que los hongos del género *Pleurotus* muestran elevadas capacidades de producción de enzimas lacasas y con un alto valor nutricional, propiedades terapéuticas y variadas aplicaciones biotecnológicas en las que destacan, la actividad hematológicas, antiviral, antitumorales, antibiótico, antibacteriano, hipocolesterolemicas y actividades de inmunomodulación (Cohen y col., 2002). La producción de carpóforos de estos hongos se producen con relativa facilidad sobre sustratos lignocelulósicos como es la paja de trigo, de cebada, de sorgo, zacate de maíz, etc, (Sánchez, 2004). Uno de los aspectos más importantes de *Pleurotus* spp. es relacionado con el empleo de su sistema ligninolítico para una gran variedad de usos, como la bioconversión de desechos agrícolas en productos valiosos para productos alimenticios y el empleo de sus enzimas ligninolíticas para la biodegradación de contaminantes orgánicos, xenobioticos y contaminantes industriales (Cohen y col., 2002). Sin embargo, para producir metabolitos como es el caso de enzimas, el mejor sistema es por fermentación en medio sólido.

Las lacasas son de las pocas enzimas que han sido estudiadas desde el siglo XIX. Inicialmente se obtuvieron del exudado del árbol Japonés lacquer (*Rhus vernicifera*) y descritas por Yoshida en 1883. Posteriormente Bertrand (1896) y Laborde (1896) demostraron por primera vez la actividad de lacasas en hongos, éstas enzimas requieren

cobre y oxígeno para oxidar fenoles, polifenoles, aminas 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).

La función fisiológica de estas enzimas no ha sido comprendida totalmente; se ha reportado que en plantas, las lacasas participan en la lignificación y en hongos en la morfogénesis (formación de esporas, de pigmentos de los cuerpos fructíferos), patogénesis, virulencia y degradación de lignina, pero también se ha reportado actividad de lacasas en algunos insectos y bacterias (Galhaup y col., 2002), aunque pocas de estas funciones han sido demostradas experimentalmente. Las lacasas no tienen un sustrato específico, por lo que pueden transformar y algunas veces mineralizar por completo gran variedad de contaminantes ambientales (Wilkołazka y col., 2002), así como degradar compuestos no fenólicos en presencia de mediadores redox apropiados.

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 de la pulpa de papel, degradación de herbicidas, etc.). Por lo tanto, se debe contar con una fuente altamente productora de enzimas con una amplia capacidad de oxidación de diferentes compuestos. Las especies del género *Pleurotus* son organismos de gran interés para la obtención de estas enzimas, debido a que pertenecen a los hongos de pudrición blanca y a la importancia económica que representan por su producción mundial como alimento. Estos hongos producen diferentes isoenzimas de lacasas, al igual que muchos otros hongos de pudrición blanca y se pueden expresar constitutivamente y pueden ser inducibles (Galhaup y col., 2002 y Téllez-Téllez y col., 2008).

1.1. Género *Pleurotus*

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). Dentro de los hongos de pudrición

blanda, se encuentran los Ascomicetos y Deuteromicetos; en el caso de los hongos de pudrición oscura, encontramos a los Basidiomicetos que degradan polímeros como celulosa y hemicelulosa y finalmente los hongos de pudrición blanca, realizada por Basidiomicetos 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), entre los hongos de pudrición blanca, se encuentran los hongos del género *Pleurotus* sp.

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 estípote 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 estípote, 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 y son lisas. (Cohen y col., 2002). Presentan un alto valor nutricional, tienen propiedades terapéuticas y variadas aplicaciones biotecnológicas, principalmente en procesos de biodegradación, ya que produce lacasas, manganeso peroxidadas y veratril alcohol oxidasas, aunque no produce lignina peroxidadas (Palmieri y col., 1997), responsables de la degradación de compuestos fenólicos recalcitrantes como la lignina.

La lignina es un polímero que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y que es de difícil degradación, para lo que se requiere de un complejo enzimático que reconozca los compuestos fenólicos de los que se compone y pueda ser hidrolizado, se mineraliza en un proceso oxidativo aerobio. La degradación de la lignina, no provee de una fuente primaria de carbono y energía para su desarrollo, 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 la lignina por medio del

complejo enzimático de polifenoloxidasas son los hongos de pudrición blanca (Dedeyan y col., 2000).

Los hongos de pudrición blanca producen cambios en la lignina mediante mecanismos oxidativos. El sistema enzimático ligninolítico es poco específico, ya que las peroxidasas y oxidasas 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 peroxidasas, manganeso peroxidasas y lacasas. Ciertos hongos de pudrición blanca producen las tres enzimas, algunos sólo dos y pocos producen una (Kirk y Cullen, 1998).

1.2. Enzimas lacasas

Las enzimas lacasas (p -difenol: oxígeno oxido-reductasas E.C. 1.10.3.2) son glicoproteínas (Heinzkill y col., 1998), su peso molecular oscila entre los 25 y 80 kDa, 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 oxidasas (Claus, 2003). Pueden oxidar fenoles y aminas aromáticas reduciendo el oxígeno molecular a agua. Son metaloglicoproteínas que contienen como cofactor iones de cobre (multi-cobre oxidasas) y requieren para su actividad catalítica un mínimo de cuatro átomos de cobre por cada proteína activa. De los cuatro átomos de cobre presentes en cada proteína se pueden distinguir tres tipos de átomos de cobre según sus propiedades espectroscópicas y paramagnéticas (Claus, 2004), del tipo 1(Cu1) paramagnético “cobre azul”, del tipo 2 (Cu4) paramagnético “cobre no azul” y dos de tipo 3 (Cu2 y Cu3) que son diamagnético emparejados “cobre-cobre”. La figura 1 muestra los centros de cobre de lacasas de *B. subtilis* (Claus, 2004).

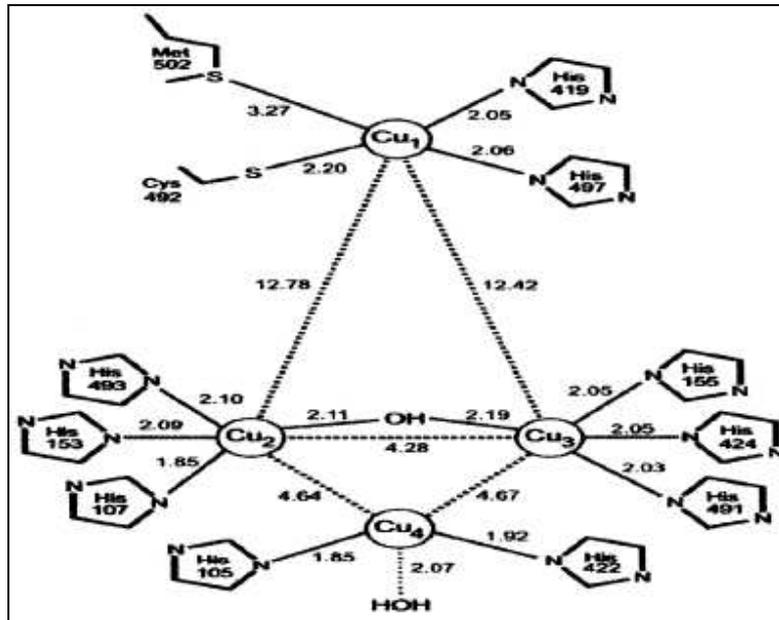


Figura 1. Centros de cobre de lacasas de *B. subtilis* (Claus, 2004)

Son secretadas en múltiples isoenzimas dependiendo de la especie de hongo y de las condiciones de desarrollo (Télez-Télez y col., 2008). La funcionalidad de las lacasas es muy variado dependiendo de la especie de hongo que la produzca, se ha reportado la presencia de una lacasa en *Cryptococcus neoformans*, que le confiere un factor de virulencia por la producción de melanina (Missall y col., 2005), así también, se ha reportado que las lacasas participan en la formación de pigmentos en algunos hongos como *Pycnoporus cinnabarinus* durante la fructificación (Temp y Eggert, 1999), el rol más conocido de las lacasas es la degradación de la madera, para el caso de los hongos de pudrición blanca.

Están presentes en un gran número de basidiomicetes, éstas presentan diferencias además de su peso molecular y el punto isoeléctrico, en el contenido de carbohidratos y características catalíticas, como pH y temperatura óptimos de actividad. Los valores de pH óptimos para la mayoría de las isoenzimas lacasas en otros basidiomicetos y ascomicetos son ácidos. Se ha reportado que las enzimas lacasas son constitutivas e inducibles, dependientes de las condiciones de desarrollo del hongo (Télez-Télez y col., 2008).

1.2.1. Usos de las enzimas lacasa

Hoy en día, muchas enzimas son utilizadas por una gran diversidad de industrias incluyendo la industria textil. Tradicionalmente, se han utilizado enzimas en el proceso de limpieza de las fibras. Actualmente, las enzimas oxidativas, se utilizan en el bioprocesamiento de fibras naturales, mientras que otras son fundamentales en el tratamiento de efluentes derivados de esos procesos (Rodríguez y Toca- Herrera, 2006).

La actividad de las lacasas se ha aprovechado en procesos de biorremediación para oxidar contaminantes similares a sustratos como son los principios activos de: insecticidas, colorantes, herbicidas y fungicidas, entre otros. También se han utilizado en la clarificación del vino, análisis de drogas, blanqueamiento de la pulpa de papel, degradación de herbicidas. Sin embargo, la utilización de estas enzimas depende de tener un buen organismo productor de lacasas con elevadas capacidades catalíticas. Se han realizado estudios de producción de lacasas de diferentes organismos desarrollados principalmente en fermentación sumergida, asimismo, se han probado soportes inertes en un sistema de fermentación sólida para su producción (Rodríguez y Toca-Herrera, 2006).

Las enzimas aplicadas en la industria textil deben producirse a bajo costo, ser estables en rangos amplios de pH y temperatura para el tratamiento de contaminantes. (Campos y col., 2001; Pazarlioglu y col., 2004; Rodríguez y Toca- Herrera, 2006). También estas enzimas son utilizadas en la oxidación de diferentes colorantes utilizados para el teñido de mezclillas. Por otro lado, en procesos de oxidación de muchos compuestos principalmente de naturaleza fenólica; la lacasa presenta una gran especificidad para un gran número de compuestos no biodegradables, por lo cual se empezó a utilizar en tratamientos de efluentes industriales (Campos y col., 2001). Se ha reportado que *Pleurotus ostreatus* produce múltiples isoenzimas de lacasa, seis de las cuales han sido aisladas y caracterizadas (Pezzella y col., 2012).

Dentro del ámbito de biorremediación se han realizado estudios, donde se inocula *Pleurotus tuber-regium* en suelos contaminados con aceite de motor, encontrando que el hongo modifica los contenidos de materia orgánica, potasio, nitrógeno, fósforo, la disponibilidad de carbono y el pH, comparada con el control (Adenipekun y col., 2008).

Por su parte, Minussi y col., (2002) han descrito usos potenciales de las lacasas en la industria alimentaria, tal como tratamientos en el procesado de bebidas y en determinación del ácido ascórbico.

Pleurotus ostreatus tienen especial atención sobre su potencial uso biotecnológico como la biorremediación o su producción de moléculas bioactivas (Faraco y col., 2009; Karas y col., 2011) además de ser considerados como una fuente invaluable de enzimas oxidasas que son obtenidas principalmente por fermentación.

1.3. Fermentación

Según el organismo y sus condiciones de crecimiento, la vía de la glucólisis puede cumplir distintas funciones. En muchos microorganismos que viven en condiciones anaeróbicas, sirve como la principal vía productora de energía por catabolismo de los carbohidratos, lo que da por resultado la formación de productos metabólicos finales específicos, como etanol, ácido láctico y glicerol. Este tipo de proceso suele llamarse fermentación. Existen muchas otras vías de fermentación, cada una de las cuales brinda un producto final específico, pero muchas son variantes o derivaciones de la vía glucolítica. En los animales, la producción de lactato por glucólisis anaeróbica es base de procesos tan importantes como proveer energía para la contracción en el músculo esquelético cuando escasea el oxígeno. En condiciones aeróbicas, las reacciones de glucólisis comprenden la fase inicial de la degradación de carbohidratos, que luego se enlazan con otra serie de reacciones de suma importancia, llamada ciclo del ácido cítrico (Bohinski, 1991).

La fermentación, comúnmente, está considerada como un proceso para la producción de alcohol, sin embargo, se trata de un proceso que comprende un cambio metabólico causado por microorganismos que actúa sobre materiales orgánicos (Bailey y Bailey, 1995) La fermentación es uno de los procesos bioquímicos más antiguos y en la actualidad se sigue usando para la fabricación de bebidas alcohólicas, pan, quesos, fármacos, antibióticos, hormonas, entre otros.

La mayoría de las fermentaciones industriales en la sociedad occidental han utilizado y desarrollado la denominada “fermentación en medio líquido” o “sumergida” (FML). Sin

embargo, existe otra técnica general de fermentación denominada “fermentación en medio sólido” (FMS), que se ha usado tradicionalmente para la manufactura de varios productos como el pozol que se produce en algunas áreas de México por la fermentación del maíz y quesos madurados de tipo Roquefort y Camembert en Francia. En el ámbito industrial se le da aplicación a la FMS para la producción de enzimas de uso en la tecnología de alimentos, diagnóstico clínico, análisis químico y producción de metabolitos como ácidos de gran demanda industrial como el cítrico, gálico, glucónico y algunos antibióticos y proteínas de origen microbiano que tienen función bactericida o bacteriostático (Viniestra-González, 1997).

1.3.1 Fermentación sólida y sumergida

La FMS es un proceso microbiológico que ocurre, en su mayor parte sobre la superficie de un material sólido, éste tiene la propiedad de absorber o contener agua con los nutrientes solubles (Viniestra-González, 1997). El material sólido puede ser biodegradable como el bagazo de caña (Trejo-Hernández y col., 1991; Solis-Pereira y col., 1993; Acuña-Argüelles y col., 1995), la pulpa de café (Antier y col., 1993) y celulosa, entre otros, o inerte como el poliuretano (Romero-Gómez y col., 2000). Uno de los requerimientos para la FMS aerobia, es crecer al microorganismo sobre un soporte impregnado de un medio nutritivo y que no se vea limitado por oxígeno.

La FML o fermentación en estado líquido, incluye una gran variedad de procesos microbiológicos con agitación y sin agitación, donde la biomasa está rodeada completamente por el medio de cultivo líquido. Las principales diferencias entre la FMS y FML son:

- La mezcla y difusión de sustratos y productos con relación a la biomasa, es muy insignificante para la FMS (Viniestra-González, 1997).
- La solubilidad y difusión de oxígeno y otros gases no polares es muy grande en FMS (Viniestra-González, 1997).
- La conducción de calor es muy pequeña en FMS (Viniestra-González, 1997).
- El contenido de agua libre es pequeño en FMS (Viniestra-González, 1997).
- La recuperación de los metabolitos se facilita en FML (Viniestra-González, 1997).
- Existe mayor control de pH, temperatura y actividad de agua en FML (Viniestra-González, 1997).

- La FML permite cuantificar directamente la biomasa (Díaz-Godínez y col., 2001; Viniegra-González y col., 2003).
- Se ha reportado mayor rendimiento de enzimas para FMS (Díaz-Godínez y col., 2001; Viniegra-González y col., 2003).
- Se ha observado menor sensibilidad a la represión catabólica por glucosa de enzimas en FMS (Díaz-Godínez y col., 2001; Viniegra-González y col., 2003).
- En algunos casos se han reportado mayor estabilidad de la enzimas en FMS (Alazard y Raimbault, 1981; Acuña-Argüelles y col., 1995).

1.4. Genoma en basidiomicetes

El interés biotecnológico de organismos productores de metabolitos de uso industrial como los hongos, requiere cepas altamente productoras, así como las mejores condiciones de crecimiento, producción e inducción de dichos metabolitos. El estudio citogenético en los basidiomicetos superiores ha sido difícil, a causa de la mitosis intranuclear y el pequeño tamaño de los cromosomas de los hongos. En el caso de *Pleurotus*, el número de cromosomas y el tamaño del genoma han estado bajo discusión durante muchos años (Sagawa y Nagata, 1992; Chiu, 1996). El estudio de la genética de hongos se revolucionó por el desarrollo de la técnica de electroforesis de campo pulsado (PFGE) y su aplicación en cuestiones relacionadas con el tamaño, organización y estabilidad de los genomas de hongos. La separación de cromosomas mediante la electroforesis de campo eléctrico homogéneo (CHEF) es el método más utilizado para el estudio molecular del cariotipo de los hongos y su evolución (Sonnenberg y col., 1996; Zolan, 1995). Sagawa y Nagata (1992) utilizaron PFGE para el estudio del cariotipo de *Pleurotus ostreatus*, reportando un tamaño de 20.8 Mpb. Peberdy y col., (1993), identificaron nueve cromosomas y un tamaño del genoma de 31.3 Mpb y Larraya y col., (1999) reportaron un tamaño de 35.1 Mpb. Todos los estudios del genoma de *Pleurotus ostreatus* reportaron diferentes número de cromosomas (Tabla 1).

Tabla 1. Características del cariotipo de *Pleurotus* spp.

Cromosoma	Tamaño (Mpb) Larraya y col., 1999	Tamaño (Mpb) Sagawa y Nagata, 1992	Tamaño (Mpb) Peberdy y col., 1993
I	4.70	5.2	5.7
II	4.35	4.4	
III	4.55	3.7	
IV	3.55	2.9	
V	3.45	2.5	
VI	3.10	2.1	
VII	3.15		
VII	2.95		
IX	2.10		1.1
X	1.75		
XI	1.45		
Total	35.1	20.8	6.8

1.4.1. Secuencia de lacasas

El análisis de las secuencia reportadas de varias lacasas de hongos, tras realizar alineamientos múltiples de más de 100 lacasas, dio como resultado la identificación de cuatro regiones (L1-L4), que son útiles para la identificación de las lacasas y que permiten poder distinguirlas dentro de la amplia gama de las muy conservadas MCOs (Figura 2a) (Kumar y col., 2003). Asimismo, en esta misma figura se muestra un ejemplo de alineamiento en las regiones L1-L4 y las regiones de unión del sustrato de los siguientes organismos: *Coprimus cinereus* Lac-Cc (Ccl1A65) (Ducros y col., 1998), *Trametes versicolor* Lccl (TvL1GYC) (Piontek y col., 2002) y Lac IIIB (TvL1KYA) (Bertrand y col., 2002), *Rigidoporus lignosus* R/L (R1G1V10) (Garavaglia y col., 2004), *Lentinus tigrinus* LtL (LtL2QT6) (Ferraroni y col., 2007) y *Trametes trogii* TtL (TtL2HRG) (Matera y col., 2008). Los aminoácidos que actúan como sitio de unión del cobre se encuentran dentro de las cuatro regiones conservadas, de las cuales L2 y L4 coinciden con la secuencia de unión del cobre reportadas anteriormente para MCOs, mientras que L1 y L3 son sitios distintos de unión para las lacasas. Por otra parte, en las zonas de unión del sustrato se identificaron (mediante la

superposición de estructuras 3D de las proteínas) cuatro regiones a las que se les ha llamado loops (bucles), nombradas como I, II, III y IV (figura 2b). En la figura 3 se muestra el ciclo catalítico de las lacasas mostrando su capacidad catalítica oxido-reductiva, liberando los átomos de cobre y reintegrándolos a su estructura.

a

Proteína	L1	L2	L3	L4
TvL1KYA	⁶⁴ HWHGFFQKGTNWADGPAFINQCPI	¹⁰⁴ GTFWYHSHLSTQYCDGLRGPF	³⁹⁵ HPPHLHGH	⁴⁴⁷ GPWFHLCHIDFHLEAGFAVVF
TvL1GYC	⁶⁰ HWHGFFQAGTNWADGPAFVNQCPI	¹⁰⁴ GTFWYHSHLSTQYCDGLRGPF	³⁹⁵ HPPHLHGH	⁴⁴⁷ GPWFHLCHIDFHLEAGFAIVF
R1G1V10	⁶⁴ HWHGFFQAGTTEMADGPAFVNQCPI	¹⁰⁴ GTYWYHSHLSTQYCDGLRGAF	³⁹⁶ HPPHLHGH	⁴⁴⁶ GPWFHLCHIDWHLEAGLAVVF
CoL1A65	⁶⁴ HWHGLFQRGTNWADGADGVNQCPI	¹⁰⁴ GTFWYHSHFQTQYCDGLRGPF	³⁹⁵ HPPHLHGH	⁴⁴⁶ GPWFFHCIEFHLMNGLAIVF
LtL2QT6	⁶⁴ HWHGFFQKGTNWADGPAFINQCPI	¹⁰⁴ GTFWYHSHLSTQYCDGLRGPF	³⁹⁴ HPPHLHGH	⁴⁴⁶ GPWFHLCHIDFHLDAGFAVVM
TtL2HRG	⁶⁴ HWHGFFQHGNTNWADGPAFVNQCPI	¹⁰⁴ GTFWYHSHLSTQYCDGLRGPI	³⁹⁶ HPPHLHGH	⁴⁴⁴ GPWFHLCHIDFHLEAGFAVVM

b

Proteína	Loops de unión del sustrato					
	Loop I	Loop II	Loop III	Loop IV		
TvL1KYA	¹⁵⁴ VAAK--LG--PA--FPLG	²⁰³ LSCDPNY	²⁶³ ANP-----NFGNVG----P	³³⁰ FNFNGTNE--FI	³⁸⁴ PPATAAAPGAP	⁴⁵⁴ HIDFHLEAGF
TvL1GYC	¹⁵⁴ TAAR--LG--PR--FPLG	²⁰³ LSCDPNY	²⁶³ ANP-----NFGTVG----F	³³⁰ FNFNGTNE--FI	³⁸⁴ LPATALAPGAP	⁴⁵⁴ HIDFHLEAGF
R1G1V10	¹⁵⁴ SLST--VLFPPNPKAPPA	²⁰⁸ TSCFPNY	²⁶⁶ ANP-----SNGRNG----F	³³⁴ IGRNATTADFTI	³⁹⁰ IP-----GGGN	⁴⁵³ HIDWHLEAGL
CoL1A65	¹⁵⁴ TPAP--SI-----QGAAQ	²⁰² LSCDPNW	²⁶⁰ AQP-----NKGRRGLAGTF	³³³ IGFSGGRF--TI	³⁹⁷ VP--AGVLGGP	⁴⁵³ HIEFHLMNGL
LtL2QT6	¹⁵⁴ VAAK--LG--PR--FPKG	²⁰³ LSCDPNY	²⁶³ ANP-----NFGTTG----F	³²⁹ FNFNGTNE--FI	³⁸³ PPATAAAPGAP	⁴⁵³ HIDFHLDAGF
TtL2HRG	¹⁵⁴ LAAK--VG--SP--VPT-A	²⁰² LSCDPNH	²⁶⁶ ALP-----NSGTRN----F	³²⁹ FGFAGGKF--TI	³⁸³ LPATAAAPGFP	⁴⁵¹ HIDFHLEAGF

Figura 2. Comparación de las secuencias de lacasas (a) y de loops de unión del sustrato (b) de las lacasas con estructura tridimensional disponible (Giardina y col., 2010).

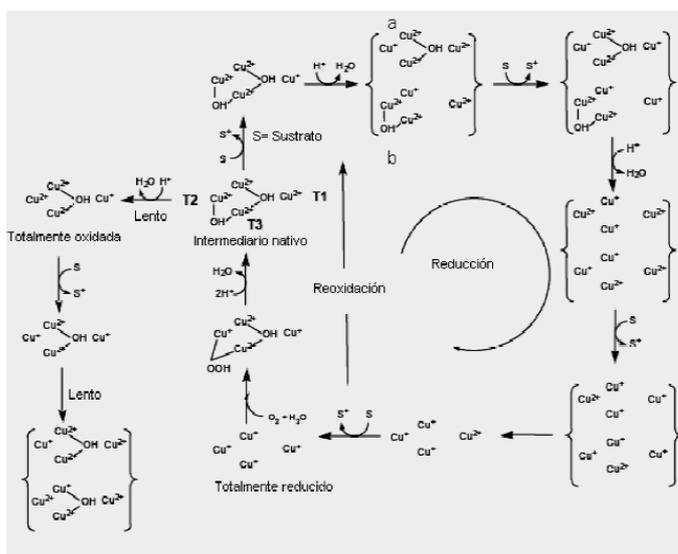


Figura 3. Ciclo catalítico de lacasas mostrando el mecanismo de reducción y oxidación de los sitios de cobre (adaptado por Shleev y col., 2004).

2. ANTECEDENTES

Las enzimas presentes en basidiomicetos utilizadas para la degradación de compuestos ligninocelulósicos, principalmente son oxidasas, que pueden degradar y en algunos casos mineralizar por completo la celulosa, hemicelulosa y lignina; más de una isoenzima se produce en hongos de pudrición blanca 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).

Los sistemas de producción de lacasas de hongos se han descrito como fermentación en medio sólido y en medio sumergido (Palmieri y col., 2003; Tlecuil-Beristain y col., 2008; Téllez-Téllez y col., 2008), considerando que el sistema en medio sólido es el que produce mayor contenido de metabolitos, sin embargo para el caso específico de *Pleurotus ostreatus*, ha mostrado un comportamiento atípico, ya que las condiciones de desarrollo en medio líquido, estimula al hongo de tal manera que la producción de lacasas se incrementa y la actividad extracelular es mucho mayor con respecto a la obtenida por medio sólido (Téllez-Téllez y col., 2008; Díaz y col., 2011a).

Se han descrito 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). Asimismo 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 isoenzima de lacasa dependiendo de las condiciones de crecimiento que se utilicen, ya que estas enzimas pueden ser constitutivas o inducibles. En estudios recientes se observó que *Pleurotus ostreatus* crecido en fermentación en medio sumergido presentó mayor actividad y número de isoenzimas de lacasas en comparación con la fermentación sólida, además, los niveles de proteasas fueron mínimos en el primer sistema de fermentación mencionado (Téllez-Téllez y col., 2008).

En *Pleurotus ostreatus* se han realizado varios trabajos con la finalidad de aislar y purificar las isoenzimas de lacasas. Palmieri y col., (1997) reportaron dos isoenzimas de lacasas: poxa1 presentó una masa molecular de 61 kDa, un pI de 6.7, alta estabilidad a diferentes valores de pH y temperatura y presentó un átomo de cobre, dos de zinc y uno de hierro por molécula. La masa molecular de poxa2 fue de 67 kDa, un pI de 4; esta isoenzima mostró baja estabilidad a la temperatura (25-35 °C) y mostró cuatro átomos de cobre por molécula. Giardina y col., (1999) purificaron otra isoenzima de lacasa en un cultivo suplementado con sulfato de cobre, denominada *Lacc6*, con una masa molecular de 62 kDa, un pI de 6.9 y cuatro átomos de cobre por molécula; además mostró un alta estabilidad al pH alcalino. Hublik y Schinner, (2000) purificaron otra isoenzima de *Pleurotus ostreatus* (cepa RK 36) en un cultivo en presencia de ácido ferúlico; esta isoenzima presentó una masa molecular de 67 kDa, un pI de 3.6 y una temperatura óptima de 50 °C. Palmieri y col., (2003), encontraron otras dos isoenzimas 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, con un pI de 4.1 y 4.3, respectivamente. Tlecuil-Beristain y col., (2005) purificaron una isoenzima de lacasa de la cepa ATCC-32783 con una masa molecular de 43.7 kDa y un pI de 2.27, presentando la enzima un margen amplio de actividad a diferentes valores de pH (2 a 8) y temperatura (20-60 °C). Se ha reportado que este hongo carece de lignina peroxidasa, indicando que probablemente la presencia de varias isoenzimas de lacasas se debe a que son las involucradas en la biodegradación de la lignina y que cada una de esas lacasa tiene un papel importante (Gochev y Krastanov, 2007).

Bettin y col., (2011) evaluaron la cinética de crecimiento, la producción y la caracterización de lacasas extracelulares de *Pleurotus sajor-caju* cepa PS-2001 producida en un biorreactor de tanque agitado, obteniendo hasta 5.2 g/L de biomasa al quinto día, mientras que la fuente de carbono se agotó alrededor del octavo día; se observó un pico de actividad de lacasa de 40 U/mL al sexto día de cultivo. En trabajos previos observaron hasta 3 diferentes isoenzimas con actividad de lacasa utilizando ABTS como sustrato; en cuanto al pH óptimo de la actividad de lacasa fue de 2.4, 3.2 y 4.4 respectivamente utilizando ABTS también como sustrato, para el caso de la temperatura óptima se evaluó utilizando diferentes buffer (acetatos pH 5.0, citratos pH 5.0 y Mc'vaine a pH 3.2). Los mejores resultados para la actividad enzimática de las lacasas fueron de 50 °C para todas las condiciones probadas

usando ABTS como sustrato. Sin embargo la estabilidad térmica de las enzimas fue mucho mayor a temperaturas de 20 °C y 30 °C hasta 168 h, por otro lado a 40 °C la actividad enzimática disminuyó considerablemente después de 36 h y a temperaturas entre 50 °C y 60°C existe un decremento considerable y su estabilidad es únicamente por algunas horas.

Diaz y col., (2011b) evaluaron la actividad de lacasas en dos medios de cultivo en fermentación sumergida, en los que se modificaron la fuente de nitrógeno (sulfato de amonio y extracto de levadura), observando que el extracto de levadura tuvo un efecto amortiguador del pH en el medio de cultivo de crecimiento, mientras que cuando se ocupó el sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, el pH del medio de cambió durante la fase exponencial de crecimiento. Observaron hasta 7 veces más actividad en el medio amortiguado con respecto al no amortiguado.

Por su parte Pereira y col., (2007) reportaron el efecto del pH del medio de crecimiento sobre el desarrollo de tres especies de hongos ectomicorrízicos *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 superficial, 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.

Moreira-Neto y col., (2009) evaluaron la influencia del pH sobre el crecimiento, la actividad lacasa y decoloración del colorante azul reactivo remazol brillante (rbbr) por basidiomicetes, como *Lentinus crinitus* y *Psilocybe castanella* utilizados en procesos de biorremediación de suelos contaminados con residuos industriales organoclorados, observando que el pH del medio de cultivo tiene una influencia sobre el crecimiento de dichos organismos, presentando menor crecimiento a pH de 5,9 y 2,7 para *L. crinitus* y *P. castanella* respectivamente; siendo el pH óptimo de desarrollo de 4,5. La actividad de lacasas máxima fue observada a pH de 3,5 para *L. crinitus* y 4,5 para *P. castanella*. Por otro lado la máxima decoloración del rbbr fue a pH de 2,5 y 3,5 para *L. crinitus* y *P. castanella*, respectivamente.

Por otro lado, Chipeta 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 afectada, 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; asimismo, evaluaron la producción de isoenzimas en fermentación sólida encontrando hasta tres isoenzimas distintas de bajo peso molecular en la gama de pH de 4 a 8.

Snajdr, (2007) evaluó el efecto de la temperatura sobre la producción, actividad y estabilidad de enzimas ligninolíticas en *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor*, utilizando celulosa como fuente de carbono, en el cual muestran la producción de lacasas y manganeso peroxidasas en un rango de temperaturas de 5-35 °C, teniendo un máximo de producción de estas enzimas entre 25 a 30 °C en *Pleurotus ostreatus* y a 35 °C en *Trametes versicolor*. A temperaturas bajas alrededor de 10 °C la producción de estas enzimas fue únicamente del 4 al 20 % del valor máximo, por otro lado la temperatura óptima de actividad enzimática de lacasa fue de 50 °C para *Pleurotus ostreatus* y para *Trametes versicolor* fue de 55 °C; en el caso de manganeso peroxidasa la temperatura óptima de actividad fue de 60 °C. Sin embargo se observó que la temperatura tiene un efecto sobre las enzimas afectando la actividad catalítica teniendo una pérdida en su actividad cerca del 50 % después de 24 h a partir de 32 °C para el caso de las lacasas y de 36 °C para manganeso peroxidasas de *Pleurotus ostreatus*, asimismo para el caso de *Trametes versicolor* las temperaturas en las que se pierde la actividad enzimática fue de 47 y 30 °C para lacasas y manganeso peroxidasas respectivamente.

Asimismo se han utilizado diferentes agentes inductores de la producción de lacasas, entre ellos se encuentran metales, fuentes de carbono y/o nitrógeno, sustratos específicos de las enzimas, etc., Palmieri y col., (2000) reportaron la inducción de lacasas por cobre o medios ricos en nitrógeno (D'Souza y col., 1999). Éstas se presentan en diversas isoenzimas 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 isoenzimas extracelulares (Durán y col., 2002).

Por su parte Flores y col., (2009) realizaron co-cultivos en fermentación sumergida utilizando *Pleurotus ostreatus* y *Trichoderma viride*, infectando la fermentación sumergida de *Pleurotus*

ostreatus a las 30 y 48 h de fermentación con esporas de *Trichoderma viride*; observando la actividad máxima de lacasa después de las 48 h en cultivo control y hasta las 72 h con co-cultivo. Únicamente el cultivo infectado a las 30 h mostró un incremento en la actividad volumétrica comparada con el cultivo control. Lo que sugiere que el tiempo de infección con *Trichoderma viride* y las condiciones de agitación/oxigenación, inducen cambios en el patrón de producción de lacasas en *Pleurotus ostreatus*.

Por otro lado Téllez-Télez y col., (2008) compararon la producción de lacasas de *Pleurotus ostreatus* desarrollado en medio sólido y en medio líquido, encontrando que para el segundo caso, la actividad enzimática se incrementó hasta 1.5 veces con respecto al medio sólido. 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, purificarlas y de encontrar mecanismos que incrementen su producción.

Hasta ahora más de 100 enzimas han sido aisladas y purificadas de cultivos fúngicos caracterizadas en función de sus propiedades bioquímicas y catalíticas. Se sabe que las enzimas lacasas son dominantes en el complejo enzimático ligninocelulósico y que cuando menos una isoenzima de lacasa es constitutiva de los hongos de pudrición blanca, por lo cual los hacen convenientes para la degradación e inmovilización de compuestos xenobióticos (Baldrian y col., 2005).

Por otro lado, Liers y col., (2007) produjeron y purificaron extractos enzimáticos para realizar una parcial caracterización molecular de una lacasa del ascomiceto *Xylaria polymorpha*. El hongo secretó la enzima preferentemente durante el crecimiento en medios de cultivo complejos usando jugo de tomate, además se adicionó 2,5-xilidina teniendo una producción estimulada de lacasa obteniendo actividades enzimáticas de hasta 14,000 U/l. La enzima fue purificada y homogeneizada por cromatografía de exclusión de tamaño y caracterizada por métodos bioquímicos y moleculares.

La lacasa obtenida de *Xylaria polymorpha* oxida los sustratos típicos fenólicos de lacasas de *Pleurotus ostreatus* como ABTS, 2,6-dimetoxifenol, guaiacol, así como siringaldazina, la secuencia de aminoácido deducida se obtuvo por amplificación de la secuencia génica de

lacasa teniendo regiones con cobre en las posiciones 1 y 3, las cuales mostraron un nivel alto de identidad a otras lacasas de ascomicetos (Christiane y col., 2007).

Asimismo, Alves-García y col., (2006) evaluaron las propiedades de lacasas producidas por *Pycnoporus sanguineus* inducida por 2,5-xilidina en fermentación sumergida, observando 2 isoenzimas que fueron parcialmente purificadas por cromatografía fenil-sefarosa. El peso molecular de las isoenzimas fue de 80 kDa (Lac I) y 68 kDa (Lac II), la actividad óptima de estas enzimas fue de pH 4.8 y 30 °C para Lac I y pH de 4.2 y 50 °C para Lac II.

Tlecuitl-Beristain y col., (2008) observaron en *Pleurotus ostreatus*, la producción de una nueva isoenzima de lacasa producida por fermentación sumergida durante las fases de crecimiento del hongo. Encontrando que la actividad de lacasa es correlacionada positivamente con el crecimiento del organismo. La isoenzima L1 fue purificada utilizando técnicas de isoelectroenfoque y caracterizada parcialmente teniendo un peso molecular aproximado a 43.7 kDa determinado por SDS-PAGE una K_m y V_{max} de 90 μM y 1.18 $\Delta Abs \text{ min}^{-1}$ respectivamente y un punto isoeléctrico de 2.3. Esta isoenzima L1 mostró actividad catalítica por arriba del pH y temperatura óptima lo cual sugiere que puede ser utilizada en descargas industriales con contaminación de colorantes textiles para su tratamiento.

Por otro lado, Liu y col., (2009) optimizaron la fermentación y la caracterización de lacasa de *Pleurotus ostreatus* cepa 10969 en las que se sugiere que la concentración de glucosa y Mg^{2+} son inductores de producción de lacasa con alta actividad catalítica utilizando concentraciones óptimas de 0.0988 g/mL y 7.3 mmol/L respectivamente, logrando incrementar hasta 2.5 veces los rendimientos de lacasa bajo las condiciones óptimas. El peso molecular de estas lacasas son de 40 kDa y el pH y temperatura óptima para esta actividad es de 4.0 y 50 °C respectivamente, observando también que el DTT, β -mercaptoetanol y NaN_3 inhiben la actividad de lacasa, asimismo la presencia de iones metálicos como la plata.

Por su parte Ramírez y col., (2003) caracterizaron enzimas lacasas obtenidas de *Pleurotus ostreatus* por fermentación sólida y fermentación sumergida. En la fermentación sólida aislaron 3 isoenzimas que presentaron bajo nivel de purificación por la pérdida que se

presentó a través de la purificación. En el caso de la fermentación sumergida obtuvieron 2 isoenzimas con pérdida de proteínas reducida y debido a las etapas de purificación. El pH óptimo de reacción indicó que las isoenzimas de la FL se mantienen en valores más ácidos 2.5 y 2 para las lacasas I y II mientras que en las de FS presentaron 2.5-3 y 3.5 respectivamente. Las temperaturas óptimas de reacción presentó los mismos valores para las isoenzimas I y II aisladas tanto en FS como FL: 50 y 40 °C respectivamente. Los extractos crudos fueron evaluados con ABTS.

Dekker y col., (2007) evaluaron la influencia de los nutrientes para mejorar la producción de lacasas de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, utilizando condiciones no inductoras e inductoras como el alcohol veratril como inductor. Observando que en condiciones no inductoras, el pH inicial, la relación C:N y la fuente de nitrógeno no tienen una influencia sobre la producción de lacasas, sin embargo el Tween 80, aceite de soya y cobre, tuvieron un efecto inductor sobre la producción de lacasas, prolina y urea, siendo estos dos últimos inhibidores de la producción de lacasas. Por otro lado bajo condiciones inductoras de crecimiento del hongo, factores como tipo de inóculo, punto de adición del inductor, el pH inicial de crecimiento, relación C:N y la fuente de nitrógeno, influenciaron la producción de lacasas; asimismo a diferencia de las condiciones no inductoras, la prolina y la urea no tienen efecto negativo sobre la producción de lacasas.

Chen 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 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 isoenzimas 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.

Jolivalt y col., (2005) realizaron estudios sobre *Trametes versicolor* cambiando el pH óptimo de actividad de lacasa producido por mutagénesis del organismo; esta transformación fue a nivel del aminoácido Asp, reemplazado por Glu, Ala o Asn, expresando las enzimas mutantes en *Yarrowia lipolytica* y por otro lado se evaluó su actividad sobre sustratos

fenólicos y no fenólicos como el 2,6-dimetoxifenol y el ABTS, encontrando una diferencia en el pH óptimo para su oxidación de pH 1.4.

Por otro lado, Das y col., (1997) observaron dos isoenzimas de lacasa L₁ y L₂, en *Pleurotus florida* optimizando un medio de cultivo que contenía 2% de glucosa y 20% de extracto de papa a pH 7.0, con agitación orbital de 150 rpm a 30 °C, utilizando como sustrato o-dianisidina a 0.3 mM o guayacol 10 mM a pH de 5.0.

Por su parte Cavallazzi y col., (2005) evaluaron la inducción de lacasas en medio líquido, en el hongo shiitake utilizando diferente concentración de nitrógeno de 2.6 a 26 mM, junto con 7 tratamientos con diferente concentración de cobre (0, 50, 100, 150, 200, 250 y 300 µM), observando que las concentraciones de 2.6 mM de nitrógeno y 250 µM de cobre induce una alta actividad de lacasa, comparado con cultivos control que usaron tartrato de amonio que presentaron actividad enzimática de hasta 251 U/mL de extracto después de 30 días.

Krishna-Pasat y col., (2005) sugieren que las condiciones iniciales del medio de cultivo como son pH, concentración de sustrato, extracto de levadura, concentración de Cu y presencia de alcohol, tienen un efecto sobre la producción de lacasas de *Pleurotus ostreatus* 1804, por fermentación sólida, utilizando espuma de poliuretano como soporte, observando el efecto de las condiciones del medio de cultivo; obteniendo actividades máximas de lacasa de 312.6 U/L que fueron más altas con respecto a estudios anteriores realizados sobre la misma cepa en micelio libre (272.2 U/L).

Asimismo, la identificación de isoenzimas a través de zimografía se utiliza como herramienta complementaria a los análisis moleculares. Arana-Cuenca y col., (2004) analizaron patrones de isoenzimas de lacasa de varias especies de *Poliporaceae* bajo diferentes condiciones de cultivo, lo que se sugiere que el patrón de producción de isoenzimas de lacasa puede usarse como un criterio adicional para la identificación de hongos.

Luis y col., (2005) evaluaron la expresión de los genes de lacasas de basidiomicetos en suelos de bosque por técnicas moleculares (extracción de RNA, RT-PCR y PCR semi-cuantitativa), en cinco muestras de suelo, encontraron que el nivel de transcripción de lacasas es heterogéneo entre las muestras del suelo, dos muestras presentaron fuertes

niveles de expresión, y dos demostraron niveles de expresión débiles y la última muestra no presentó transcripción perceptible de lacasas.

Luis y col., (2004) analizaron la expresión de genes de lacasas de basidiomicetos aislados de cinco muestras de suelo; encontrando diferentes niveles de transcripción de los genes que codifican para la expresión de lacasas, utilizaron un primer degenerado que identificó la región conservada de los aminoácidos donde se encuentran los átomos de cobre.

La presencia de diferentes isoenzimas en *Pleurotus ostreatus* y en otros organismos se debe a la existencia de múltiples genes que codifican para diferentes isoenzimas de lacasas (Palmieri y col., 1997). Asimismo diferentes autores reportan que, la expresión de los genes depende de las condiciones del cultivo, habiéndose encontrado un sistema regulado diferencialmente para controlar la producción de lacasas (Giardina y col., 1999; Faraco y col., 2003; Téllez-Téllez y col., 2008).

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 sí (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).

Palmieri y col., (2000) realizaron estudios de inducción de enzimas lacasa con un medio de cultivo con cobre, observando la producción de isoenzimas tales como *lacc6*, *poxa2*, y *lacc10*. Siendo la isoenzima más abundantemente producida *lacc10* en estas condiciones de cultivo. Asimismo se observó que durante la transcripción, el mRNA de *lacc6* fue el que mayormente fue inducido durante el crecimiento del hongo. La discrepancia entre la transcripción de *lacc6* y las cantidades de proteína puede ser explicada por la presencia de un nivel alto de la proteína en el extracto crudo enzimático de *Pleurotus ostreatus*, que indicó

que la isoenzima *lacc6* podría ser ineficazmente secretado y/o su actividad fisiológica podría ser intra o extra celular.

Pezzella y col., (2009) aislaron y evaluaron la expresión heteróloga multigénica de lacasas de *Pleurotus ostreatus*, encontrando la existencia de un agrupamiento de genes de lacasa en este hongo basidiomiceto, y tres nuevos genes de lacasa fueron clonados, aprovechándose de su estrecha relación con la organización espacial en el genoma del hongo. Una peculiar estructura intrón exón fue revelado por el gen de una de las nuevas lacasas, junto con una elevada inestabilidad de la enzima recombinante debido a la inestabilidad de su ligando de cobre. Esta investigación muestra la expresión de tres nuevos genes de lacasa *lacc4*, *lacc1* y *pox5* en *Pleurotus ostreatus* se evaluó por medio de la transcriptasa reversa RT-PCR utilizando cebadores con genes específicos.

Castanera y col., (2012) realizaron un estudio sobre el perfil de expresión de diferentes cepas de basidiomicetos y en diferentes condiciones de cultivo (medio sólido y líquido), utilizando paja de trigo como inductor. Utilizaron técnicas de RT-PCR cuantitativo usando un gen constitutivo como referencia de la eficiencia de la reacción. Los genes de *lacc2* y *lacc10*, sugieren que son la principal fuente de actividad de la actividad de lacasas en la fermentación líquida; sin embargo en la fermentación sólida no se ha podido caracterizar específicamente que lacasas son responsables de la actividad que complementa a *lacc2* y *lacc10*. Asimismo sugiere que la actividad enzimática y el perfil de expresión varían con respecto a la cepa utilizada para su determinación, lo que puede ser objeto de estudio para mejorar la producción enzimática bajo la fermentación líquida.

Pezzella y col., (2012) mencionan que se han reportado hasta 11 diferentes genes que codifican para lacasa, sin embargo se han caracterizado solo seis isoenzimas de lacasas. Por otro lado, la expresión de lacasas, sugieren estos autores que, está regulada por las condiciones del medio de cultivo y las etapas de desarrollo, asimismo se tiene incierta la función de estas enzimas *in vivo*, sin embargo se estima que la producción de *lacc10* tiene un papel importante en la fase vegetativa, ya que en la etapa de fructificación, su expresión es reducida, por otro lado la subunidad pequeña de *lacc2* parece tener un papel importante durante la fructificación de *Pleurotus ostreatus*.

Particularmente, seis isoenzimas lacasa de *Pleurotus ostreatus* han sido aisladas y caracterizadas, se observa un grupo con propiedades peculiares. *lacc10* es una lacasa abundantemente producida bajo diferentes condiciones de crecimiento (Palmieri y col., 1993). *lacc6* es una lacasa azul muy estable a pH alcalino (Giardina y col., 1999) y con un alto potencial redox (Garzillo y col., 2001), características que aumentan su potencial aplicación biotecnológica (Cañas, 2007). Esta enzima ha sido utilizada como molde para la selección de mutantes aleatorios con características mejoradas (Festa y col., 2008; Miele y col., 2010). *lacc2* es una lacasa heterodimérica atípica, constituida por una subunidad grande, claramente homóloga a otras lacasas fúngicas y una subunidad chica *sspoxa3*, probablemente involucrada en la estabilización del complejo (Palmieri y col., 2003; Giardina y col., 2007; Faraco y col., 2008). *lacc12* es una lacasa recientemente aislada del cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus* (Lettera y col., 2010). *lacc9* es una isoenzima de lacasa relacionada muy cercanamente a *lacc10* (Las secuencias del cDNA de *lacc9* y *lacc10* muestran hasta un 84% de identidad en las secuencias (Giardina y col., 1995)) que solo se ha detectado e identificado (a través de electroforesis en gel de poliacrilamida nativa (PAGE) y análisis de espectrometría de masas) en una nueva cepa de *Pleurotus ostreatus* dicariótico obtenido por cruzamiento clásico (Lettera y col., 2011; Del Vecchio y col., 2012). Además, otros tres genes de lacasa, *lacc1*, *lacc4* y *lacc11* han sido identificados en este hongo, aunque sus correspondientes proteínas nunca se han aislado en un caldo de cultivo. Los productos de la expresión heteróloga de *lacc1* y *lacc4*, reveló que codifican para lacasas muy inestables, mientras que el gen *lacc11* no se ha detectado en todas las condiciones ensayadas (Pezzella y col., 2009).

Hasta el momento se han registrado en el Gene bank la secuencia de DNA y RNA de al menos 11 diferentes isoenzimas de lacasa de *Pleurotus ostreatus*. La tabla 2 muestra los genes reportados.

Tabla 2. Genes de lacasas reportadas en el Gene bank (nombres de genes previamente reportados por otros autores en paréntesis).

Gen
<i>lacc1 (pox4)</i>
<i>lacc2 (poxa3)</i>
<i>lacc3</i>
<i>lacc4 (pox3)</i>
<i>lacc6 (poxa1b)</i>
<i>lacc7</i>
<i>lacc8</i>
<i>lacc9 (pox1)</i>
<i>lacc10 (pox2)</i>
<i>lacc12</i>
<i>sspoxa3</i>

La mayoría de las lacasas de hongos que se han reportado hasta el momento son enzimas extracelulares y se han descrito hasta el momento sólo algunas enzimas de fructificación. Sin embargo hasta el momento no se reportan estudios sobre el efecto del pH inicial de desarrollo sobre el patrón de producción y expresión de lacasa en *Pleurotus ostreatus*.

3. JUSTIFICACIÓN

El estudio de las lacasas se ha realizado en muchos organismos, determinándose las isoenzimas y los genes que las codifican bajo las mejores condiciones de desarrollo del hongo, así como sus propiedades fisicoquímicas, para posteriormente ser utilizadas en procesos de biorremediación.

Existen pocos estudios que evalúen el efecto del pH inicial de desarrollo sobre la producción y expresión de las lacasas, y específicamente en *Pleurotus ostreatus* no hay investigación relacionada hasta el momento, por lo que en este estudio se evaluó el efecto del pH sobre el patrón de producción y expresión de lacasas, lo cual nos permitirá conocer la relación entre ambos patrones.

4. HIPÓTESIS

El pH inicial del medio de cultivo tiene un efecto sobre los perfiles de producción y expresión de lacasas de *Pleurotus ostreatus* obtenidas por fermentación sumergida.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

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

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar las fermentaciones sumergidas a pH de 3.5, 4.5, 6.5 y 8.5.
2. Determinar el patrón de producción de isoenzimas de lacasas intra-extracelulares de *Pleurotus ostreatus* desarrollado en fermentación sumergida a diferente pH.
3. Determinar la actividad de lacasa intra-extracelular de cada fermentación incubada en solución buffer a diferente pH (3.5, 4.5, 6.5 y 8.5).
4. Establecer el patrón de expresión de las isoenzimas de lacasas por RT-PCR.

6. METODOLOGÍA

En la Figura 4 se muestra el diagrama de flujo de la metodología a seguir para evaluar el efecto del pH de desarrollo de *Pleurotus ostreatus* sobre la producción y expresión de enzimas lacasa.

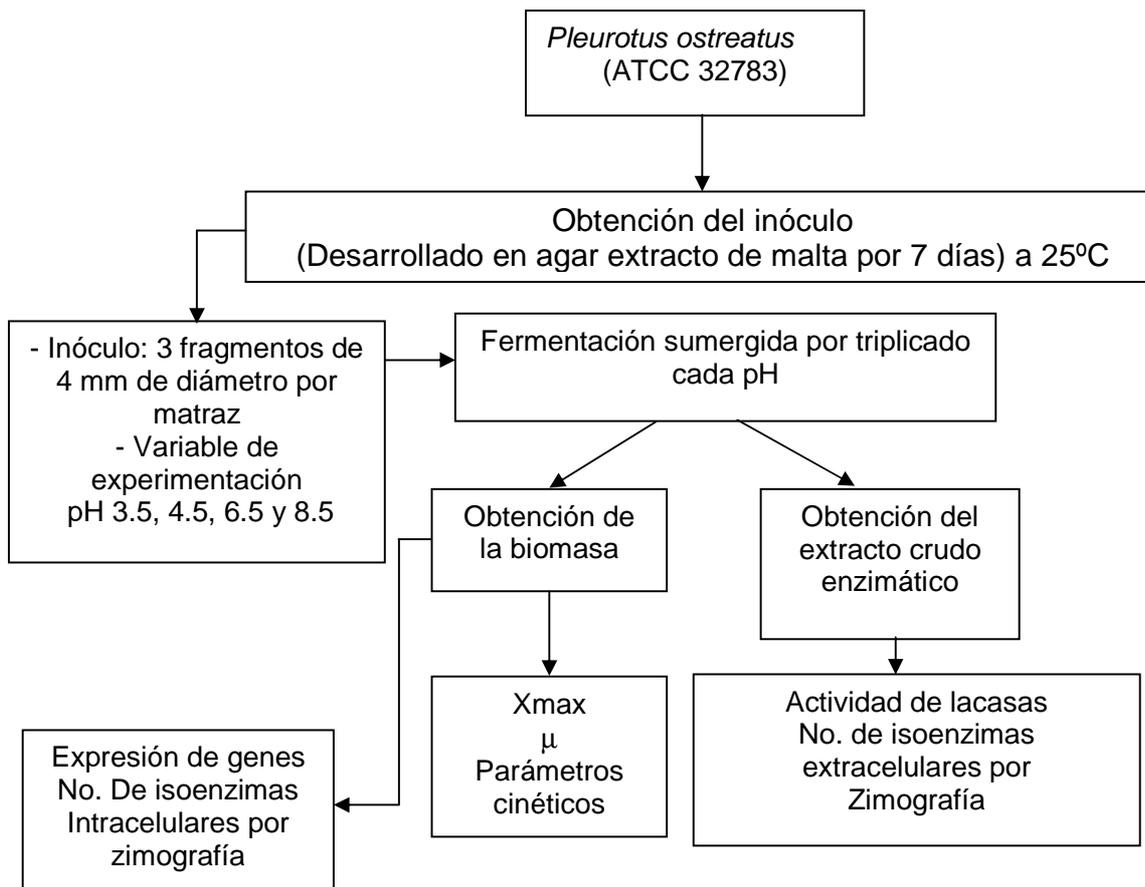


Figura 4. Metodología para el desarrollo de esta investigación.

6.1. 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 se desarrollada en las mismas condiciones que la cepa stock.

6.2. 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 temperatura de 25 °C y bajo diferentes valores de pH; 3.5, 4.5, 6.5 y 8.5, ajustado con HCl o NaOH 1 N. La composición del medio de cultivo en todos los casos el que se muestra en la Tabla 3 (Téllez-Téllez y col. 2008). Los matraces se incubaron con agitación orbital a 120 rpm. Se tomaron muestras cada 24 h hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento del hongo.

Tabla 3. Composición del medio de cultivo.

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

El pH se ajustó a 3.5, 4.5, 6.5 y 8.5, con NaOH o HCl 0.1 M según sea el caso.

6.3. Obtención del extracto enzimático

El extracto enzimático (EE) se considera al caldo de fermentación obtenido en cada muestreo de la fermentación, y después de la filtración con papel Whatman No. 1 y posteriormente a través de filtros con tamaño de poro de 0.2 µm.

6.4. Biomasa y parámetros cinéticos de crecimiento del hongo

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

Para determinar los parámetros de crecimiento se considera 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 estima como la relación entre la E_{\max} (U/L) y X_{\max} (g/L). Se calcula 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 ($q_p = \mu Y_{E/X}$).

6.5. Determinación de proteína soluble

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

6.6. Determinación de la actividad enzimática

La actividad enzimática de lacasa (E) intra-extracelular, se determinó en EE y biomasa obtenidas en diferentes tiempos de cada fermentación utilizando DMP como sustrato, cada medición se realizó por triplicado. La mezcla de reacción se preparó con 900 μ l de DMP 2mM en solución buffer a pH 3.5, 4.5, 6.5 y 8.5; todos a concentración de 0.1 M y 100 μ l de EE; a cada fermentación se determinó la actividad enzimática a todos los pH. La absorbancia se lee en un espectrofotómetro Jenway 6405 UV/Vis 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 considera como la cantidad de enzima que provoque un incremento de una unidad de absorbancia por minuto.

6.7. Identificación de isoenzimas de lacasa

Para cada fermentación se determinó el número de isoenzimas presentes en el extracto enzimático y en la biomasa 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 contiene 10 y 4% de acrilamida, respectivamente. La concentración de SDS es de 0.1% en el gel. Las muestras del EE se separan 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 1-1.25 h. Después de la corrida, los geles se lavan 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 en solución buffer a todos los valores de pH de esta investigación a temperatura ambiente en DMP 2mM.

6.8. Expresión de genes de lacasas de *Pleurotus ostreatus* desarrollado en diferentes pH por RT-PCR

6.8.1. Diseño de cebadores

Los cebadores se diseñaron a partir de las secuencias de bases nitrogenadas reportados para los genes de *lacc1*, *lacc4*, *lacc6*, *lacc9* y *lacc10*; y *gpd* como gen constitutivo, todos

obtenidos del banco de genes del NCBI. Los oligonucleótidos presentan temperaturas de fusión similares, o la diferencia es de máximo 3°C, no presentan homología intra-oligonucleótido en más de 3 pares de bases, su composición es del 45% al 55% en GC y no forman estructuras secundarias entre ellos.

6.9. Expresión de genes de lacasas en diferentes tiempos de fermentación sumergida

Un análisis semi-cuantitativo RT-PCR se utilizó para analizar la expresión de cinco genes de *Pleurotus ostreatus*. El RNA fue aislado de micelio congelado, producido a diferentes tiempos de las fermentaciones de esta investigación (ver la sección de las condiciones de cultivo), usando TRIZOL (Invitrogen) para la extracción y cuantificado espectrofotométricamente, determinando la densidad óptica a OD_{260/280}. El RNA fue tratado con DNasa I libre de RNasa (Invitrogen) y re-suspendido en 20 µL de agua tratada con dietilpirocarbonato; los tiempos analizados fueron seleccionados con respecto a la actividad enzimática y los zimogramas.

La síntesis de cDNA se realizó utilizando oligos dT y la transcriptasa reversa Moloney murine Leukemia virus (M-MuLV-RT; Fermentas) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. La mezcla de reacción de RT contenía (1 µg) y 10 pmol de primer específico fueron mezclados, para la amplificación por PCR se utilizó el Kit AccsesQuick™ (PROMEGA^{MR}). Las condiciones de desnaturalizantes fueron 94 °C por 3 min. El programa incluyó 35 ciclos a 94 °C por 40 s, 56 °C por 40 s y 72 °C por 50 s.

6.10. Electroforesis en geles con formaldehído

En geles al 1.5% de agarosa, se colocaron las muestras dentro del pocillo y durante 50 a 70 min se hizo pasar una corriente eléctrica de 100-110 V. Las bandas se visualizaron con luz ultravioleta. Posteriormente al tratamiento con DNasa, se realizó la retro-transcripción con la enzima M-MuLV para generar cDNA; finalmente se realizó PCR para observar la amplificación de cada uno de los genes en cada uno de los puntos evaluados de cada fermentación.

6.11. Análisis estadístico

Las fermentaciones se realizaron por triplicado cada una, se determinó la media y desviación estándar para los datos de crecimiento del hongo, actividad enzimática intra-extracelular y que fueron reportados como barras de desviación estándar en los gráficos.

7. RESULTADOS

7.1. Fermentación sumergida a pH inicial de desarrollo de 3.5

6.1.2. Biomasa

La producción de Biomasa (X) durante la fermentación se muestra en la Figura 5. Se observó una fase de adaptación larga y duró aproximadamente 216 h, después de este tiempo inició la fase exponencial de crecimiento, que terminó aproximadamente a las 528 h. La X_{\max} fue de 5.2 g/L y la μ de 0.006 h^{-1} .

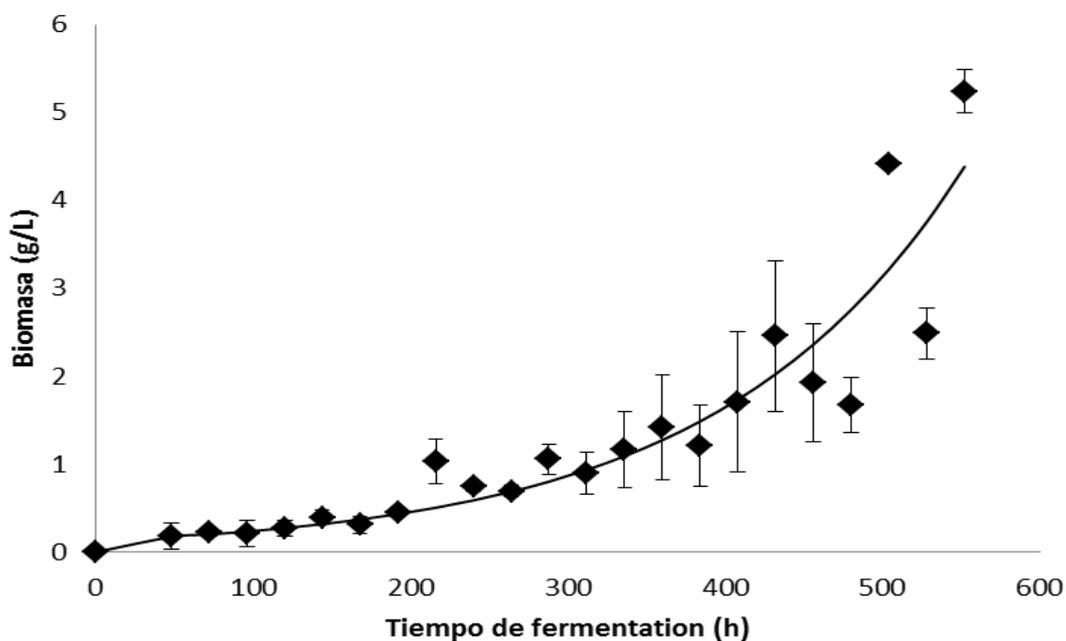


Figura 5. Cinética de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en fermentación a pH 3.5 inicial de desarrollo.

6.1.3. Actividad de lacasa extracelular de la fermentación sumergida a pH inicial de 3.5

En la Figura 6 se muestra la actividad extracelular de lacasas, obtenida a través de los EE de la fermentación desarrollada a pH 3.5; evaluada en buffer a diferentes pH, (3.5, 4.5, 6.5 y 8.5). Las actividades máximas de lacasas fueron de 21,360 U/L y 29,490 U/L cuando fueron incubadas en solución buffer de pH de 3.5 y 4.5 respectivamente. También se observaron para estos EE valores de actividad de lacasas de 1,595 U/L y 3,535 U/L cuando se incubaron los EE en solución buffer de pH de 6.5 y 8.5 respectivamente.

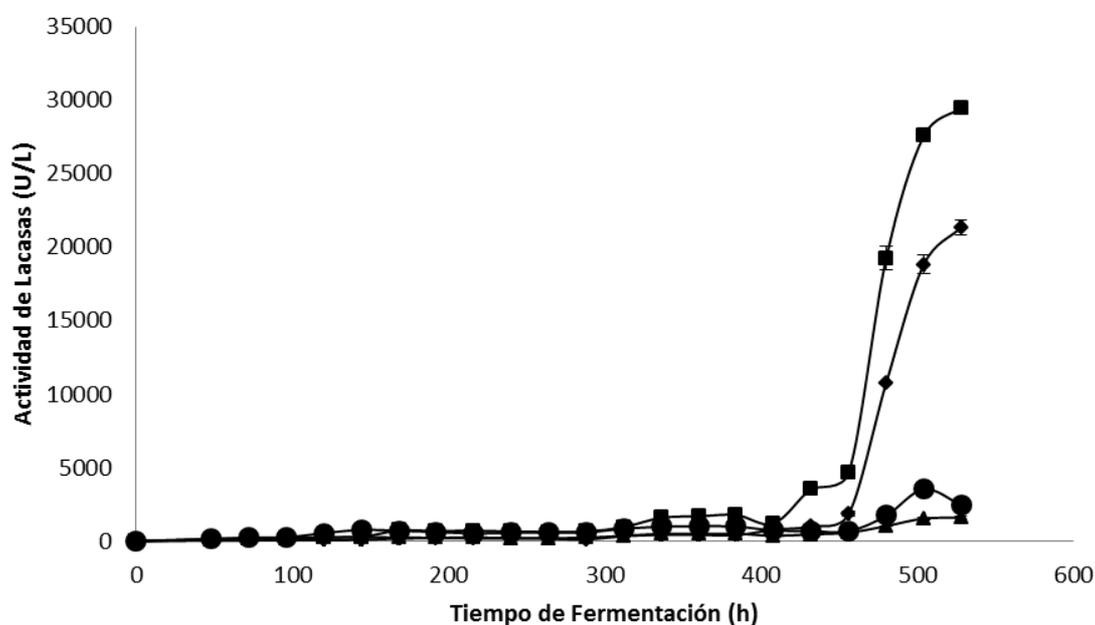


Figura 6. Actividad extracelular de lacasa de *Pleurotus ostreatus* obtenidas por fermentación a pH de 3.5 inicial de desarrollo, evaluada en solución buffer a pH de 3.5 (◆), 4.5 (■), 6.5 (▲) y 8.5 (●).

6.1.4. Actividad de lacasa Intracelular de la fermentación sumergida a pH inicial de 3.5

En la Figura 7 se observa la actividad intracelular evaluada en solución buffer a pH de 3.5, 4.5, 6.5 y 8.5. Se observó actividad máxima de aproximadamente 817 U/g de biomasa seca

cuando se midió la actividad en buffer a pH de 3.5; de 700, 350 y 350 U/g de biomasa seca cuando se evaluó en buffer a pH de 4.5, 6.5 y 8.5 respectivamente.

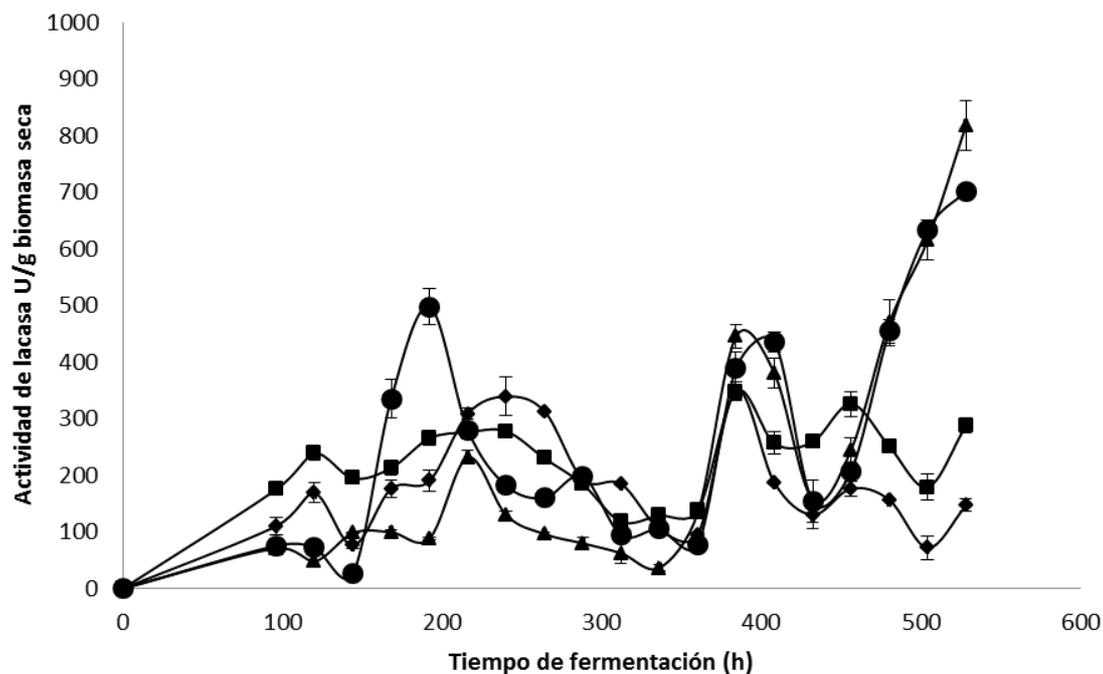


Figura 7. Actividad intracelular de lacasa de *Pleurotus ostreatus* obtenidas por fermentación sumergida a pH de 3.5 inicial de desarrollo, evaluada en solución buffer a pH de 3.5 (♦), 4.5 (■), 6.5 (▲) y 8.5 (●).

6.1.5. Perfil de pH de la fermentación sumergida a pH inicial de 3.5 de desarrollo.

En la figura 8 se observa el perfil de pH a través del tiempo de fermentación de *Pleurotus ostreatus*, se observó un incremento de este valor conforme avanzó la fermentación, llegando a valores alrededor de 7.

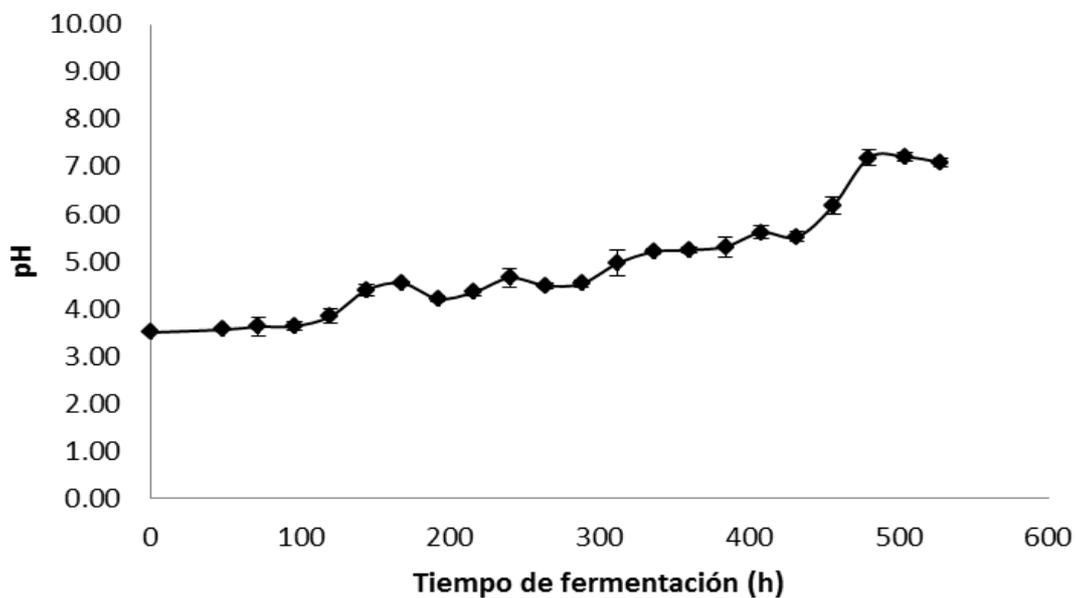


Figura 8. Perfil de pH de la fermentación sumergida de *Pleurotus ostreatus* a pH inicial de desarrollo de 3.5

6.1.6. Isoenzimas de lacasas extracelulares de *Pleurotus ostreatus* obtenidas por fermentación sumergida a pH inicial de desarrollo de 3.5

En la Figura 9 se muestra el zimograma con bandas de actividad de lacasa extracelulares, incubado en solución buffer de pH de 3.5 usando DMP 2 mM como sustrato. Se observó que aproximadamente las bandas corresponden a un peso molecular de 29 y 65 kDa.

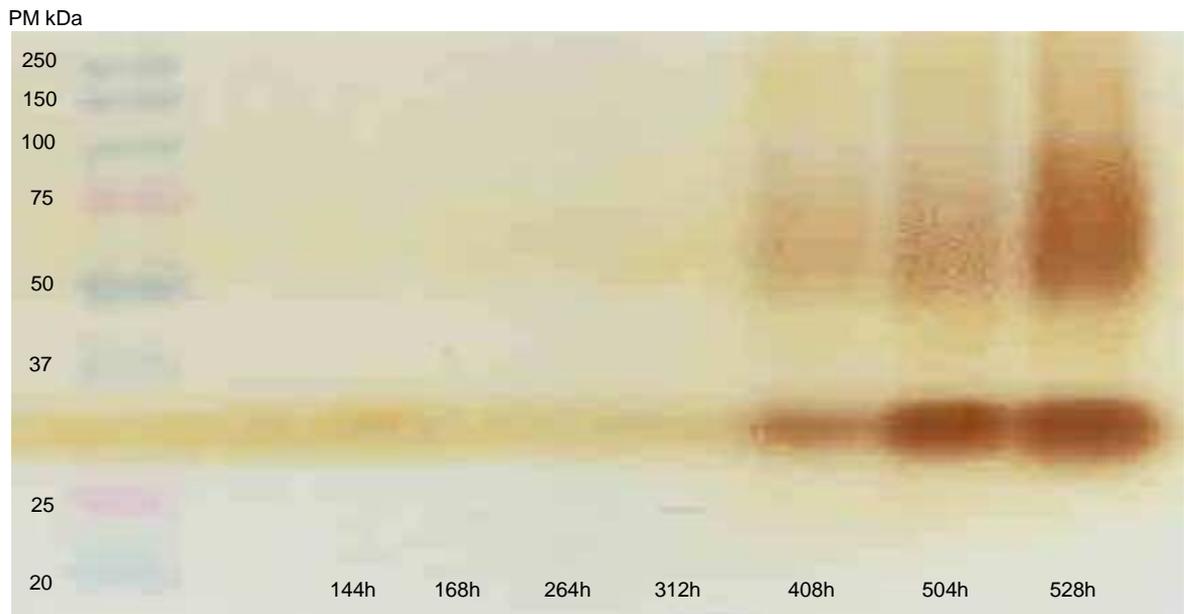


Figura 9. Zimograma de lacasas extracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 3.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 3.5.

La Figura 10 muestra el zimograma de lacasas extracelulares incubado en solución buffer pH 4.5 usando DMP 2mM como sustrato. Los pesos moleculares son aproximadamente de 29 y 65 kDa.

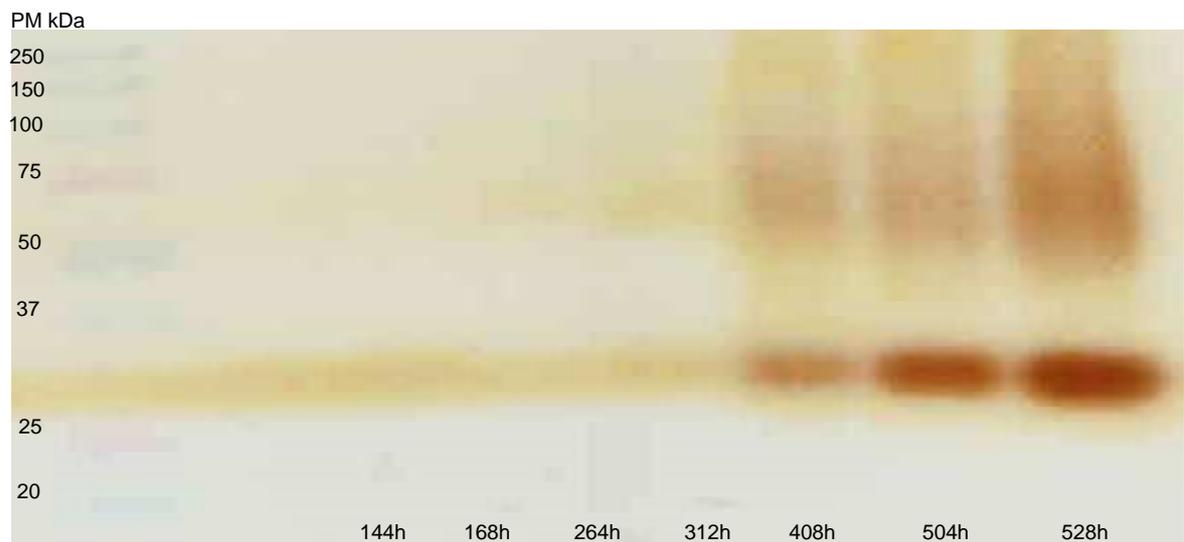


Figura 10. Zimograma de lacasa extracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 3.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 4.5.

En la Figura 11 se muestra el zimograma de lacasas extracelulares, incubado en solución buffer a pH de 6.5. Se observaron pesos moleculares aproximados de 29 y 65 kDa.

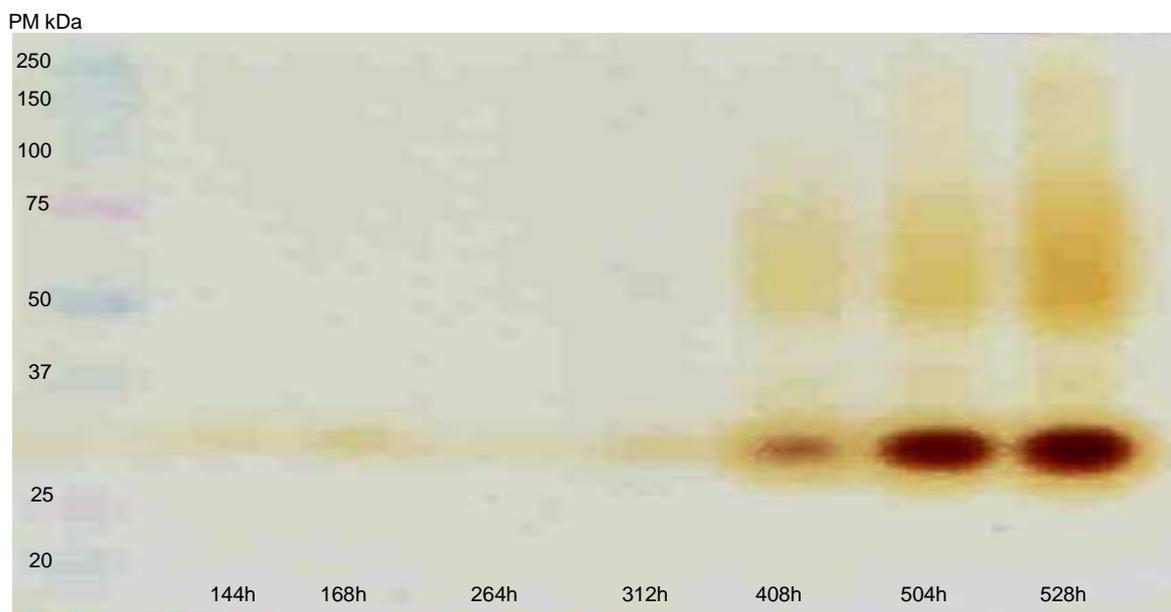


Figura 11. Zimograma de lacasas extracelulares de la fermentación de pH inicial de 3.5 de desarrollo de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 6.5.

En la Figura 12 se muestra el zimograma de lacasa extracelulares, incubado en solución buffer a pH de 8.5; se observó únicamente una isoenzima de peso molecular aproximado de 29 kDa. Se observó en los tiempos finales de la fermentación, a partir de la fase de crecimiento exponencial y estacionaria del hongo.

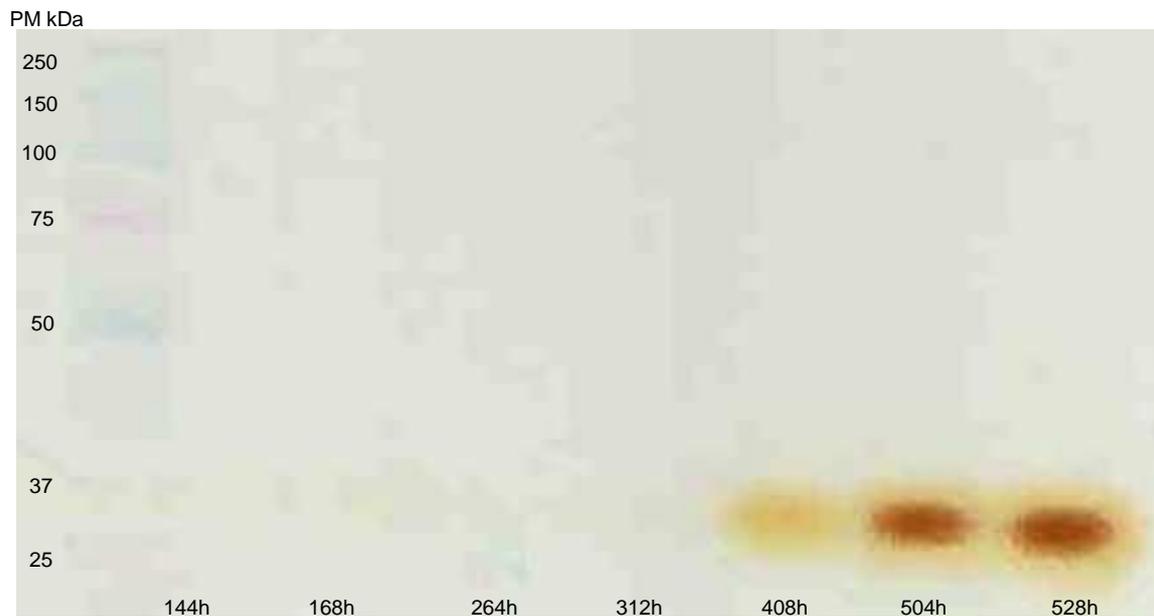


Figura 12. Zimograma de lacasas extracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 3.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 8.5.

6.1.7. Isoenzimas de lacasas intracelulares de *Pleurotus ostreatus* obtenidas por fermentación sumergida a pH inicial de desarrollo de 3.5

En la Figura 13 se observan las bandas obtenidas a partir de las lacasas intracelulares de la fermentación de 3.5, donde se observó durante los primeros tiempos de la fermentación una banda con peso molecular aproximado de 65 kDa. La Figura 14 muestra cuando menos dos bandas con actividad enzimática en el zimograma, con pesos moleculares aproximados de 65 kDa y 29 kDa durante la fase de crecimiento exponencial y estacionaria de hongo.

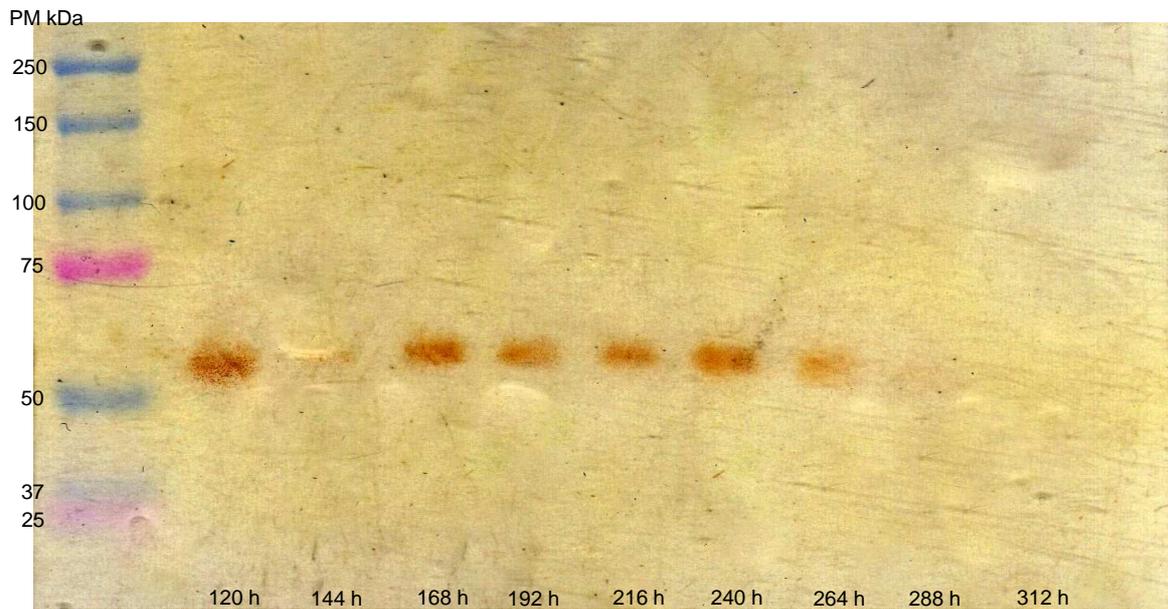


Figura 13. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de 3.5 de desarrollo de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 3.5.

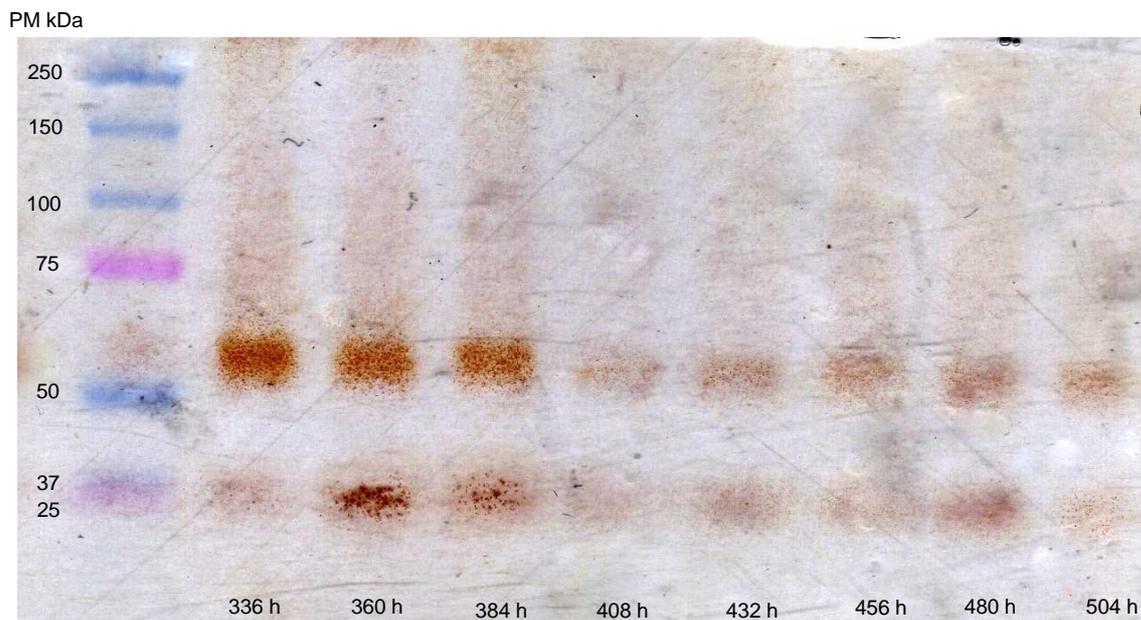


Figura 14. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 3.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 3.5.

En la Figura 15 se observa el zimograma de lacasas intracelulares, de la fermentación a pH inicial de desarrollo 3.5 incubado en solución buffer a pH 4.5; mostrando cuando menos dos

bandas con actividad de lacasa, con pesos moleculares aproximados de 65 kDa y 29 kDa. Por otro lado la Figura 16 muestra la segunda etapa de la fermentación, la cual contiene el mismo número de bandas y del mismo peso molecular.

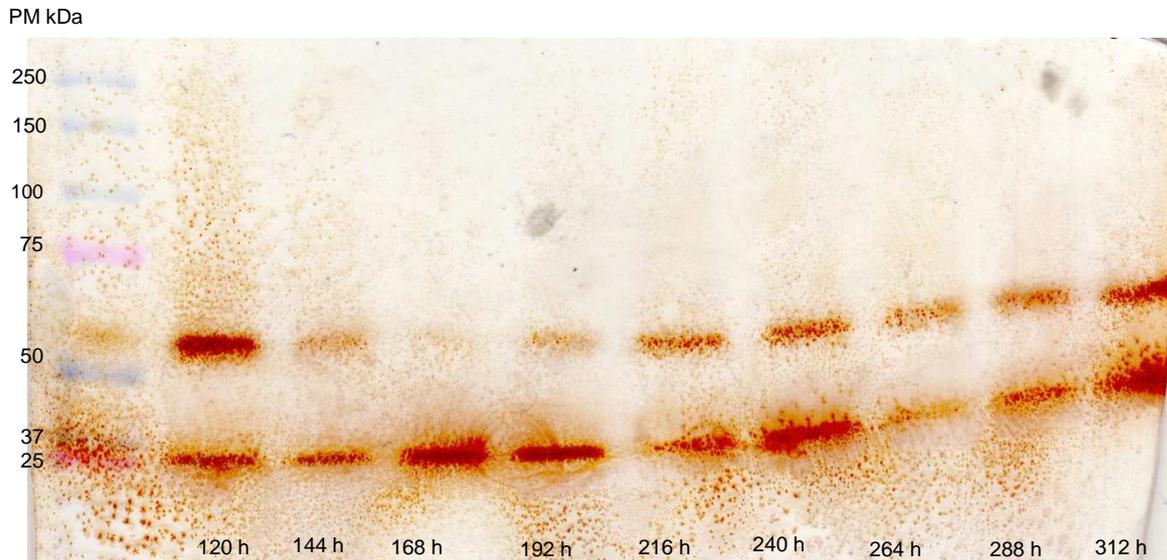


Figura 15. Zimograma de lacasa intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 3.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 4.5.

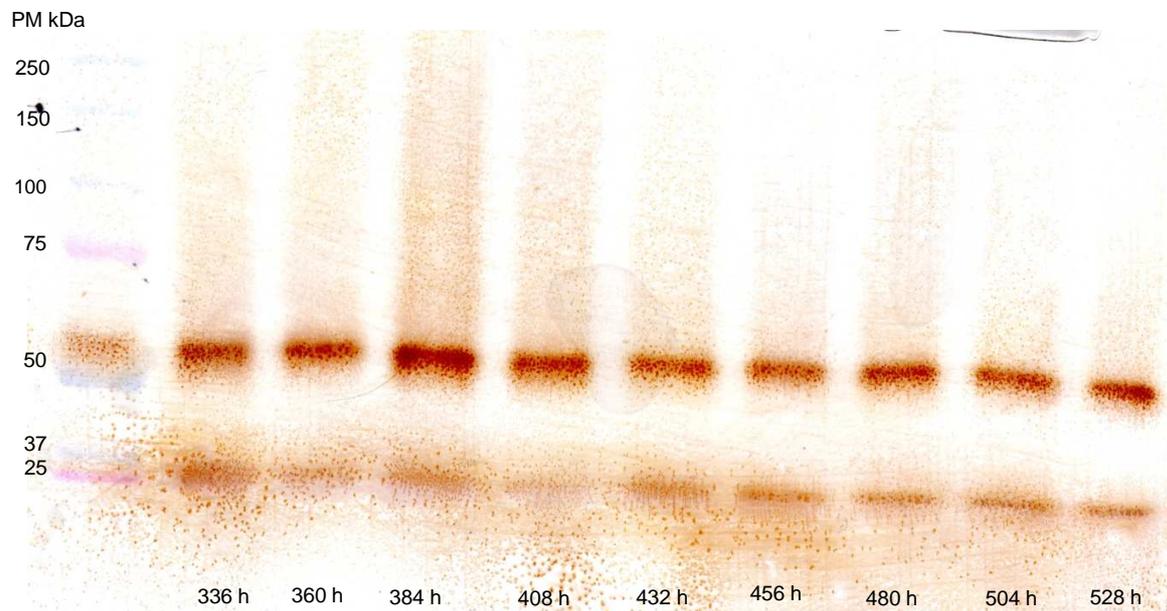


Figura 16. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 3.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 4.5.

En la Figura 17 y 18, se muestran los zimogramas con bandas con actividad de lacasa intracelular de la fermentación de pH inicial de 3.5 de desarrollo incubado en solución buffer a pH 6.5, donde se observan cuando menos dos isoenzimas (65 y 29 kDa), que se mantienen constantes durante todo el tiempo de la fermentación.

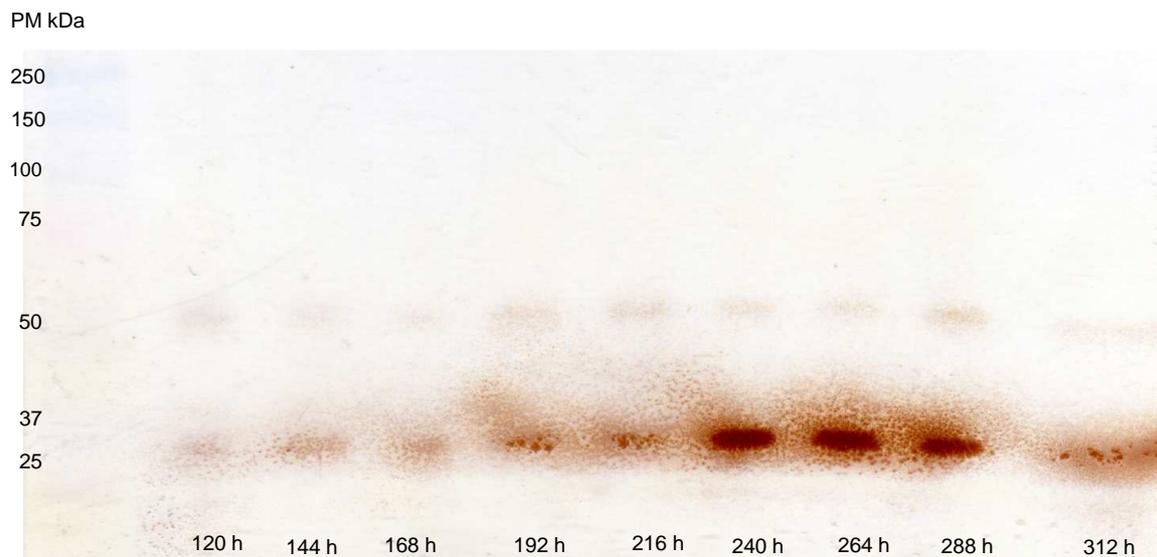


Figura 17. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 3.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 6.5.

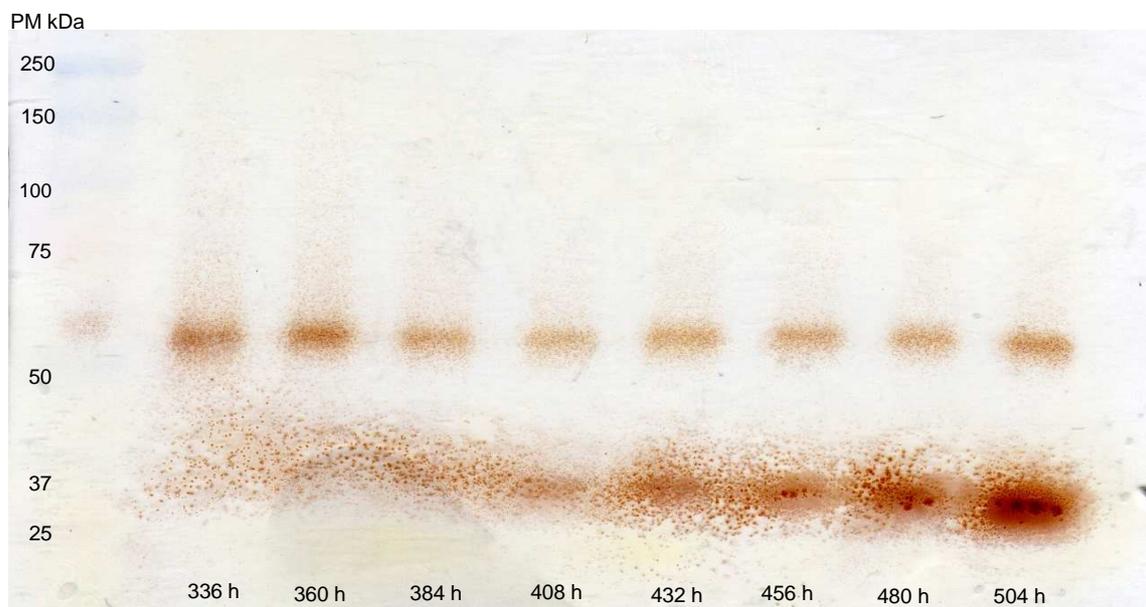


Figura 18. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 3.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 6.5.

En las Figuras 19 y 20 se observan los zimogramas con bandas con actividad de lacasa obtenidas de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 3.5, incubadas en solución buffer a pH 8.5. El PM aproximado es de 65 y 29 kDa.

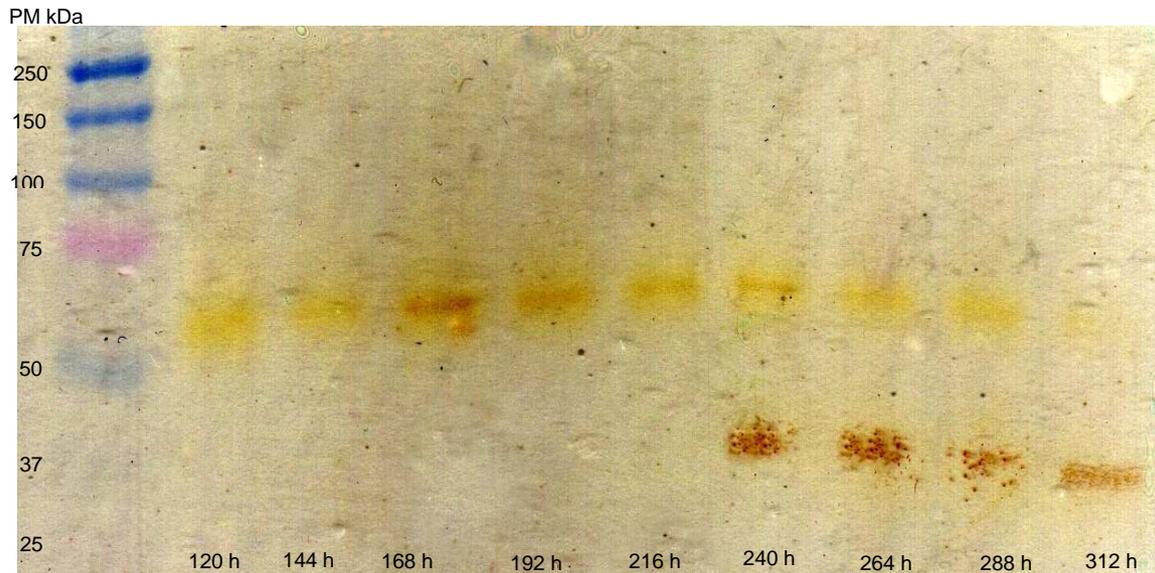


Figura 19. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 3.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 8.5.

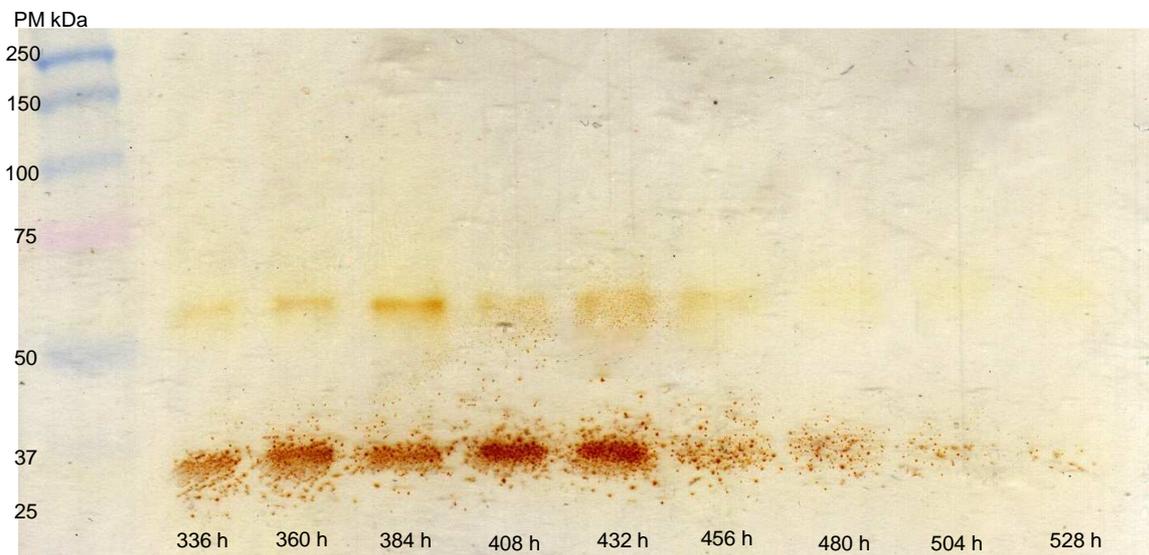


Figura 20. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 3.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 8.5.

7.2. Fermentación sumergida a pH inicial de desarrollo de 4.5

7.2.1. Biomasa

La producción de X durante la fermentación se muestra en la Figura 21. 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 5.3 g/L y se observó a las 408 h. La μ fue de 0.014 h^{-1} .

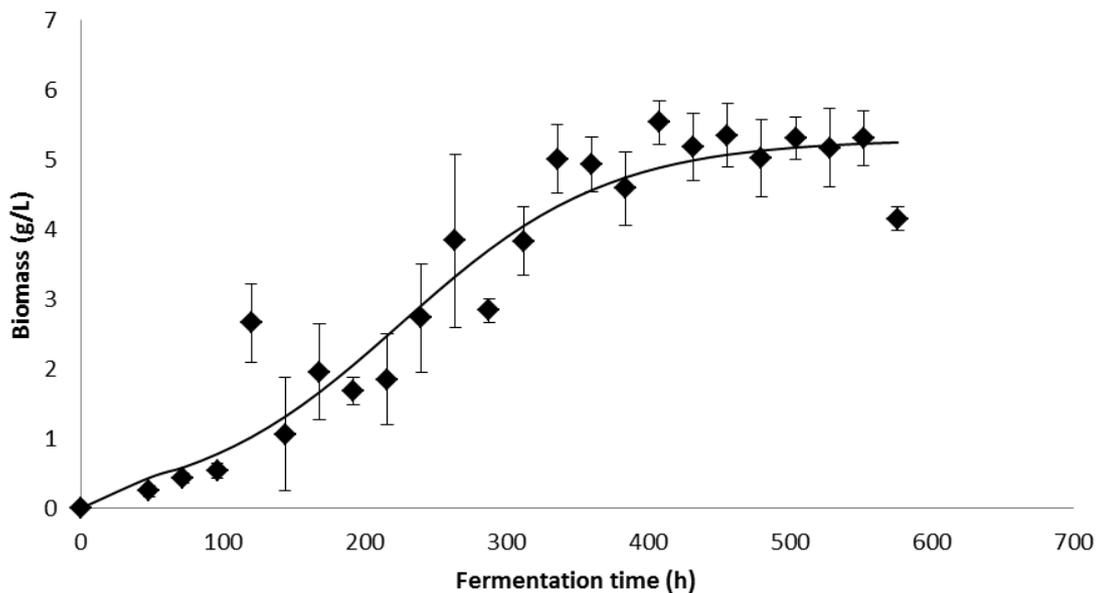


Figura 21. Cinética de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida a pH inicial de desarrollo de 4.5.

7.2.2. Actividad de lacasa extracelular de la fermentación sumergida de pH inicial de desarrollo de 4.5

La actividad de lacasa se muestra en la Figura 22. 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, siendo el valor máximo aproximadamente de 70,320 U/L a las 480 h y un valor máximo de 77,550 U/L a las 408 h, cuando se evaluó la actividad en solución buffer de pH 3.5 y 4.5 respectivamente. A pH de 6.5 la actividad máxima de lacasa fue de 6,195 U/L y cuando se evaluó a pH de 8.5 se alcanzó una actividad máxima de 16,310 U/L.

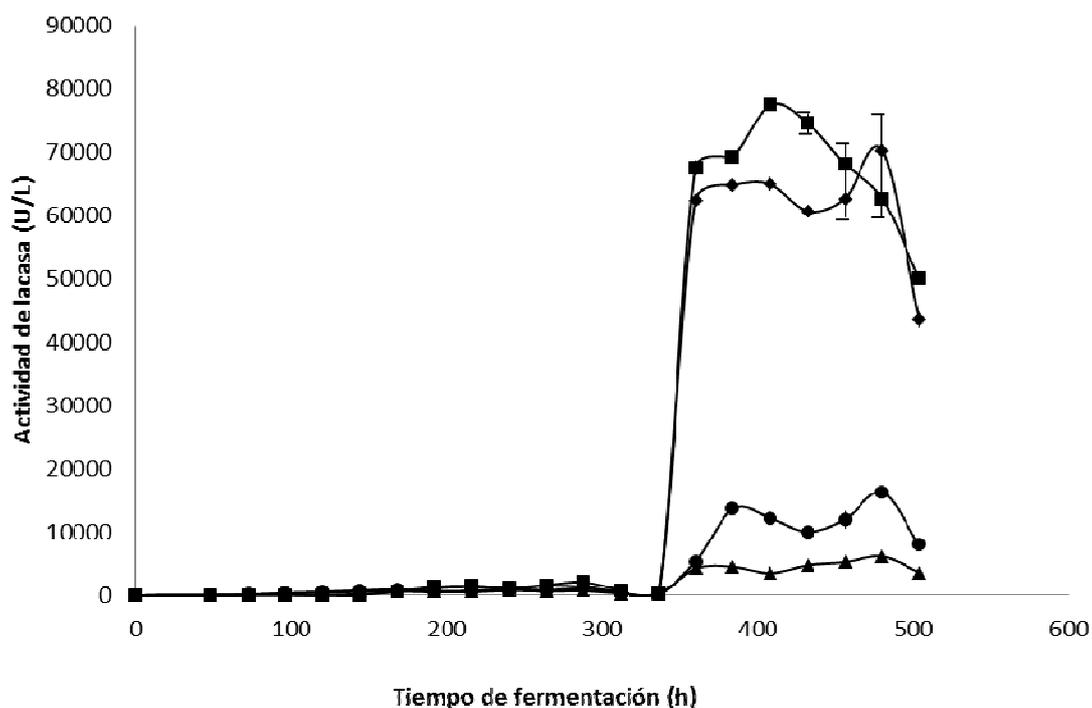


Figura 22. Actividad de lacasas extracelular de *Pleurotus ostreatus* obtenidas por fermentación a pH inicial de desarrollo de 4.5, incubada en solución buffer a pH de 3.5 (♦), 4.5 (■), 6.5 (▲) y 8.5 (●).

7.2.3. Actividad de lacasa intracelular de la fermentación sumergida de pH inicial de desarrollo de 4.5

La actividad intracelular se muestra en la Figura 23. Se observó un patrón similar en las actividades cuando se incubó en solución buffer a pH 3.5, 4.5 y 6.5, obteniendo valores máximos de actividad de 4,445, 4,800 y 2,446 U/g de biomasa seca respectivamente. La actividad menor fue observada cuando se incubó a pH 8.5 con un valor máximo de actividad de 837 U/g de biomasa seca.

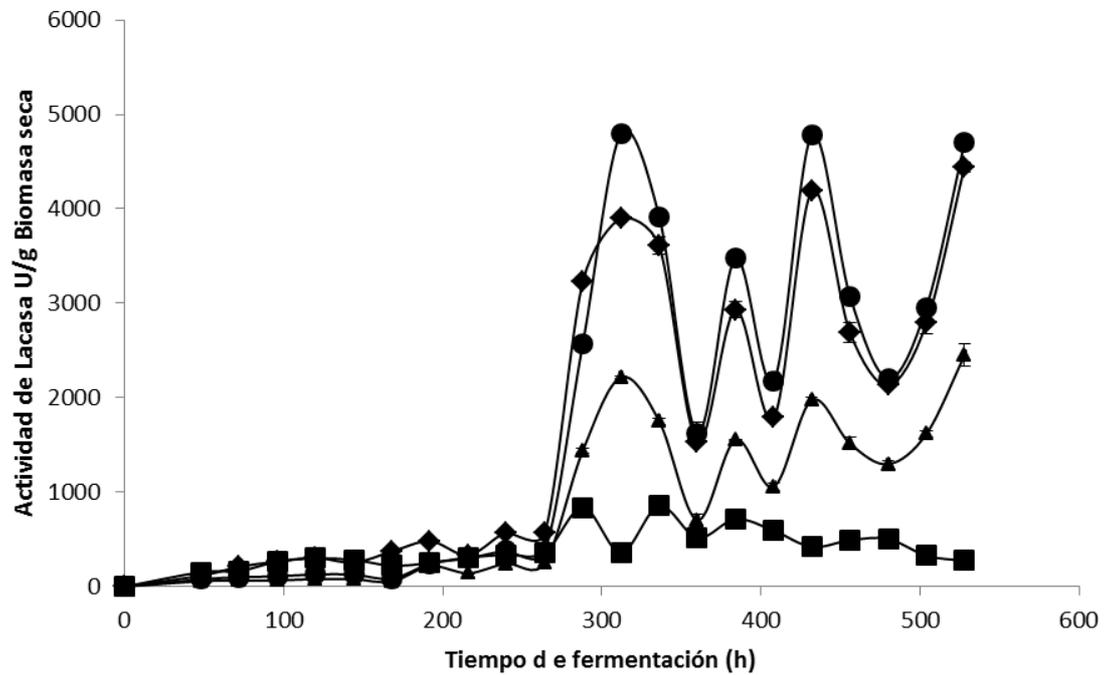


Figura 23. Actividad intracelular de lacasas de *Pleurotus ostreatus* obtenidas por fermentación a pH de 4.5 inicial de desarrollo, evaluada a pH de 3.5 (◆), 4.5 (●), 6.5 (▲) y 8.5 (■).

7.2.4. Perfil de pH de la fermentación sumergida a pH inicial de 4.5 de desarrollo.

La figura 24 muestra el perfil de pH a través del tiempo de la fermentación de *Pleurotus ostreatus* a pH 4.5 inicial de desarrollo, se observó un incremento paulatino de este valor conforme avanzó la fermentación, llegando a valores alrededor de 7.

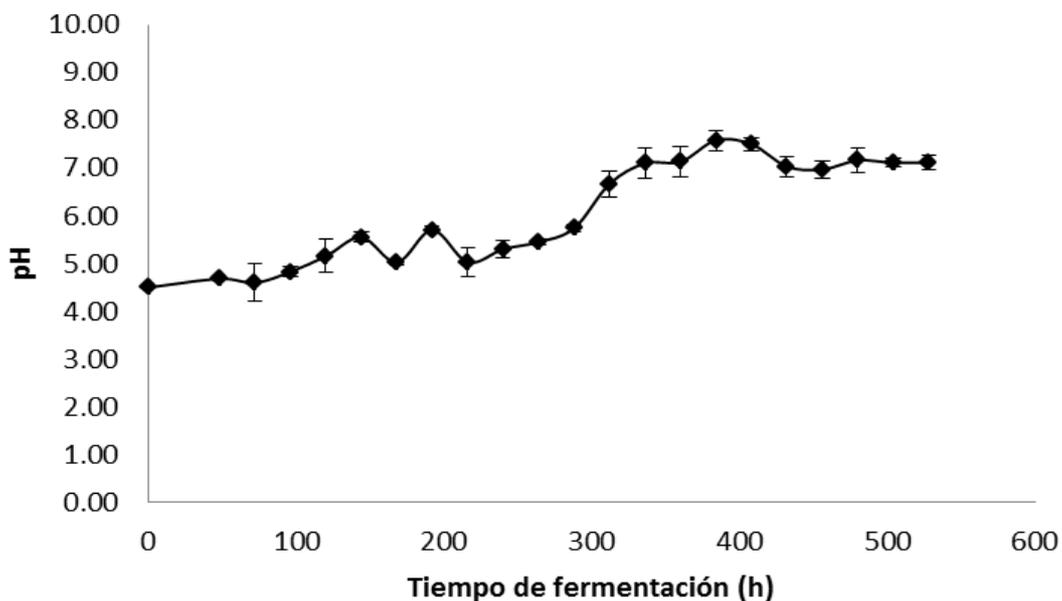


Figura 24. Perfil de pH de la fermentación sumergida de *Pleurotus ostreatus* a pH inicial de desarrollo de 4.5

7.2.5. Isoenzimas de lacasas extracelulares de *Pleurotus ostreatus* obtenidas por fermentación sumergida a pH inicial de desarrollo de 4.5

En la Figura 25 se muestra el zimograma de la fermentación sumergida con pH inicial de desarrollo de 4.5, incubado en solución buffer a pH 3.5, se observaron dos bandas con pesos moleculares aproximados de 65 y 29 kDa durante la fase estacionaria de crecimiento, observando la mayor intensidad de banda en la de menor peso molecular. Por otro lado, durante los primeros tiempos de la fermentación no se logró observar la banda de mayor peso molecular.

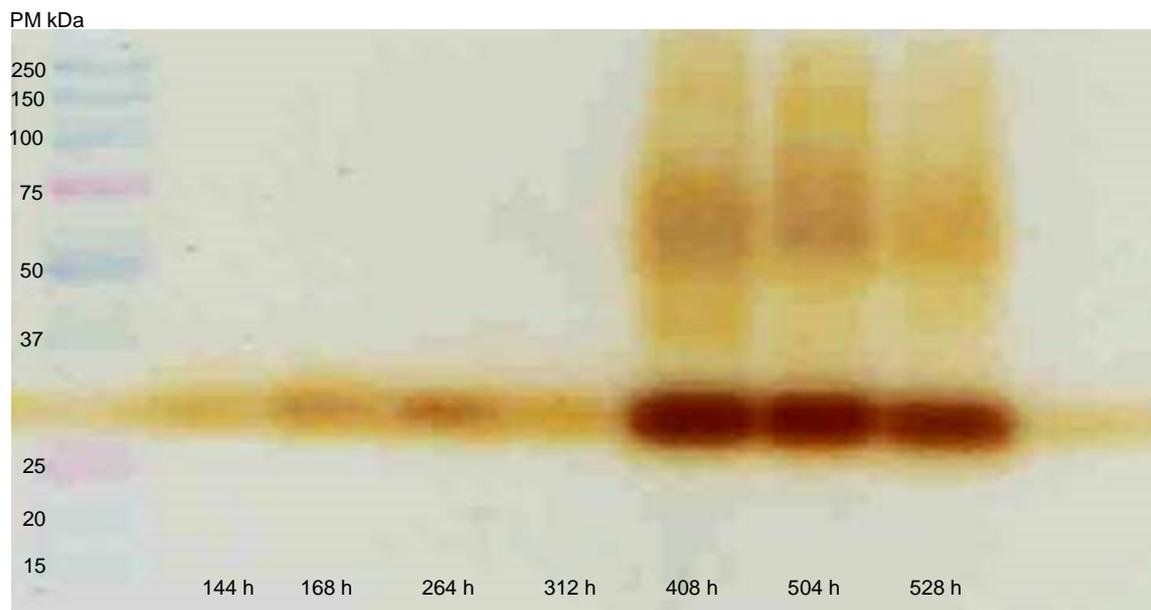


Figura 25. Zimograma de lacasas extracelulares de la fermentación de *Pleurotus ostreatus* a pH inicial de desarrollo de 4.5. Incubado en solución buffer a pH 3.5.

La Figura 26 muestra el zimograma de la fermentación sumergida con pH inicial de desarrollo de 4.5 incubado en solución buffer de pH 4.5, observando durante la fase estacionaria, cuando menos tres bandas con actividad de lacasa, con pesos moleculares aproximados de 65, 47 y 29 kDa. En los tiempos iniciales de la fermentación sólo se observó la isoenzima de 29 kDa.

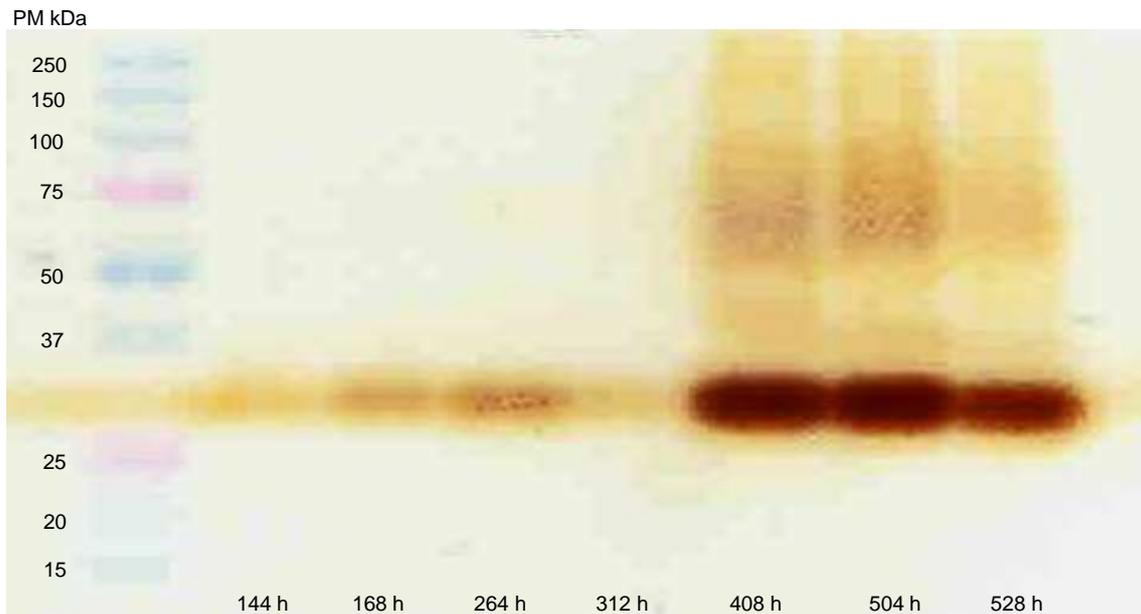


Figura 26. Zimograma de lacasas extracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 4.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 4.5.

La Figura 27 muestra el zimograma de lacasas extracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 4.5 incubado en solución buffer a pH 6.5. Durante la fase de crecimiento estacionaria del hongo, cuando menos tres isoenzimas con actividad de lacasa fueron observadas, con pesos moleculares aproximados de 65, 47 y 29 kDa. Mientras que durante los primeros tiempos de la fermentación sólo se observó la banda de menor peso molecular.

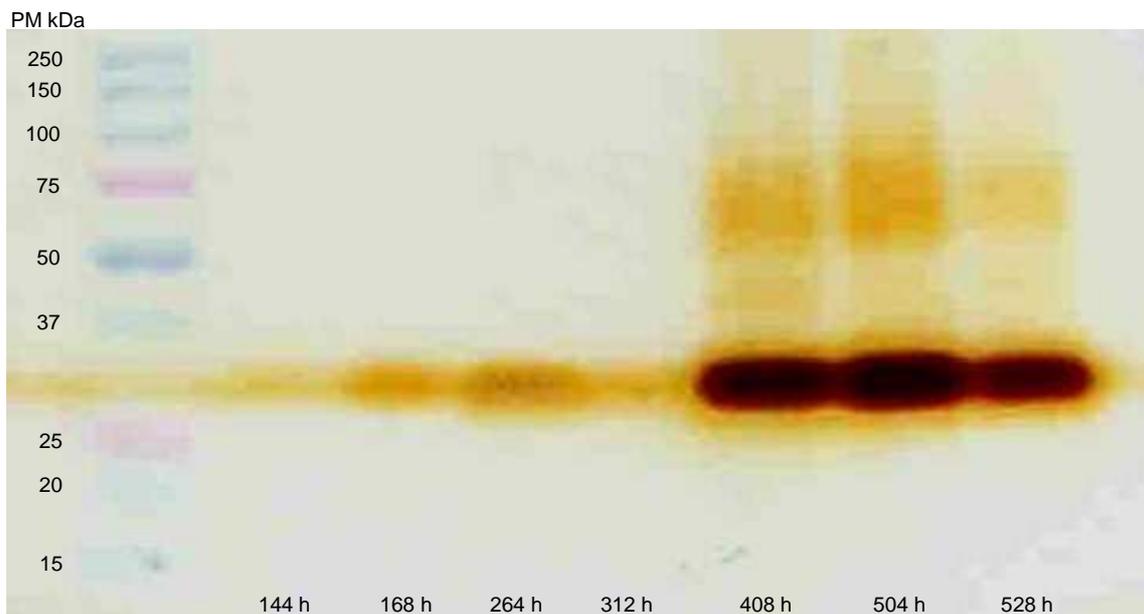


Figura 27. Zimograma de lacasas extracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 4.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 6.5.

La Figura 28 muestra el zimograma de lacasas extracelulares de la fermentación sumergida a pH inicial de desarrollo de 4.5 incubado en solución buffer a pH de 8.5. Se observó una sola isoenzima en la fase estacionaria con peso molecular aproximado de 29 kDa.

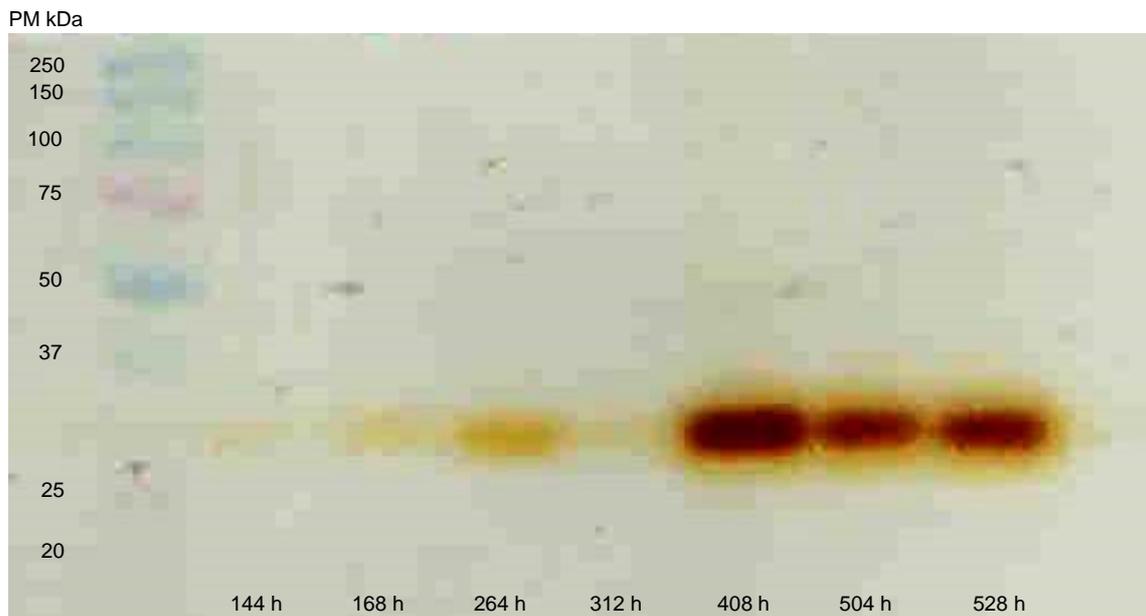


Figura 28. Zimograma de lacasas extracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 4.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 8.5.

7.2.6. Isoenzimas de lacasas intracelulares de *Pleurotus ostreatus* obtenidas por fermentación sumergida a pH inicial de desarrollo de 4.5

En la Figura 29 se muestra el zimograma con bandas con actividad de lacasas intracelular de la fermentación sumergida a pH inicial de desarrollo de 4.5 de *Pleurotus ostreatus* incubado en solución buffer a pH 3.5. Durante los primeros tiempos de la fermentación se observó una banda con peso molecular aproximado de 65 kDa. Posteriormente (Figura 30) en la fase de crecimiento exponencial y estacionario, se observaron cuando menos dos bandas de PM aproximado de 65 y 29 kDa.

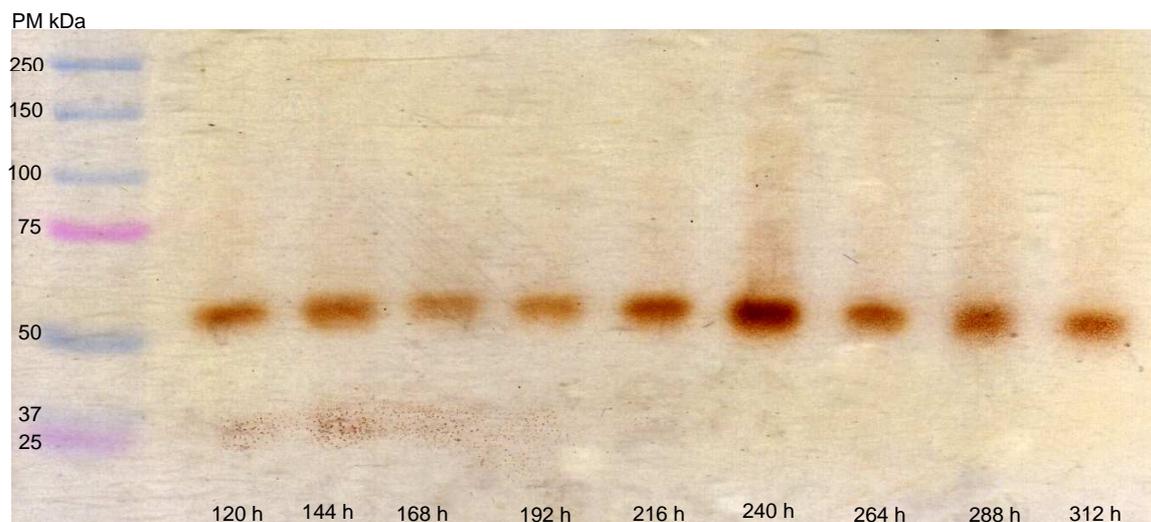


Figura 29. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 4.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 3.5.

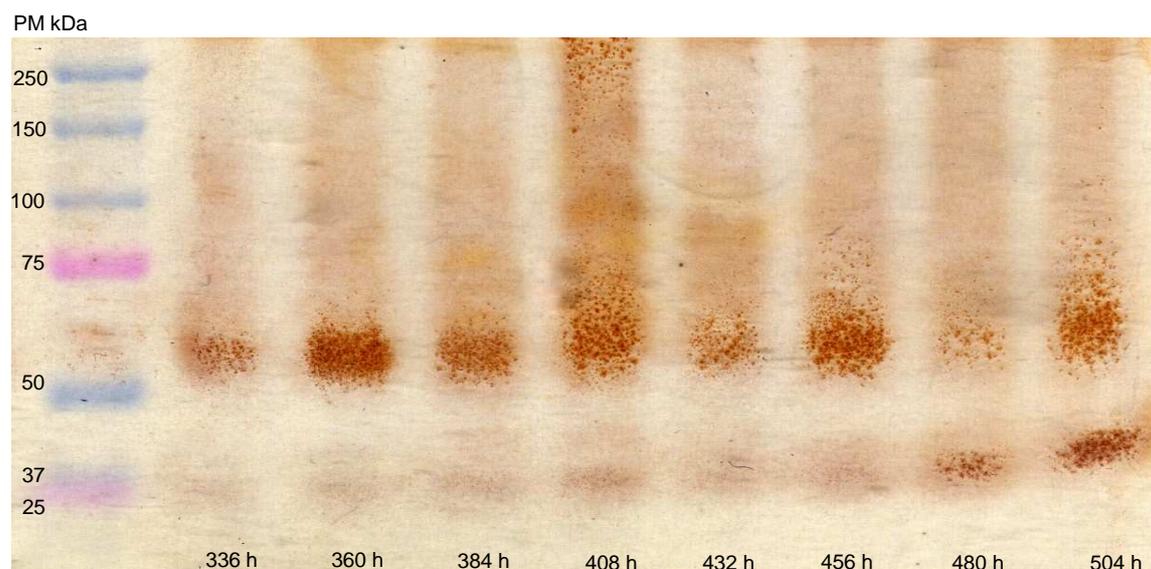


Figura 30. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 4.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 3.5.

El zimograma de lacasas intracelulares de *Pleurotus ostreatus* incubado en solución buffer a pH de 4.5 se muestra en la Figura 31, se observan bandas con pesos moleculares de 65 y 29 kDa aproximadamente, siendo mayor la actividad en la fase de crecimiento exponencial y estacionaria. (Figura 32).

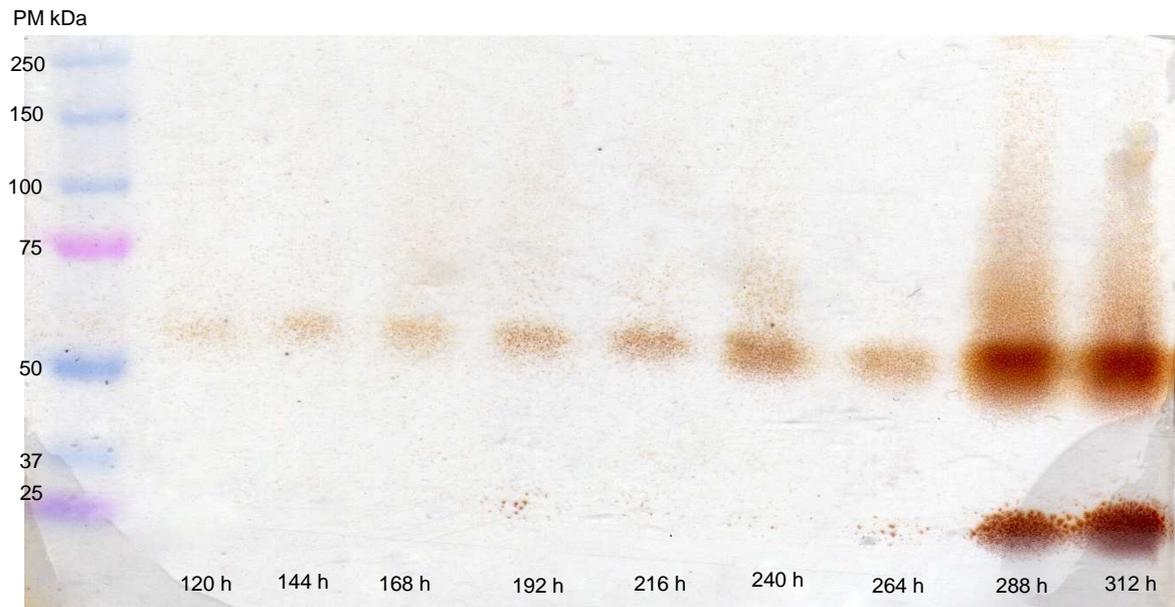


Figura 31. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 4.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 4.5.

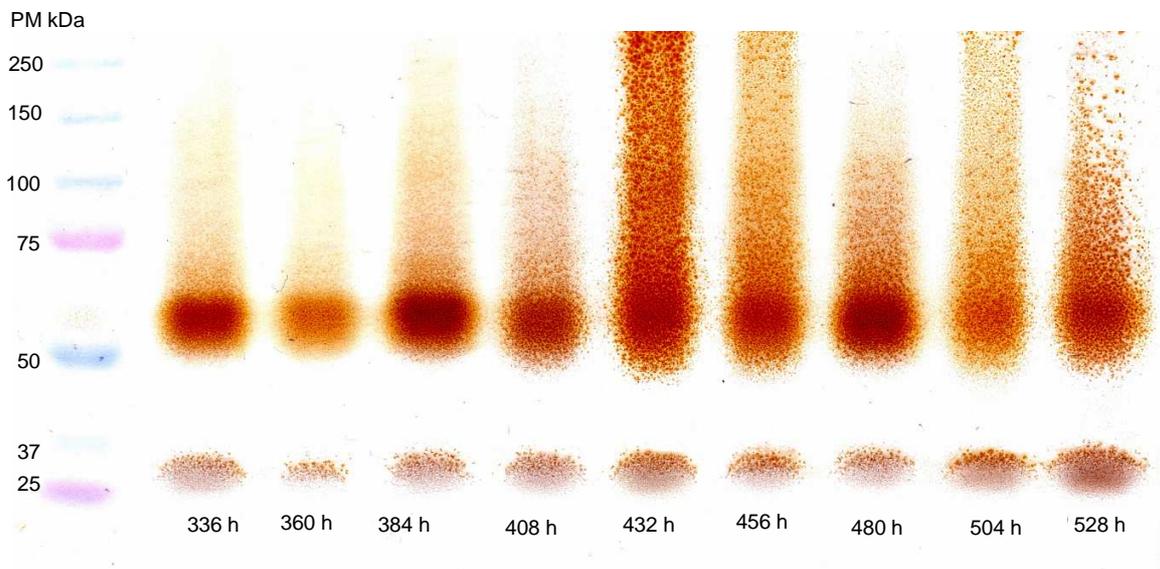


Figura 32. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 4.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 4.5.

En la Figura 33 se observan el zimograma de lacasas intracelulares, cuando se incubó en solución buffer de pH 6.5, se observaron pesos aproximados de 65 y 29 kDa. En el caso de las bandas con peso aproximado de 65 kDa se hacen más evidentes a partir de las 288 h.

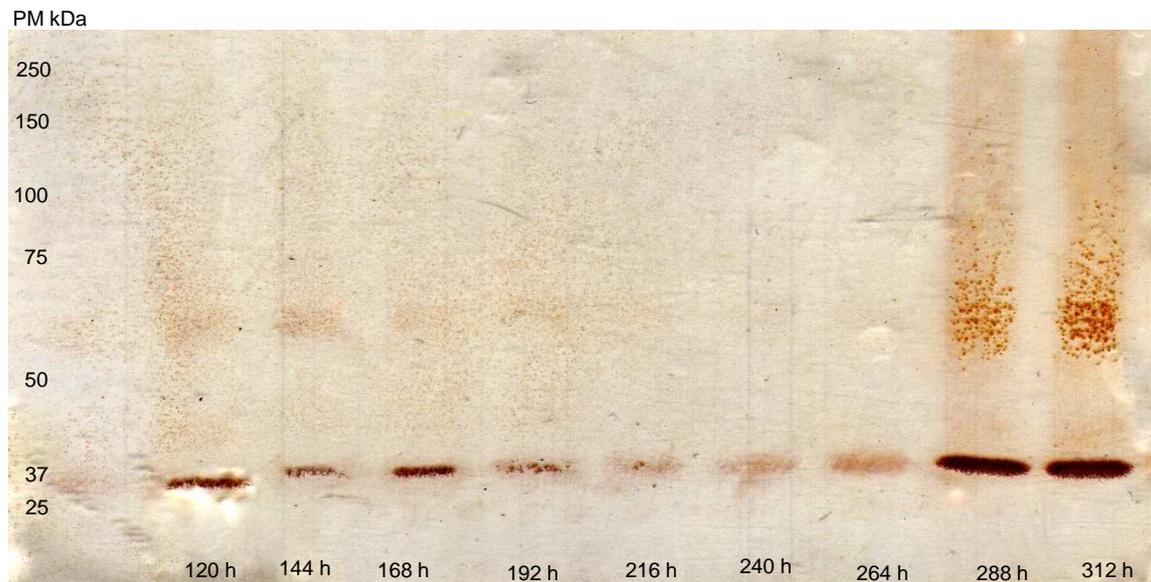


Figura 33. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 4.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 6.5.

A partir de las 336 h de fermentación, se observan las bandas de isoenzimas de lacasas intracelulares, siendo mayor la actividad en la fase estacionaria. Figura 34.

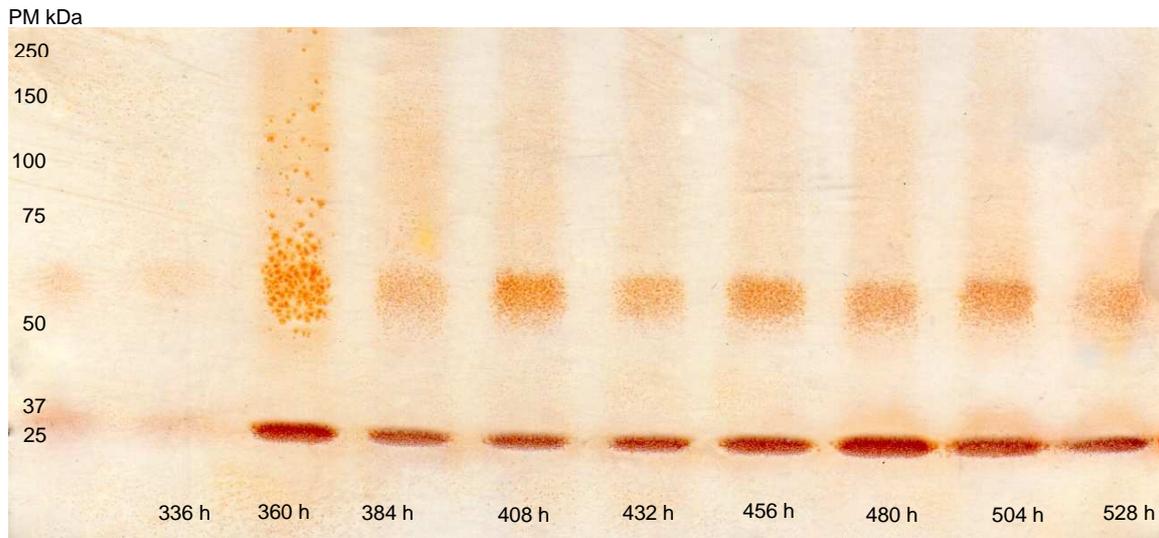


Figura 34. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 4.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 6.5.

En la Figura 35 se muestra el zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación sumergida de pH inicial de desarrollo de 4.5, incubado en solución buffer de pH 8.5. Las bandas tienen aproximadamente 65 y 29 kDa, mismas isoenzimas se observaron en las fases exponencial y estacionaria (Figura 36).

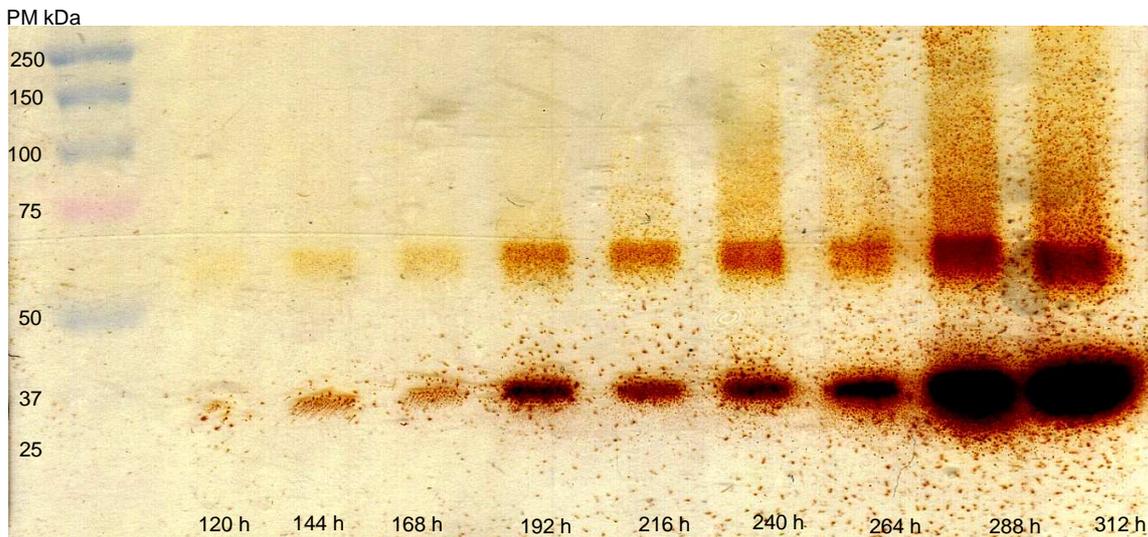


Figura 35. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 4.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 8.5.

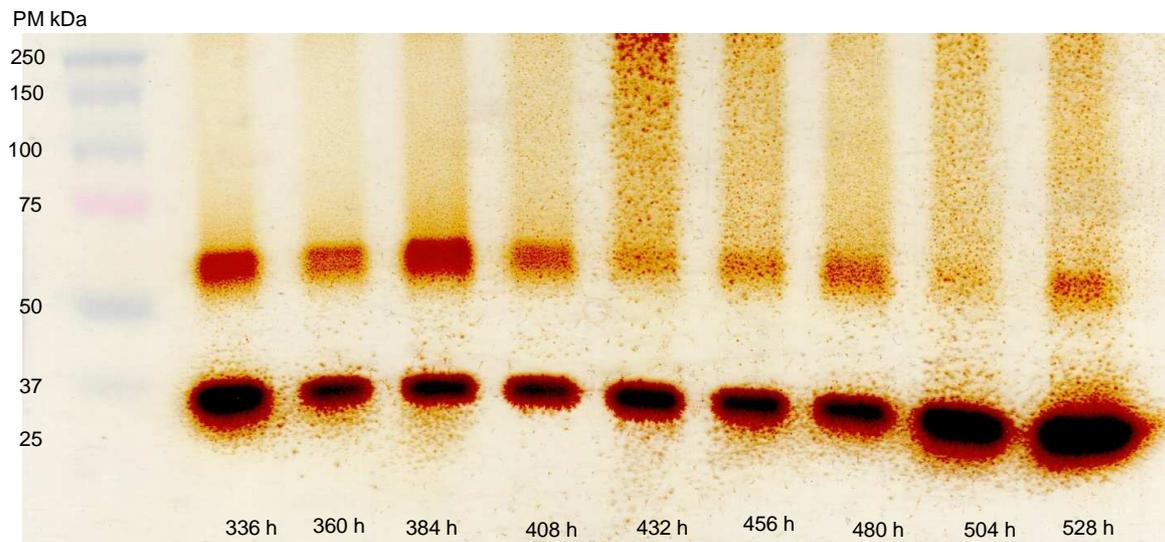


Figura 36. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 4.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 8.5.

7.3. Fermentación a pH de desarrollo de 6.5

7.3.1. Biomasa

La producción de X durante la fermentación se muestra en la Figura 37. 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 9.64 g/L y la μ de 0.018 h^{-1} .

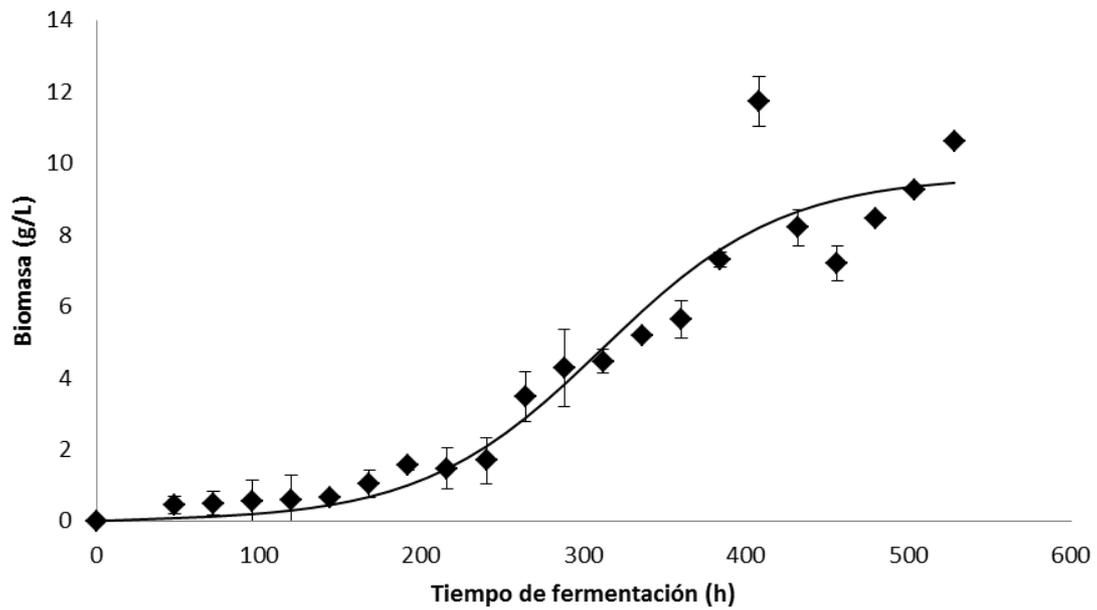


Figura 37. Cinética de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en fermentación a pH inicial de desarrollo de 6.5.

7.3.2. Actividad de lacasa extracelular

En la Figura 38 se muestra la actividad de lacasas extracelular de *Pleurotus ostreatus*, obtenida por fermentación a pH inicial de desarrollo de 6.5 e incubada en solución buffer a pH 3.5, 4.5, 6.5 y 8.5. Se observó una máxima actividad de lacasas de aproximadamente 25,000 U/L cuando se incubó en solución buffer de pH 3.5, 4.5 y 6.5. Por otro lado la actividad máxima observada cuando se incubó en solución buffer a pH de 8.5 fue de 5,075 U/L.

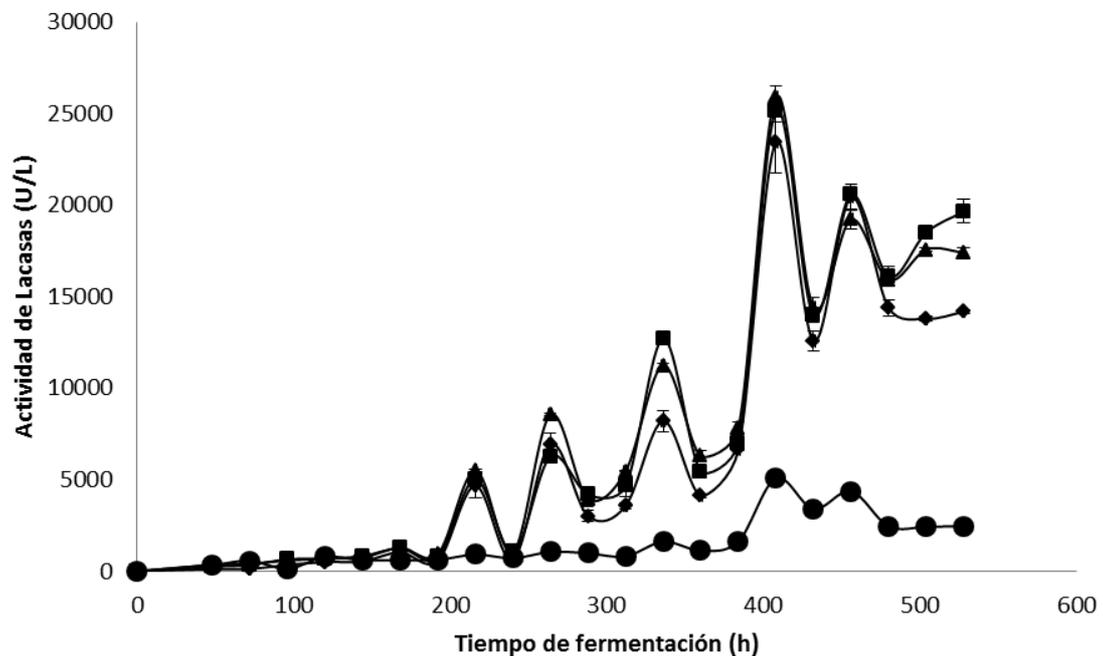


Figura 38. Actividad de lacasas de *Pleurotus ostreatus* obtenidas por fermentación a pH de 6.5 inicial de desarrollo, evaluada a pH de 3.5 (●), 4.5 (▲), 6.5 (◆) y 8.5 (■).

7.3.3. Actividad de lacasa intracelular

En la Figura 39 se muestra la actividad intracelular. Se observan actividades bajas durante la fermentación, teniendo actividad máxima cuando se incubó a pH de 6.5, alcanzando valores de 1,741 U/g de biomasa seca; en el caso de la actividad incubada en solución buffer a pH 3.5 se alcanzó un máximo de 207 U/g de biomasa seca; por otro lado cuando se incubó a pH 4.5 la actividad máxima fue de 810 U/g de biomasa seca y de 506 U/g de biomasa seca para el caso de la actividad cuando fue incubado en solución buffer a pH 8.5.

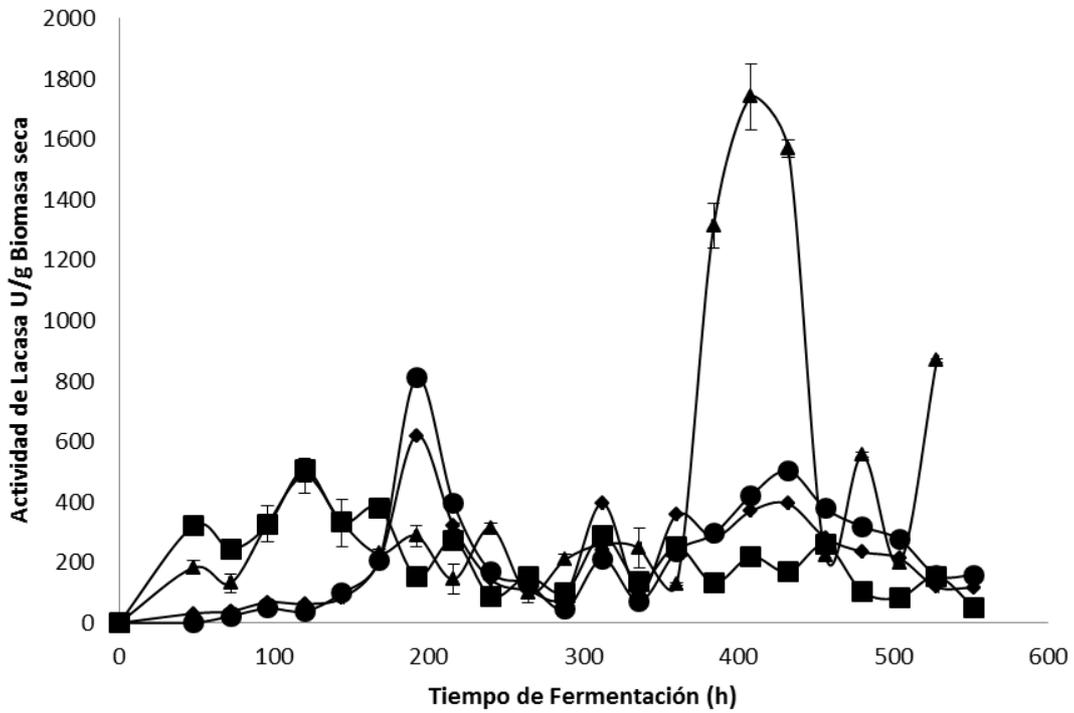


Figura 39. Actividad intracelular de lacasas de *Pleurotus ostreatus* obtenidas por fermentación a pH de 6.5 inicial de desarrollo, evaluada a pH de 3.5 (◆), 4.5 (●), 6.5 (▲) y 8.5 (■).

7.3.4. Perfil de pH de la fermentación sumergida a pH inicial de 6.5 de desarrollo.

La figura 40 muestra el perfil de pH a través del tiempo de la fermentación de *Pleurotus ostreatus* a pH 6.5 inicial de desarrollo, se observó durante la fase de crecimiento de adaptación y exponencial hasta cierta forma constante, para finalmente en la fase estacionaria de crecimiento el pH aumentó a valores alrededor de 7.

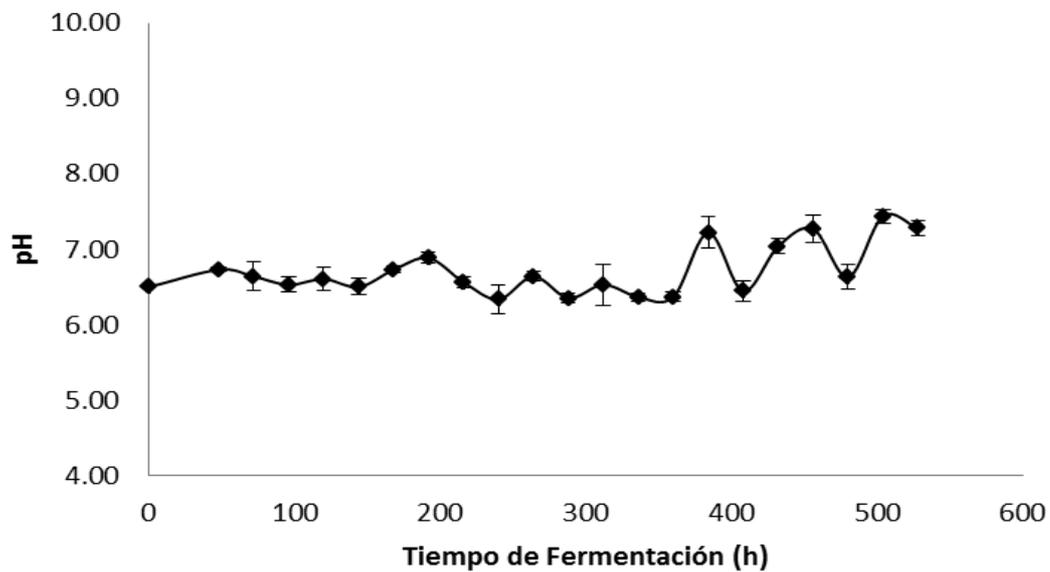


Figura 40. Perfil de pH de la fermentación sumergida de *Pleurotus ostreatus* a pH inicial de desarrollo de 6.5

7.3.5. Determinación de número de isoenzimas de lacasas extracelulares de la fermentación sumergida de *Pleurotus ostreatus* desarrollado a pH inicial de 6.5

En la Figura 41 se muestra el zimograma de la fermentación sumergida a pH inicial de 6.5, incubado en solución buffer a pH 3.5. Se observó la presencia de tres isoenzimas con actividad de lacasa con un PM aproximado de 65, 47 y 29 kDa durante la fase estacionaria de crecimiento del hongo.

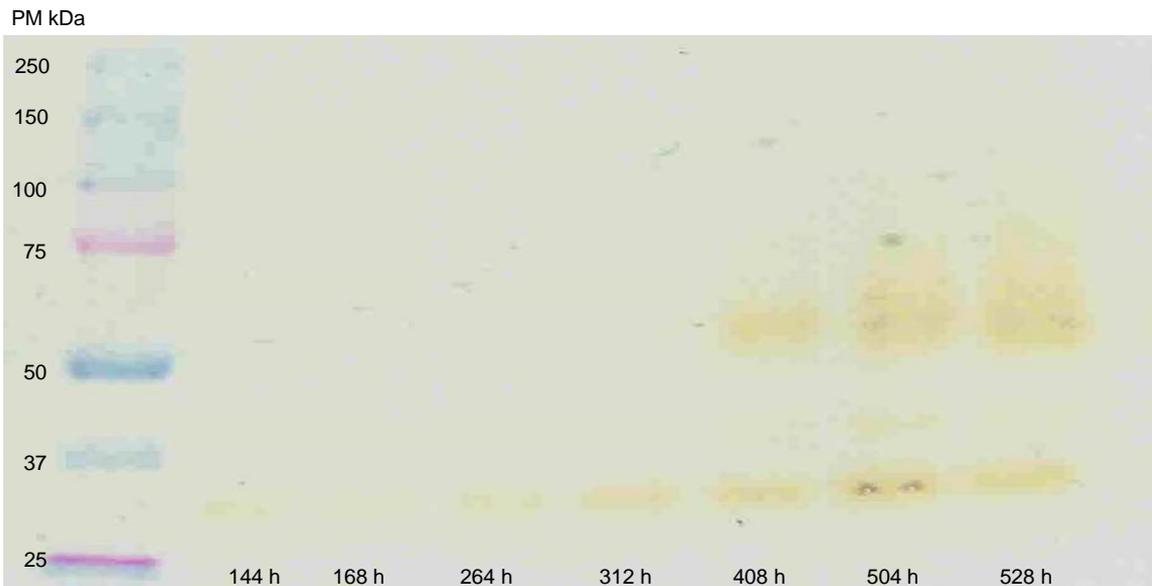


Figura 41. Zimograma de lacasas extracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 6.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 3.5.

La Figura 42 muestra el zimograma de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 6.5 incubado en solución buffer a pH de 4.5. Se observaron tres isoenzimas de lacasa durante la fase de crecimiento estacionario del hongo de 65, 47 y 29 kDa.

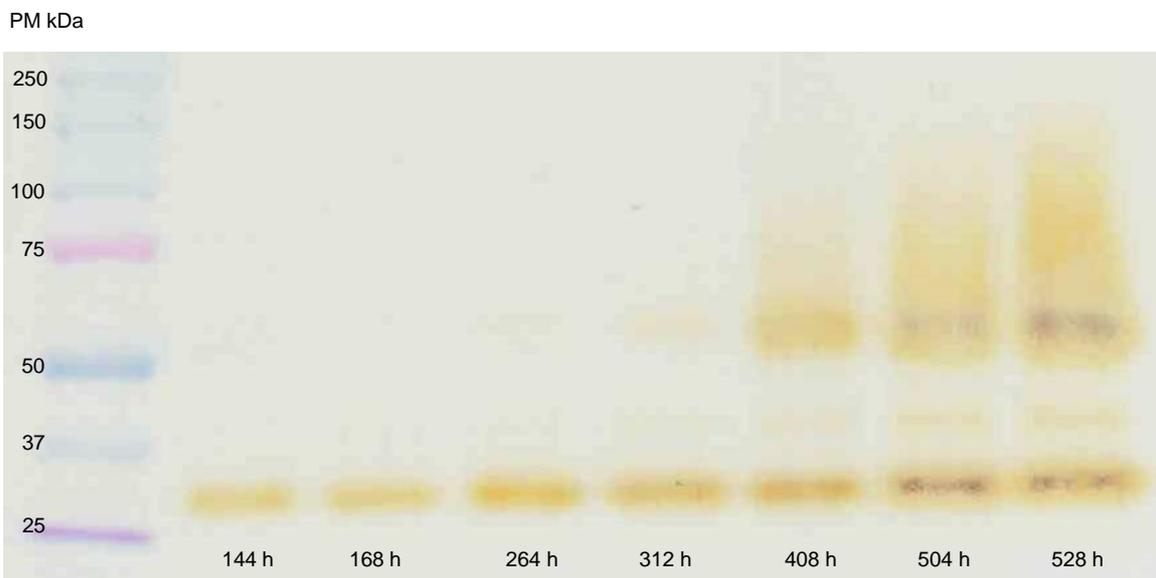


Figura 42. Zimograma de lacasas extracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 6.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubada en solución buffer a pH 4.5.

En la Figura 43 se muestra el zimograma de la fermentación sumergida a pH inicial de desarrollo de 6.5 incubado en solución buffer a pH de 6.5, se observó cuando menos cuatro isoenzimas de lacasa con peso molecular aproximado de 65, 47, 38 y 29 kDa.

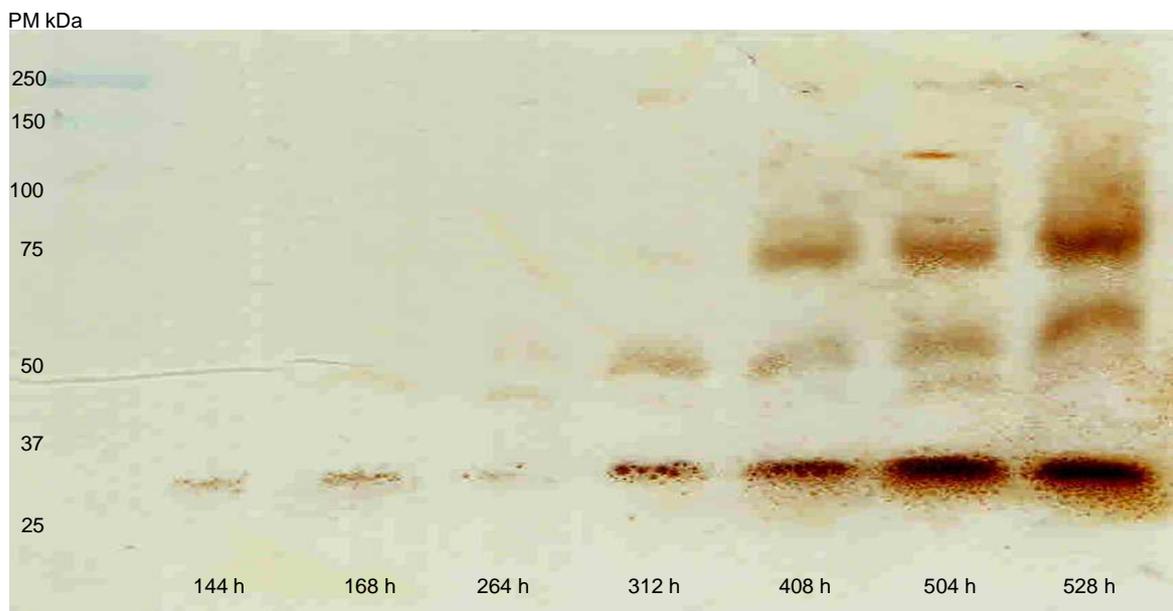


Figura 43. Zimograma de lacasas extracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 6.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH de 6.5.

En la Figura 44 se muestra el zimograma de la fermentación de pH 6.5 inicial de desarrollo, incubado en solución buffer a pH 8.5, se observó una sola isoenzima con baja actividad de aproximadamente 29 kDa.

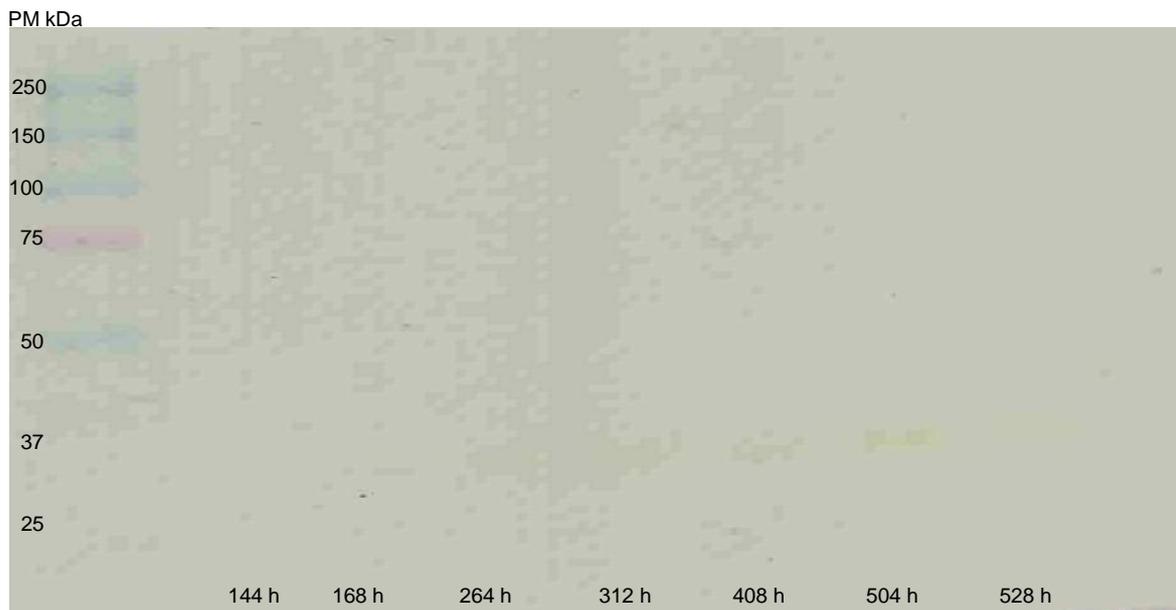


Figura 44. Zimograma de lacasas extracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 6.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH de 8.5.

7.3.6. Determinación de número de isoenzimas intracelulares de lacasas de la fermentación sumergida a pH inicial de desarrollo de 6.5

Las Figuras 45 y 46 muestran los zimogramas de lacasas intracelulares de la fermentación sumergida a pH inicial de desarrollo de 6.5, incubado en solución buffer a pH 3.5. Se observaron cuando menos dos bandas de pesos moleculares de aproximadamente 65 y 47 kDa, de las cuales la de mayor peso molecular presenta mayor actividad. Este patrón de producción se mantiene durante todo el tiempo de fermentación.

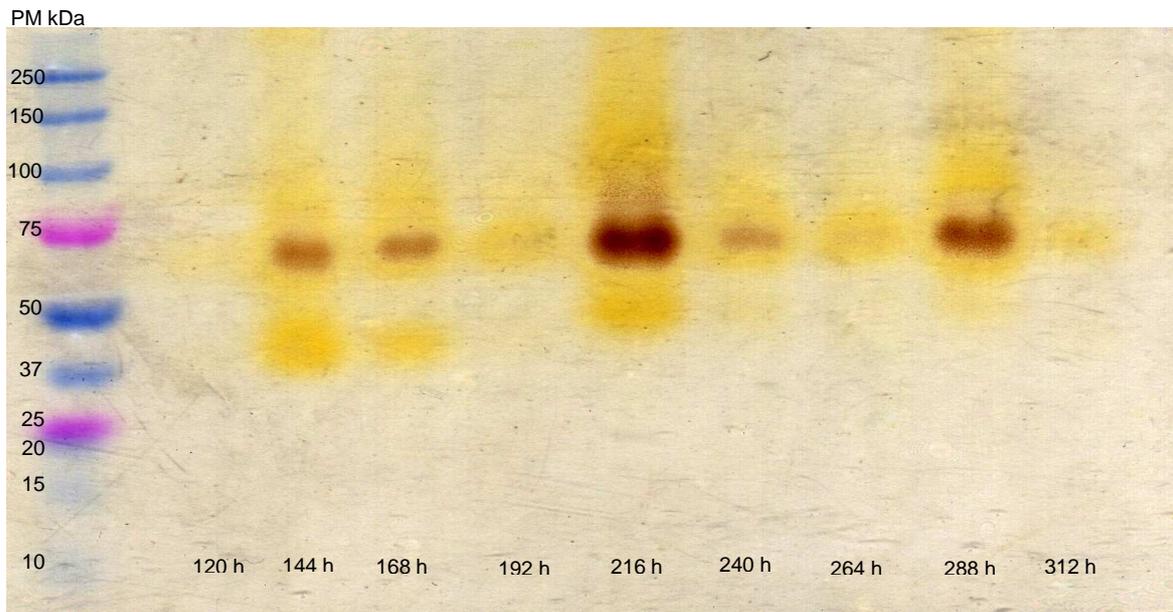


Figura 45. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 6.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 3.5.

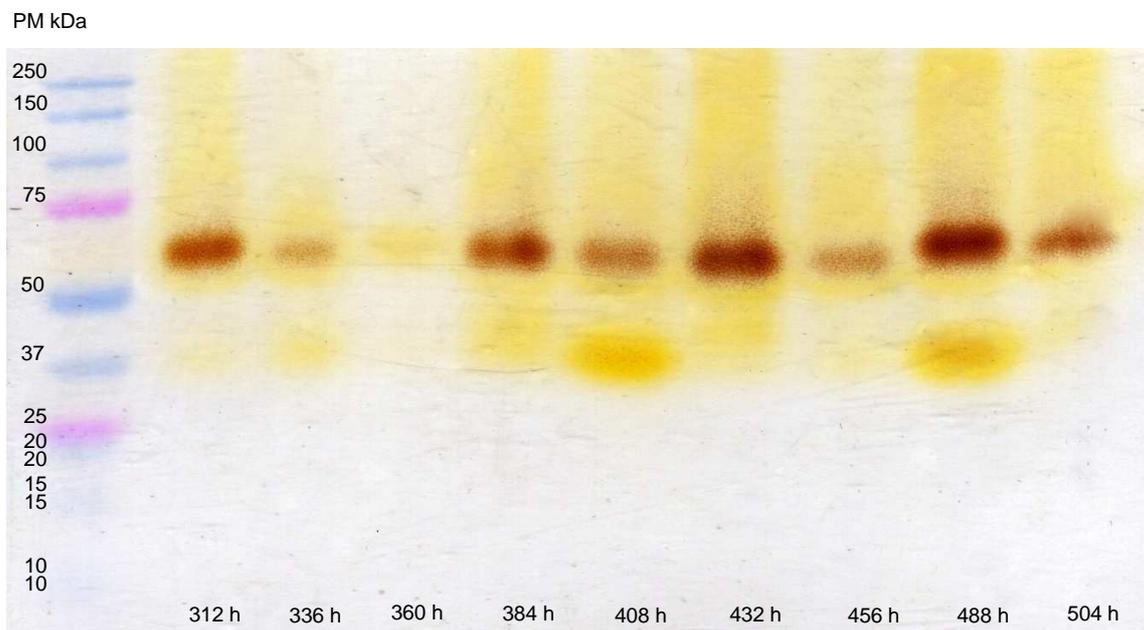


Figura 46. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación a pH inicial de desarrollo de 6.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 3.5.

Las Figuras 47 y 48 muestran los zimogramas de lacasas observadas en la fermentación sumergida a pH inicial de desarrollo de 6.5, incubados en solución buffer a pH 4.5, mostrando cuando menos tres isoenzimas durante toda la fermentación de 65, 47 y 29 kDa aproximadamente.

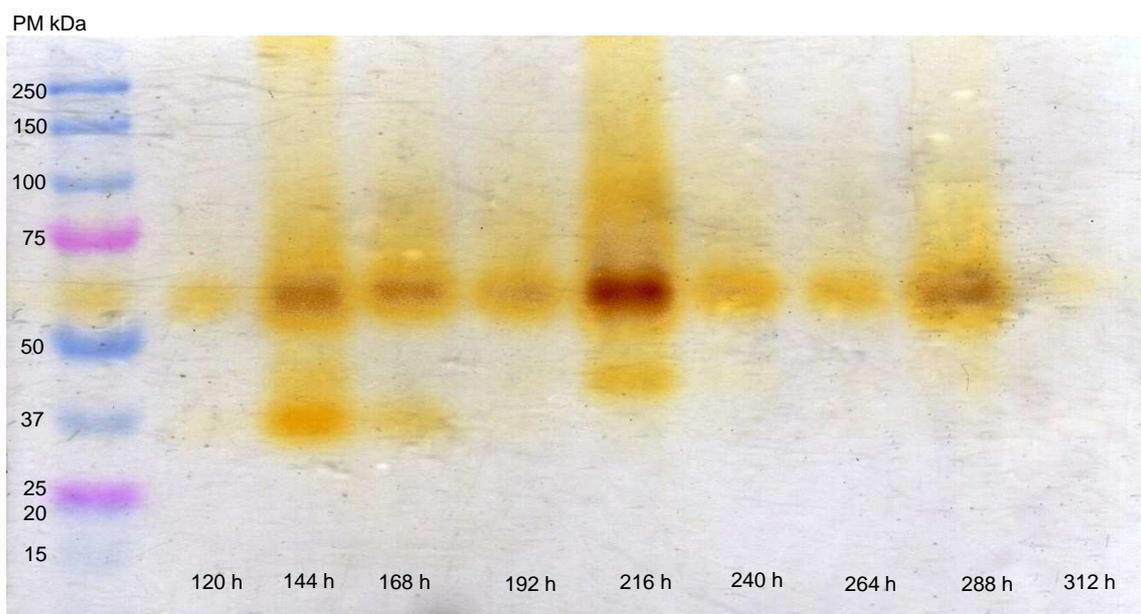


Figura 47. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 6.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 4.5.

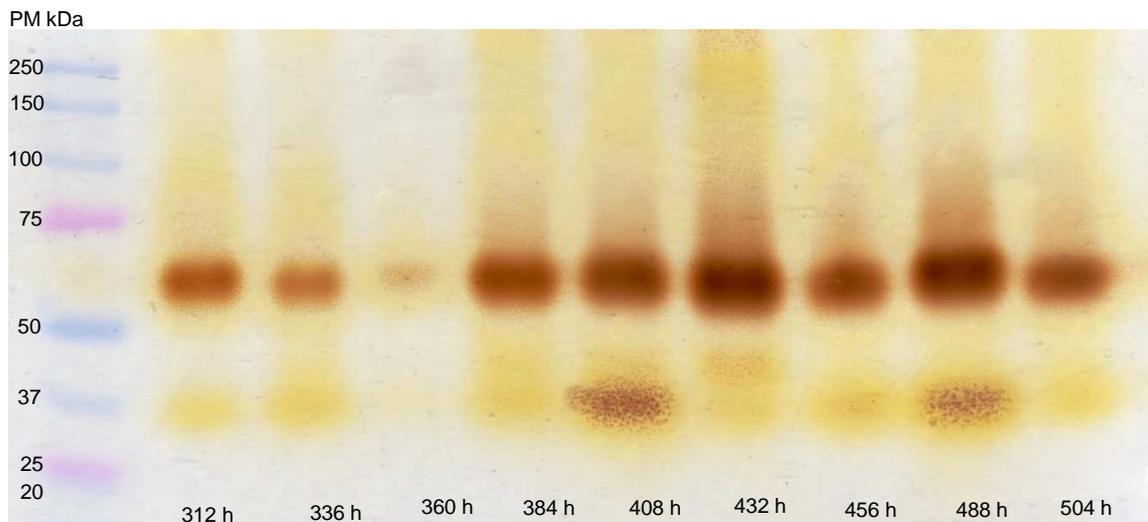


Figura 48. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 6.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 4.5.

En las Figuras 49 y 50 se observan los zimogramas de lacasas intracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 6.5, incubados en solución buffer a pH de 6.5, mostrando pesos moleculares de 70 y 47 kDa aproximadamente.

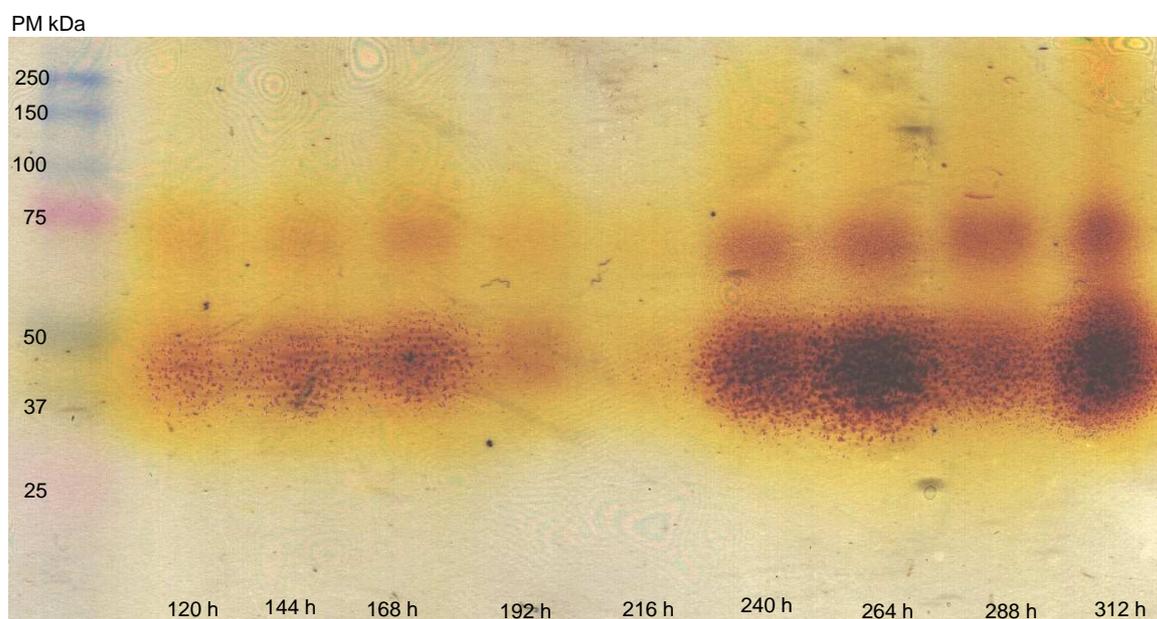


Figura 49. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 6.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 6.5.

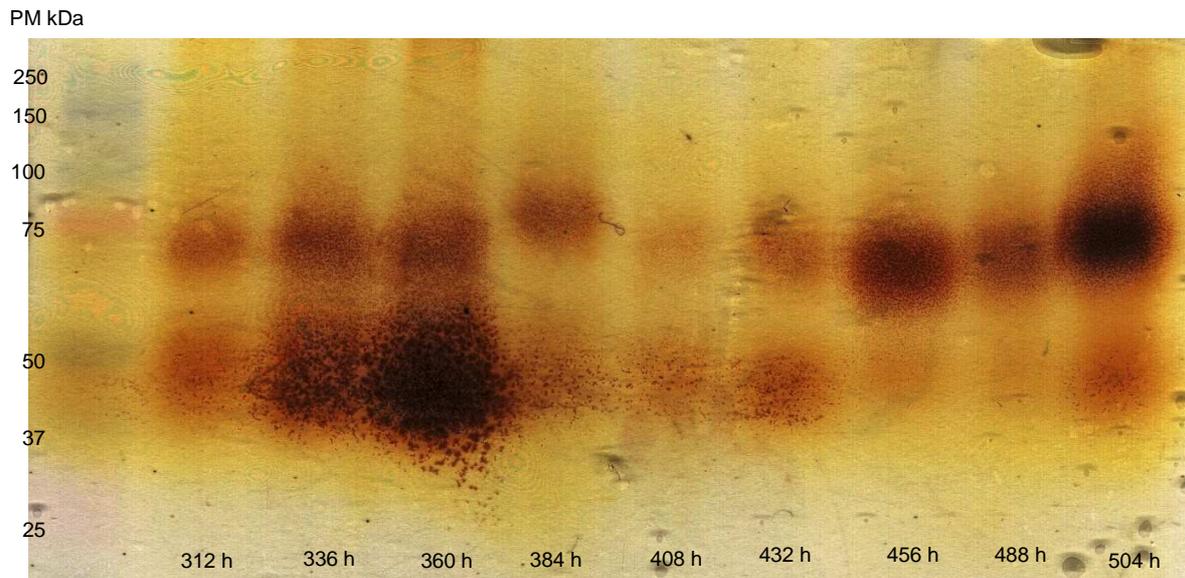


Figura 50. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 6.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 6.5.

La Figura 51 muestra el zimograma de lacasas de la fermentación sumergida de *Pleurotus ostreatus* a pH inicial de desarrollo de 6.5, incubado en solución buffer a pH 8.5. No se observaron bandas en este pH de incubación en ningún tiempo de la fermentación.

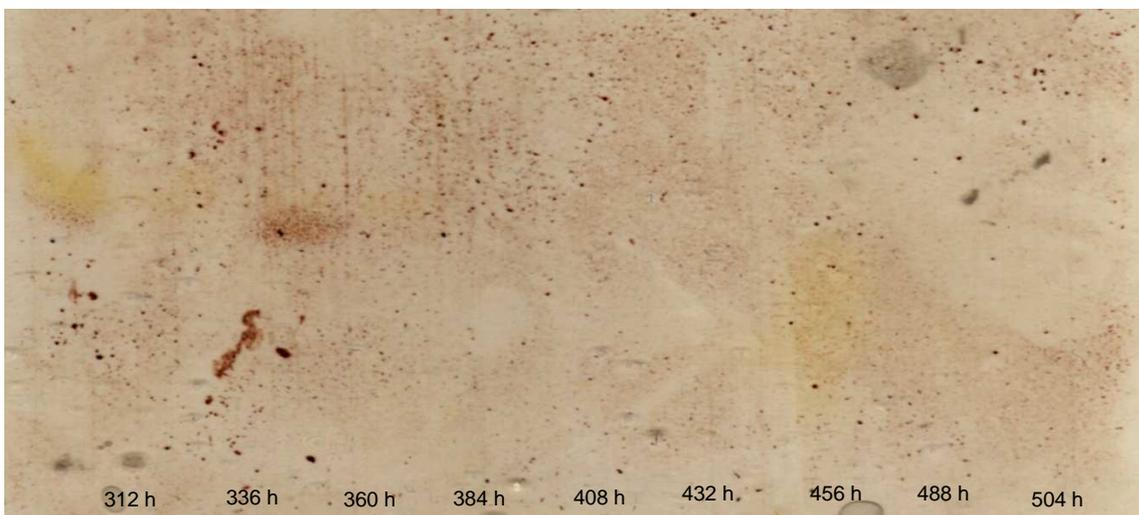


Figura 51. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 6.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 8.5.

7.4. Fermentación a pH de desarrollo de 8.5

7.4.1. Biomasa

La producción de X durante la fermentación se muestra en la Figura 52. 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 8.3 g/L y la μ de 0.02 h^{-1} .

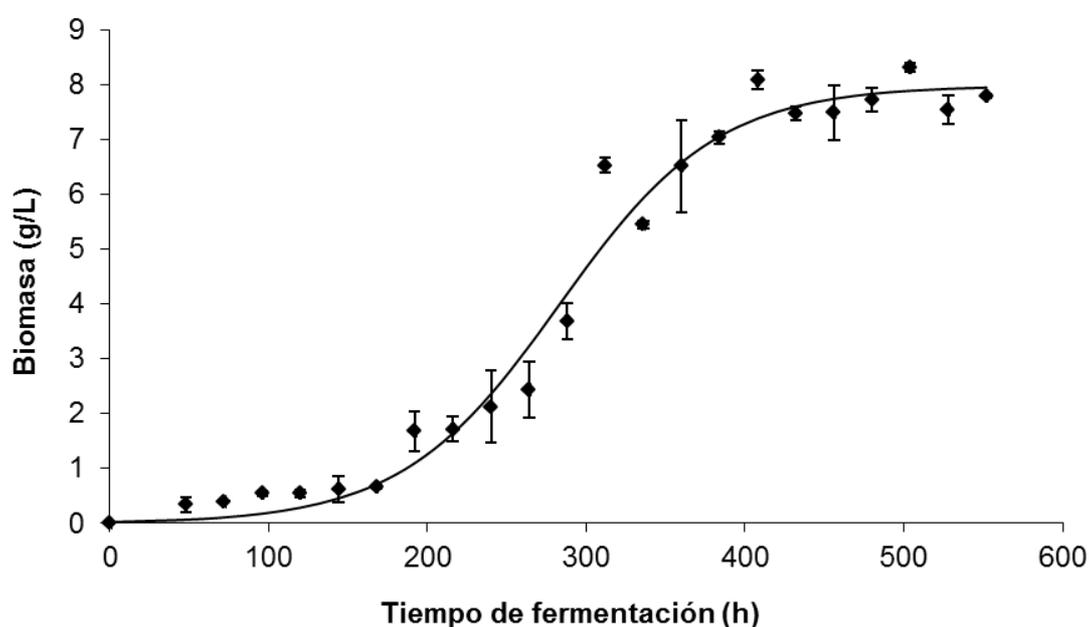


Figura 52. Cinética de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en fermentación a pH inicial de desarrollo de 8.5.

7.4.2. Actividad de lacasa extracelular

La Figura 53 muestra la actividad de lacasas extracelular de *Pleurotus ostreatus*, obtenida por fermentación a pH inicial de desarrollo de 8.5 incubada a pH 3.5, 4.5, 6.5 y 8.5. Se observaron actividades de lacasa bajas durante la fase de adaptación, habiendo un incremento de actividad durante la fase exponencial de crecimiento y alcanzando los valores máximos de actividad en la fase estacionaria; de 16,660 U/L aproximadamente cuando se

incubó en solución buffer de pH 3.5 y 4.5. Para los pH de incubación de 6.5 y 8.5, la actividad máxima fue de 2,420 y 3,715 U/L respectivamente.

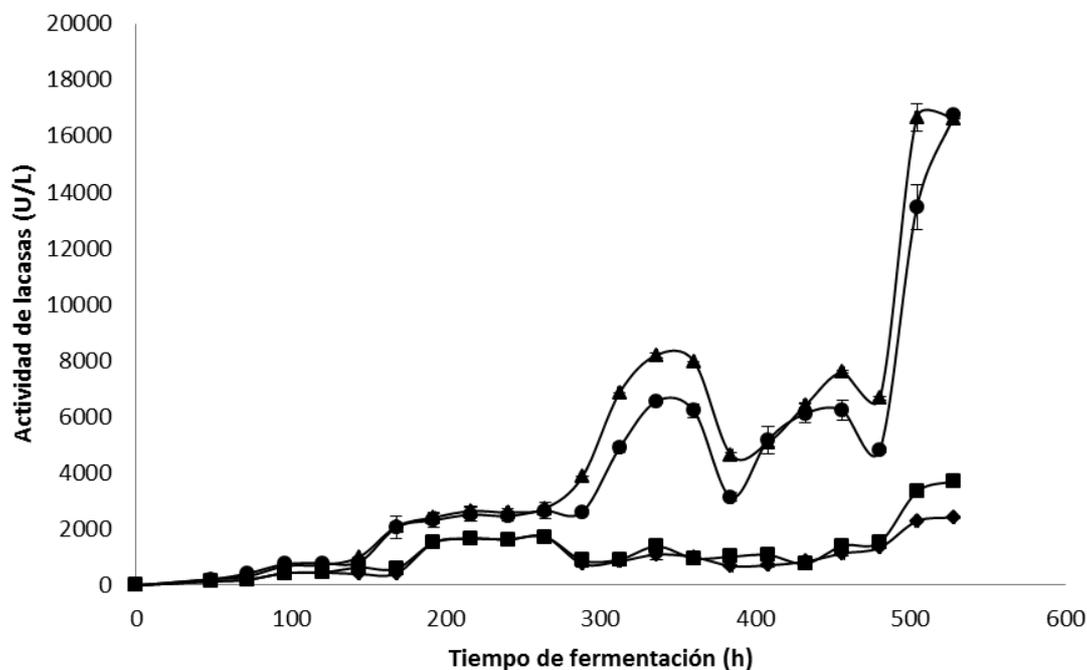


Figura 53. Actividad de lacasas de *Pleurotus ostreatus* obtenidas por fermentación a pH de 8.5 inicial de desarrollo, evaluada a pH de 3.5 (●), 4.5 (▲), 6.5 (◆) y 8.5 (■).

7.4.3. Actividad de lacasa intracelular

En la Figura 54 se muestra la actividad intracelular de la fermentación sumergida a pH inicial de desarrollo de 8.5. Se observaron actividades bajas, teniendo valores de actividad máxima cuando se incubó a pH de 3.5, alcanzando un máximo de actividad de 532 U/g de biomasa seca; por otro lado cuando se incubó a pH 4.5 se obtuvo un máximo de actividad de 291 U/g de biomasa seca, cuando se incubó a pH de 6.5 la actividad máxima fue de 120 U/g de biomasa seca y de 125 U/g de biomasa seca para el caso de la actividad cuando se incubó a pH 8.5.

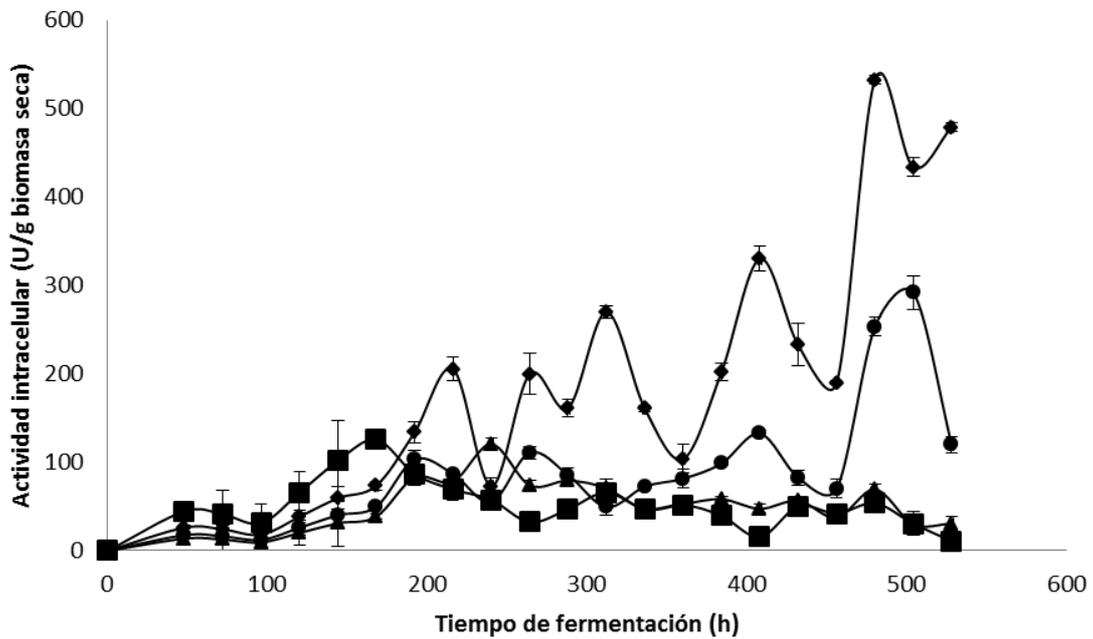


Figura 54. Actividad intracelular de lacasas de *Pleurotus ostreatus* obtenidas por fermentación a pH de 8.5 inicial de desarrollo, evaluada a pH de 3.5 (♦), 4.5 (●), 6.5 (▲) y 8.5 (■).

7.4.4. Perfil de pH de la fermentación sumergida a pH inicial de 8.5 de desarrollo.

La figura 55 muestra el perfil de pH a través del tiempo de la fermentación de *Pleurotus ostreatus* a pH 8.5 inicial de desarrollo, se observó una disminución alrededor de una unidad de pH a valores cercanos a 7.

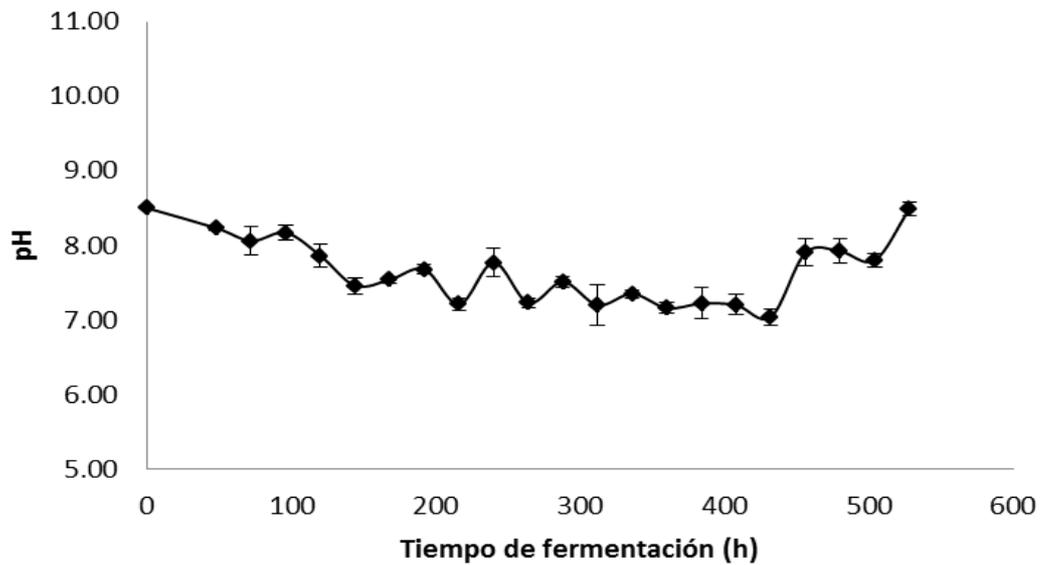


Figura 55. Perfil de pH de la fermentación sumergida de *Pleurotus ostreatus* a pH inicial de desarrollo de 8.5

7.4.5. Determinación de número de isoenzimas de lacasas extracelulares de la fermentación sumergida de *Pleurotus ostreatus* desarrollado a pH inicial de 8.5

En la Figura 56 se muestra el zimograma de lacasas obtenidas de la fermentación sumergida de *Pleurotus ostreatus* desarrollado a pH inicial de 8.5, incubado en solución buffer a pH 3.5. Se observó la presencia de dos isoenzimas con actividad de lacasa con un PM aproximado de 47 y 29 kDa durante la fase estacionaria de crecimiento del hongo.

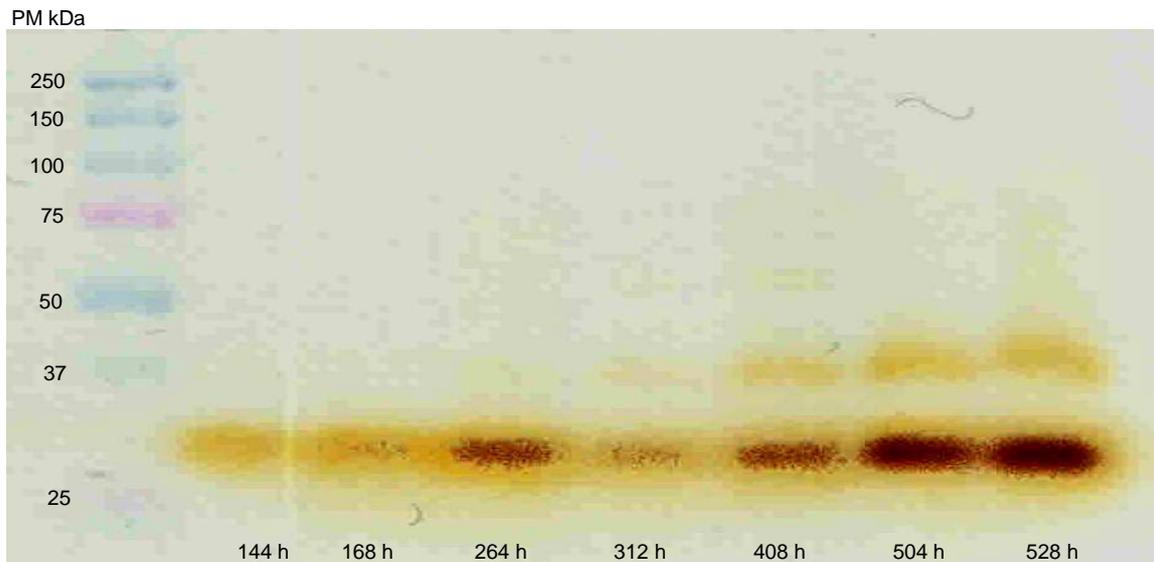


Figura 56. Zimograma de lacasas extracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 8.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 3.5.

La Figura 57 muestra el zimograma fermentación sumergida a pH inicial de 8.5, incubado en solución buffer a pH 4.5. Se observó la presencia de tres isoenzimas con actividad de lacasa con un PM aproximado de 65, 47 y 29 kDa.

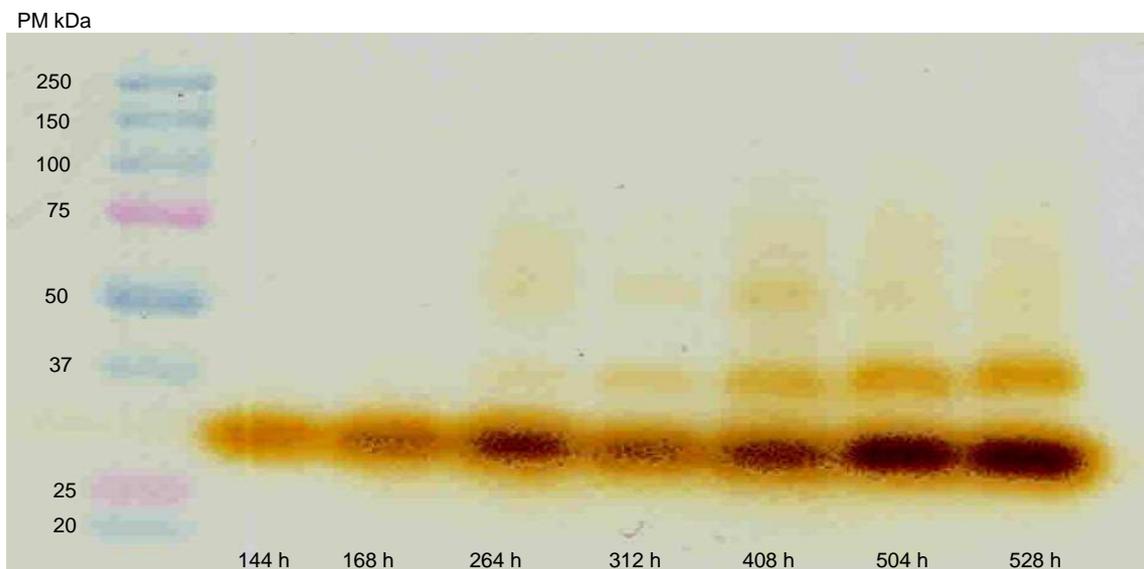


Figura 57. Zimograma de lacasas extracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 8.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 4.5.

En la Figura 58 se muestra el zimograma de lacasas obtenidas de la fermentación sumergida de *Pleurotus ostreatus* desarrollado a pH inicial de 8.5, incubado en solución buffer a pH 6.5. Se observaron las mismas tres isoenzimas con actividad de lacasa observados cuando se incubó en solución buffer a pH 4.5, con un PM aproximado de 65, 47 y 29 kDa.

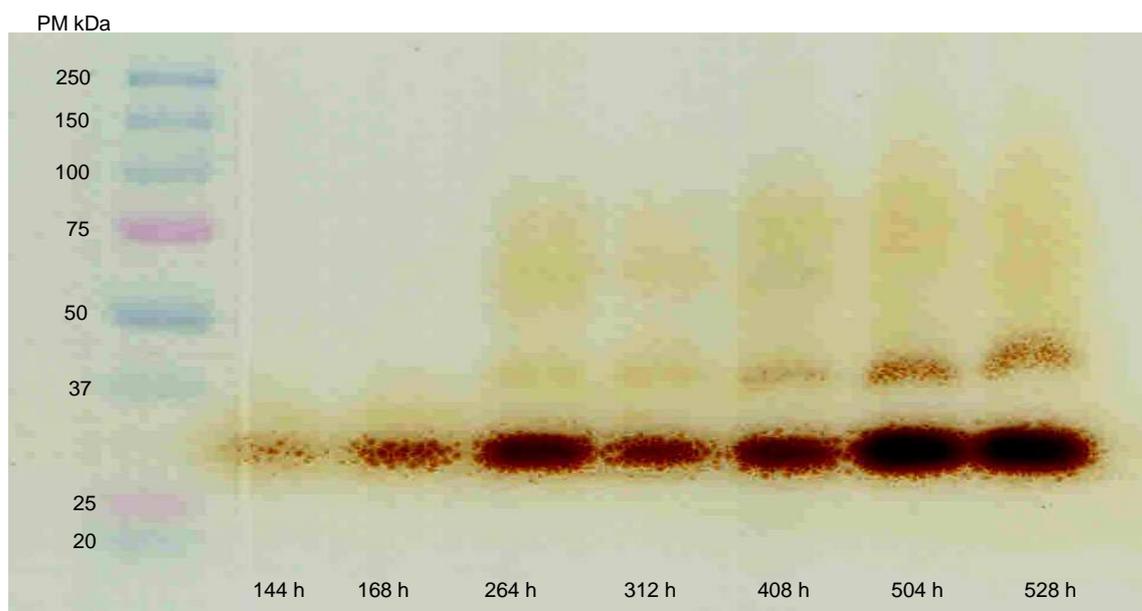


Figura 58. Zimograma de lacasas extracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 8.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 6.5.

En la Figura 59 se muestra el zimograma de lacasas obtenidas de la fermentación sumergida de *Pleurotus ostreatus* desarrollado a pH inicial de 8.5, incubado en solución buffer a pH 8.5. Se observó únicamente una isoenzima de aproximadamente 29 kDa con baja actividad.

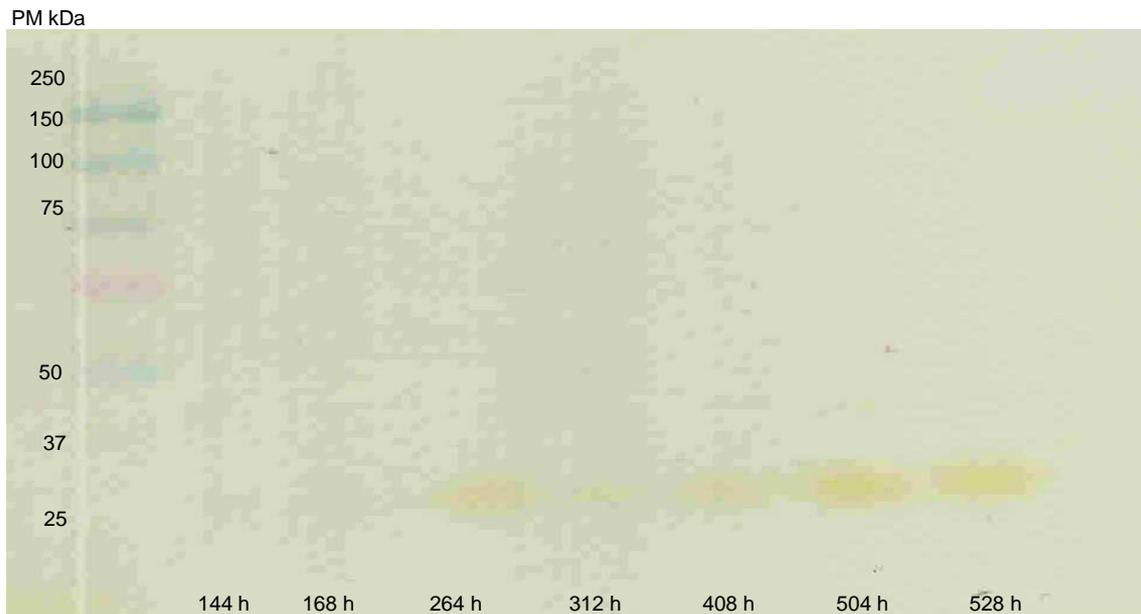


Figura 59. Zimograma de lacasas extracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 8.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 8.5.

7.4.6. Determinación de número de isoenzimas intracelulares de lacasas de la fermentación sumergida a pH inicial de desarrollo de 8.5

Las Figuras 60 y 61 muestran los zimogramas de lacasas intracelulares de la fermentación sumergida a pH inicial de desarrollo de 8.5, incubado en solución buffer a pH 3.5. Se observaron cuando menos dos bandas de pesos moleculares de aproximadamente 75 y 29 kDa durante los primeros tiempos de la fermentación hasta cuando empieza la fase exponencial de crecimiento; posteriormente apareció otra isoenzima de PM aproximado de 47 kDa con baja actividad de lacasa.

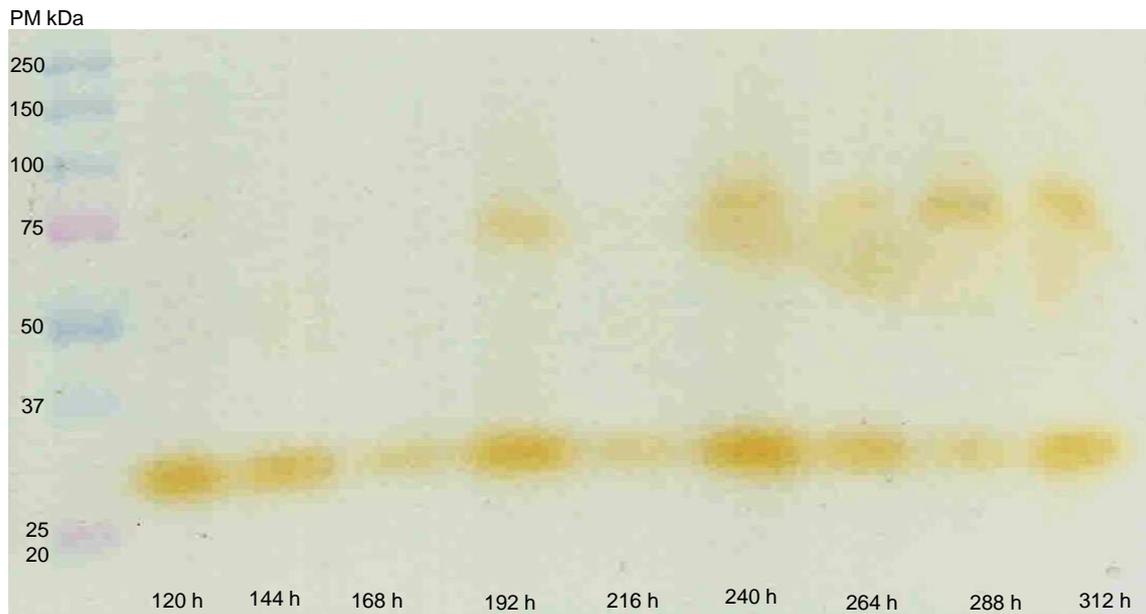


Figura 60. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 8.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 3.5.

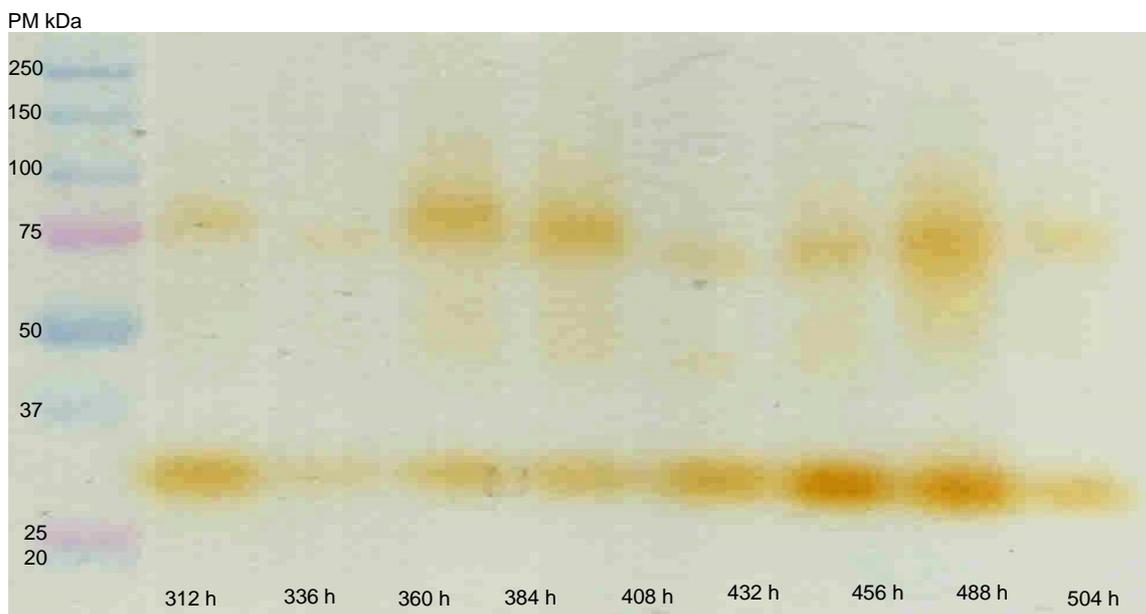


Figura 61. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 8.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 3.5.

La Figura 62 muestra el zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación sumergida a pH inicial de desarrollo de 8.5, incubado en solución buffer a pH 4.5. Se observaron hasta tres bandas con actividad de lacasa de pesos moleculares de aproximadamente 75, 65 y 29 kDa.

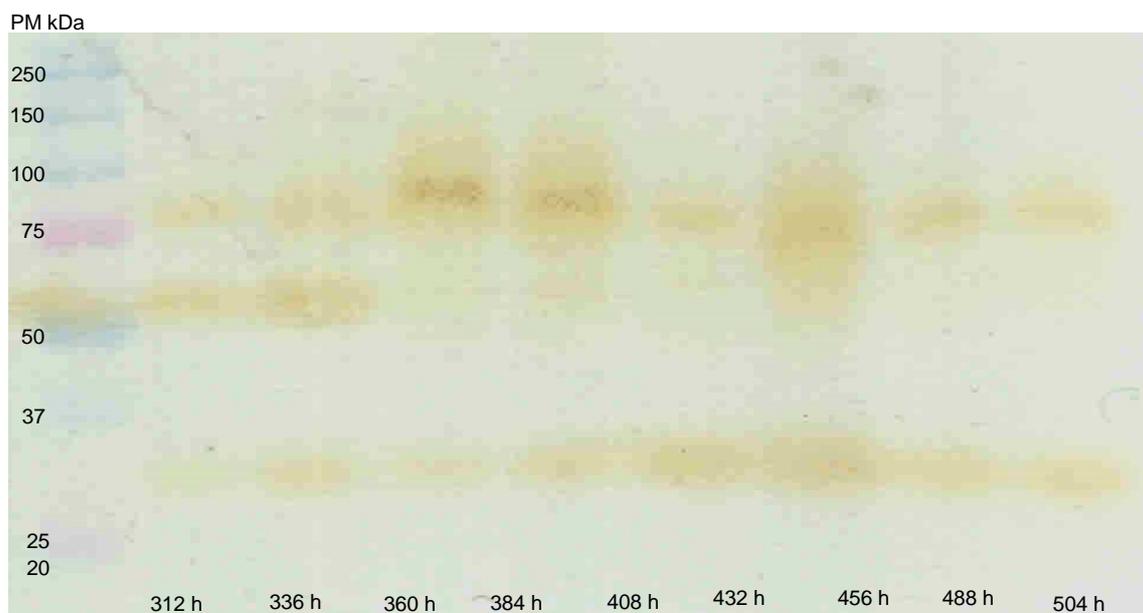


Figura 62. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 8.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 4.5.

Las Figuras 63 y 64 muestran los zimogramas de lacasas intracelulares obtenidas de la fermentación sumergida de *Pleurotus ostreatus* a pH inicial de desarrollo de 8.5, incubados en solución buffer de pH 6.5. Se observó a partir de la fase exponencial y hasta el final de la fermentación, se observó una sola banda de PM aproximado de 29 kDa. Finalmente se observó una isoenzima de PM aproximado de 75 kDa con baja actividad.

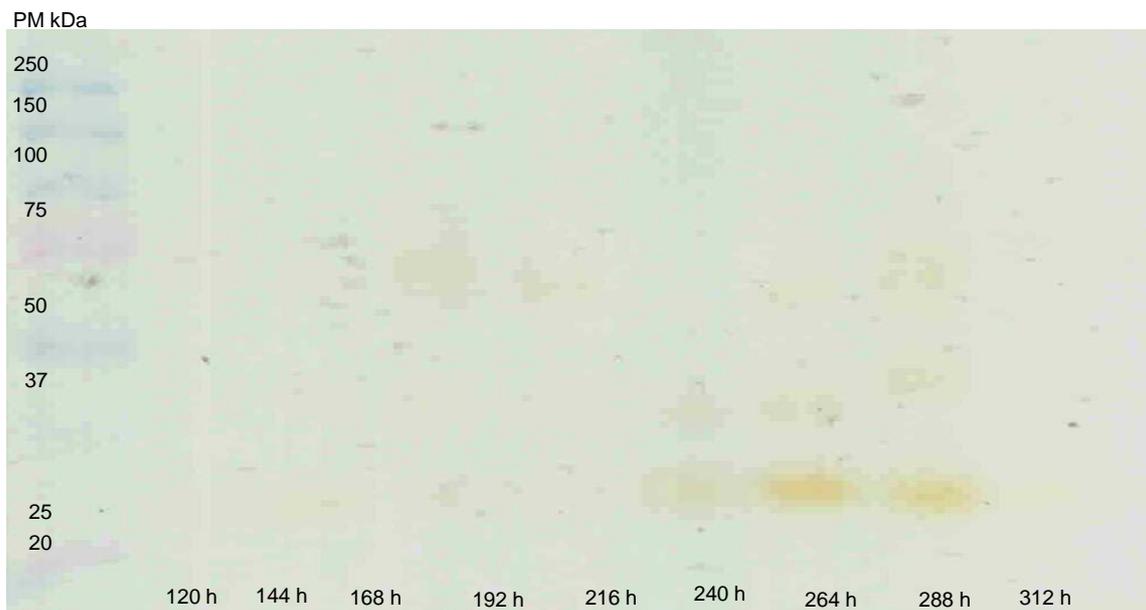


Figura 63. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 8.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 6.5.

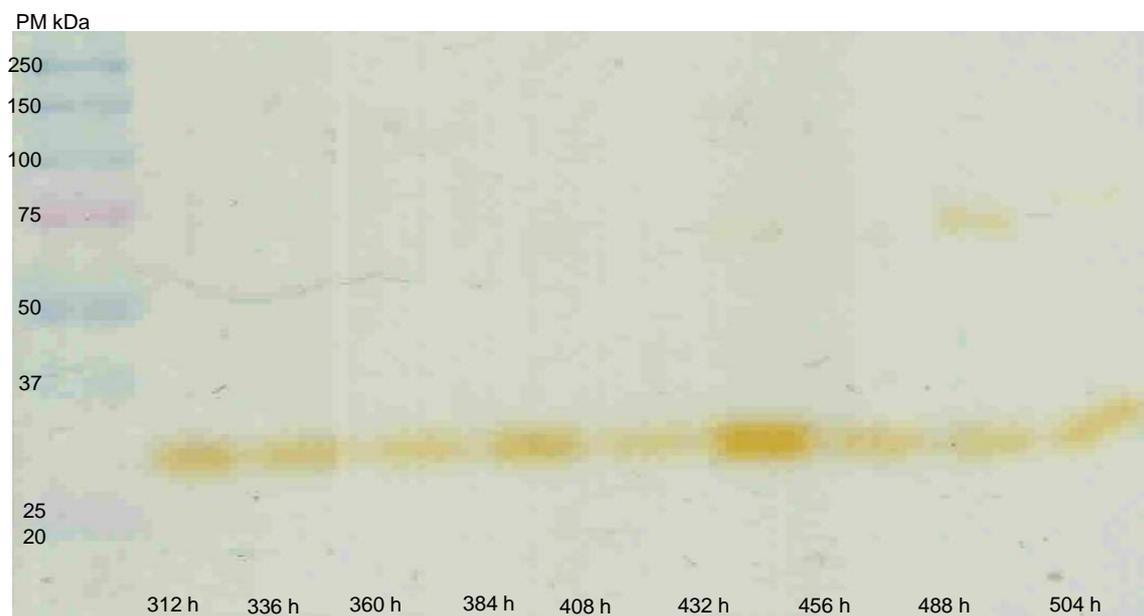


Figura 64. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 8.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 6.5.

La Figura 65 muestra el zimograma de lacasas obtenidas de la fermentación sumergida a pH inicial de desarrollo de 8.5, cuando se incubó a pH de 8.5; únicamente se observó durante la fase estacionaria de crecimiento la isoenzima de 29 kDa con actividad muy baja.

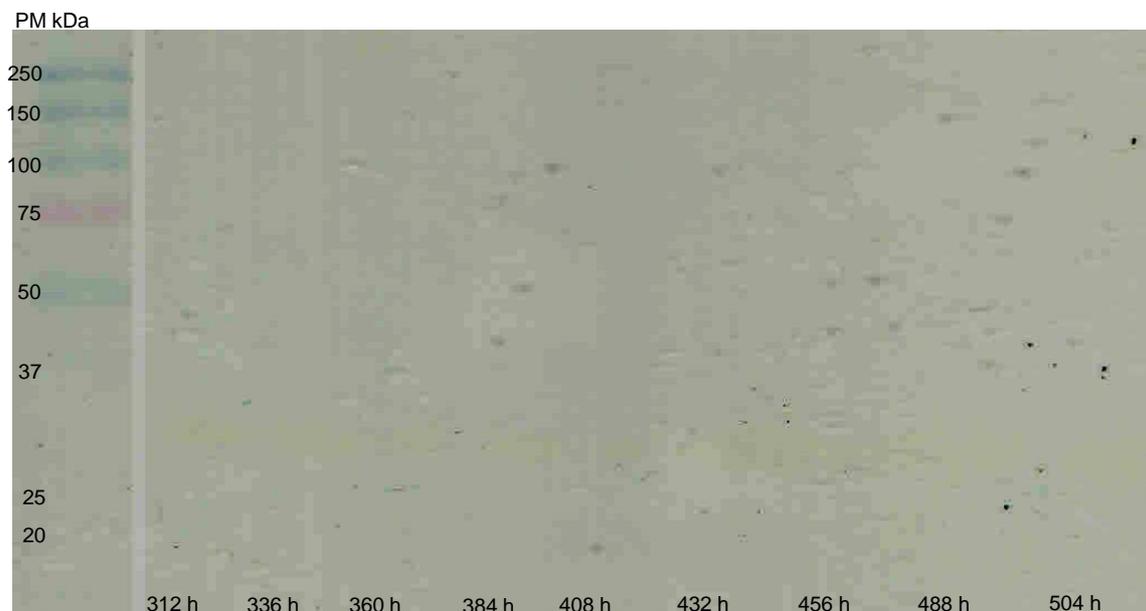


Figura 65. Zimograma de lacasas intracelulares de la fermentación de pH inicial de desarrollo de 8.5 de *Pleurotus ostreatus*. Incubado en solución buffer a pH 8.5.

7.5. Perfiles de expresión de genes de lacasas

7.5.1 Diseño de cebadores

En la tabla 4 se muestran los cebadores utilizados para la evaluación de la expresión de cinco genes de lacasa de *Pleurotus ostreatus* los cuales fueron diseñados en base a las secuencias de ARNm reportadas y tomando en consideración el tamaño diferencial del amplicón entre el producto de ADN o ARN. Como gen constitutivo se utilizó *gpd* (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa).

Tabla 4. Cebadores de genes de lacasas de *Pleurotus ostreatus*.

No. acceso	Gen (mRNA)	Secuencia (5' - 3')	Amplicón (pb) RNA	Amplicón (pb)DNA
FM202673 FM202670.1	<i>lacc1</i>	Fw ATGGACCAATCCCTACTCCC Rv GGCATTGGGTGCTAAGATG	382	537
FM202672	<i>lacc4</i>	Fw TGCGCCTGTACTCTCATTG Rv GGTAGAGACCGTGCCAATGT	265	371
AJ005018 AJ005017.2	<i>lacc6</i>	Fw CGCTTGTTTCACTCGCATT Rv ATAGTGTGAGTCGGGATGG	548	1001
Z34847 Z22591.1	<i>lacc9</i>	Fw GTCTCTCTGACGGCTTAC Rv ATACTGGGTGGAAAGATGCG	332	603
Z34848	<i>lacc10</i>	Fw ACGAGCTGGAGGCTAACAAA Rv TCACGAAGCGAATAGTGACG	203	314
GU062704.1 AB690874.1	<i>gpd</i>	Fw TCTGCGGTGTTAACCTTGAGTCGT Rv TGGTAGCGTGGATGGTGCTCATT	149	203

7.5.2 Perfil de expresión la lacasas de *Pleurotus ostreatus* desarrollado en fermentación sumergida a pH inicial de 3.5, 4.5, 6.5 y 8.5

La tabla 5 muestra la concentración de RNA obtenido para cada fermentación y por cada tiempo de esta investigación, una vez que se realizó la retrotranscripción, todas las muestras se ajustaron a una concentración de 250 ng/μL de cDNA para correr los ensayos de PCR.

Tabla 5. Concentración de RNA obtenido del micelio de *Pleurotus ostreatus* de cada fermentación

Tiempo (h)	[] RNA μg/mL de cada fermentación			
	pH de 3.5	pH de 4.5	pH de 6.5	pH de 8.5
144	5400	10180	800	600
168	5100	8360	100	400
264	6400	8180	10900	700
312	7100	10000	3700	700
408	5300	8080	19300	1100
504	6500	4700	200	500
528	4800	3860	8200	1400

En la Figura 66 se observan el RNA y los productos de RT-PCR correspondientes a los tiempos seleccionados de la fermentación a pH de 3.5. Se observó que todos los genes hibridan, excepto *lacc9*, sin embargo la intensidad de las bandas es diferente. Para este caso

particular, *lacc1*, *lacc6* y *lacc10* tienen mayor intensidad de banda con respecto a *lacc4*; sugiriendo que la intensidad de la banda corresponde a una mayor expresión de ese gen en ese momento.

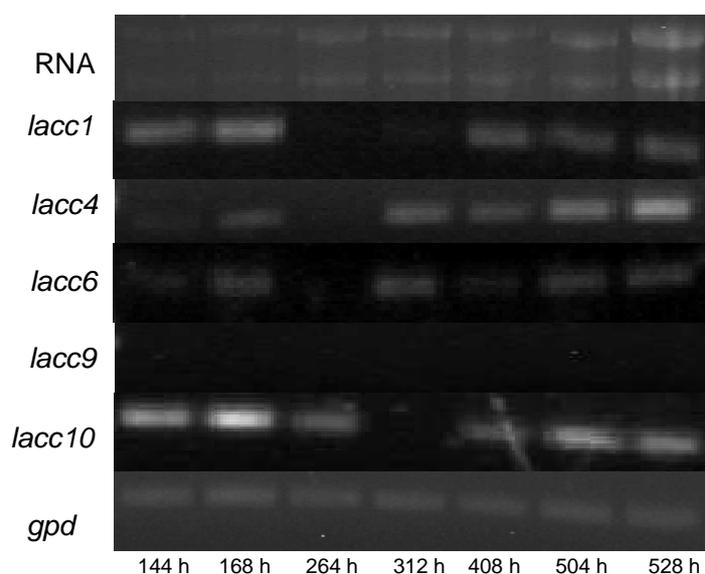


Figura 66. Perfil de expresión de genes de lacasa y *gpd* durante la fermentación sumergida de pH inicial de desarrollo de 3.5 de *Pleurotus ostreatus*.

La Figura 67 muestra el RNA y los productos de RT-PCR obtenidos de la fermentación sumergida de *Pleurotus ostreatus* a pH inicial de desarrollo de 4.5. Se detectó expresión de todos los genes de lacasa a diferentes tiempos y niveles. La expresión del gen *lacc6* parece ser la predominante durante toda la fermentación y con mayor nivel.

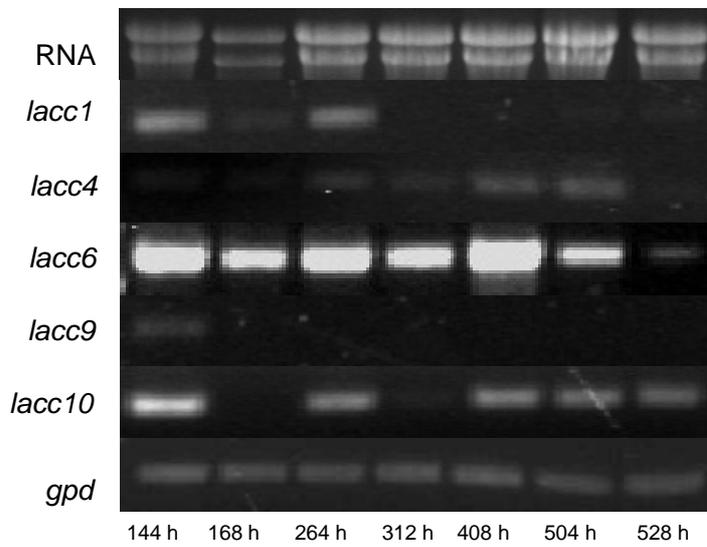


Figura 67. Perfil de expresión de genes de lacasa y *gpd* de la fermentación sumergida de pH inicial de desarrollo de 4.5 de *Pleurotus ostreatus*.

En la Figura 68 se muestran el RNA y los perfiles de expresión obtenidos por RT-PCR de la fermentación sumergida a pH inicial de desarrollo de 6.5. Cabe destacar que se detectó expresión de todos los genes excepto de *lacc9* a niveles similares y en todos los tiempos de la fermentación.

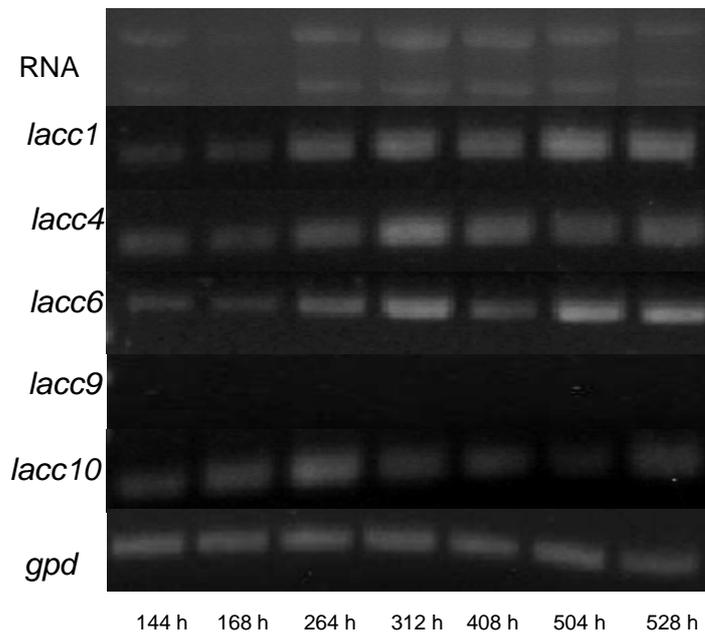


Figura 68. Perfil de expresión de genes de lacasa y *gpd* de la fermentación sumergida de pH inicial de desarrollo de 6.5 de *Pleurotus ostreatus*.

La Figura 69 muestra el RNA y los perfiles de expresión obtenidos por RT-PCR de la fermentación sumergida a pH inicial de desarrollo de 8.5. Se observó que *lacc1*, *lacc4* y *lacc6* fueron los genes que tuvieron mayor expresión durante todo el curso de la fermentación, destacando la expresión del gen *lacc6* y la no detección de expresión para el gen *lacc9*.

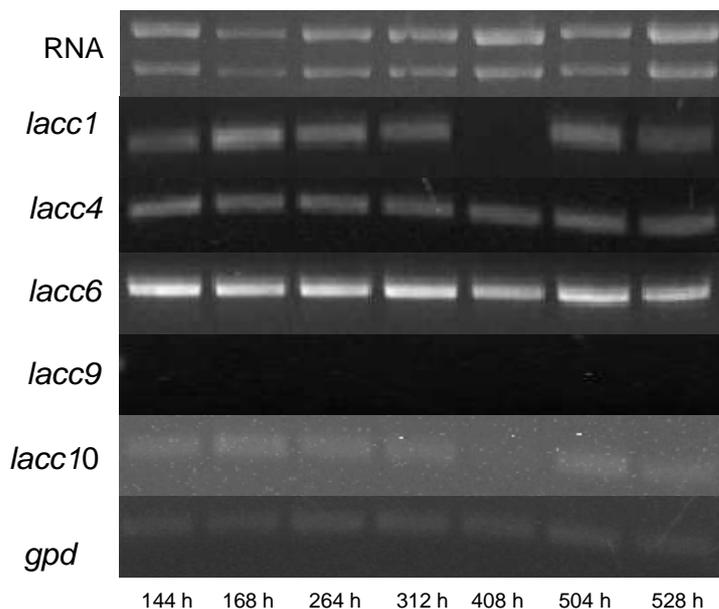


Figura 69. Perfil de expresión de genes de lacasa y *gpd* de la fermentación sumergida de pH inicial de desarrollo de 8.5 de *Pleurotus ostreatus*.

7.6. Parámetros cinéticos de crecimiento y producción de lacasas de *Pleurotus ostreatus*

En la Tabla 6 se muestran los parámetros cinéticos de crecimiento y producción de lacasas de *Pleurotus ostreatus* obtenidos de todas las fermentaciones evaluadas. En las Tablas 6 y 7 se muestran el número y peso molecular de las isoenzimas observadas en cada fermentación.

Tabla 6. Comparativo de datos cinéticos de las fermentaciones a diferente pH inicial de desarrollo de *Pleurotus ostreatus*.

Parámetro	pH inicial de desarrollo del hongo			
	3.5	4.5	6.5	8.5
X_{\max} (g L ⁻¹)	5.2	5.3	9.6	8.3
E_{\max} (U L ⁻¹)	29,490	77,550	25,000	16,660
μ (h ⁻¹)	0.006	0.014	0.018	0.020
$Y_{X/S}$ (gX gS ⁻¹)	0.43	0.44	0.8	0.69
$Y_{E/X}$ (U gX ⁻¹)	5,671	14,632	2,604	2,007
P_{RO} (UL ⁻¹ h ⁻¹)	55.85	146.87	47.34	31.55
q_p (U h ⁻¹ gX ⁻¹)	34.02	204.84	46.87	40.14

Tabla 7. Comparativo de isoenzimas extracelulares de lacasa obtenidas por fermentación sumergida de *Pleurotus ostreatus*.

pH de desarrollo del hongo	Peso molecular (kDa) de isoenzimas extracelulares de lacasas obtenidas por zimografía incubado en solución buffer a diferente pH			
	3.5	4.5	6.5	8.5
3.5	29 y 65	29 y 65	29 y 65	29
4.5	29 y 65	29, 47 y 65	29, 47 y 65	29
6.5	29, 47 y 65	29, 47 y 65	29, 38, 47 y 65	29
8.5	29 y 47	29, 47 y 65	29, 47 y 65	29

Tabla 8. Comparativo de isoenzimas intracelulares de lacasa obtenidas por fermentación sumergida de *Pleurotus ostreatus*.

pH de desarrollo del hongo	Peso molecular (kDa) de isoenzimas intracelulares de lacasas obtenidas por zimografía incubado en solución buffer a diferente pH			
	3.5	4.5	6.5	8.5
3.5	29 y 65	29 y 65	29 y 65	29 y 65
4.5	29 y 65	29 y 65	29 y 65	29 y 65
6.5	47 y 65	29, 47 y 65	47 y 70	--
8.5	29, 47 y 75	29, 65 y 75	29 y 75	29

8. DISCUSION

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 $R^2 > 0.98$, lo cual indica que es un buen modelo para describir el comportamiento de este hongo bajo las condiciones de fermentación evaluadas.

Tlecuitl-Beristain y col., (2008) Con el mismo hongo pero con un medio de cultivo suplementado con sulfato de amonio y pH inicial de 6.0, obtuvieron valores de μ de 0.02 h^{-1} y de X_{max} de 7.8 g/L , 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 observaron valores de μ de 0.022 y 0.033 h^{-1} , 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 en fermentación líquida a pH de 6.5 y 8.5 muestran la μ (0.018 y 0.02 h^{-1}) cercana a los valores anteriormente reportados para este hongo y una X_{max} de 9.64 y 8.39 g/L en los pH de 6.5 y 8.5 respectivamente, sin embargo, a pH de 4.5 se observó un valor de 0.014 h^{-1} , menor al reportado por Téllez-Téllez y col., (2008), mientras que a pH de 3.5, se redujo el valor hasta 0.006 h^{-1} . Si el objetivo de la investigación fuese la producción de biomasa, las óptimas serían las fermentaciones de 6.5 y 8.5 por haber alcanzado los valores más altos, sin embargo los valores máximos de actividad enzimática de lacasa corresponden a las fermentaciones de pH de 4.5 y 3.5.

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 más 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 diferentes a las ideales de crecimiento 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; por otro lado los perfiles de pH a través del tiempo en cada una de las fermentaciones, se observó una clara tendencia hacia valores cercanos a la neutralidad, si bien es cierto que el pH inicial de desarrollo fue diferente de 7, también es cierto que en la etapa final de la fase exponencial y en toda la estacionaria, el pH del medio tiende a la neutralidad, probablemente por la producción de diferentes metabolitos que secreta el hongo para equilibrar sus procesos metabólicos.

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. Existen reportes de actividad de lacasas obtenida por fermentación líquida producida por el mismo hongo usado en este estudio, reportando 13,000 U/L en un medio de cultivo suplementado con extracto de levadura (Téllez-Téllez y col., 2008) y 12,200 U/L en un medio de cultivo con sulfato de amonio (Tlecuil-Beristain y col., 2008), mientras que en este estudio se obtuvieron 77,550 U/L en la fermentación a pH inicial de desarrollo de 4.5, incubado en solución buffer a pH de 4.5, de 29,490 U/L a pH de 3.5 incubado en solución buffer de pH de 4.5, de 25,000 U/L en la fermentación de pH de 6.5, y para el caso de la fermentación de 8.5 la actividad máxima fue de 16,660 U/L.

Por su parte Díaz y col., (2011a) reportó los parámetros cinéticos de crecimiento y el patrón zimográfico de cinco cepas diferentes de *Pleurotus ostreatus* desarrolladas en fermentación sumergida utilizando diferente concentración de cobre en el medio de cultivo, siendo de hasta 37,490 U/L para la cepa ATCC 32783, misma cepa que se utilizó en esta investigación, que fue cuando menos dos veces más actividad; asimismo Díaz y col., (2011b) evaluó el número de isoenzimas y actividad de lacasas de *Pleurotus ostreatus* desarrollado en un medio de cultivo amortiguado y no amortiguado a pH de 3.5, encontrando diferencia significativa entre estas dos fermentaciones siendo hasta siete veces más alta la fermentación utilizando un medio de cultivo amortiguado con respecto al no amortiguado, 3,200 U/L y 450 U/L respectivamente; comparado con lo obtenido en esta investigación al

mismo pH de desarrollo se obtuvieron hasta nueve veces más actividad cuando se incubó el EE en solución buffer a pH 4.5.

Estos resultados sugieren que a pH de 3.5 y 4.5 inicial de desarrollo, se obtienen valores más altos de actividad, los cuales no corresponden con el pH de mayor producción de X que corresponden a pH de 6.5 y 8.6. Los valores de actividad de lacasas obtenidos en este estudio en la fermentación a pH de 4.5 se consideran elevados en comparación con otros reportes, además porque en tiempos menores 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 el valor más bajo en la fermentación a pH inicial de 8.5 (2,007 U/gX) con respecto a las otras fermentaciones realizadas en este trabajo; los valores más altos fueron en la fermentaciones a pH de 3.5 y 4.5 (5,671 y 14,632 U/gX respectivamente), mientras que en la fermentación a pH inicial de 6.5 el valor fue de 2,604 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 3.5 y 4.5 las que presentaron los valores mayores (55.85 y 146.87 U/Lh), mientras que a pH inicial de 6.5 y 8.5 el valor fue de 46.87 y 40.14 U/Lh respectivamente.

Mouso 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 isoenzimas que son codificadas por familias de genes. Los zimogramas son una herramienta de gran utilidad, esta técnica permite identificar el número de isoenzimas 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.

En los patrones zimográficos se observan diferentes perfiles, encontrándose hasta 6 isoenzimas diferentes (4 extracelulares y 2 intracelulares; 29, 38, 47, 65 y 70, 75 respectivamente) en las diferentes fermentaciones, de las 11 que se han reportado para *Pleurotus ostreatus* (Pezzella y col., 2012), sin embargo, el mayor número de isoenzimas reportadas en un mismo sistema ha sido de tres y posiblemente de cuatro (Téllez-Téllez y col., 2008). En esta investigación se encontraron hasta 4 isoenzimas en una misma fermentación (pH 6.5) de 29, 38, 47 y 65 kDa. Rigling y Van Alfen, (1993) reportaron que en *Cryphonectria parasitica* encontraron dos isoenzimas 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.

En esta 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 igual a lo reportado por otros autores (Tlecuitl-Beristain y col., 2008 y Téllez-Téllez y col., 2005).

Los pesos moleculares para las diversas isoenzimas purificadas son muy variables (por SDS-PAGE). Podemos encontrar desde las isoenzimas más pesadas como la de *Gaeumannomyces graminis* de 190 kDa (Edens y col., 1999) hasta isoenzimas más ligeras como las de *Coriolus hirsutus* de 55 kDa (Koroljova-Skorbogat'ko y col., 1998) y una isoenzima (Lac I) de *Coriolopsis rigida* del mismo valor (Saparrat y col., 2002). Una isoenzima de *Pleurotus ostreatus* purificada presentó un peso molecular menor de 43.7 kDa (Tlecuitl-Beristain y col., 2008). Saloheimo y col., (1991) reportaron una isoenzima 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 isofomas de lacasa en *Ceriporiopsis subvermispora*, con pesos moleculares de 71 y 68 kDa, respectivamente. *Trametes pubescens* secreta varias isoenzimas 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 isoenzimas 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 del hongo *Lentinula edodes*. Palmieri y col., (1997) reportaron dos isoenzimas 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 isoenzima mostró baja estabilidad a la temperatura (25-35 °C) y presentó cuatro átomos de cobre por molécula. Giardina y col., (1999) purificaron otra isoenzima de lacasa de *Pleurotus ostreatus*, en un cultivo suplementado con sulfato de cobre, denominada *lacc6*, con un peso molecular de 62 kDa, además mostró un alta estabilidad al pH alcalino. Hublik y Schinner, (2000) purificaron otra isoenzima de *Pleurotus ostreatus* (cepa RK 36) en un cultivo en presencia de ácido ferúlico; esta isoenzima presentó un peso molecular de 67 kDa. Palmieri y col., (2003) encontraron otras dos isoenzimas 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 isoenzimas en *Pleurotus ostreatus* y en otros organismos se debe a la existencia de múltiples genes que codifican para diferentes isoenzimas de lacasas.

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 isoenzimas 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.

Castanera y col., (2012), realizaron estudios sobre el perfil de expresión de diferentes cepas y en diferentes condiciones de cultivo (medio sólido y líquido), utilizando paja de trigo como inductor. Utilizaron técnicas de RT-PCR cuantitativo. Los genes de *lacc2* y *lacc10*, sugiere Castanera, son la principal fuente de actividad de la actividad de lacasas en la fermentación líquida; sin embargo en la fermentación sólida no se ha podido caracterizar específicamente que lacasas son responsables de la actividad que complementa a *lacc2* y *lacc10*. Asimismo sugiere que la actividad enzimática y el perfil de expresión varían con respecto a la cepa utilizada para su determinación, lo que puede ser objeto de estudio para mejorar la producción enzimática bajo la fermentación líquida. En esta investigación también se usaron técnicas de RT-PCR para evaluar la expresión de diferentes genes de lacasas.

Palmieri y col. (2000) realizaron estudios sobre la inducción de enzimas lacasas con un medio de cultivo rico en cobre, observando la producción de isoenzimas tales como *lacc6*, *poxa2*, y *lacc10*. Siendo que durante la transcripción, el mRNA de *Lacc6* fue el que mayormente fue inducido durante el crecimiento del hongo. En esta investigación también se utilizó un medio de cultivo (Téllez-Téllez y col. 2008) que contenía cobre para la inducción de lacasas y se modificó el pH inicial de desarrollo del hongo, encontrando que para la fermentación sumergida de pH inicial de desarrollo de 3.5, la expresión de los genes evaluados fue intermitente durante la fermentación, especialmente durante el cambio de fase de crecimiento de adaptación a exponencial (264 y 312 h), ya que los genes *lacc1*, 4, 6 y 10 no se expresaron durante esos tiempos. Aparentemente durante esos tiempos de desarrollo, estos genes no están involucrados en el cambio de fase, pero si en la expresión de las isoenzimas responsables de la actividad máxima de lacasa al final de la fermentación, las isoenzimas extracelulares e intracelulares son del mismo peso molecular (29 y 65 kDa).

Asimismo para la fermentación sumergida con pH inicial de desarrollo de 4.5, la expresión de los genes es diferente con respecto a la fermentación de pH inicial de desarrollo de 3.5, ya que *lacc1* solo se observó en la fase de adaptación del hongo y en las fases exponencial y estacionaria este gen tiene bajo nivel de expresión, por su parte *lacc4* mostró baja expresión durante la fase de adaptación, pero mayor durante la fase exponencial y estacionaria, *lacc6*

fue el gen que mostró la mayor expresión y durante todo el tiempo de la fermentación. *lacc9* no presentó expresión en ningún tiempo de la fermentación y finalmente *lacc10*, solo se expresó durante la fase estacionaria del crecimiento del hongo. Esto sugiere que el rol que tiene cada lacasa es específico dependiendo la etapa de desarrollo del organismo.

Con respecto a la fermentación sumergida a pH inicial de desarrollo de 6.5, aparentemente, la expresión de genes fue igual en todos los tiempos de la fermentación, excepto *lacc9* que no presentó expresión en ningún tiempo, lo que sugiere que todos los genes tienen participación activa durante todas las etapas de desarrollo del hongo, para su desarrollo metabólico, fisiológico y/o morfológico.

Por otro lado la fermentación sumergida a pH de 8.5 inicial de desarrollo, mostró un patrón similar a lo observado en la fermentación de pH inicial de desarrollo de 6.5, donde todos los genes se observaron y únicamente *lacc9* no se expresó. *lacc6* presentó mayor intensidad en las bandas de expresión, probablemente sea la isoenzima responsable de la mayor parte de la actividad enzimática. Se ha reportado que los elementos XRE median la activación transcripcional por sustancias aromáticas en genes de eucariontes, por lo que se ha sugerido que participan en la inducción de las lacasas de hongos por compuestos aromáticos (Soden y Dobson, 2001). En el promotor de *Trametes pubescens* no hay presencia de elementos de respuesta XRE, lo que se ha relacionado con el hecho de que en experimentos de inducción de la producción de lacasas mediante compuestos tales como 2,5 xilidina o catecol (los cuales normalmente son compuestos inductores de lacasas) no se indujo la actividad de dicha enzima (Galhaup y col., 2002). Se ha sugerido que el efecto estimulador del cobre y otros iones metálicos no sólo inhibe el crecimiento, como se ha sugerido para otros hongos (Gianfreda y col., 1999), sino que el organismo presenta un mecanismo de protección basado en la estimulación de la síntesis de melanina, algo que se ha observado en *T. pubescens* en presencia de altas concentraciones de cobre (Galhaup y Haltrich, 2001).

Galhaup y col. (2002) reportaron que se incrementó la síntesis de lacasas en *T. pubescens* en respuesta a varios iones de metales pesados, lo que sugiere que la presencia de regiones MRE en el promotor del gen de la lacasa *lap2* tiene una gran significancia fisiológica. Se han reportado múltiples posibles sitios MRE en otros promotores de genes de lacasas (Karahanian y col., 1998; Mansur y col., 1998; Klonowska y col., 2001; Galhaup y col., 2002).

Los promotores analizados para *Pleurotus ostreatus* muestran varios sitios de regulación MRE: el promotor de *lacc1* solo presentó uno, pero *lacc10* presentó cuatro y *lacc4* presentó cinco. Con respecto a los XRE, estos elementos sólo estuvieron presentes en *lacc10* y *lacc2*. El sitio de unión para el elemento de respuesta al estrés solo se presentó en *lacc2*. Al parecer, los promotores de la familia de lacasas de *Pleurotus ostreatus* son poco conservados (Pezzella y col., 2009).

Téllez-Téllez y col. (2012) reporta que *Pleurotus ostreatus* en la región del promotor presenta posibles elementos de respuesta, tales como MRE, XRE y de defensa, sugiriendo que debido a esta respuesta al medio de desarrollo se expresan las diferentes isoenzimas de lacasa, lo cual coincide con lo observado en esta investigación donde se observa el efecto del pH inicial de desarrollo sobre las lacasas de *Pleurotus ostreatus*.

Cary y col., 2006, reportó que existen elementos de regulación génica para la biosíntesis de metabolitos secundarios en hongos como el factor de transcripción global PacC que es activado por cambios de pH alcalinos.

Por otro lado Drori y col., 2003 sugiere la presencia de nueve sitios probables de unión al promotor en la región 5' del promotor PacC que incrementan sus funciones y que el pH es un factor regulatorio para la secreción y virulencia de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Asimismo Rollins y col., (2001), reportaron que el factor transcripcional PacC se autorregula a partir de los cambios de pH del medio ambiente en *Sclerotinia sclerotiorum* en la producción de ácido oxálico durante la infección de plantas y que se ha implicado como un factor determinante en la patogenicidad en este y otros hongos fitopatógenos y que probablemente ocurra de igual manera con *Pleurotus ostreatus* en la regulación de los factores de transcripción de lacasas.

Se ha reportado que dichos factores transcripcionales condicionan los patrones de expresión de enzimas (Rollins y col., 2001), por lo que se sugiere que el patrón de expresión y producción de lacasas afectan directamente la actividad enzimática y el número de isoenzimas observadas por zimografía, ya que hasta el momento no se tienen reportes del efecto del pH inicial de desarrollo de *Pleurotus ostreatus* sobre la producción y expresión de

sus isoenzimas de lacasa y los valores de actividad máxima dependiente del pH de revelado que fue el objeto de estudio de este trabajo.

Aparentemente, cuatro isoenzimas extracelulares fueron observadas y cuatro genes (*lacc1*, *lacc4*, *lacc6*, y *lacc10*) fueron expresados, *lacc9* no tuvo expresión. Estos resultados sugieren que *lacc6* y *lacc10* son las isoenzimas de 65 y 47 kDa, respectivamente, y *lacc4* y *lacc1* pueden ser las isoenzimas de pesos moleculares de 38 y 29 kDa.

9. CONCLUSIÓN

Se observó que el pH inicial de desarrollo es un factor importante que modifica los patrones de expresión y de producción de lacasas, lo cual se ve reflejado en los niveles de actividad, además se observó que el pH inicial de crecimiento del hongo es diferente al pH de producción de lacasas, y estos son diferentes al pH de actividad.

La fermentación de pH inicial de desarrollo de 4.5 mostró valores más altos de actividad de lacasa comparado con la que se ha considerado las condiciones ideales de desarrollo de *Pleurotus ostreatus* (pH 6.5).

El pH inicial de desarrollo tiene un efecto del sobre los patrones de producción y expresión de lacasas de *Pleurotus ostreatus* crecido en fermentación sumergida, probablemente por la activación del factor transcripcional PacC que es activado por cambios de pH en hongos.

El gen *lacc9* no presentó expresión bajo ninguna condición de las estudiadas en esta investigación, sin embargo *lacc1*, *lacc4*, *lacc6* y *lacc10* presentaron diferente nivel de expresión en cada fermentación de esta investigación.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Acuña-Argüelles ME, Gutiérrez-Rojas M, Viniegra-González G, Favela-Torres E. 1995. Production and properties of the pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 43:808-814.
- Adenipekun C. 2008. Bioremediation of engine-oil polluted soil by *Pleurotus tuber-regium* Singer, a Nigerian white-rot fungus. *African Journal of Biotechnology*. 7 (1): 55-58.
- Alves-García T, Fontes-Santiago M, Ulhoa C. 2007. Studies on the *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518 laccase purified by hydrophobic interaction chromatography. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 75: 311–318.
- Alazard D, Raimbault M. 1981. Comparative study of amylolytic enzymes production by *Aspergillus niger* in liquid and solid-state cultivation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 12: 113-117.
- Antier P, Minjares CA, Roussos S, Raimbault M, Viniegra-González G. 1993. Pectinase-hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid-state fermentation of coffee pulp. *Enzyme Microbiology Technology* 15:254-260.
- Aramayo R, 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.
- Bailey SP, Bailey AC. 1995. Química orgánica, conceptos y aplicaciones. Quinta edición. Prentice Hall. México D.F. pp 265
- Baldrian P. 2005. Fungal Laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*. 30 (2): 215-242.
- Bertrand G. 1896. Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences*. 9: 463-465.
- Bertrand T, Jolival C, Briozzo P, Caminade E, Joly N, Madzak C, Mougín C. 2002. Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry*. 41: 7325-7333.

- Bettin F, Osório L, Montanari Q, Calloni R, Aparecida T, Malvessi E, Moura M, Pinheiro J. 2011. Growth kinetics, production, and characterization of extracellular laccases from *Pleurotus sajor-caju* PS-2001. *Process Biochemistry*. 46: 758-764.
- Bohinski CR. 1991. *Bioquímica*. Quinta edición. Addison Wesley Iberoamericana. México. pp 491-492.
- 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.
- Breene WM. 1990. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. *Journal of Food Protection*. 53: 883-894.
- Campos R, Kandelbauer A, Robra KH, Cavaco-Paulo A, Gübitz GM. 2001. Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Biotechnology*. 89 (2-3):131-139.
- Cañas A, Alcalde M, Plou F, Martínez MJ, Martínez A, Camarero S. 2007. Transformation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase Is Strongly Enhanced by Phenolic Compounds Present in Soil. *Environmental Science and Technology*. 41 (8): 2964-2971.
- Carvallazzi J, Kasuya C, Soares M. 2005. Screening of inducers for laccase production by *Lentinula edodes* in liquid medium. *Brazilian Journal of Microbiology*. 36: 383-387.
- Castanera R, Pérez G, Omarini O, Alfaro M, Pisabarro A.G, Faraco V, Amore A, Ramírez L. 2012. Transcriptional and enzymatic profiling of *Pleurotus ostreatus* laccase genes in submerged and solid-state fermentation cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. 78 (11): 4037-4045.
- Cary JW, Ehrlich KC, Kale SP, Calvo AM, Bhatnagar D, Cleveland TE. 2006. Regulatory elements in aflatoxin biosynthesis. *Micotoxin Research*. 22 (2):105-109.
- Chen S, Ma D, Ge W, Buswell J. 2003. Induction of laccase activity in the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *Microbiology Letters*. 218 (1):143-148.
- Chefetz B, Chen Y, Hadar Y. 1998. Purification and Characterization of Laccase from *Chaetomium thermophilum* and Its Role in Humification. *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (9):3175-3179.
- Chipeta Z, du Preez J, Lew C. 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*. 35:587-594.

- Chiu SW. 1996. Nuclear changes during fungal development. In: Chiu S-W, Moore D (eds) Patterns in fungal development. Cambridge University Press, Cambridge, pp 105–125.
- Claus H. 2003. Laccases and their occurrence in prokaryotes. Archives Microbiology. 179: 145-150.
- Claus H. 2003. Laccases: structure, reactions, distribution. Micron. 35 (1-2):93-96.
- Cohen R. 2002. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. Applied Microbiology and Biotechnology. 58: 582–594.
- Das N, Sengupta S, Mukherjee M. 1997. Importance of laccase in vegetative growth of *Pleurotus florida*. Applied and Environmental Microbiology. 63 (10):4120-4122.
- 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 and Biotechnology. 26: 271-275.
- Díaz R, Alonso S, Sánchez C, Tomasini A, Bibbins-Martínez MD, Díaz-Godínez G. 2011a. Characterization of the growth and laccase activity of strains of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. Bioresources. 6(1):282-290.
- Díaz R, Sánchez C, Bibbins-Martínez MD, Díaz-Godínez G. 2011b. Effect of medium pH on laccase zymogram patterns produced by *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. African Journal of Microbiology Research. 5(18):2720-2723.
- 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.
- D'Souza TM, Merritt SC, Reddy A. 1999. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. Applied and Environmental Microbiology. 65 (12): 5307-5313.
- Dekker R, Barbosa A, Giese E, Godoy S, Covizzi L. 2007. Influence of nutrients on enhancing laccase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. International Microbiology. 10: 177-185.
- Del-Vecchio C, Lettera V, Pezzella C, Piscitelli A, Leo G, Birolo L, Sannia G. 2012. Classical breeding in *Pleurotus ostreatus*: a natural approach for laccase production improvement. Biocatalysis and Biotransformation. 30 (1): 78-85.
- Drori N, Kramer-Hainovich H, Rollins J, Dinoor A, Okon Y, Pines O, Prusky D. 2003. External pH and Nitrogen Source Affect Secretion of Pectate Lyase by

- Colletotrichum gloeosporioides*. Applied and Environmental Microbiology. 69 (6):3258-3262.
- Ducros V, Brzozowski AM, Wilson KS, Brown SH, Østergaard P, Schneider P, Yaver DS, Pedersen AH, Davies GJ. 1998. Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. Nature Structural & Molecular Biology 5: 310-316.
- Ducros V, Brzozowski AM, Wilson KS, Ostergaard P, Scheneider P, Svendsen A, Davies GJ. 2001. The structure of laccase from *Coprinus cinereus* at 1.6 Å resolution: evidence for different type 2 Cu-deplete isoforms. Acta Crystallographica D57, 333-336.
- Durán N, Rosa AM, D'Amnnibale A, Giafreda L. 2002. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. Enzyme and Microbial Technology. 31: 907-931.
- Edens W, Goins T, Dooley D y Henson J. 1999. Purification and characterization of secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Applied and Environmental Microbiology. 65: 3071-3074.
- Faraco V, Giardina P. y Sannia G. 2003. Metal-responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters. Microbiology. 149: 2155-2162.
- Faraco V, Ercole C, Festa G, Giardina P, Piscitelli A, Sannia G. 2008. Heterologous expression of heterodimeric laccase from *Pleurotus ostreatus* in *Kleyveromyces lactis*. Applied Microbiology and Biotechnology. 77 (6): 1329-1335.
- Faraco V, Pezzella C, Miele A, Giardina P, Sannia G. 2009. Bio-remediation of colored industrial wastewaters by the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus ostreatus* and their enzymes. Biodegradation. 20: 209–220.
- Ferraroni M, Myasoedova NM, Schmatchenko V, Leontievsky AA, Golovleva LA, Scozzafava A, Briganti F. 2007. Crystal structure of a blue laccase from *Lentinus tigrinus*: evidences for intermediates in the molecular oxygen reductive splitting by multicopper oxidases. BMC Structural Biology. 7: 60-72.
- Festa G, Autore F, Fraternali F, Giardina P, Sannia G. 2008. Development of new laccases by directed evolution: Functional and computational analyses. Proteins: Structure, Function and Bioinformatics. 72 (1): 25-34.
- Flores C, Casasanero R, Trejo-Hernandez M, Galindo E, Serrano-Carreón L. 2009. Production of laccases by *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation in co-culture with *Trichoderma viride*. Enzyme and Microbial Technology. 44: 426-433.

- Frioni L. 1999. Procesos Microbianos. Laboratorio de Microbiología, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay. Editorial de la Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto Argentina.
- Fukushina Y, Kirk TK. 1995. Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispora* lignin-degrading system. Applied and Environmental Microbiology. 61 (3):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.
- Galhaup C, Haltrich D. 2001. Enhanced formation of laccase activity by the whiterot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. Applied Microbiology and Biotechnology. 56: 225-232.
- 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.
- Garavaglia S, Cambria MT, Miglio M, Ragusa S, Iacobazzi V, Palmieri F, D'Ambrosio C, Scaloni A, Rizzi M. 2004. The structure of *Rigidoporus lignosus* laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair. Journal of Molecular Biology. 342: 1519-1531.
- Garzillo AM, Chiara M, Buonocore V, Oliva R, Falcigno L, Saviano M, Santoro AM, Zappala R, Bonomo RP, Bianco C, Giardina P, Palmieri G, Sannia G. 2001. Structural and Kinetic Characterization of Native Laccases from *Pleurotus ostreatus*, *Rigidoporus lignosus*, and *Trametes trogii*. Journal of Protein Chemistry. 20 (3): 191-201.
- 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.
- Gianfreda L, Xu F, Bollag JM. 1999. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. Bioremediation Journal. 3: 1-25.
- Giardina P, Cannio R, Martirani L, Marzullo L, Palmieri G, Sannia G. 1995. Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology. 61 (6): 2408-2413.
- Giardina P, Palmieri G, Scaloni A, Fontanella B, Faraco V, Cennamo G, Sannia G. 1999. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. Biochemical Journal. 341: 655-663.

- Giardina P, Autore F, Faraco V, Festa G, Palmieri G, Piscitelli A, Sannia G. 2007. Structural characterization of heterodimeric laccases from *Pleurotus ostreatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 75 (6): 1293-1300.
- Giardina P, Faraco V, Pezzella C, Piscitelli A, Vanhulle S, Sannia G. 2010. Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 67: 369-385.
- Griffin H. 1994. *Fungal Physiology*. Wiley-Liss. New York.
- Gochev V, Krastanov A. 2007. Fungal Laccase review. National Centre for Agrarian Sciences. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 13: 75-83.
- Heinzkill M, Bech L, Halkier T, Schneider P, 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 C, Valenti P, Visca P, Antonini G, Nicolini L, 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.
- Jolivalt C, Madzak C, Brault A, Caminade E, Malosse C, Mougín C. 2005. Expression of laccase IIIb from the white-rot fungus *Trametes versicolor* in the yeast *Yarrowia lipolytica* for environmental applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 66 (4):450-456.
- Karahanian E, Corsini G, Lobos S, Vicuña R. 1998. Structure and expression of a laccases gene from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1443: 65-74.
- Karas P, Perruchon C, Exarhou K, Ehaliotis C, Karpouzas D. 2011. Potential for bioremediation of agro-industrial effluents with high loads of pesticides by selected fungi. *Biodegradation*. 22: 215-228.
- Kirk-Kent T, 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, Le Petit J, Tron T. 2001. Enhancement of minor laccases production in the basidiomycete *Marasmius quercophilus* C30. *FEMS Microbiology Letters*. 200: 25-30.

- Kofujita H, Asada Y, Kuwuhara M. 1991. Alkyl-aryl cleavage of phenolic beta-O-4 lignin substructure model compound by Mn(II)-peroxidase isolated from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of the Japan Wood Research Society*. 37(6) 555-561.
- Koroljova-Skorobogat'ko O, Stepanova E, Gavrilova V, Morozova O, Lubimova N, Dzchafarova A, Jaropolov A, Makover A. 1998. Purification and characterization of the constitutive form of laccase from the basidiomycete *Coriolus hirsutus* and effect of inducers on laccase synthesis. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 28 (1):47-54.
- Krishna-Pasat. 2005. Solid-State Fermentation Systems An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology*. 25 (1-2):1-30.
- Kumar SVS, Phale PS, Durani S, Wangikar PP. 2003. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnology and Bioengineering*. 83: 386-394.
- Laborde J. 1896. Sur laccase des vins. *CR Hebd Seances Acad Sci*. 123: 1074-1075.
- Larraya LM, Pérez G, Peñas MM, Baars JJP, Mikosch TSP, Pisabarro AG, Ramírez L. 1999. Molecular karyotype of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 3413-3417.
- Leammler UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lettera V, Piscitelli A, Leo G, Birolo L, Pezzella C, Sannia G. 2010. Identification of a new member of *Pleurotus ostreatus* laccase family from mature fruiting body. *Fungal Biology*. 114: 724-730.
- Lettera V, Del-Vecchio C, Piscitelli C, Sannia G. 2011. Low impact strategies to improve ligninolytic enzyme production in filamentous fungi: The case of laccase in *Pleurotus ostreatus*. *Lignobiotech symposium: Biotechnology applied to lignocelluloses*. 334 (11): 781-788.
- Liers C, Ullrich R, Pecyna M, Schlosser D, Hofrichter M. 2007. Production, purification and partial enzymatic and molecular characterization of a laccase from the wood-rotting ascomycete *Xylaria polymorpha*. *Enzyme and Microbial Technology*. 41 (6-7): 785-793.
- Liu L, Lin Z, Zheng T, Lin L, Zheng C. 2009. Fermentation optimization and characterization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* strain 10969. *Enzyme and Microbial Technology*. 44 (6-7): 426-433.

- López-Rodríguez C, Hernández-Corredor R, Suárez-Franco C, Borrero M. 2008. Evaluation of growth and production of *Pleurotus ostreatus* on different agroindustrials wastes of Cundinamarca. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Cra. 7: 43-82. Bogotá, Colombia.
- Luis P, Walther G, Kellner K, Martin F, Buscot F. 2004. Diversity of laccase genes from Basidiomycetes in a forest soil. *Soil Biology & Biochemistry*. 36: 1025– 1036.
- Luis P, Kellner K, Martin F, Buscot F. 2005. A molecular method to evaluate basidiomycete laccase gene expression in forest soils. *Geoderma*. 128: 18– 27.
- Mansur M, Suarez T, González AE. 1998. Differential gene expression in the laccase gene family from Basidiomycete I-62 (CECT 20197). *Applied Environment Microbiology*. 64: 771-774.
- Matera I, Gullotto A, Tilli S, Ferraroni M, Scozzafava A, Briganti F. 2008. Crystal structure of the blue multicopper oxidase from the white-rot fungus *Trametes trogii* complexed with p-toluate. *Inorganica Chimica Acta* 361: 4129-4137.
- Miele A, Giardina P, Sannia G, Faraco V. 2010. Random mutants of a *Pleurotus ostreatus* laccase as new biocatalysts for industrial effluents bioremediation. *Journal of Applied Microbiology*. 108 (3): 998-1006.
- Minussi R., Pastore G.M. y Duran N. (2002). Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology* 13: 205-216.
- Missall TA, Moran JM, Corbett JA, Lodge JK. 2005. Distinct Stress Responses of Two Functional Laccases in *Cryptococcus neoformans* Are Revealed in the Absence of the Thiol-Specific Antioxidant Tsa1. *Eukariotic Cell*. 4 (1): 202-208.
- Moreira-Neto S, Roberto-Matheus R, Gomes-Machado K. 2009. Influence of pH on the Growth, Laccase Activity and RBBR Decolorization by Tropical Basidiomycetes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 52 (5): 1075-1082.
- Mouso N, Papinutti L, Forchiassin F. (2003). Combined effect of copper and initial pH of the culture medium on production of laccase and manganeseperoxidase by *Stereum hirsutum* (Willd) Pers. *Revista Iberoamericana de Micología*. 20:176-178.
- Nagai M, Sato T, Watanabe H, Saito K, Kawata M, 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 (3):327-335.

- Palmieri G, Giardina P, Marzullo L, Desiderio B, Nittii G, Cannio R, Sannia G. 1993. Stability and activity of a phenol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 39: 632-636.
- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Scaloni A, Capasso A, 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, 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, Giardina P. 2003. Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme and Microbial Technology*. 33: 220-230.
- Peberdy JF, Hanifah AH, Jia JH. 1993. New perspectives on the genetics of *Pleurotus*. En Chang S.T., Buswell J.A. y Chiu S.W. (ed.), *Mushroom biology and mushroom products*. The Chinese University Press, Hong Kong. pp 55–62.
- 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. *Bosque* 28(3): 215-219.
- Pezzella C, Autore F, Giardina P, Piscitelli A, Sannia G, Faraco V. 2009. The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: isolation and heterologous expression of new family members. *Current Genetics*. 55: 45-57.
- Pezzella C, Lettera V, Piscitelli A, Giardina P, Sannia G. 2012. Transcriptional analysis of *Pleurotus ostreatus* laccase genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97 (2):705-717.
- Piontek K, Antorini M, Choinowski T. 2002. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biological Chemistry*. 277: 37663-37669.
- Ramírez NE, Vargas MC, Ariza JC, Martínez C. 2003. Characterizing laccase obtained by two production methods using *Pleurotus ostreatus*. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 5 (2):64-72.
- Rigling D, Van Alfen NK. 1993. Extra- and intracellular laccases of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Applied and Environmental Microbiology*. 59:3634-3639.

- Rodríguez-Couto S, Toca-Herrera JL. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances*. 24(5): 500-513.
- Rollins J, Dickman M. 2001. pH Signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: Identification of a *pacC/RIM1* Homolog. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (1):75-81.
- Romero-Gómez SJ, Augur C, Viniegra-González G. 2000. Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnology Letters*. 22:1255-1258.
- Sagawa I, Nagata Y. 1992. Analysis of chromosomal DNA of mushrooms in genus *Pleurotus* by pulsed field gel electrophoresis. *Journal of General and Applied Microbiology*. 38: 47-52.
- Saloheimo M, Niku-Paavola ML, Knowlws JKC. 1991. Isolation and structural analysis of the laccase gene lignin-degrading fungus *Phlebia radiata*. *Journal of General Microbiology*. 137: 1537-1544.
- Sánchez C. 2004. Modern aspects of mushroom culture technology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64: 756-762.
- Saparrat M, Guillén F, Arambarri A, Martínez A, 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.
- Schwarze F, Engels J, Mattheck C. 2000. Fundamental aspects. In *Fungal strategies of wood decay in trees*. Springer. 5: 31.
- Shleev SV, Khan IG, Morozova OV, Mazhugo YM, Khalunina AS, Yaropolov AI. 2004. Phenylpyrazolones, novel oxidoreductase redox mediators for degradation of xenobiotics. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 40:140-5.
- Snajdr J, Baldrian P. 2007. Temperature affects the production, activity and stability of ligninolytic enzymes in *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor*. *Folia Microbiologica*. 52 (5): 498-502.
- Soden DM, Dobson ADW. 2001. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology*. 148: 1755-1763.
- Solis-Pereira S, Favela-Torres E, Viniegra-González G, Gutiérrez-Rojas M. 1993. Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 39:36-41.

- Sonnenberg AM, de Groot PWJ, Schaap PJ, Baars JJP, Visser J, Van Griensven L. 1996. Isolation of expressed sequence tags of *Agaricus bisporus* and their assignment to chromosomes. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 4542-4547.
- Téllez-Téllez M, Sánchez C, Loera O, Díaz-Godínez G. 2005. Differential patterns of constitutive intracellular laccases of the vegetative phase for *Pleurotus* species. *Biotechnology Letters*. 27:1391-1394.
- Téllez-Téllez M, Fernández FJ, Montiel-González AM, Sánchez C, Díaz-Godínez G. 2008. Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 81: 675-679.
- Téllez-Téllez M; Díaz-Godínez G; Aguilar MB; Sánchez C, Fernández F. 2012. Description of a laccase gene from *Pleurotus ostreatus* expressed under submerged fermentation conditions. *Bioresources*, 7 (2): 2038-2050.
- Temp U, Egert C. 1999. Novel interaction between laccase and cellobiose dehydrogenase during pigment synthesis in the white rot fungus. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (5):389-395.
- Thurston CF. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*. 140: 19-26.
- Tlecuítl-Beristain S, Díaz-Godínez G, Soriano-Santos J, Romero-Gómez S, Sánchez, C. 2003. Effect of the initial concentration of glucose or sucrose on exopolysaccharide production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. *Chimica Oggi/Chemistry Today*. 21 (2): 50-53.
- Tlecuítl-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.
- Tlecuítl-Beristain S, Sánchez C, Loera O, Robson GD, 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.
- Trejo-Hernández MR, Oriol E, López-Canales A, Roussos S, Viniestra-González G, Rambault M. 1991. Producción de pectinasas de *Aspergillus niger* por fermentación sólida sobre soporte. *Micología Neotropical Aplicada*. 4:49-62.
- Viniestra-González G. 1997. Strategies for the selection of mold strains geared to produce enzymes on solid substrates. *Advances in Bioprocess Engineering*. 2: 123-135.

- Viniegra-González G, Favela-Torres E, Aguilar NC, Romero-Gómez SJ, Díaz-Godínez G, 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, Leonowicz A. 2002. Fungi and their ability to decolourize azo and anthraquinonic dyes. *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 566-572.
- Yoshida H. 1883. *Journal of the Chemical Society. (Tokyo)* 43:472-486.
- Zolan ME. 1995. Chromosome-length polymorphism in fungi. *Microbiological Reviews* 59: 686-698.