

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS



**PRODUCCIÓN, INDUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN
PARCIAL DE LACASAS DE *Pleurotus djamor***

Tesis Profesional

Que para Obtener el Título de

BIÓLOGO

Presenta:

Ricardo Cruz López

Ensenada, Baja California, México

Noviembre de 2004

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

PRODUCCIÓN, INDUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN
PARCIAL DE LACASAS DE *Pleurotus djamor*

TESIS PROFESIONAL

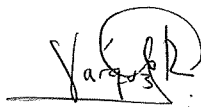
Que para obtener el título de

BIÓLOGO

Presenta:

RICARDO CRUZ LÓPEZ

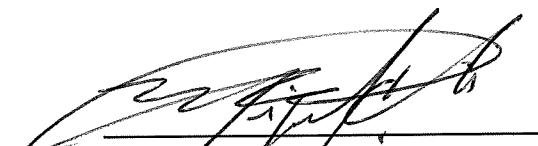
Aprobado Por:



Dr. FACUNDO JOAQUÍN MÁRQUEZ ROCHA
Director de Tesis



Dra. NAHARA ERNESTINA
AYALA SANCHEZ
Secretario



M. C. MIGUEL HUMBERTO
CARRILLO MENDIVIL
1er vocal

AGRADECIMIENTOS

A mi familia; a mi gran amiga, mi madre María Rosa, mi padre Jorge Enrique y mis hermanos Citlalli y Jorge Leonardo por su apoyo a lo largo de todos estos años.

A mi director de Tesis Dr. Facundo J. Márquez Rocha por su tiempo, paciencia, comentarios, enseñanzas y sobre todo por su amistad. Al equipo de bioprocesos de CICESE, M.C.'s Glenda (Rita) Castro, Rene García, Roberto Altamirano (...y Maru), Raúl Leal, Ivonne Santiago, Eduardo Morales, Carlos Lezama y **todos** aquellos en CICESE que me echaron la mano y me brindaron (¡jeje!) su amistad.

A mis sinodales, Dra. Nahara Ernestina Ayala Sánchez y M.C. Miguel Humberto Carillo Mendivil por el tiempo dedicado a la revisión de este escrito así como por sus comentarios.

A la **palomilla** (mis carnales), **Biólogos** (sin distinciones, al cabo ya casi...si no es que ya) Alejandro González, Carlos Flores, Leopoldo Ávila, Gonzalo de León, Ricardo Valencia, Alejandro Beltrán, Iván Peraza, Alonso Gutiérrez (biólogo de corazón)... y **Biólogas** (al más puro estilo Fox) Marlenne Rodríguez, Lucrecia Ramos, Amanda Dávila, Carolina Álvarez, Saruhén Ávila Annie Peralta, Cynthia Jáuregui...y por supuesto a todos en la Facultad de Ciencias. ¡¡Salud!!

A la UABC - Facultad de Ciencias por todas las facilidades y adversidades. Un enorme agradecimiento y reconocimiento a la planta docente, técnicos, personal administrativo, de limpieza, **absolutamente a todos** por hacer más agradable mi paso a través de la facultad.

Al proyecto CONACYT 34199-B "Producción y caracterización de las enzimas ligninolíticas producidas por especies del genero *Pleurotus* spp. y su capacidad para metabolizar y/o degradar al insecticida organoclorado endosulfán" por el financiamiento otorgado al laboratorio de bioprocesos de CICESE.

Al Dr. José Ernesto Sánchez Vázquez (ECOSUR – Unidad Tapachula) por el financiamiento otorgado al proyecto así como las facilidades para la obtención de las cepas.

RESUMEN de la Tesis de Ricardo Cruz López presentada como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en Biología. Ensenada, Baja California México, Noviembre 2004. PRODUCCION, INDUCCION Y CARACTERIZACION PARCIAL DE LACASAS DE *Pleurotus djamor*.



Resumen aprobado por: _____
Dr. Facundo Joaquín Márquez Rocha

Tres cepas de *Pleurotus djamor* fueron utilizadas para evaluar la producción de biomasa y la enzima lacasa. *P. djamor* creció bien en diferentes fuentes de carbono, seleccionando la glucosa para el desarrollo del trabajo. La cepa ECS-0184 fue seleccionada por sus características de crecimiento y producción de lacasa. En la optimización del medio de cultivo para producción de biomasa, las mejores condiciones se obtuvieron a 25 °C, pH 7 y 9 días de cultivo, mientras que para la producción de lacasa fueron a 25 °C, pH 5.0-6.0 y 5 días de cultivo. Los mejores inductores de la formación de lacasa fueron el 2, 2;-azino-bis(3-etilbenztiazolina-6-sulfonato) (ABTS) y la cebada en comparación con el control. En cultivos estáticos *P. djamor* también produce lacasa. La lacasa fue purificada utilizando precipitación con sulfato de amonio y cromatografía en gel de exclusión SEPHADEX G-75, obteniendo la mayor actividad con el pico de proteína. El peso molecular de la lacasa obtenida fue de 41.3 kDa obtenido en geles de poliacrilamida y comprobado por HPLC. Los geles no desnaturalizantes de poliacrilamida (PAGE) para revelar la actividad muestran una sola banda de actividad usando ABTS y guayacol como sustrato. Estos resultados sugieren que *P. djamor* puede ser utilizada para la producción de biomasa y lacasa en medio líquido. Se muestran resultados preliminares de su producción en fermentador.

Palabras clave: *Pleurotus djamor*, lacasa, biomasa, condiciones de cultivo, ABTS, cromatografía, PAGE.

INDICE

INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	5
HIPOTESIS.....	17
OBJETIVOS.....	17
Objetivo general.....	17
Objetivo particular.....	17
METODOLOGIA.....	18
Cepas y medio de cultivo.....	18
SELECCIÓN DE LA FUENTE DE CARBONO.....	18
SELECCIÓN DE LA CEPA.....	19
Determinación de biomasa.....	20
Determinación cualitativa de actividad lacasa.....	20
Determinación cuantitativa de actividad lacasa.....	20
OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO.....	21
Determinación de proteína soluble en el medio de cultivo.....	23
EFECTO DE INDUCTORES SOBRE LA FORMACION DE LACASA.....	23
En medio sólido.....	23
En cultivos estáticos.....	24
Producción de biomasa, proteína y lacasa en dos tipos de fermentadores.....	24
PURIFICACION Y CARACTERIZACION PARCIAL DE LACASAS.....	25
Determinación de actividad específica.....	25
Determinación del peso molecular de la lacasa por medio de zimograma.....	26
Determinación del peso molecular de la lacasa por medio de cromatografía líquida de alta resolución.....	26

Determinación de los valores cinéticos de la lacasa.....	27
Determinación de la actividad lacasa para varios sustratos aromáticos.....	27
PROCESAMIENTO DE DATOS Y ANALISIS DE RESULTADOS.....	27
RESULTADOS.....	27
SELECCIÓN DE LA FUENTE DE CARBONO.....	28
SELECCIÓN DE LA CEPA.....	32
OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO.....	35
EFECTO DE INDUCTORES SOBRE LA FORMACION DE LACASA.....	38
PURIFICACION Y CARACTERIZACION PARCIAL DE LACASAS.....	44
DISCUSIONES.....	52
CONCLUSIONES.....	57
LITERATURA CITADA.....	58

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de los diferentes medios utilizados en el cultivo sólido de <i>P. djamor</i>	19
Tabla 2. Valores de códigos usados en la optimización del experimento.....	21
Tabla 3. Identificación del tratamiento con la combinación de códigos.....	22
Tabla 4. Velocidad de crecimiento lineal y crecimiento máximo de tres cepas de <i>P. djamor</i> cultivada en medio sólido con diferentes fuentes de carbono.....	30
Tabla 5. Análisis estadístico comparativo de las tres cepas de <i>P. djamor</i>	30
Tabla 6. Resultados de biomasa, proteína y actividad de lacasas por tratamiento.....	36
Tabla 7. Rendimiento de proteína y actividad de lacasas por unidad de biomasa.....	37
Tabla 8. Velocidad de crecimiento lineal y crecimiento máximo de tres cepas de <i>P. djamor</i> en presencia de inductores.....	40
Tabla 9. Comparación de resultados de biomasa, proteína y lacasa producidos por <i>P. djamor</i> en dos tipos de fermentadores.....	43
Tabla 10. Purificación de lacasas en columna SEPHADEX G-75.....	45
Tabla 11. Tiempos de retención, ln PM y peso molecular de los estándares y la lacasa.....	49
Tabla 12. Determinación de la actividad específica de lacasas.....	51

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Unidades monoméricas de fenilpropanoides que polimerizan para formar lignina. (A) alcohol cumarílico; (B) alcohol coniferílico; (C) alcohol sinapílico.....	3
Figura 2. Desarrollo del micelio en medio PDA después de 7 días de cultivo a 28 °C. a) ECS-0184, b) ECS-0185, c) ECS-0190.....	29
Figura 3. Crecimiento de las cepas a) ECS-0184, b) ECS-0185 y c) ECS-0190 con diferentes fuentes de carbono, en agar: cuadrado, glucosa-malta; triángulo hacia arriba, glucosa; triángulo hacia abajo, sacarosa; rombo, sorbitol; círculo, almidón.....	31
Figura 4. Incremento en biomasa en cultivos sumergido de las cepas de <i>P. djamor</i> , ECS-0184, ECS-0185, ECS-0190 después de 6 días de cultivo.....	32
Figura 5. Identificación rápida de presencia de lacasas en el caldo de cultivo, utilizando placa de ELISA y guaiacol como sustrato.....	33
Figura 6. Formación de lacasas en cultivo sumergido a lo largo de seis días de cultivo en las cepas ECS-0184, ECS-0185 y ECS-0190 de <i>P. djamor</i>	34
Figura 7. Efecto de inductores sobre la producción de lacasas en las cepas a) ECS-0184 b) ECS-0185 y c) ECS-0190; cuadro: ABTS; triángulo hacia arriba: guaiacol; triángulo hacia abajo: alcohol veratrílico.....	39
Figura 8. Efecto de inductores en la formación de proteína extracelular (a) y lacasa (b).....	42
Figura 9. Proteína soluble y actividad específica por número de fracción.....	46
Figura 10. Tiempos de retención de los estándares. (A) IgG, (B) BSA, (C) CPO, (D) quimiotripsina, (E) tripsina, (F) lisozima.....	47
Figura 11. Tiempo de retención de la lacasa.....	48

Figura 12. Regresión lineal del cromatograma de los estándares y la lacasa. Concentrando los datos del cromatograma de los estándares y de la lacasa, se hizo una regresión lineal para determinar el peso molecular de la lacasa48

Figura 13. PAGE mostrando la purificación de la lacasa de *P. djamour* .**(A)** Carriles: **M**, marcador de pesos moleculares(miosina, 216,000. β -galactosidasa, 132,000. BSA, 78, 000. anhidrasa carbónica, 45,700. inhibidor de tripsina de soya, 32,500). **F1**, fracción 7. **F2**, fracción 8.
(B) Carriles: **M**, marcador de pesos moleculares. **F1**, fracción 7. **F2**, fracción 8.....49

Figura 14. Cinética enzimática para la lacasa usando ABTS como sustrato....50

INTRODUCCIÓN

Los basidiomicetos de pudrición blanca han recibido gran atención debido su capacidad para degradar lignina. Estos hongos son inusuales entre los microorganismos ya que son capaces de mineralizar todos los componentes de la lignina nativa hasta dióxido de carbono y agua. La lignina es un polímero aleatorio y de esta forma pocos sistemas son capaces de hidrolizar dichos enlaces. El sistema enzimático ligninolítico de los hongos de pudrición blanca reúne este prerequisite y de esta forma es capaz de oxidar un amplio número de contaminantes aromáticos.

Dichos hongos producen enzimas oxidativas extracelulares que degradan la lignina. La lignina juega un papel importante en el ciclo del carbono como el mayor compuesto aromático en la naturaleza, otorgando una matriz protectora que rodea a las microfibrillas de celulosa de la pared celular de las plantas. Este polímero amorfo e insoluble carece de estereoregularidad y, en contraste con la celulosa y hemicelulosa no es susceptible al ataque hidrolítico. A este grupo de descomponedores se le llamo hongos de pudrición blanca, ya que la lignina es café y al momento de ser hidrolizada por el sistema enzimático ligninolítico deja como producto a la celulosa, que es de color blanco. Éstos son los únicos organismos capaces de depolimerizar y mineralizar eficientemente la lignina.

El sistema enzimático ligninolítico de los hongos de pudrición blanca consta de un arreglo de peroxidasas y oxidasas que actúan de manera no específica generando radicales libres que llevan a reacciones espontáneas de división. La naturaleza no específica del potencial de oxidación de estas enzimas ha atraído considerable interés para la aplicación en bioprocesos tales como la degradación de organocontaminantes y el blanqueamiento de fibras.

Basándose en los patrones de las enzimas ligninolíticas, los hongos de pudrición blanca pueden ser divididos en dos grupos; aquellos que producen solo lacasas (LAC) y mangneso-peroxidasas (MnP) y aquellos que además de las anteriores producen lignina-peroxidasas (LiP). Estos dos grupos, respectivamente, han sido relacionados con la capacidad de degradar preferencialmente lignina de la pared celular de plantas leñosas y de mineralizar eficientemente lignina sintética (Muñoz *et al.*, 1997).

La lignina constituye el segundo grupo más abundante de biopolímeros en la biosfera, de esta forma, su biodegradación ocupa una importante posición en el ciclo global del carbón (Eggert *et al.*, 1996). Está compuesta por tres unidades monoméricas de alcoholes cinamílicos (**figura 1**): alcohol cumarílico, encontrada principalmente en pastos; alcohol coniferílico, la mayor unidad

monomérica de las gimnospermas; y alcohol sinapílico predominantemente en angiospermas.

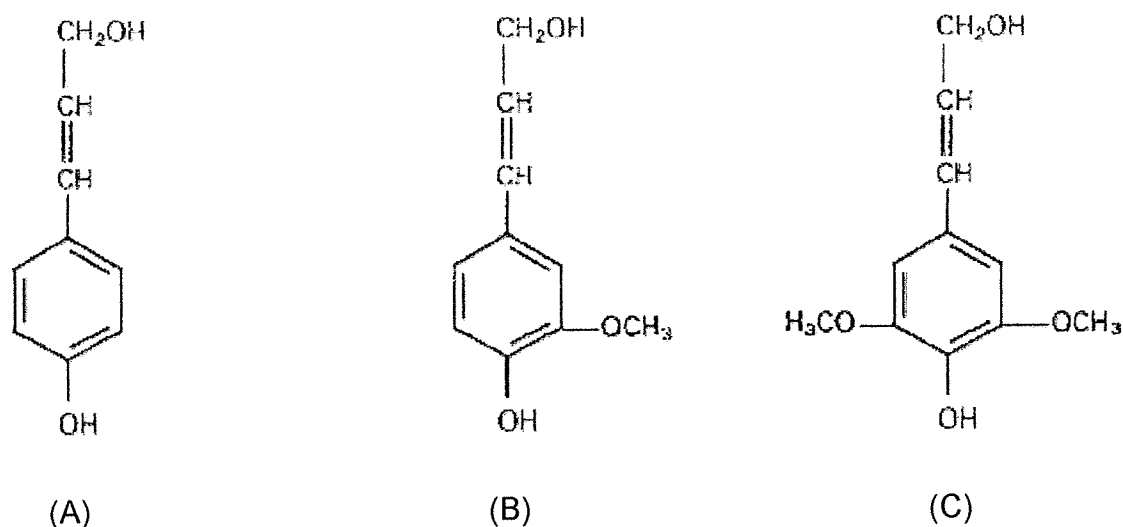


Figura 1. Unidades monoméricas de fenilpropanoides que polimerizan para formar lignina. (A) alcohol cumarílico; (B) alcohol coniferílico; (C) alcohol sinapílico.

El género *Pleurotus* spp. es promisorio ya que sus diferentes especies naturales actúan principalmente como saprofitas al crecer y fructificar directamente sobre troncos de madera. La base de tal facilidad de desarrollo consiste en la capacidad oxidativa e hidrolítica del sistema enzimático ligninolítico el cual actúa sobre las estructuras ligninocelulósicas de dichos sustratos (Sánchez y Royse, 2002).

Éstas son enzimas de relevancia industrial ya que pueden aplicarse para propósitos biocatalíticos tales como la delignificación de lignocelulosa y polisacáridos, biorremediación, detoxificación y biotransformación de desperdicios derivados de industrias como la papelera y textil, en la industria alimenticia, como biosensores y propósitos analíticos (Galhaup *et al.*, 2002).

La meta de este trabajo es seleccionar una fuente de carbono adecuada para el cultivo de 3 cepas de *Pleurotus djamor* (Rumphius: Fries) Boedijn; seleccionar la mejor cepa productora de lacasa y biomasa; por medio de un diseño experimental factorial 2^3 analizar la influencia de 3 variables (pH inicial, temperatura y día de cosecha) sobre la formación de lacasa y biomasa; analizar el efecto de 5 inductores sobre la formación de lacasa, así como purificar y caracterizarla parcialmente.

ANTECEDENTES

La lacasa (p-difenol:dioxígeno oxidorreductasa; EC 1.10.3.2) pertenece a un pequeño grupo llamado proteínas de cobre azul u oxidasas de cobre azul (Koroljova *et al.*, 1998). Son proteínas glicosiladas extracelulares de 60-85 kDa con un contenido de carbohidratos de entre 15-20% (Rubia *et al.*, 2002; Galhaup *et al.*, 2002), caracterizadas por su contenido de cobre y su actividad oxidativa sobre fenoles, aminas aromáticas y ascorbato, la cual tiene una gran variedad de sustratos específicos respecto al donador de electrones (de la Rubia *et al.*, 2002).

Ésta cataliza la remoción de un átomo de hidrógeno de un grupo hidroxilo *orto* y *para*, así como sustratos mono y polifenólicos (Abudalla *et al.*, 2000), cataliza además la abstracción de un electrón de una amplia variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos, incluyendo mono-, di- y polifenoles, aminofenoles, metoxifenoles, complejos metálicos como ferroceno, ferrocianidos o iodidos (Galhaup *et al.*, 2002).

Las lacasas están involucradas en la biodegradación de la lignina, la cual constituye el segundo biopolímero después de la celulosa. Un gran número de hongos blancos de pudrición han sido reportados como productores de enzimas degradadoras de lignina entre los que se encuentra el género *Pleurotus* spp. (Abudalla *et al.*, 2000).

En los hongos de pudrición blanca dichas enzimas son producidas en forma de múltiples isoenzimas (Koroljova *et al.*, 1998; Palmieri *et al.*, 2000; Galhaup *et al.*, 2002), codificadas por una familia de genes (Galhaup *et al.*, 2002; Zhao y Kwan, 2002) sugiriéndose que tales genes codifican para varias isoenzimas las cuales se regulan de diferente manera, siendo algunas expresadas constitutivamente y otras inducidas (Galhaup *et al.*, 2002).

La producción de lacasas para tales propósitos puede ser estimulada por sustancias inductoras principalmente compuestos aromáticos y fenólicos relacionados ó derivados de la lignina. Su síntesis puede verse influenciada por la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo y la fuente de carbón usada (*idem*).

Además de usar al oxígeno como aceptor de electrones para remover el hidrógeno de grupos hidroxifenólicos, la lacasa puede oxidar sustratos no fenólicos. El intervalo de oxidación puede variar de un tipo de lacasa a otro. La especificidad del sustrato para lacasas puede ser explicado con base a su función fisiológica, pudiéndose presentar tres posibilidades: formación de pigmento, degradación de lignina y detoxificación (Koroljova *et al.*, 1998). La mayoría de los hongos de pudrición blanca producen lacasas, preferentemente extracelulares. Isómeros específicos de lacasas pueden ser inducidos utilizando

compuestos fenólicos que emulan compuestos lignocelulósicos encontrados en la naturaleza (Srinivasan *et al.*, 1995).

La lacasa cataliza la oxidación de un amplio grupo de sustancias las cuales son reducidas hasta O_2 . Contiene 4 átomos de cobre por molécula distribuidas en tres diferentes sitios de unión de cobre. Los sitios T2 y T3 forman un espacio de cobre trinuclear en el cual el O_2 es reducido. El centro de cobre T1 lleva a cabo la reducción del sustrato y transfiere electrones a los sitios T2 y T3 (Xu Feng *et al.*, 2000). El sitio T1 (o cobre azul) es responsable del intenso color azul de la enzima, el sitio T2 exhibe una absorbancia visible baja y el sitio T3, incorpora 2 centros de cobre y es responsable de la absorbancia a 330 nm. Estos tres sitios están involucrados en el mecanismo catalítico (Palmieri *et al.*, 1997).

Hay muchas fuentes de hongos, principalmente basidiomicetos involucrados en la degradación de lignina. Dichos estudios señalan que las enzimas involucradas en tal degradación están distribuidas en los hongos de pudrición blanca, aunque hay diferentes niveles de producción enzimática inclusive entre cepas de la misma especie. Las condiciones de cultivo y la composición del medio juegan un papel importante en la expresión proteica, por lo que es importante llevar a cabo estudios preliminares para optimizar la producción de la enzima. (Pickard *et al.*, 1999)

El cultivo en medio sólido es un método usual de preparación de inóculo para el género *Pleurotus* spp., consiste en propagar el micelio en granos de cereales como trigo o sorgo. Este proceso presenta algunos problemas como: tiempo relativamente largo hasta la producción del inóculo secundario, contaminación frecuente por manipulación, disponibilidad del grano y dificultades en el control del proceso (Guillén-Navarro *et al.* 1998).

En *Phanerochaete chrysosporium* Burdsall el ensayo en placa de agar, permitió una rápida determinación de la presencia de lacasas, en el fluido extracelular del cultivo se utilizaron 15 mL de agarosa estéril al 0.5 % con 14 μ M de ABTS por mL en 50 mM de glicina (Srinivasan *et al.*, 1995).

Saparrat *et al.* (2000), utilizó medio agarizado Kirk modificado con ABTS como sustrato aromático. Él agrupó las actividades de los diversos hongos analizados de la siguiente manera: a) especies sin actividad extracelular oxidante del ABTS; b) especies con baja actividad extracelular oxidante de ABTS; c) especies con moderada actividad extracelular oxidante del ABTS; d) especies con alta actividad oxidante del ABTS. En su análisis de 31 especies fúngicas, incluyó a *Pleurotus laciniatocrenatus* (Speg) Speg. el cual mostró una alta actividad oxidante de ABTS.

Una alternativa para evitar problemas en el cultivo de hongos en sustrato sólido, es la obtención del inóculo en cultivo sumergido, ya que permite producir mayor cantidad de biomasa de mejor calidad en menos tiempo, favorece la dispersión y adaptación del hongo y facilita su manipulación durante la siembra en el sustrato final (Guillén-Navarro *et al.* 1998). El cultivo sumergido presenta varias ventajas tales como la disminución del tiempo de incubación, manejo de grandes volúmenes al mismo tiempo pues se preservan las propiedades fisiológicas y genéticas del hongo, entre otras. Este método puede ser utilizado para preparar el inóculo líquido para la producción de cuerpos fructíferos o semillas, para producción de biomasa para consumo humano, para estudios fisiológicos o enzimáticos en las áreas de biodegradación de compuestos tóxicos y en aspectos de biorremediación. Con los hongos *Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler y *Pleurotus ostreatus* (Jacquin: Fries) P. Kummer se evaluó la propagación por cultivo sumergido obteniéndose resultados prometedores (Nieto-López, 2002).

El hongo se ve afectado por las condiciones de crecimiento a las que se cultive. Tales parámetros, como la temperatura, el pH, la agitación y la aireación; así como también el inóculo y el sustrato influyen directamente en la calidad de la biomasa formada y el rendimiento (Guillén-Navarro *et al.* 1998).

Para la obtención de metabolitos, el método mas eficiente de cultivo es el cultivo sumergido. Los hongos filamentosos en cultivo sumergido pueden crecer en forma de aglomerados o colonias esféricas llamadas "pellets". El crecimiento del micelio o de los "pellets" puede verse influenciado por un número de factores tales como la cepa, el medio, el tamaño de inóculo, fuerza mecánica, y la tensión de oxígeno disuelto (Kuo-Ching, F. 2004).

Parece ser que la producción de enzimas y el crecimiento del hongo están relacionados (Guillén-Navarro *et al.* 1998), debido a esto se realizó el presente estudio para optimizar la técnica de producción del inóculo en *Pleurotus djamor* y al mismo tiempo evaluar la producción de lacasas durante su crecimiento.

Carroad y Wilke (1977) utilizaron el siguiente medio de cultivo para determinar la cinética de crecimiento para *Pleurotus ostreatus* (g/L): glucosa, 10; KH_2PO_4 , 0.6; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; K_2HPO_4 , 0.4; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.074; ferricitrato, 0.012; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.666; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.005; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.001; e hidrocloreuro de tiamina, 0.0001, siendo ajustado a pH 5.0. En *Phanerochaete chrysosporium* el cultivo contenía amortiguador dimetilsuccinato pH 4.2, tartrato de amonio 2.4 y 24 mM como fuente de nitrógeno y celulosa pulverizada como fuente de carbono (Srinivasan *et al.*, 1995). Pérez *et al.* (1996) para *Phanerochaete flavido-alba* (Cooke) Rattan

ensayó 40 mL de medio basal modificado. En dicho artículo se reporta que la adición de detergentes como Tween 20 a cultivos sumergidos optimiza la secreción de enzimas ligninolíticas.

Muñoz *et al.*, (1997) para *Pleurotus eryngii* (De Candolle: Fries) Quélet ensayó el siguiente medio: 56 mM de glucosa y 22 mM de tartrato de amonio. Se utilizaron 50 mL en matraces de 250 mL a 250 rpm 26 °C. Se probaron 7 sustratos aromáticos, siendo la alkalilignina el mejor sustrato inductor, seguido del ácido vanílico y el ácido verátrico.

El cultivo sumergido del género *Pleurotus* spp. permite producir al mismo tiempo enzimas ligninolíticas importantes como la lacasa (LAC), magnesoperoxidasa (MnP) y lignina-peroxidasa (LiP). Este tipo de organismos degradan lignina más extensa y rápidamente que otros grupos de organismos conocidos. Al variar las condiciones de cultivo se puede mejorar el rendimiento, optimizar la calidad y reducir costos del proceso de fermentación (Guillén-Navarro *et al.* 1998).

Al parecer, fuentes naturales de lignina incrementan la producción de la enzima. Pickard *et al.* (1999) ensayó a *Coriolopsis galliga* (Fr.) Ryv. UAMH 8260, *Bjerkandera adusta* (Willd.) P. Karst y *Trametes versicolor* (L.:Fries) Pilat con 2% de bran flakes de Kellog's™ en cultivos sumergidos. Para proveer una

fuentes similar de carbón en cultivo sumergido, se investigaron distintas fuentes de fibra natural hallándose que dichas fuentes son efectivas en la producción de enzimas degradadoras de lignina en distintos hongos, siendo la 2,5-xilidina buen inductor para el genero *Pleurotus* spp.

En *Pleurotus ostreatus* se ensayaron cultivos estáticos en matraces erlenmeyer de 100 mL conteniendo 10 mL de medio Kirk con nitrógeno limitado y alcohol veratrílico 1 mM como concentración final (Eichlerova y Homolka,1999). De la Rubia *et al.* (2002), probó 14 compuestos aromáticos en cultivos estáticos de 7 y 11 días en medio basal pH 4.5 conteniendo CuSO_4 22.4 μM , cada compuesto aromático fue disuelto en dimetilformamida : agua (3:7 v/v), y adicionada a cultivos de 2 días, después de una incubación adicional de cinco días. El compuesto con mejor rendimiento en la inducción fue la vanilina cuando se aplico a una concentración de 1 mM.

En *Phanerochaete chrysosporium* se observaron 2 isoformas con peso molecular muy similar. La lacasa es una de las pocas proteínas que conserva su actividad incluso después del procedimiento de los geles. El SDS-PAGE muestra que el peso molecular de la lacasa es de 46,5 kDa hallándose dentro del promedio reportado para otros basidiomicetos. El peso molecular de la mayoría de las lacasas de los basidiomicetos se reporta entre 55 y 72 kDa, aunque diversas isoformas de lacasas de *Trametes versicolor* se encuentran

entre 43 y 66 kDa, y cinco isoformas de *Schizophyllum commune* entre 36 y 48 kDa. (Srivasan *et al.*, 1995).

En *Phanerochaete flavido-alba* se reporta para la lacasa un peso molecular de 94 kDa con un pI de 3.5, similar al reportado para otros hongos de pudrición blanca (Pérez, J. *et al.* 1996). Palmieri *et al.* (1997), caracterizó dos nuevas isoformas de lacasas. POXA1 y POXA2 las cuales tienen un contenido de carbohidratos de 3 y 9%, en SDS-PAGE su peso molecular fue de 61 y 67 kDa y por filtración en gel de la enzima nativa de 54 y 59 kDa., pI de 6.7 y 4.0 respectivamente. En 1997 Muñoz *et al.*, caracterizó dos nuevas isoformas de lacasas. Éstas son dos glicoproteínas monoméricas con 7 y 1% en contenido de carbohidratos, pesos moleculares de 65 y 61 kDa y con pI de 4.1 y 4.2 respectivamente. Koroljova *et al.* (1998) purificó la lacasa de *Coriolus hirsutus* (sin. *Trametes hirsuta* (Wulfen) Pilát), probando también el efecto de algunos inductores. El inductor más eficiente fue la siringaldazina a 0.11 μ M. El peso molecular de la lacasa fue estimado en 55 kDa y pI de 4, siendo una glicoproteína monomérica con 12% de carbohidratos.

En *Phanerochaete flavido-alba* el peso molecular fue de 98.7 kDa. Este inusual alto peso molecular de la lacasa constitutiva e inducida puede deberse en parte al contenido de carbohidratos (17.7%) que es mayor que el promedio de los hongos de pudrición blanca (de la Rosa *et al.*, 2002).

Aunque la lacasa ha sido extensamente estudiada, solo una estructura cristalina esta disponible, la del tipo 2 de cobre plegada de *Coprinus cinereus* (Schaeff.: Fr.) S.F. Gray, la de *Trametes versicolor* (L.:Fries) Pilat y *Pycnoporus cinnabarinus* (Jacquin : Fr.) Karsten. En dicho artículo se describe la estructura tridimensional de la lacasa de *Melanocarpus albomyces*, la cual contiene cuatro sitios de cobre. La lacasa de este ascomiceto, comparte aproximadamente del 20-30% en la secuencia con las lacasas de los basidiomicetos (Hakulinen *et al.*, 2002).

Se han hecho grandes esfuerzos para purificar y caracterizar lacasas debido al alto interés comercial, en *Coriolopsis rigida* (Berk. y Mont.) Murrill. se estudió la capacidad para degradar desechos derivados de la industrialización del trigo, así como su capacidad para degradar fracciones del suelo contaminados con petróleo crudo y compuestos alifáticos (Saparrat, 2002). En *Pleurotus ostreatus* esta bien demostrada la capacidad ligninolítica y por lo tanto oxidativa de varios compuestos aromáticos. Pickard *et al.*, (1999) estudió la oxidación de 20 compuestos aromáticos en *Coriolopsis gallica* UAMH 8260, en donde observo que 7 fueron significativamente metabolizados por la lacasa en presencia de ABTS y lentamente metabolizados en su ausencia. Se ha estudiado la posibilidad de su uso como biosensores y procesos de degradación en la industria, también usada en procesos de detoxificación y

decoloración si se usan compuestos aromáticos como sustratos donadores de electrones (Yousung *et al.*, 2002).

Existen evidencias que la lacasa por si misma es capaz de depolimerizar lignina sintética (Srebotnik *et al.*, 2000) y delignificar pulpa de madera cuando son combinadas con varios agentes de transferencia de electrones de bajo peso molecular. Pérez *et al.*, (1998) reporta que la lacasa juega un importante papel en la decoloración y detoxificación de los desechos del aceite de oliva mientras que Ruiz *et al.*, (2002) reporta por su parte que los compuestos fenólicos presentes en las aguas de tratamiento inducen la producción de lacasas en *Phanerochaete flavid-alba*.

Estudios han demostrado que el cobre a diferentes concentraciones afecta positivamente la síntesis de lacasas en *Coriolopsis rigida*, *Cerrena unicolor* (Bull.) Murrill., *Coriolus hirsutus*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* y *Ceriporiopsis subvermispora* (Pilát) Gilbn. y Ryv. (Koroljova *et al.*, 1998; Collins & Dobson, 1998; Palmieri *et al.*, 2000; Galhaup *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002; Saparrat *et al.*, 2002). Rubia *et al.*, (2002) reportó que para *P. flavid-alba* la vanilina incrementa considerablemente la concentración de proteínas. Koroljova *et al.*, (2002), reportó que utilizando siringaldazina como inductor la concentración de lacasas se incrementa hasta en 1000% a concentraciones de 0.11 μ M. En *Trametes versicolor*, al adicionarse 40 g/L de etanol, se observó

que la concentración de lacasa aumento 24 veces, siendo casi igual de significativa la concentración que si se hubiera utilizado otro tipo de inductor comercial (Lee *et al.*, 1999).

HIPÓTESIS

Las cepas ECS-0184, ECS-0185 y ECS-0190 de *Pleurotus djamor* en cultivo sumergido son buenas productoras de lacasas al igual que otras cepas del género *Pleurotus* spp.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar si *Pleurotus djamor* puede cultivarse en medio líquido, para la producción de biomasa y lacasa.

Objetivos particulares

- Optimizar las condiciones de cultivo de *Pleurotus djamor* para la producción de biomasa y lacasa.
- Obtener inductores para la producción de lacasa.
- Purificar y caracterizar parcialmente la lacasa.

METODOLOGIA

La fase experimental se desarrollo en el laboratorio de Ingeniería de Bioprocesos Marinos perteneciente al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).

Cepas y medio de cultivo

Se utilizaron las cepas ECS-0184, ECS-0185 y ECS-0190 de *Pleurotus djamor* procedentes del cepario micológico del Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR – Unidad Tapachula). Las cepas de trabajo, debidamente etiquetadas se mantuvieron en medio papa dextrosa agar (PDA) pH 5.0 en cajas de petri a 30°C. El medio basal (MB) contiene (g/L): KCl 0.2, MgSO₄ 0.2, CaCl₂ 0.2, extracto de levadura 1.5. Para medio sólido se uso 15 g/L de agar grado bacteriológico.

SELECCIÓN DE LA FUENTE DE CARBONO

Las cepas fueron propagadas en un medio que tiene una composición como se muestra en la **Tabla 1**. La diferencia entre cada uno de ellos es la fuente de carbono. Se utilizaron cajas petri de 90X15 mm con 15 mL de medio. En el centro de la superficie del agar, se sembró un fragmento del micelio de 4 mm² por cada cepa, incubado a 30 °C por 7 días en oscuridad.

Tabla 1. Composición de los diferentes medios utilizados en el cultivo sólido de *P. djamor*.

nutriente (g/L)	medio de cultivo				
	A	B	C	D	E
KCl (0.2)	+	+	+	+	+
MgSO ₄ (0.2)	+	+	+	+	+
CaCl ₂ (0.2)	+	+	+	+	+
extracto de levadura (1.5)	+	+	+	+	+
extracto de malta (2)	+	-	-	-	-
glucosa (10)	+	+	-	-	-
sacarosa (10)	-	-	+	-	-
sorbitol (5)	-	-	-	+	-
almidón (5)	-	-	-	-	+
agar (15)	+	+	+	+	+

SELECCIÓN DE LA CEPA

Dos fragmentos de micelio de 4 mm² propagado en medio basal sólido y glucosa como fuente de carbono (**MBsG**) por cada cepa, fueron transferidos a 100 mL de MB líquido y glucosa como fuente de carbono (**MBIG**), puestos en agitación a 200 rpm durante 7 días a 30 °C.

De las “pellets” resultantes del micelio de 7 días, 5 de estos fueron transferidos a matraces erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de MBIG a 200 rpm durante 6 días a 30 °C cada uno con su respectiva réplica. Se tomaron muestras diariamente durante el transcurso del experimento almacenadas a -70 °C hasta su análisis.

Determinación de biomasa

Al finalizar el experimento, se recuperó el micelio resultante en cada uno de los matraces por medio de filtración y se determinó la biomasa obteniendo el peso seco mediante desecación en horno a 55 °C durante 24 h.

Determinación cualitativa de actividad lacasa

Al finalizar el experimento se recuperó el caldo de cultivo agotado y se paso a través de un filtro de 10 μm de poro. A placas de ELISA se adicionaron 50 μL del caldo de cultivo, 20 μL de H_2O y 5 μL de guayacol. Esto se realizó para las tres cepas haciéndose por triplicado con su respectivo control.

Determinación cuantitativa de actividad lacasa

Para la determinación de la actividad lacasa fueron usados los extractos crudos de las muestras tomadas; se siguió el rango de oxidación del 2, 2'-azino-bis(3-etilbenztiazolina-6-sulfonato) (**ABTS**) hasta su estado catiónico $\text{ABTS}^{+\cdot}$, monitoreando el incremento de A_{410} (ϵ 5507 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) contra tiempo (min^{-1}). La reacción tuvo 1000 μl de H_2O destilada, 700 μl de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 6.5, 200 μl de ABTS 140 μM y 100 μl de muestra cruda para dar un volumen total de reacción de 2000 μl .

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO

Para la optimización de las condiciones de cultivo se utilizó un diseño experimental factorial 2^3 para analizar la influencia de 3 variables (pH inicial, temperatura y día de cosecha) sobre la producción de biomasa, proteína soluble y lacasa.

Dos fragmentos del micelio (4 mm^2) de 7 días de *Pleurotus djamor* ECS-0184 fueron transferidos a un matraz erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de MBIG. Cinco “pellets” de siete días de tamaño homogéneo (obtenidos de la inoculación anterior), fueron transferidos a 15 matraces con 50 mL de medio, dando como resultado cinco “pellets” por matraz erlenmeyer de 250 mL, por triplicado. El MBIG contenía 20 g/L de glucosa (**MBIG'**). Los cultivos fueron puestos en agitación a 200 rpm aplicándose las siguientes condiciones de cultivo.

Tabla 2. Valores de códigos usados en la optimización del experimento.

Variable	código		
	-1	0	1
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)(X_1)	25	30	35
pH (X_2)	5	6	7
Día de cosecha (X_3)	5	7	9

Tabla 3. Identificación del tratamiento con la combinación de códigos.

Tratamiento	código		
	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1
2	-1	+1	-1
3	-1	0	0
4	-1	-1	+1
5	-1	+1	+1
6	0	-1	-1
7	0	+1	-1
8	0	0	0
9	0	-1	+1
10	0	+1	+1
11	+1	-1	-1
12	+1	+1	-1
13	+1	0	0
14	+1	-1	+1
15	+1	+1	+1

Determinación de proteína soluble en el medio de cultivo

La determinación de proteínas de los extractos crudos se realizó por el microensayo para proteínas de Bradford (1976) (Biorad), este ensayo involucra la adición de una tinción ácida azul brillante de coomassie G-250, a la solución proteica. La tinción de azul de coomassie se une a aminoácidos básicos y aromáticos resultando en un cambio máximo en la absorbancia de 465 nm (café), a 595 nm (azul). El método requiere de una curva estándar utilizando albúmina de suero bovino (BSA). Los valores de la densidad óptica a 595 nm de fracciones generadas experimentalmente fueron ajustadas a la curva estándar, y el contenido de proteína fue determinado.

EFFECTO DE INDUCTORES SOBRE LA FORMACIÓN DE LACASA

La formación de lacasa extracelular se monitoreó usando MBsG' en presencia de sustratos aromáticos. Se utilizaron los cromóforos ABTS, guayacol y alcohol veratrílico. La búsqueda fue llevada a cabo en cajas petri de 90X15 mm Ø con 20 mL de medio MBsG' más ABTS, guayacol y alcohol veratrílico, .7 mM, 1.1 mM y 1.15 mM respectivamente. En el centro de la superficie del agar, se sembró un inóculo de 4 mm² de la cepa previamente cultivado en medio PDA, después se incubaron hasta la completa colonización del medio a 30 °C por triplicado durante 7 días en oscuridad. El crecimiento de la cepa fue estimado en términos del diámetro de la colonia. La actividad oxidativa de la

lacasa extracelular fue estimada en términos de la tasa lineal de oxidación e intensidad del color (oxidación de los sustratos aromáticos).

Para la inducción de lacasa en cultivos estáticos se utilizaron los siguientes inductores: ABTS (.7 mM + MBIG'), gu ayacol (1.1 mM + MBIG'), bran flakes (2% p/v) y cebada (2% p/v + MBIG') durante 14 días, pH inicial 5.0, temperatura ambiente protegidos de la luz. A diferencia de los cultivos en agitación donde el micelio crece en forma de "pellets", en los cultivos estáticos el micelio se desarrolla superficialmente.

Producción de biomasa, proteína y lacasa en dos tipos de fermentadores

Fueron utilizados dos tipos de fermentadores de 1L, New Brunswick y Applikon. Como producto de los experimentos anteriores en donde se observan mejores resultados para el cultivo con glucosa, en esta etapa experimental se incluyo otra variante, que se refiere a la adición de una fuente ligninolítica como inductora de lacasas. En ambos casos se utilizo MBIG', 25-28 °C, pH inicial 5.0, 200 rpm durante 7 días y 2% p/v de granos de cebada. Dadas las dificultades para el manejo de la cebada, previamente se esterilizó y se recuperó el caldo de cultivo sin materia sólida, éste posteriormente fue adicionado al medio basal cuidando las condiciones de dilución y esterilidad.

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LACASAS

Obtenidas las condiciones óptimas de cosecha las células fueron separadas del caldo de cultivo por medio de filtros whatman #4, determinando proteína soluble y actividad enzimática para cada muestra filtrada. El extracto obtenido con mayor actividad lacasa y proteína soluble (cebada 2% en MBIG') fue transferido a un vaso de precipitado por medio de filtros MILLIPORE-swinnex no estériles de 10 μm de diámetro, posteriormente el filtrado fue saturado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta una concentración final de 80%. Después de 30 minutos en agitación lenta a 4°C, el precipitado se transfirió a tubos eppendorf de 1.5 mL para centrifugarse a 14,000 rpm durante diez minutos a 4 °C. El "pellet" se concentró y resuspendió en 1 mL de H₂O destilada. La muestra concentrada fue eluida a través de una columna cromatográfica de exclusión molecular SEPHADEX G-75 (Pharmacia K16/100) equilibrada en solución amortiguadora de fosfato de sodio 20 mM, pH 6.5 con un flujo de 0.8 ml min⁻¹. Para cada fracción se determinó proteína soluble y actividad lacasa, como se describe anteriormente.

Determinación de actividad específica.

La actividad específica se define como:

$$\Delta\text{Amin}^{-1}\varepsilon^{-1}\text{mg}^{-1} \text{ proteína soluble}$$

Determinación del peso molecular de la lacasa por medio de zimograma

Para la determinación del peso molecular de la proteína nativa la purificación de la enzima se llevó a cabo en un gel de poliacrilamida no desnaturizante 12.6 % (p/v) en solución amortiguadora tris/glicina pH 8.8. El peso molecular de la lacasa fue estimada con base en el marcador de pesos moleculares Kaleidoscope™ (Biorad Laboratories) como referencia. La actividad lacasa fue determinada por medio de zimograma usando ABTS 20 mM y guayacol 50 mM como sustratos, puestos en agitación durante 30 minutos.

Determinación del peso molecular de la lacasa por medio de cromatografía líquida de alta resolución

Para la confirmación del peso molecular de la lacasa se utilizó cromatografía líquida de alta resolución, utilizando una columna C-18 para proteínas, y como fase móvil solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.2 M pH 6.0 y NaCl 50 mM con un flujo de 1 mL min⁻¹. Se utilizaron proteínas estándares como referencia IgG, BSA, CPO, quimiotripsina, tripsina, lisozima con pesos moleculares de 150, 66, 42, 25.6, 23.8 y 14.3 kDa respectivamente.

Determinación de los valores cinéticos de la lacasa

El rango de la oxidación del sustrato aromático fue determinado espectrofotométricamente. Los valores de K_m y V_{max} fueron determinados para ABTS ($\epsilon_{410} = 5507 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) siguiendo su oxidación en solución amortiguadora de fosfatos 20 mM (pH 7.0) a 25 °C como se describe anteriormente para actividad lacasa. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Determinación de la actividad lacasa para varios sustratos aromáticos

La actividad lacasa fue determinada para varios sustratos aromáticos, usando ABTS, guayacol, alcohol veratrilico, rojo fenol, pinacianol y pirogalol a 5 y 50 mM.

Procesamiento de datos y análisis de resultados

Los datos obtenidos de cada una de las réplicas, para cada una de las variables, se contrastaron entre sí mediante un análisis de varianza de 2 vías, seguido de una prueba t de student en aquellos casos que muestren diferencias significativas para $p < 0.05$.

RESULTADOS

La estrategia para responder a los objetivos planteados en el trabajo, se realizó en cinco etapas; 1) selección de la fuente de carbono; 2) selección de la cepa; 3) optimización de las condiciones de cultivo; 4) efecto de inductores

sobre la formación de lacasas; 5) purificación y caracterización parcial de lacasas.

SELECCIÓN DE LA FUENTE DE CARBONO

En esta etapa se ensayaron las cepas ECS-0184, ECS-0185 y ECS 0190 en medio basal (MB) con 5 diferentes fuentes de carbono, donde se midió el crecimiento del diámetro del micelio por 7 días a 28 °C.

En las tres cepas su diámetro crece de forma lineal con aproximadamente 1 día de fase lag (acondicionamiento al medio y condiciones de cultivo) (**figura 2**). La máxima tasa lineal de crecimiento fue para ECS-0184 con 9.4-10.7 mm/d para las diferentes fuentes de carbono, seguido de ECS-0190 con 7.6-10.2 mm/d, teniendo por último a ECS-0185 con 5.6-7.5 mm/d (**Tabla 4**). Al realizar el análisis estadístico para el crecimiento de cada cepa no se observó una diferencia significativa de las velocidades de crecimiento pero se observaron los siguientes comportamientos entre cepas: existen diferencias significativas al compararse la tasa lineal de crecimiento en ECS-0184 vs ECS-0185 y ECS-0185 vs ECS-0190, no encontrándose entre ECS-0184 vs ECS-0190. Al analizarse la varianza del diámetro máximo alcanzado se encuentra que al compararse ECS-0184 vs ECS-0185 y ECS-0184 vs ECS-0190 no hay diferencias, encontrándose en ECS-0185 vs ECS-190 (**Tabla 5**).

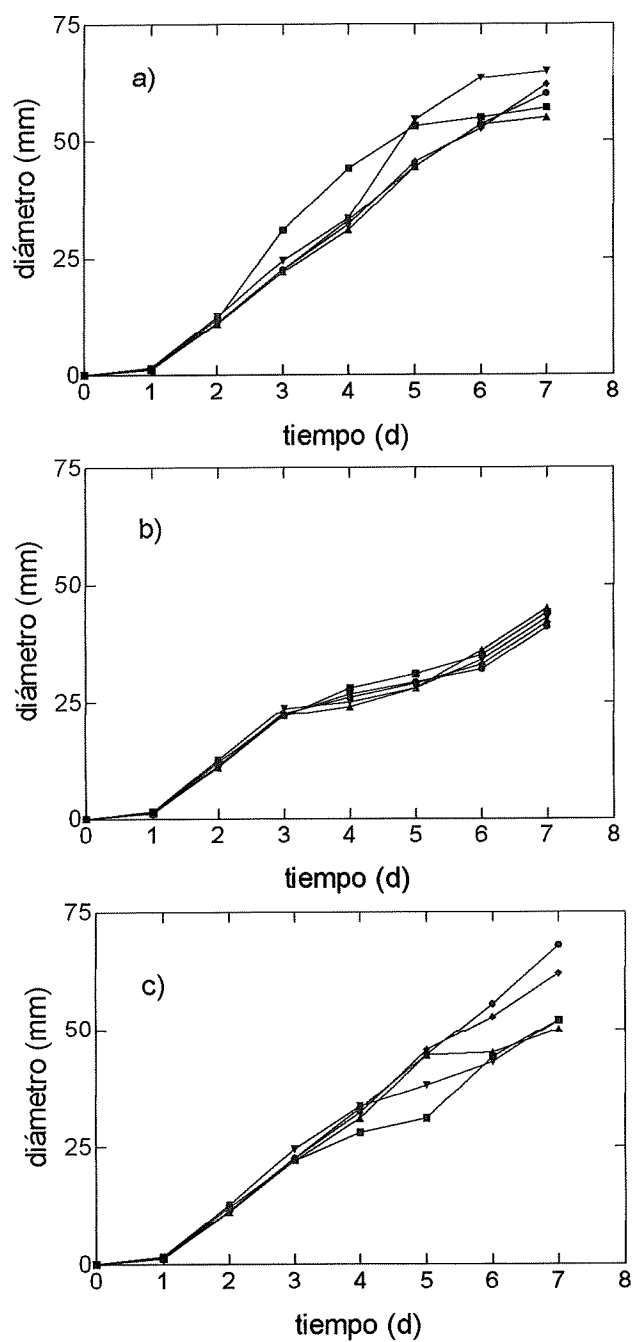


Figura 2. Crecimiento de las cepas a) ECS-0184, b) ECS-0185 y c) ECS-0190 con diferentes fuentes de carbono, en agar: cuadrado, glucosa-malta; triángulo hacia arriba, glucosa; triángulo hacia abajo, sacarosa; rombo, sorbitol; círculo, almidón.

Tabla 4. Velocidad de crecimiento lineal y crecimiento máximo de tres cepas de *P. djamor* cultivada en medio sólido con diferentes fuentes de carbono.

Fuente de carbono	cepas					
	ECS-0184		ECS-0185		ECS-0190	
	dl/dt (mm/d)	d _{max} (mm)	dl/dt (mm/d)	d _{max} (mm)	dl/dt (mm/d)	d _{max} (mm)
Glucosa-Malta	9.6±1.04	57	6.4±0.44	44	7.6±0.43	52
Glucosa	9.0±0.57	55	6.5±0.42	45	8.1±0.61	50
Sacarosa	10.7±0.79	65	6.1±0.49	43	7.8±0.47	52
Sorbitol	9.6±0.46	62	6.1±0.48	42	9.6±0.46	62
Almidon	9.4±0.46	60	5.9±0.51	41	10.2±0.52	68

dl/dt = tasa lineal de crecimiento; d_{max} = diámetro máximo alcanzado

Tabla 5. Análisis estadístico comparativo de las tres cepas de *P. djamor*.

	Cepas					
	ECS-0184		ECS-0185		ECS-0190	
	dl/dt (mm/d)	d _{max} (mm)	dl/dt (mm/d)	d _{max} (mm)	dl/dt (mm/d)	d _{max} (mm)
media	9.6	59.8	6.2	43	8.7	56.8
error	0.28	1.77	0.11	0.71	0.52	3.5
coeficiente de variación %	6.5	6.63	4	3.68	13.5	13.8
t-test medias						
0184 vs 0185	SI					
0184 vs 0190	NO					
0185 vs 0190	SI					
t-test varianza						
0184 vs 0185		NO				
0184 vs 0190		NO				
0185 vs 0190		SI				

En esta etapa se observó el crecimiento micelial en medio sólido **papa dextrosa agar (PDA)** durante 7 días a 28 °C. Como se observa en la **figura 3**, a) y c) tuvieron un crecimiento muy similar en cuanto a diámetro, observándose un crecimiento menor y asimétrico para b). En cuanto a densidad micelial, claramente se observa que b) tuvo una mayor densidad micelial, seguido de a) y c).

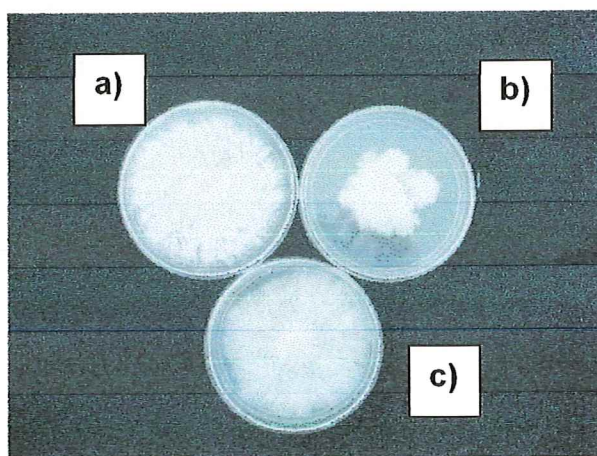


Figura 3. Desarrollo del micelio en medio PDA después de 7 días de cultivo a 28 °C. a) ECS-0184, b) ECS-0185, c) ECS-0190.

SELECCIÓN DE LA CEPA

Las tres cepas fueron cultivadas, esta vez en medio líquido, utilizando glucosa como fuente de carbono. Los cultivos se incubaron por 6 días a 28 °C y 200 rpm. Después de 6 días de cultivo se midió la producción de biomasa. En la **figura 4** se observa que el incremento en biomasa a los 6 días el cual fue mayor en la cepa ECS-0184, seguido de la ECS-0190 y ECS-0185.

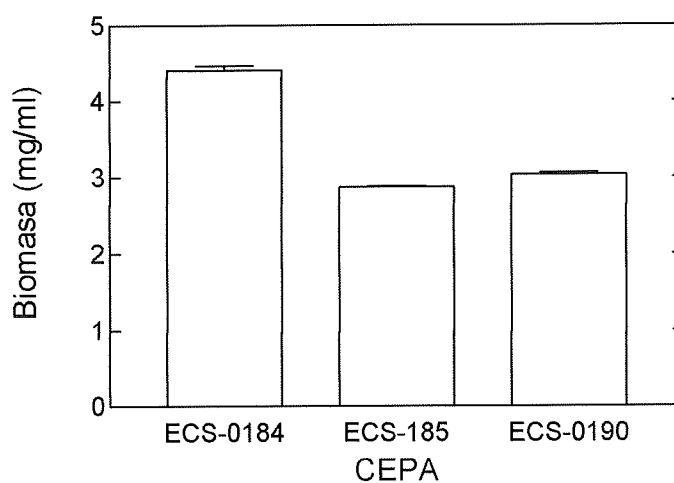


Figura 4. Incremento en biomasa en cultivos sumergido de las cepas de *P. djamor*, ECS-0184, ECS-0185, ECS-0190 después de 6 días de cultivo.

Para una determinación rápida de la producción de lacasas se utilizaron placas de ELISA, utilizando como sustrato al guayacol, el cual es oxidado, formando una mezcla colorida fácilmente visible. Se utilizó esta reacción catalítica en placas de ELISA como un monitoreo rápido de la producción de lacasas por cada cepa.

Como se observa en la **figura 5**, la cepa con mayor actividad fue la ECS-0184 de acuerdo al incremento en el color de las celdillas, que nos indica que la enzima esta oxidando al sustrato, mientras que para las cepas ECS-0185 y ECS-0190 en muy bajo el incremento en la coloración, lo que nos indica baja oxidación, y por lo tanto poca actividad de lacasas.

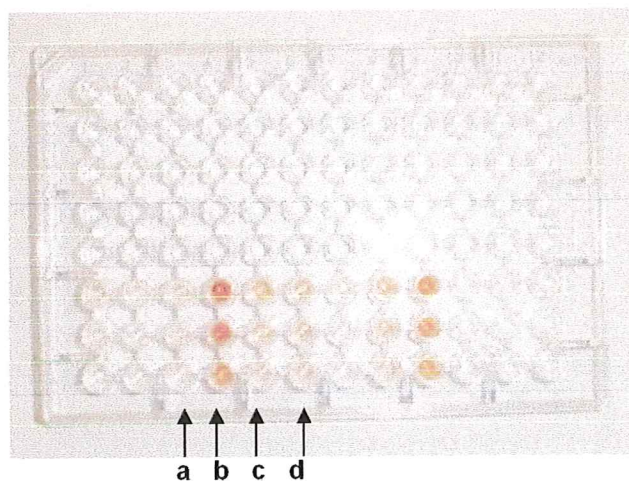


Figura 5. Identificación rápida de presencia de lacasas en el caldo de cultivo utilizando placa de ELISA y guayacol como sustrato; a) control; b) ECS-0184; c) ECS-0185; d) ECS-0190.

Al medir el incremento en la actividad lacasa durante el crecimiento, se observa que en el día 6 hay mas actividad para todas las cepas, siendo mayor la actividad para la cepa ECS-0184 (**figura 6**).

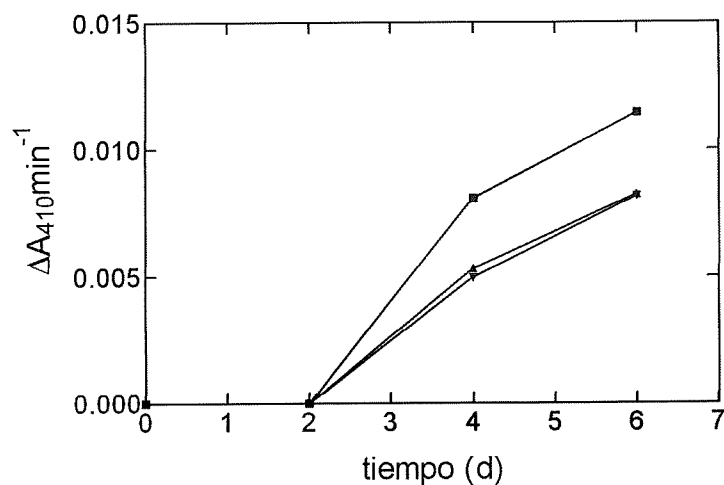


Figura 6. Formación de lacasas en cultivo sumergido a lo largo de seis días de cultivo en las cepas (cuadro) ECS-0184, (triángulo hacia arriba) ECS-0185 y (triángulo hacia abajo) ECS-0190 de *P. djamor*.

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO

En esta tercera etapa experimental, se buscó mejorar las condiciones de cultivo al ensayarse los cultivos en medio líquido a distintos pH, temperaturas y días de cosecha. Este ensayo tuvo como fuente de carbono glucosa 20 g/L. Cada tratamiento se refiere a las condiciones establecidas en la metodología (**tabla 2 y 3**).

En la optimización del medio de cultivo para producción de biomasa, las mejores condiciones se obtuvieron para los códigos (-1,-1+1) y (-1,+1,+1) que se refieren a 25 °C, pH 5.0, 9 días de cultivo y 25 °C, pH 7 y 9 días de cultivo respectivamente. Para la producción de lacasa los códigos de mayor producción son (-1,-1,-1) y (-1,+1,-1) que corresponden a 25 °C, pH 5.0, 5 días de cultivo y 25 °C, pH 7, 5 días de cultivo respectivamente (**tabla 6**). Por otro lado, el mayor rendimiento de producción de proteína extracelular y actividad lacasa se obtuvo en los tratamientos 1 y 2 (**tabla 7**).

Tabla 6. Resultados de biomasa, proteína y actividad lacasa por tratamiento.

Tratamiento	Biomasa	Proteína soluble	ΔA_{410}	Actividad específica
	(mg/mL)	(μ g/mL)	(min^{-1}) $\times 10^{-3}$	($\Delta A \text{min}^{-1} \text{e}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
1	5.7 $\pm$ 0.03	120.6 $\pm$ 0.03	33.6 $\pm$ 1.1	4.41
2	6.3 $\pm$ 0.02	115.8 $\pm$ 0.30	32.6 $\pm$ 2.1	4.43
3	7.2 $\pm$ 0.06	102.5 $\pm$ 0.05	27.3 $\pm$ 2.3	4.08
4	8.4 $\pm$ 0.08	86.2 $\pm$ 0.21	20.6 $\pm$.3	3.69
5	7.7 $\pm$ 0.00	77.7 $\pm$ 0.44	17.2 $\pm$ 2.2	3.39
6	5.3 $\pm$ 0.03	81.3 $\pm$ 0.40	18.6 $\pm$ 1.2	3.52
7	5.1 $\pm$ 0.03	81.5 $\pm$ 0.35	18.7 $\pm$ 1.7	3.52
8	4.8 $\pm$ 0.02	79.8 $\pm$ 0.23	18.0 $\pm$ 1.6	3.47
9	4.3 $\pm$ 0.02	61.7 $\pm$ 0.05	10.7 $\pm$ 0.9	2.66
10	4.7 $\pm$ 0.08	71.6 $\pm$ 0.33	14.7 $\pm$ 3.3	3.15
11	6.9 $\pm$ 0.02	94.9 $\pm$ 0.40	16.3 $\pm$ 1.6	3.91
12	6.1 $\pm$ 0.05	83.5 $\pm$ 0.43	5.4 $\pm$ 0.4	3.53
13	5.9 $\pm$ 0.01	41.2 $\pm$ 0.01	15.9 $\pm$ 2.7	0.87
14	5.4 $\pm$ 0.01	40.2 $\pm$ 0.00	10.3 $\pm$ 3.4	0.73
15	5.8 $\pm$ 0.02	49.3 $\pm$ 0.43	11.4 $\pm$ 2.4	1.79

Tabla 7. Rendimiento de proteína y actividad de lacasas por unidad de biomasa.

Tratamiento	Biomasa	$Y_{P/X}$	$1/L_X$	$Y_{P/X}/\text{actividad específica}$
	(mg/mL)	mg proteína / g biomasa	actividad/ g biomasa	$Y_{P/X}/(\Delta A_{\epsilon^-}$ $^1\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1})$
1	$5.72 \pm .031$	21.1	93	4.8
2	$6.28 \pm .016$	18.4	81.5	4.15
3	$7.24 \pm .063$	14.2	58	3.5
4	$8.44 \pm .076$	10.2	38	2.7
5	$7.704 \pm .003$	10.1	34.2	3
6	$5.32 \pm .025$	15.3	54	4.43
7	$5.06 \pm .025$	16.1	57	5
8	$4.83 \pm .024$	16.5	57.2	4.8
9	$4.26 \pm .017$	14.5	39	5.5
10	$4.69 \pm .081$	15.3	48.2	4.9
11	$6.87 \pm .015$	13.8	54	3.52
12	$6.12 \pm .047$	13.6	48	3.9
13	$5.87 \pm .013$	7	6.1	8
14	$5.43 \pm .013$	7.4	5.4	10.1
15	$5.80 \pm .022$	8.5	15.2	4.8

EFFECTO DE INDUCTORES SOBRE LA FORMACION DE LACASA

En esta etapa, se realizaron ensayos en medio sólido para las tres cepas con tres diferentes inductores, los cuales fueron: ABTS, guayacol y alcohol veratrílico. La aparición de aros de oxidación (colorido) alrededor del micelio nos indica que las lacasas están actuando sobre el sustrato, que es una manera indirecta de determinar la actividad enzimática de las lacasas, indicando además que la lacasa es producida extracelularmente.

Como se observa en la **figura 7**, las tres cepas tuvieron resultados positivos con los tres inductores, lo que abrió camino para el siguiente experimento, que consistió en la observación del incremento en la oxidación en el diámetro del micelio en las tres cepas a lo largo de siete días de cultivo, que de acuerdo a experimentos anteriores, al día siete, se tiene un máximo crecimiento micelial en la caja de petri.

Se puede observa en la **tabla 8** que la máxima tasa lineal de oxidación se logra con el cromoforo ABTS, siendo mayor para la cepa ECS-0184, seguida de la ECS-0190 y por último la ECS-0185. El segundo cromoforo que demostró actividad fue el alcohol veratrílico, en el mismo orden de oxidación del ABTS, presentando los resultados más bajos para el guayacol en las tres cepas.

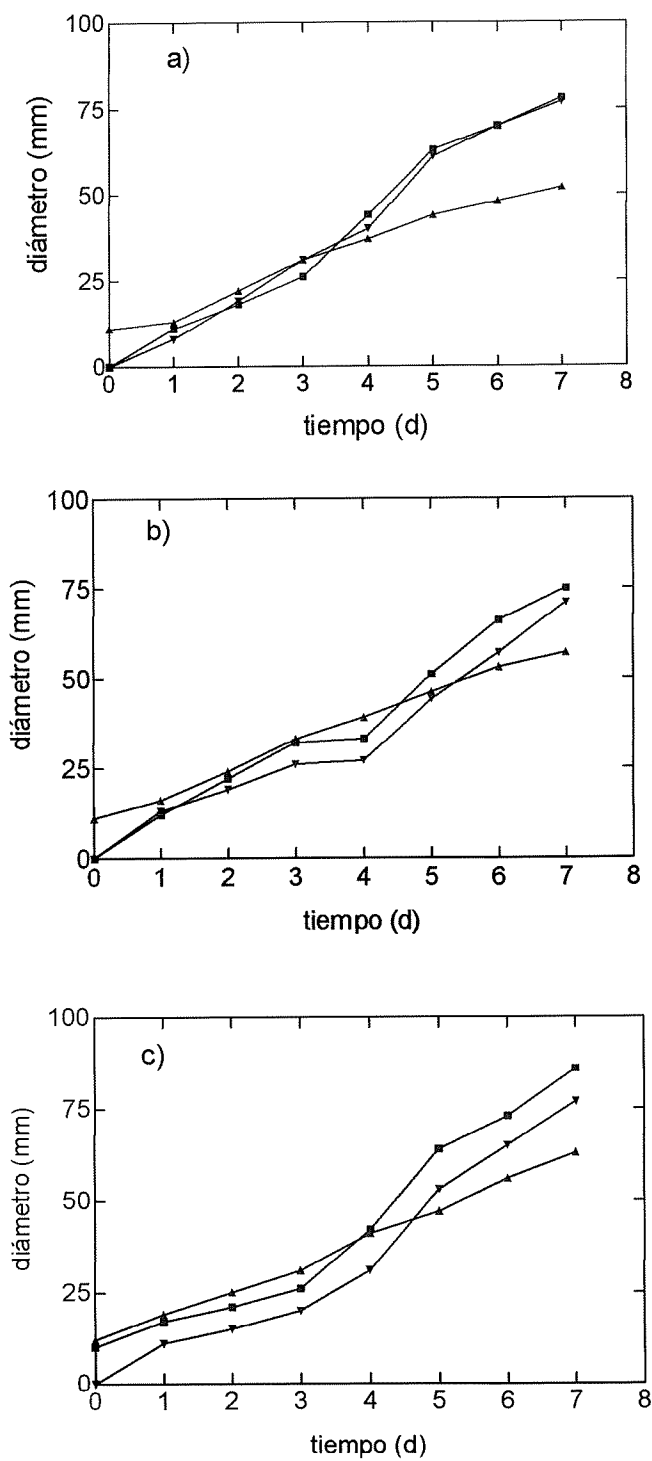


Figura 7. Efecto de inductores sobre la producción de lacasas en las cepas a) ECS-0184 b) ECS-0185 y c) ECS-0190; cuadro: ABTS; triángulo hacia arriba: guaiacol; triángulo hacia abajo: alcohol veratrilico.

Tabla 8. Velocidad de crecimiento lineal y crecimiento máximo de tres cepas de *P. djamor* en presencia de inductores

	ECS-0184		ECS-0185		ECS-190	
	dl/dt	d _{max}	dl/dt	d _{max}	dl/dt	d _{max}
	(mm/d)	(mm)	(mm/d)	(mm)	(mm/d)	(mm)
ABTS	11.8±0.7	70	10.5±0.6	66	11.4±1.0	73
guayacol	6.4±0.3	48	6.9±0.2	53	7.4±0.8	56
alcohol veratrílico	11.7±0.5	70	9.4±0.8	57	11.2±1.0	65

dl/dt = tasa lineal de crecimiento; d_{max} = diámetro máximo alcanzado

Esto quiere decir que el ABTS y el alcohol veratrílico si tienen una inducción aparente con respecto al crecimiento sin estos compuestos. El guayacol parece ser un compuesto inhibitorio en ECS-0184 y ECS-0190, sin ningún efecto para ECS-0185.

Cultivos estáticos

Se decidió realizar cultivos estáticos en medio líquido con los siguientes inductores: ABTS, guayacol, bran flakes y cebada durante 14 días, pH 5 a temperatura ambiente cubiertos de la luz, en donde al igual que en otros experimentos se observó el incremento en proteína y actividad enzimática. A diferencia de los cultivos en agitación donde el micelio crece en forma de “pellets”, en los cultivos estáticos el micelio crece en la superficie del medio

Tal como se muestra en la **figura 8a**, se puede observar el incremento en proteína soluble en el tratamiento con cebada, seguido del control, ABTS, bran flakes y por último guayacol.

En la **figura 8b** se puede observar que la mayor actividad específica se tiene en el tratamiento con ABTS, seguido del tratamiento con cebada, bran flakes, el control y por último guayacol.

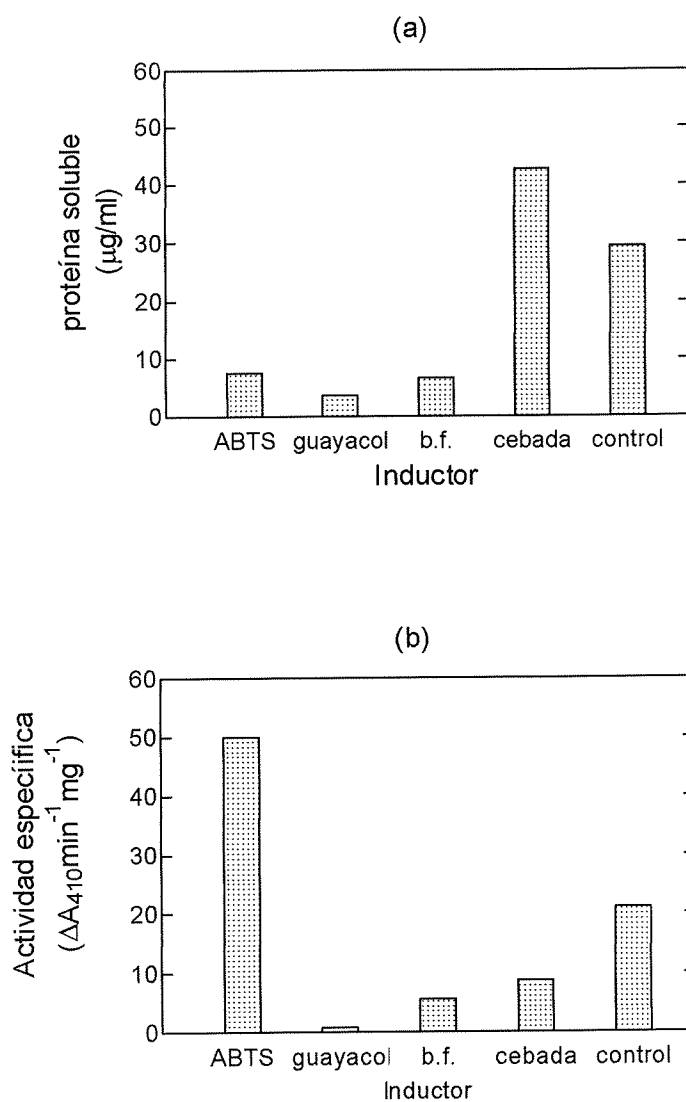


Figura 8. Efecto de inductores en la formación de proteína extracelular (a) y lacasa (b).

Producción de biomasa, proteína y lacasa en dos tipos de fermentadores

Los cultivos en fermentador fueron llevados a cabo con un pH inicial de 5.0, temperatura 25-28 °C y una agitación de 200 rpm para ambos casos. En la **tabla 9** se observa que la mayor cantidad de biomasa obtenida se dio en el fermentador New Brunswick con 24 g/L, mientras que para Applikon fue de 11 g/L. A diferencia de la biomasa, los resultados para proteína y actividad enzimática fueron mejores para el fermentador Applikon.

Tabla 9. Comparación de resultados de biomasa, proteína y lacasa producidos por *P. djamor* en dos tipos de fermentadores.

Tipo de fermentador	biomasa (g/L)	proteína soluble (μg/mL)	actividad lacasa $\Delta A_{410} \text{min}^{-1} (10^{-4})$
New Brunswick	23.1	37.2	16
Applikon	10.9	39	18

PURIFICACION Y CARACTERIZACION PARCIAL DE LACASAS

Para la purificación de la lacasa se procedió de la siguiente manera: El caldo de cultivo se filtro para separar la biomasa del caldo libre de células. El caldo libre de células fue tratado con sulfato de amonio a una saturación de 80%, para precipitar proteínas extracelulares producidas durante el crecimiento del hongo. El precipitado fue resuspendido en agua destilada, preparándose una suspensión de 450 $\mu\text{g/mL}$ de proteína, la cual fue procesada por cromatografía de exclusión molecular a través de una columna SEPHADEX G-75 equilibrada con agua destilada, eluída en una solución amortiguadora de fosfato de sodio 20 mM, pH 6.5.

Se colectaron fracciones de 1.5 mL de volumen y se midió la concentración de proteína a A_{595} y la actividad lacasa de cada fracción (**tabla 10**). La proteína apareció en la fracción 6 hasta la 14 concentrando la actividad principalmente en las fracciones 7 y 8, las cuales eluyen muy cercanamente a la fracción de mayor contenido proteico (**tabla 10, figura 9**).

Para determinar el peso molecular de la lacasa, el extracto concentrado de proteína se proceso en un sistema de HPLC usando una columna de exclusión molecular C-18, utilizando los marcadores moleculares descritos en la **figura 10**. Después de realizar la separación de la proteína del extracto, la cual tiene un tiempo de retención de 2.72 minutos (**figura 11**). Se determinó el peso

molecular realizando una gráfica semilogarítmica de tiempo de retención vs $\ln$ PM, de la recta se obtuvo la ecuación para que conociendo el tiempo de elusión de la lacasa de peso molecular desconocido se calculara su PM en 41.3 kDa (tabla 11, figura 12).

Tabla 10. Purificación de lacasas en columna SEPHADEX G-75

# fraccion	A_{595}	$\mu\text{g/mL}$	ΔAmin^{-1}	Actividad ($\Delta\text{Amin}^{-1}\text{mg}^{-1}$)
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0.019	0	0.088	0
7	0.093	53.18	0.033	6.2
8	0.188	127.69	0.0534	4.18
9	0.219	152	0.0474	3.12
10	0.145	93.96	0.0373	3.97
11	0.132	83.76	0.0297	3.54
12	0.129	81.41	0.0293	3.6
13	0.148	96.31	0.0367	3.81
14	0.042	13.18	0.0072	5.45
15	0	0	0	0
16	0	0	0	0
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	0	0
22	0	0	0	0
23	0	0	0	0
24	0	0	0	0
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0

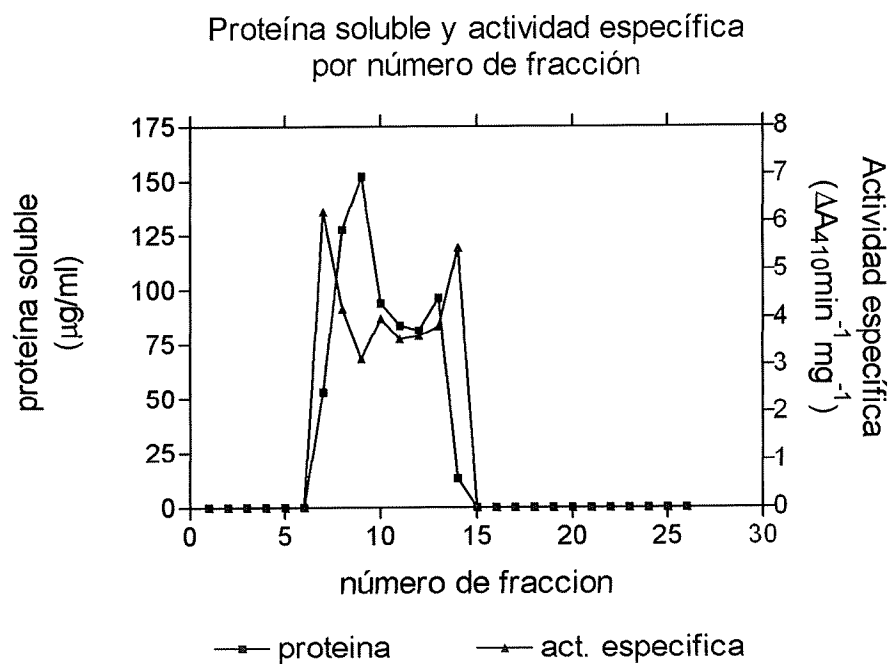


Figura 9. Proteína soluble y actividad específica por número de fracción.

Las fracciones fueron analizadas por medio de geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes, para determinar las bandas de actividad lacasa (**figura 13**). Se usaron dos sustratos para detectar la actividad lacasa de las fracciones 7 y 8 que presentan bandas coloridas debido a la oxidación de cada uno de los sustratos.

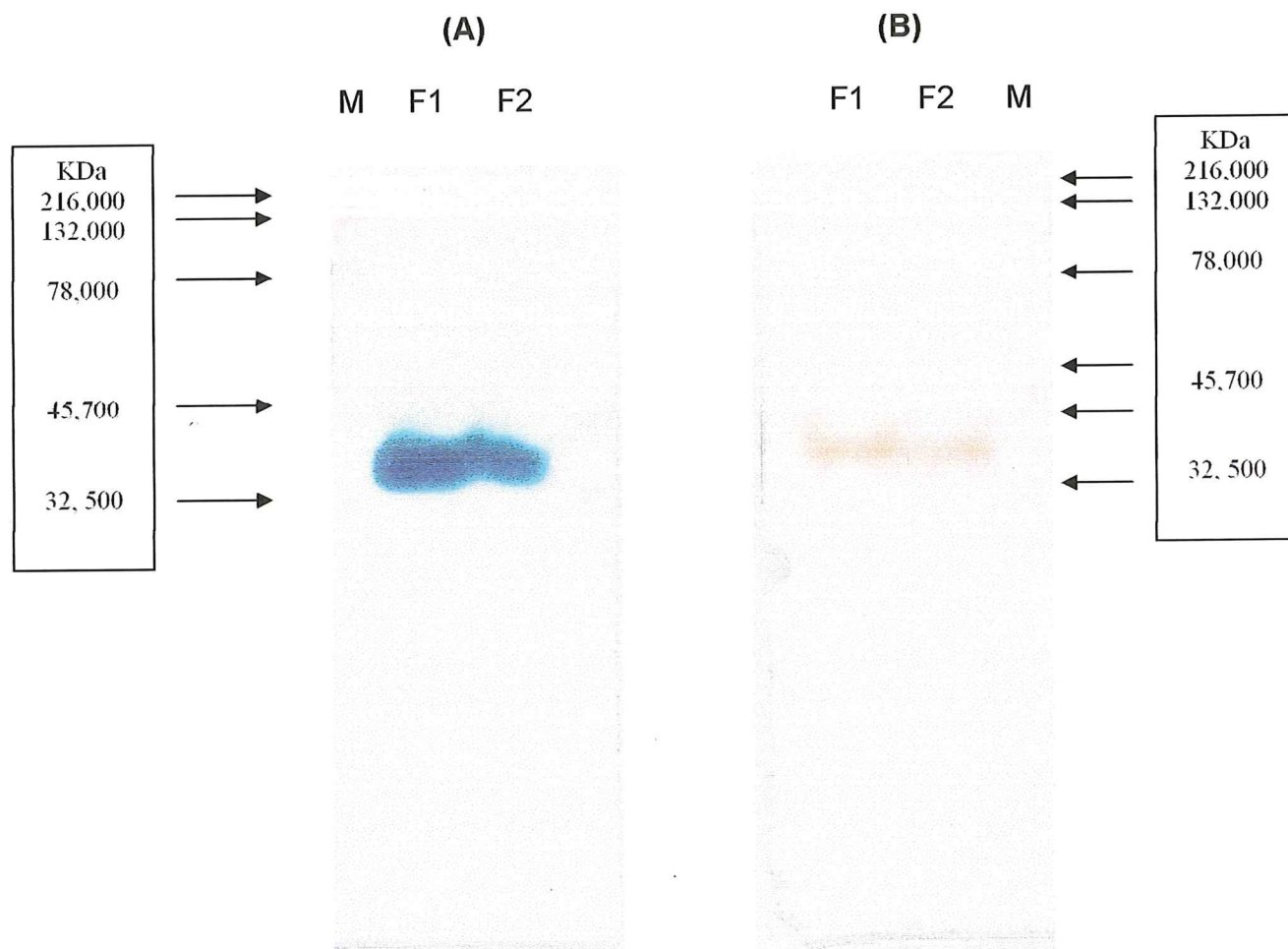


Figura 10. PAGE mostrando la purificación de la lacasa de *P. djamour*. **(A)** En presencia de ABTS. Carriles: **M**, marcador de pesos moleculares (miosina, 216,000. β -galactosidasa, 132,000. BSA, 78, 000. anhidrasa carbónica, 45,700. inhibidor de tripsina de soya, 32,500). **F1**, fracción 7. **F2**, fracción 8. **(B)** En presencia de guayacol. Carriles: **M**, marcador de pesos moleculares. **F1**, fracción 7. **F2**, fracción 8.

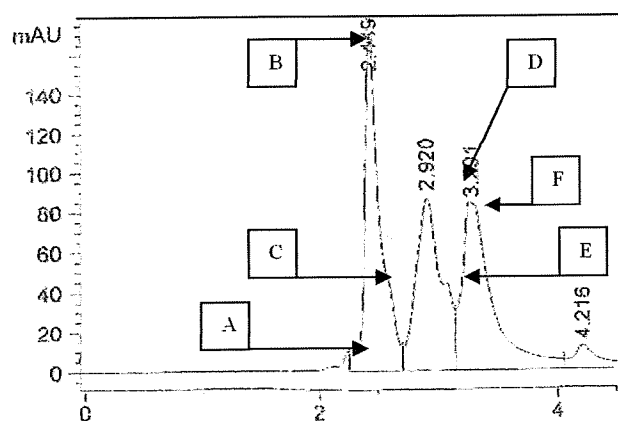


Figura 11. Tiempos de retención de los estándares. (A) IgG, (B) BSA, (C) CPO, (D) quimiotripsina, (E) tripsina, (F) lisozima.

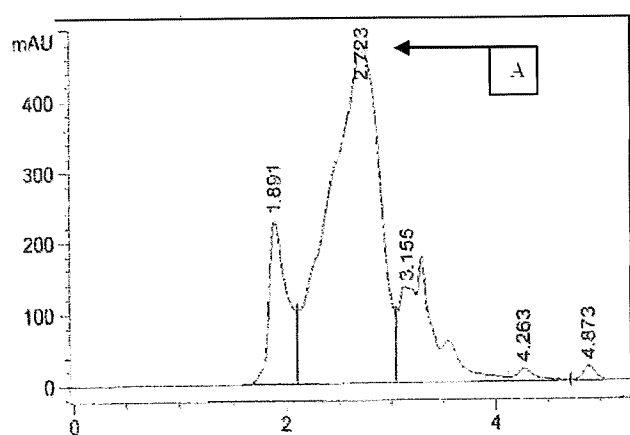


Figura 12. Tiempo de retención de: (A) lacasa.

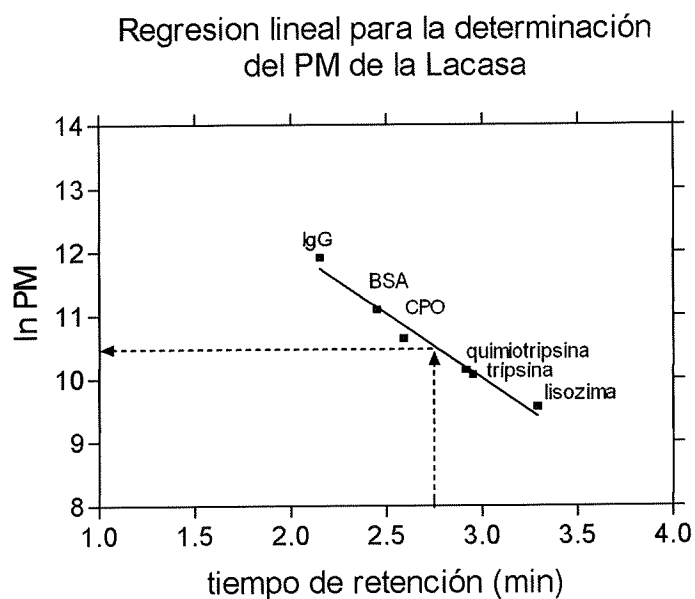


Figura 13. Regresión lineal del cromatograma de los estándares y la lacasa.

Tabla 11. Tiempos de retención, ln PM y peso molecular de los estándares y la lacasa.

proteína	tiempo retención		PM (kDa)
	(min)	ln PM	
IgG	2.15	11.918	150
BSA	2.449	11.097	66
CPO	2.589	10.645	42
lacasa	2.732	10.48	41.3
quimiotripsina	2.916	10.15	25.7
tripsina	2.95	10.07	23.8
lisozima	3.29	9.57	14.3

Basándose en el análisis de la regresión lineal, el peso molecular de la lacasa se determinó en 41.3 kDa.

Se determinaron los parámetros cinéticos de K_m y V_{max} usando ABTS como sustrato. La curva presenta un comportamiento típico de la ecuación Michaelis-Menten (**figura 14**). La K_m obtenida fue de $K_m=70.12 \mu M$ y una V_{max} de $0.13 \mu M \text{ min}^{-1}$.

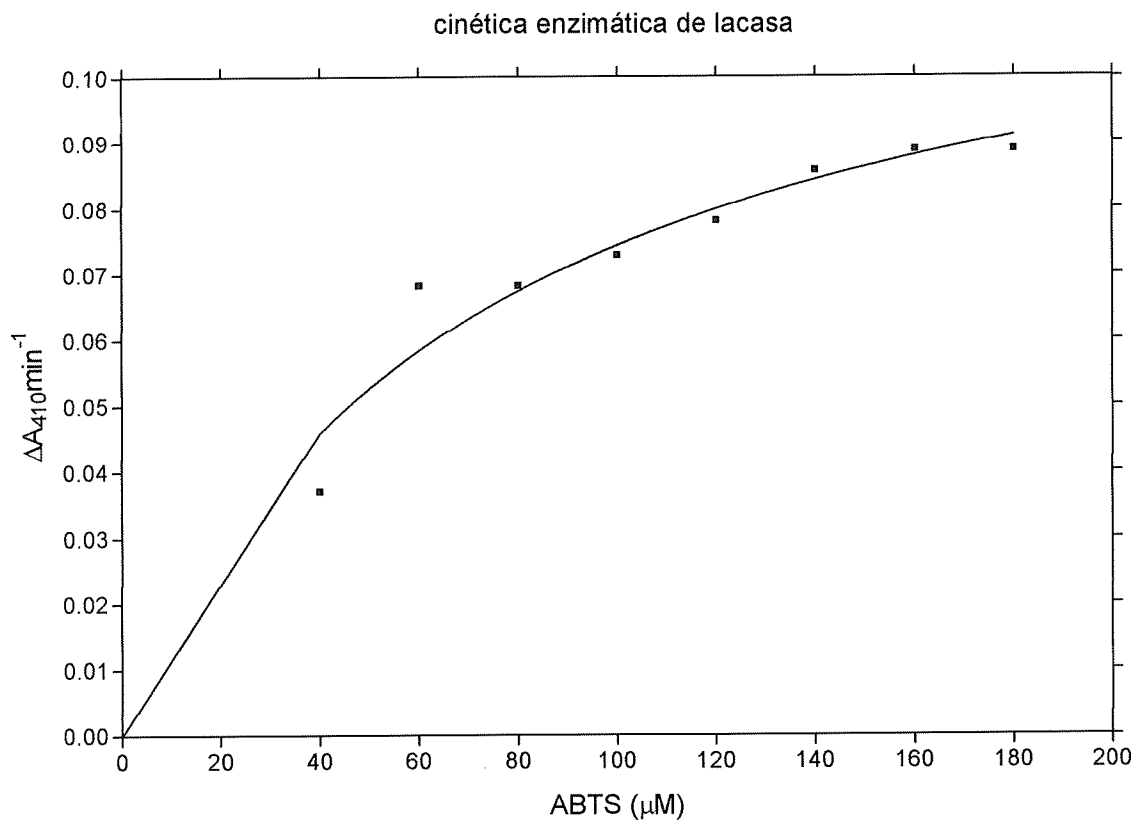


Figura 14. Cinética enzimática para la lacasa usando ABTS como sustrato.

Como parte de la caracterización se midió la actividad lacasa sobre varios sustratos a 0.5 y 5.0 mM. La lacasa reconoce a la mayoría de los sustratos excepto al rojo fenol (**tabla 12**).

Tabla 12. Determinación de la actividad específica de lacasa en varios sustratos aromáticos.

sustrato	[mM]	(ΔAmin^{-1})	proteína ($\mu\text{g/mL}$)	(ΔAmin^{-1})(mg^{-1})	Actividad específica ($\Delta\text{Amin}^{-1} \epsilon^{-1} \text{mg}^{-1}$)
ABTS	5	$2.33 \pm .006$	5.92	393.6	0.06
	5	$0.4427 \pm .0043$	1.18	375.2	0.058
guayacol	5	$0.0843 \pm .0005$	5.92	14.3	0.071
rojo fenol	5	n.a.	5.92	n.a.	n.a.
	0.5	n.a.	1.18	n.a.	n.a.
pírogallol	5	$0.035 \pm .005$	5.92	5.91	*
	5	$0.012 \pm .007$	1.18	6.7	*
alcohol					
veratrílico	5	$.004 \pm .02$	5.92	0.65	*
	5	$0.0014 \pm .008$	1.18	1.18	*
pinacianol	0.5	$0.14 \pm .002$	5.92	23.32	*

* no se considera el ϵ .

n.a: no actividad

DISCUSIONES

Al ensayarse las diferentes fuentes de carbono en medio basal sólido se observó que las cepas ECS-0184 y ECS-0190 al no presentar diferencias significativas en su tasa lineal de crecimiento tienen una fase lag similar. La cepa ECS-0185 si presenta diferencias en su tasa lineal de crecimiento respecto a las dos anteriores. Al analizarse las varianzas del diámetro máximo se encuentra que al igual que sucede con la tasa lineal de crecimiento, entre ECS-0184 y ECS-0190 no hay diferencias marcadas, hallándose en ECS-0185 respecto a las dos anteriores. Estas se deben seguramente a la forma en la que se desarrolla el micelio de ECS-0185, ya que si se analiza la morfología de ésta, se observa que crece de forma asimétrica aunque densa, mientras ECS-0184 y ECS-0190 crecen claramente de manera uniforme y simétrica pero presentando menor densidad miceliar. Por la forma en la que se desarrolla el micelio de la cepa ECS-0185 se puede decir que su densidad esta asociada a la forma en la que metaboliza el sustrato, debido a que bajo esas condiciones de cultivo, la concentración de glucosa es muy alta para esta cepa y no necesita extenderse más para obtener los recursos, a diferencia de las cepas ECS-0184 y ECS-0185 que crecen más respecto a diámetro, pero su densidad miceliar es menor.

Al cultivarse las tres cepas en MBIG durante 6 días, 28 °C y 200 rpm, se observó que la cepa ECS-0184 tiene la mayor producción de biomasa bajo

estas condiciones, seguido de la ECS-0190 y la ECS-0185 respectivamente. Esta prueba respalda lo afirmado en el experimento anterior en donde la cepa ECS-0184 tiene una tasa lineal de crecimiento y diámetro mayor seguida de ECS-0190 y ECS-0185. Basándonos en estas pruebas se puede pensar que ECS-0184 se aclimata más rápido al medio sobre el que se cultiva.

Cuando se determinó de forma rápida la presencia de lacasas en el caldo de cultivo agotado del experimento anterior, se observó que la cepa ECS-0184 oxido de manera más eficiente el sustrato que las otras dos cepas, por lo que se procedió a realizar una prueba cuantitativa de las alícuotas tomadas a lo largo de los seis que duró su cultivo. Al analizar las alícuotas se confirmó de manera sólida que la cepa ECS-0184 tiene potencial como productora de lacasas debido a que hasta el día 6 ésta tiene la mayor actividad. Dichas pruebas exponen que tanto para la producción de biomasa y lacasa ECS-0184 resulto ser mejor productora.

Al exponerse de manera clara que la cepa ECS-0184 es la mejor productora de biomasa y lacasa se procedió a la optimización del medio de cultivo. Dado que el género *Pleurotus* spp. crece en un intervalo de temperatura entre 25-30 °C las mejores condiciones de cultivo para la producción de biomasa se obtuvieron a 25 °C, pH 5.0, 9 días de cultivo y 25 °C, pH 7 y 9 días de cultivo, mientras que para la producción de lacasa fueron a 25 °C, pH 5.0 y

25 °C, pH 7 y 9 días de cultivo. La producción de biomasa y lacasa para la cepa ECS-0184 se ve afectada por la temperatura ya que no tiene un intervalo de temperatura amplio para la producción de estas, sin embargo si lo tiene respecto al pH ya que los tratamientos respecto al pH no muestran diferencias significativas para biomasa y lacasa pues se desarrollaron bien el intervalo de pH 5 y 7, presentándose variaciones respecto al día de cosecha solamente. La producción de lacasas después de 6 o 7 días puede verse afectada por cuestiones fisiológicas, como el aumento en la actividad proteolítica, debido a esto el día de cosecha es algo importante a considerar en estos cultivos.

Al ensayarse ABTS, guayacol y alcohol veratrílico en medio sólido para la expresión de lacasas, las tres cepas tuvieron resultados positivos, ya que oxidaron a los tres sustratos. La mayor tasa lineal de oxidación se logro con el ABTS en las tres cepas aunque mayor para la ECS-0184. Debido a que la lacasa presenta mayor facilidad para la oxidación de este sustrato, el ABTS es usado ampliamente como mediador de electrones en diversas pruebas catalíticas.

En cultivo líquido sin agitación estos inductores afectan la producción de lacasa y de biomasa en ECS-0184. Por otro lado, al ensayarse dos fuentes lignocelulósicas como la cebada y el bran flakes se observó que los niveles de proteína soluble eran más altos que en el caso de los ensayos con sustratos

aromáticos, aunque se observó que la actividad específica es mayor cuando se usa ABTS como inductor.

La producción de biomasa y lacasa en fermentadores está relacionada claramente con su hidrodinámica, el tipo de paletas, la agitación y la temperatura a la cual se llevan a cabo los cultivos. Cuando se ensayaron los cultivos en medio basal y 2% de cebada, en ambos fermentadores se observó que el crecimiento de los "pellets" era completamente uniforme variando en tamaño uno respecto del otro. Esta uniformidad y el tamaño de "pellets" afectan la transferencia de oxígeno a las células y por lo tanto la producción de biomasa, proteína soluble y lacasa. En el fermentador New Brunswick se observó que la producción de biomasa duplicó a la del fermentador Applikon aunque los dos tuvieron la misma agitación y condiciones de cultivo, el factor que afectó en este caso es el tipo de las paletas. Aunque la producción de biomasa y lacasa están relacionadas, respecto a la producción de proteína soluble y actividad enzimática no tiene diferencias significativas, pero sí respecto a la producción de biomasa.

La cromatografía de exclusión molecular destaca dos picos de actividad lacasa presentados en las fracciones 7 y 8 de las 26 ensayadas, los cuales eluyen cercanamente a la fracción de mayor contenido proteico. En la cromatografía líquida de alta resolución se logró un pico para la lacasa con un

tiempo de retención de 2.72 minutos, por lo que se trata de una molécula de peso molecular mediano en comparación con los estándares que tuvieron un tiempo de retención entre 2.15 – 3.29 minutos, ya que la columna C-18 permite la elusión de moléculas mayores primero y menores al final.

Los geles no desnaturizantes de poliacrilamida revelaron una sola banda de oxidación para ambas fracciones usando ABTS y guayacol como sustratos. Para saber si la relación existente entre banda-grado de oxidación es una, se deben hacer pruebas de geles de poliacrilamida en dos dimensiones para detectar la presencia de isoenzimas.

Determinando los parámetros cinéticos de la lacasa, se obtuvo que los valores de K_m y V_{max} usando ABTS como sustrato son de $K_m=70.12 \mu M$ y una V_{max} de $0.13 \mu M \text{ min}^{-1}$, al ser K_m tan pequeña, se puede afirmar que tiene gran afinidad por el ABTS. Al ajustarse al modelo de Michaelis-Menten podemos inferir que no se trata de una enzima alostérica y que no necesita un cofactor para llevar a cabo la catálisis.

Aunque el mediador más utilizado es el ABTS, la lacasa reconoce a más sustratos aromáticos, aunque tiene mucha mejor actividad con el ABTS, por lo que podemos esperar valores más altos de K_m para los demás sustratos ensayados, ya que tiene una actividad específica menor.

CONCLUSIONES

- Mediante el procedimiento utilizado en el presente trabajo pudimos seleccionar cepas de la misma especie con diferencias en la producción de lacasas.
- La mejor cepa productora de lacasas fue la ECS-0184 con glucosa como fuente de carbono.
- Para la producción de biomasa, las mejores condiciones se obtuvieron a 25 °C, pH 7 y 9 días de cultivo, mientras que para la producción de lacasa fueron a 25 °C, pH 5.0-6.0 y 5 días de cultivo.
- Las condiciones de cultivo son un factor importante para la producción de biomasa y lacasa, así como las condiciones hidrodinámicas de un fermentador.
- Los geles no desnaturizantes de poliacrilamida (PAGE) para revelar la actividad muestran una sola banda de actividad lacasa.
- La lacasa reconoce un amplio espectro de sustratos aromáticos.
- El ABTS es el mejor sustrato para la actividad lacasa.
- Es una de las lacasas más pequeñas reportadas hasta el momento con un peso molecular de 41.3 kDa.

LITERATURA CITADA

ABUDALLA, E., T. Tzanov, S. Costa, K. Robra, A. Covaco-Paulo. G. Gubitz. 2000. Decolorization and detoxification a Laccase from *Trametes hirsuta*. Appl. Environ. Microbiol. 66:3357-3362.

AMITAL, G., R. Adani, G. Sod-Moriah, I. Rabinovitz, A. Vincze, H. Leader, B. Chefetz, L. Leibovitz-Persky, D. Friesem, y Y. Hadar. 1998. Oxidative biodegradation of phosorothiolates by fungal laccase. FEBS letters. 483:195-200.

BEZALEL, L., Y. Hadar, P. Fu, J. Freeman y C. Cerniglia. 1996. Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Appl. Environ. Microbiol. 62:2554-2559.

BOURBANNAIS, R., M. Paice, I. Reid, P. Lanther y M. Yaguchi, M. 1995. Lignin oxidation by laccase Isoenzymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. Appl. Environ. Microbiol. 61:1876-1880.

CARROAD, P. y C. Wilke. 1977. Exponential growth kinetics for *Polyporus versicolor* and *Pleurotus ostreatus* in submergen culture. Appl. Environ. Microbiol. 33:871-873.

COLLINS, P.J., A.D.W. Dobson, y J.A. Field. 1998. Reduction of 2,2'-Azinobis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate) cation radical by physiological organic acids in the absence and presence of magnese. Appl. Environ. Microbiol. 64:2026-2031.

DE LA RUBIA, T., E. Ruiz, J. Pérez y J. Martínez. 2002. Properties of a Laccase produced by *Phanerochaete flavido-alba* induced by vanillin. Arch. Microbiol. 179:170-173.

EICHLEROVA I., y L. Homolka. 1999. Preparation and crossing of basidiospore-derived monokaryons- a useful tool for obtaining laccase and other ligninolytic enzyme higher-producing dikaryotic strains of *Pleurotus ostreatus*. Antoine van Leeuwenhock. 75:321-327.

GADD, G.M. 2001. **Fungi in bioremediation**. Cambridge University Press. p. 17.

GALHAUP, C., S. Goller, C.K. Peterbauer, J. Strauss y D. Haltrich. 2002. Characterization of the major Laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. Microbiology. 148:2159-2169.

GUILLÉN-NAVARRO, G., F. Márquez-Rocha, y J. Sánchez-Vázquez . 1998. Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. Rev. Iberoam Micol. 15:302-306.

HAKULINEN, N., L.L. Kiiskinen, K. Kruus, M. Saloheimo, A. Paananen, A. Koivula y J. Rouvinen. 2002. Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* copper site. Nature structure biology. 9:601-605.

KIM, Y., N.S. CHO, T.J. Eom, y Shin W. 2002. Purification and characterization of a Laccase from *Cerrania unicolor* and its reactivity in lignin degradation. Bull. Korean Chem. Soc. 23:985-989.

KOROLJOVA-SKOROBOGAT'KO, O.V. E.V. Stepanova, V.P. Gavrilova, O.V. Morozova, N.V. Lubimova, A.N. Dzchafarova, V. Jaropolov y A. Makower. 1998. Purification and characterization of the constitutive form of Laccase from the basidiomycete *Coriolus hirsutus* and effect of inducers on Laccase synthesis. Biotechnol.Appl.Biochem. 28:47-54.

KUO-CHING, F., R. Tzyy-Min, L. Bing-Lan, T. Yew-Min y C. Yaw-Nan. 2004. Effect of fungal pellet size in the high yield production of dextruxin B by *Metarhizium anisopliae*. Enz. Microbiol. Tech. 34:22-25.

MÁRQUEZ-ROCHA, F., V. Hernandez-Rodriguez, y R. Vázquez-Duhalt. 2000. Biodegradation of soil-adsorbed polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Biotechnology Letters. 22:469-472.

MUÑOZ, C., F. Guillen, A. Martínez y M. Martínez. 1997. Induction and characterization of Laccase in the Ligninolytic Fungus *Pleurotus eryngii*. Current Microbiology. 34:1-5.

MUÑOZ, C., F. Guillen, A. Martínez y M. Martínez. 1997. Laccase Isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: Characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn^{2+} oxidation. Appl. Environmen. Biotech. 63: 2166-2174.

NIETO LÓPEZ, C. 2002. Producción de biomasa de *Pleurotus djamor* por cultivo líquido. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Químicas. Campus IV. Tapachula. Universidad Autónoma de Chiapas. 1-4, 17, 36- 38 p.

PALMIERI, G., P. Giardina, C. Bianco, A. Scaloni, A. Capasso y G. Sannia. 1997. A novel Laccase from *Pleurotus ostreatus*. J.biol.chem. 272:31301-31307.

PALMIERI, G., P.Giardina, C. Bianco, B. Fontanella, y G. Sannia. 2000. Copper induction of Lacasse isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. Appl. Environmen. Biotech. 66: 920-924.

PÉREZ, J., J. Martínez, y T. De la Rubia. 1996. Purification and partial characterization of a Laccase from the white rot fungus *Phanerochaete flavidobalba*. Appl. Environ. Microbiol. 62:4262-4266.

PICKARD, M., R. Roman, R. Tinoco y R. Vázquez-Duhalt. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 Laccase. Appl. Environ. Microbiol. 65:3805-3809.

PICKARD, M., H. Vandertol, R. Roman y R. Vázquez-Duhalt. 1999 High production of ligninolytic enzymes from white rot fungi in cereal brand liquid medium. Can. J. Microbiol. 45:627-631.

SÁNCHEZ, J. E. y D. Royse. 2002. **La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp.** Ed. Limusa – El Colegio de la Frontera Sur. 2001. 159 p.

SAPPARRAT, M.C.N., A.M.M. Bucsinzky, H. Alfio Tournier, M.N. Cabello y A.M. Arambarri. 2000. Extracellular ABTS-oxidizing activity of autochthonous fungal strains from Argentina in solid medium. Rev. Iberoam. Micol. 17:64-68.

SAPARRAT, M.C.N., F. Guillén, A.M. Arambarri, A.T. Martínez y M.J. Martínez. 2002. Induction, isolation and characterization of two Laccases from the white rot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. Appl. Environmen. Biotech. 68:1534-1540.

SREBOTNIK, E. y K.E. Hammel. 2000. Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system. J. Biotechnol. 81:179-188.

SRINIVASAN, C., T.M. D'Souza, K. Boominathan y C.A. Reddy. 1995. Demostration of Laccase in white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. Appl. Environ. Microbiol. 61:4274-4277.

VÁZQUEZ-DUHALT, R., K. Semple, D. Westlake y P. Fedorak, P. 1993. Effect of water-miscible organic solvents on the catalytic activity of cytochrome c. Enzyme Micro. Technol. 15.

XU, F., J. Kulys, K. Duke, K. Li, K. Krikstopaitis, H. Deussen, E. Abbate, V. Galinyte y P. Schneider. 2000. Redox chemistry in Laccase-catalyzed oxidation on N-Hydroxy compounds. Appl. Environ. Microbiol. 66:2052-2056.

YOUNG L., J. Hee, L. Hwan y P. Hoon. 1999. Enhanced production of Laccase in *Trametes versicolor* by the addition of ethanol. Biotechnology letters. 21:965-968.

ZHAO, J. y H. Kwan. 1999. Characterization, molecular cloning and differential expression analysis of Laccase genes from the edible mushroom *Lentitula edodes*. Appl. Environ. Biotech. 65:4908-4913.