



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

sa abierta al tiempo

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

227426



RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS
LACASAS Y LA MADURACIÓN DE *Pleurotus ostreatus* y
Pleurotus pulmonarius

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A

JAVIER ISIDORO LÓPEZ CRUZ

MÉXICO DF

OCTUBRE DE 2001

11/25/01



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA *Iztapalapa*

TESIS

RELACION ENTRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS LACASAS Y LA
MADURACIÓN DEL HONGO *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius*

NOMBRE

LÓPEZ CRUZ JAVIER ISIDORO

MAESTRIA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

TUTOR

Dr. GUSTAVO VINIEGRA GONZÁLEZ

ASESORES

Dr. OCTAVIO LOERA CORRAL

Dra. CARMEN SÁNCHEZ HERNÁNDEZ

JURADO DE EXAMEN

Presidente
Secretario
Vocal
Vocal
Vocal

Dr. Gustavo Viniegra González
Dr. Octavio Loera Corral
Dra. Carmen Sánchez Hernández
Dr. Rigoberto Gaytan Hernández
Dr. Hermilo Leal Lara

OCTUBRE DE 2001

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Biología Molecular perteneciente al departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana plantel Iztapalapa, bajo la tutoría del **Dr. Gustavo Viniegra González** y la asesoría del **Dr. Octavio Loera Corral** de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y de la **Dra. Carmen Sánchez Hernández** perteneciente al Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas (CICB) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa a través de el laboratorio de Biología Molecular (W104), formado por mis compañeros y amigos, que me ayudaron a desempeñar mi trabajo con ahínco y alegría, Emilio Medina Rivero, Miriam Helue García Ignacio, Mirna Solis Oba, Miguel Angel Cancino Cardenas y Arturo Obregón Sánchez.

A mi tutor y asesor de tesis Dr. Gustavo Viniegra González y Dr. Octavio Loera Corral por su ayuda al realizar los experimentos, por su apoyo en todos los aspectos, disposición y por sus sugerencias en el manuscrito y principalmente por que me permitieron formarme como investigador.

A mi jurado de tesis Dra. Carmen Sánchez Hernández por la disposición de material como los son las cepas de *Pleurotus*, motivos de esta investigación, Dr Rigoberto Gaytan Hernández y Dr. Hermilo Leal Lara, a todos ellos por las acertadas sugerencias y que han tenido que ver con la buena definición e imagen del manuscrito.

Un agradecimiento en especial a Francisco Villaseñor Ortega por sus valiosos consejos en el desempeño de mis labores y brindándome su amistad incondicional, fuera y dentro de las labores en el laboratorio.

Y a la bandera de mi vida Norma Quevedo Rosales por su entereza, apoyo en todos los aspectos y que me permite comprender que existe un motivo que es vivir y soñar.

A todos Gracias, ya que creer es saber que cada día es un nuevo comienzo, confiar en que los sueños realmente se hacen realidad, es encontrar la fuerza y el coraje que yace dentro nuestro, cuando es el momento de recoger las piezas y empezar de nuevo y que es saber que nunca estamos solos, que la vida es un don y que es hoy nuestro tiempo de apreciarlo.

Javier Isidoro López Cruz

INDICE	Pag
INDICE	2
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
MARCO TEÓRICO	7
○ Perspectiva histórica del estudio	8
○ Morfología, taxonomía y biología de los hongos	9
○ Características morfológicas en el género <i>Pleurotus</i>	13
○ Degradación de la lignina	15
○ Enzimas ligninolíticas y la lacasa	17
○ La función de la lacasa: el papel que desempeña durante la degradación de la lignina	20
○ La función de la lacasa en la morfogénesis	21
○ La importancia de la lacasa en la patogénesis relacionada con plantas	24
○ La lacasa y sus genes	24
○ Aspectos importantes en la genética de lacasas de hongos	26
○ Mediadores de bajo peso molecular	27
○ Cooperación de enzimas en la degradación de la lignina y celulosa	29
○ Estructura de la lacasa	32
○ Propiedades de las lacasas de hongos	34
○ Mecanismos de desactivación de peroxidasas en cultivo líquido	36
○ Isoenzimas de lacasa en otros hongos	38
○ Utilización y búsqueda de mediadores de la lacasa	41
○ La fermentación en medio sólido	42-45
OBJETIVOS	46
HIPÓTESIS	47
JUSTIFICACIÓN	48-49
MATERIALES Y MÉTODOS	50
○ Obtención de las cepas iniciales	50
○ Obtención de la cepa maestra	50
○ Inoculación en cajas de Petri con discos de poliuretano (PUF)	50
○ Determinación de la masa micelial	50
○ Tinción convencional y selectiva de hifas de <i>Pleurotus</i>	52

○ Determinación de los patrones de actividad enzimática para las cepas de <i>Pleurotus</i> crecidas en FUF	53
○ Determinación de proteína total (proteína unida e colorante) Bradford	53
○ Estimación de los parámetros cinéticos K_m y V_{max} de la lacasa con sir'agaldazina	54
○ Determinación del efecto del pH sobre la actividad de la lacasa	54
○ Determinación de la actividad zimográfica de la lacasa de <i>Pleurotus</i>	55
○ Actividad zimográfica de la lacasa	58
○ Determinación del punto isoelectrico	58
○ Estimación de la temperatura óptima de actividad y estabilidad zimográfica	59
○ Determinación de la estabilidad térmica de la lacasa de <i>Pleurotus</i>	60

RESULTADOS

○ Diseño experimental	61
○ Obtención de cepas de <i>Pleurotus</i>	62
○ Crecimiento micelial sobre poliuretano	62
○ Diferenciación de hifas maduras y jóvenes	65
○ Determinación de la velocidad radial (U_r) de crecimiento	67
○ Extracción Enzimática de la Lacasa de <i>Pleurotus</i>	68
○ Efecto del inductor sobre la actividad lacasa proveniente del micelio total	70
○ Patrones de actividad enzimática en caja con poliuretano	73
○ Determinación de los parámetros cinéticos K_m y V_{max}	74
○ Determinación proteica de los extractos	75
○ Determinación del pH óptimo para la actividad de las lacasa de <i>Pleurotus</i>	76
○ Zimografía de lacasas del micelio total de <i>Pleurotus</i>	77
○ Comparación zimográfica de los extractos de hifas jóvenes y maduras de <i>Pleurotus</i>	79
○ Electroenfoque de lacasas de <i>Pleurotus</i>	81
○ Efecto de la temperatura y termoestabilidad de la lacasa de <i>Pleurotus</i>	83-86

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

87-94

BIBLIOGRAFÍA

95-104

RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS LACASAS Y LA MADURACIÓN DE *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius*

RESUMEN

Las lacasas (bencendiol: oxígeno oxidoreductasa EC 1.103.2), son cupro-enzimas presentes en plantas, microorganismos y en diversos hongos ligninolíticos. Usan el oxígeno como un aceptor de electrones para oxidar grupos hidroxilo fenólicos y sustratos no fenólicos en presencia de mediadores como el ácido 2,2 azinobis(3-etilbencenotiazolina-6 sulfónico) (ABTS), hidroxibenzotriazol (HBT) la siringaldazina y otros más. Se ha visto su influencia en estudios sobre la degradación de lignina de los sustratos donde crecen los hongos: pajas, rastrojos y bagazos. El hongo comestible *Pleurotus* (seta) produce isoenzimas de lacasa de origen citoplasmático o extracelular para la degradación de las fibras linocelulolíticas y para la formación de pigmentos. Aquí, se pretende averiguar si el patrón de producción de lacasas está relacionado con la productividad de las cepas y el grado de madurez del micelio. Se emplearon las cepas: *Pleurotus ostreatus* (UATPo7), de alta productividad, y *Pleurotus pulmonarius* (HKPPI27) de baja productividad; crecidas en cajas de Petri de 14 cm de diámetro que contenían discos de espuma de poliuretano (PUF), con un grosor de 0.5 cm, impregnados con 20 mL de medio líquido extracto de malta (33.6 g/L), inductor de lacasa CuSO₄ (5mM) y ácido tánico (1mM). Se diferenciaron, por tinción con azul de toluidina (0.1%) en H₃BO₃, las hifas jóvenes y las maduras durante un periodo de 21 días. Las curvas de crecimiento mostraron una velocidad específica (μ) de 0.013 y 0.011 h⁻¹ y X_{max} (g/g PUF) de 1.5 y 0.8, para las cepas UATPo7 y HKPPI27, respectivamente. Se relacionó el mejor crecimiento de UATPo7 con una mayor cantidad de hifas maduras, en relación con la otra cepa. Se notó un efecto sobre el nivel de lacasas pero no sobre el crecimiento de las dos cepas. Las lacasas se precipitaron con acetona al 85% y se encontró que la K_m para UATPo7 y HKPPI27 fue de 0.011mM y 0.009 μ mol/min, respectivamente, usando siringaldazina disuelta en metanol. Por otro lado los valores de V_{max} determinados fueron de 0.016mM y 0.012 μ mol/min para las cepas UATPo7 y HKPPI27, respectivamente. UATPo7 presentó una actividad lacasa mayor a pH 5 (0.1866 UI/mL), mientras que en la cepa HKPPI27 lo tuvo a pH 5.5 (0.2264 UI/mL). Los análisis por electroforesis en PAGE al 10% (no desnaturizante) mostraron que UATPo7 produce 3 tipos de enzimas, mientras que HKPPI27. Se mostraron actividades considerables para las cepas UATPo7 y HKPPI27 en un rango de valores de pH, de 7.4 a 3.5 y 7.0 a 4.8 en el electro enfoque, respectivamente. Los resultados muestran que a una temperatura de 45°C se alcanza la máxima actividad con 0.042 y 0.11 UI/mL, con una constante de activación de 52 y 28.2 Kcal/mol; y de desactivación de 168 y 49 Kcal/mol para las cepas UATPo7 y HKPPI27, además de una estabilidad hasta de 12.5 horas, comparadas con la lacasa de *M. thermophila* a condiciones óptimas hasta de 21 horas y que una de las bandas de UATPo7 no es termoestable. Los resultados confirmaron que: la cepa más productiva (*P. ostreatus*) creció más rápido y por lo tanto, produjo más enzima lacasa puesto que el nivel de lacasa no estuvo asociada al crecimiento pero sí a la cantidad final de la biomasa. En la cepa más productiva, se observaron más bandas de isoenzimas de lacasa que en la menos productiva y el número de bandas aumentó conforme avanzó el grado de madurez del micelio. Por lo tanto, se verificaron las hipótesis planteadas al principio de la tesis.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los contaminantes fenólicos en el ambiente son producidos por el proceso de elaboración del papel, así como el blanqueo del mismo; inclusive el tratamiento textil con colorantes de este tipo (Ferrer y Col., 1991). Convencionalmente los métodos de tratamiento como las lagunas de aereación y las plantas de lodos activados son inefectivas en la remoción de colorantes o son métodos extremadamente caros (Ferrer y Col., 1991). Estos componentes fenólicos tienen varios grados de toxicidad y esto repercute en el medio ambiente. Sin embargo muchos de estos compuestos son biodegradables por tratamientos enzimáticos (Stirt J. G. y Crawford R L., 1985).

En lo que concierne a la acción enzimática se han descubierto infinidad de enzimas potencialmente disponibles en la naturaleza que ejerzan esta acción, como lo son las polifenoloxidasas. Recientemente su uso se ha extendido hacia la remoción de desperdicios tóxicos y también a nivel laboratorio para remover eficientemente aminas aromáticas que pueden ser carcinogénicas, a partir de efluentes industriales (Klibanov A. M. y Alberti B., 1981) y compuestos coloridos de bajo peso molecular (Paice M. y Jurasek L., 1984).

Una de las peroxidadas aplicables es la lacasa; miembro de la familia oxidoreductasa, también referida como azuloxidasas, producida en plantas (Reinhammar B., 1970), pero las principales fuentes enzimáticas son los hongos. La lacasa es abundante en los hongos de la pudrición blanca, por su habilidad para la degradación de la lignina de la madera en la naturaleza y que es clave en la descomposición. Esta actividad enzimática se ha encontrado en cerca de 500 especies de hongos donde se han aislado (Eriksson K., 1993), entre ellas *Agaricus bisporus* (Matcham, S. E. y Wood, D. A., 1992), y diversas especies de *Pleurotus* (Palmieri y Col., 1997). Por otra parte Martínez-Carrera (1993) ha señalado que el cultivo comercial de *Pleurotus* tiene un gran potencial en México para convertir los residuos lignocelulósicos en alimento. A este producto en México se le conoce comercialmente como "Seta", en la cual la lacasa se encuentra en múltiples isoformas (Muñoz C. y Guillen F., 1997), para la degradación de estos residuos. Por otra parte, en *Agaricus bisporus* se han planteado varios modelos matemáticos que describen la iniciación de su crecimiento (Matcham, S. E. y Wood, D. A., 1992), en el cual se asume que la iniciación de los cuerpos fructíferos ocurre cuando la invasión micelial del sustrato ha alcanzado cierta densidad hifal.

En este trabajo se usó la espuma de poliuretano como soporte inerte que ha sido empleado para el cultivo vegetativo de diversos hongos (Romero-Gómez S. J. y Col., 2000; Arora D. S. y Gill P. K., 2001) y adicionando medios nutritivos compuestos de minerales, extracto de malta (33.6 g/L) como medio básico y CuSO_4 y ácido tánico como inductores de la síntesis de las lacasas (Palmieri G. y Col., 2000). Se emplearon para esta investigación dos cepas: *Pleurotus pulmonarius* (HKPP127) y otra de *Pleurotus ostreatus* (JATPo7) para medir la producción de la biomasa por gravimetría, su invasión del soporte por observación directa, la edad del micelio por tinción con o-toluidina (Sánchez C. y Mocre D., 1999) y la actividad lacasa por la oxidación de siringaldazina (Leonowicz A. y Grzywnowicz K., 1981). Las actividades fueron caracterizadas por zimografía y por la estabilidad frente a cambios de pH y temperatura de fracciones parcialmente purificadas. También se estudiaron los patrones de separación por electroenfoque y calcularon los valores de V_{max} y K_m .

Por otro parte el uso de sistemas modelo de cultivo de micelios ha facilitado mucho los estudios bioquímicos de la producción de enzimas fúngicas (Raimbault y Col., Zhu y Col., Marado y Col., Romero y Col., Aguilar y Col., Días y Col.), porque al usarse de soporte inerte, como el poliuretano, se pueden medir con facilidad los componentes solubles (sustratos y productos) separables de la biomasa y del soporte no biodegradable y de esta forma es posible extraerlas del medio, con un mínimo de componentes por analizar, ya que se pueden formular los caldos de cultivo de manera completamente arbitraria y definida y el crecimiento no se asocia a la degradación del soporte artificial.

Sin embargo poco se sabe de la relación de estas diferencias tintoreales con los patrones de producción de enzimas, como las lacasas, que se consideran fundamentales para el crecimiento de los hongos sobre las fibras lignocelulósicas y que quizá desempeñen un papel fisiológico en la maduración del micelio por la oxidación de compuestos aromáticos endógenos (Rogalski J., 1996). Martínez, Giardina y colaboradores (1996 y 1999), han demostrado que los cultivos de *Pleurotus*, producen al menos 6 isoformas distintas de lacasas, con estructuras primarias diferentes y que las lacasas excretadas al medio son distintas de las fijadas a la biomasa (Young H. L. y Col., 1989). La identificación de diferentes lacasas, hace posible estudiar algunas propiedades cinéticas y de termoestabilidad, siendo esta última una característica muy atractiva para la industria biotecnológica.

MARCO TEÓRICO

Los hongos han estado ligados al hombre desde tiempos inmemoriales. Los estudios realizados sobre estos organismos señalan su amplia distribución en diversos nichos ecológicos y su papel es relevante en relación con los hábitos alimenticios del hombre y sus propiedades toxicológicas. A través de los años, el conocimiento de los hongos se incrementa de tal forma, que actualmente es motivo de estudio por numerosos especialistas. Han surgido así, nuevos conocimientos que incluyen aspectos taxonómicos, ecológicos, nutricionales y más recientemente los temas farmacológicos y bioquímicos.

Si bien, desde el punto morfológico y taxonómico los hongos macroscópicos continúan siendo objeto de atención de los especialistas y aún se registran nuevas especies y variedades, los desarrollos biotecnológicos modernos señalan la importancia del cultivo de los hongos, debido a su extraordinaria actividad metabólica, que ha permitido su desarrollo en condiciones óptimas para mejorar la producción de biomasa.

La utilización de materiales orgánicos industriales para el cultivo de los hongos comestibles refleja su extraordinaria actividad metabólica. El cultivo de hongos ha evolucionado con el tiempo y actualmente es uno de los campos económicamente importante, en especial sobre la producción de especies de *Agaricus*, *Pleurotus*, *Lentinula* y otros, y que da la posibilidad abierta de que varios más pudieran ser empleados con iguales fines.

De una manera muy importante, los basidiomicetos se han usado como fuente para la producción transgénica de las enzimas lacasas (Fen Xu, 1998), porque son los basidiomicetes los organismos que contribuyen a la biomasa vegetal, para la pudrición de la madera y en general los residuos lignocelulósicos. Por ejemplo la empresa Novo, ya produce la enzima lacasa termotolerante, proveniente de *Miceliophthora thermophila* (Fen Xu, 1996, Yaver D. y Col, 1999) y expresada a nivel industrial en *Aspergillus oryzae*, la cual es producida en una preparación comercial llamada DeniLite II S, usada para decolorar al índigo, derivado del lavado de la mezclilla.

En la UAM-I se ha iniciado estudios de largo plazo para identificar y aprovechar las lacasas, con fines ambientales, para oxidar compuestos aromáticos contaminantes y una parte importante de este estudio es la búsqueda, caracterización y clonación de nuevos genes de las lacasas de origen tropical.

A su vez en la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UAQ), se ha desarrollado un laboratorio de estudios fisiológicos y bioquímicos de *Pleurotus*, para auxiliar el desarrollo local de su producción comercial. Ahí se estudian nuevas técnicas de caracterización morfológica y bioquímica de las cepas comerciales de este tipo de hongos, para correlacionarlos con su potencial productivo. Por lo tanto se ha visto necesario el desarrollo de numerosos métodos de estudio de la producción de lacasas de basidiomicetos usando las técnicas aquí descritas.

Perspectiva histórica del estudio

Los hongos son organismos comunes en la naturaleza, puesto que viven prácticamente en la mayoría de los hábitat, entre ellos, las especies comestibles gozan de especial importancia desde tiempos remotos. En México el cultivo de hongos comestibles se inicio desde mediados de 1930, sin embargo, la actual industria en el país data apenas de 40 años, con el cultivo del champiñón (*Agaricus bisporus*), utilizando técnicas y cepas extranjeras, pero a partir de 1974, se empezó a cultivar las llamadas “setas”, también llamadas “orejas blancas” u “orejas de cazahuate” (*Pleurotus ostreatus*) que cada vez tienen más aceptación comercial (Martínez-Carrera y Col., 1991).

Las setas han llamado la atención de los cultivadores, porque crecen sobre una gran cantidad de residuos agrícolas, y dado que en México se producen millones de toneladas anuales de este tipo de materiales, esto actualmente es una alternativa con gran potencial para el cultivo de hongos sobre esos sustratos como el bagazo de caña o pulpa de café, entre otros (Mata y Martínez-Carrera D., 1988).

En un futuro no muy lejano todos los países se verán obligados a la sustitución progresiva del petróleo por los residuos vegetales, como materia prima para producir la gran variedad de compuestos de la industria química y la fuente principal de los compuestos aromáticos será la lignina de los residuos vegetales. Por eso hay un interés mundial en estudiar, clonar los genes y producir las enzimas como las lacasas, que se pueden usar para la oxidación controlada de la lignina.

México es una de las zonas de mayor biodiversidad del mundo, pero poco se aprovecha para obtener nuevos genes de interés industrial a partir de los hongos característicos de sus múltiples nichos ecológicos.

Por eso se ha considerado de gran importancia el desarrollo de un proyecto cooperativo entre distintas instituciones como son: la UAM-I, la UATx, el Instituto Tecnológico de Mérida y el Centro Investigaciones Biológicas de Madrid, para investigar los métodos, que permitan estudiar y aprovechar la biodiversidad nacional, para el aprovechamiento de los basidiomicetos como fuente de nuevos genes de las lacasas. En este marco amplio de cooperación, este trabajo pretende contribuir al desarrollo de nuevos métodos para la caracterización de las lacasa de *Pleurotus*.

Morfología, taxonomía y biología de los hongos

Los hongos se habían clasificado tradicionalmente dentro del reino vegetal, a pesar de que no tienen clorofila, tejidos especializados, ni flores. Pero hace unos 30 años, se empezó a aceptar la idea de que los hongos son organismos independientes de las plantas y que aunque químicamente están muy relacionados con los animales, forman un grupo a parte, el llamado Reino Fungi como ha señalado Whittaker (1969) y Herrera y Ulloa (1990). La pared celular de los hongos generalmente esta compuesta de quitina como la de los animales y no de lignina y celulosa como la de los vegetales. Además los hongos almacenan glucógeno en vez de almidón.

La clasificación de los hongos en un reino diferente, se basa en que tienen características propias y a su vez una mezcla curiosa de las del vegetal y animal. La palabra fungi o fungus, aplicada por Tournefort en el siglo XVII, significa florecimiento o excreción de la tierra. Su nutrición es por absorción de nutrientes, además de que los procesos de reproducción sexual de los hongos son diferentes a los de los vegetales y animales.

Los hongos viven en la materia orgánica, ya sea viva o muerta, a la cual degradan para alimentarse de ella. Las especies que se desarrollan sobre materia viva son las parásitas y las simbióticas y las otras son las saprobias. Los hongos *parásitos* son los que se desarrollan dentro de las células de vegetales o animales (incluyendo el hombre). Las especies *simbióticas* son las que viven en equilibrio biológico con el organismo, asociación en la que ambos obtienen mutuo beneficio, como es el caso de las micorrizas. Los hongos saprobios, que crecen en el suelo, troncos o sobre desechos agrícolas, degradan para su crecimiento, dicha materia orgánica.

La ventaja de que los hongos puedan degradar en forma natural la mayoría de la materia orgánica, ha proporcionado una manera de cómo pueden investigarse los hongos. Esto ha sido retomado por Guzmán y colaboradores en el Instituto de Ecológica de Xalapa en Veracruz, los cuales han efectuado un sin número de investigaciones sobre hongos de diferentes especies, entre los cuales se encuentra la especie *Pleurotus*. Dichas investigaciones sobre los hongos en general, han sido retomados de una revisión extensa sobre el Cultivo de Hongos Comestibles en México y se mencionan a continuación (Guzmán G. y Col., 1993)

En la naturaleza, los hongos invaden materia que contenga lignina y celulosa y generalmente requieren pocos nutrientes para su desarrollo, pues los sustratos que consumen son fuentes de carbono, nitrógeno, minerales y factores de crecimiento. Un sustrato muy duro tendrá pocos espacios intercelulares y por tanto presentará problemas en la aireación tan indispensables en los hongos y un sustrato muy blando con exceso de agua, presentará el mismo problema para el intercambio de oxígeno (Auria R. y Col., 1992), por lo tanto la porosidad de los sustratos es una propiedad importante para el cultivo de los hongos. El pH del mismo también es importante para el adecuado desarrollo del hongo pues, en general los hongos requieren sustratos ligeramente ácidos o neutros.

Por otro lado, existe una clasificación sencilla de los hongos que los agrupa en *microscópicos* y *macroscópicos* (*micromicetos* y *macromicetos* respectivamente), la cual se basa en la presencia o no de cuerpos fructíferos grandes, es decir macroscópicos, que los definan a simple vista. Los hongos microscópicos no tienen fructificaciones macroscópicas. Técnicamente el verdadero hongo, es una masa algodonosa generalmente blanca, a la que se le llama *micelio* y el cual crece sobre el sustrato en donde se desarrolla el cuerpo fructífero. La unidad microscópica fundamental del hongo es la hifa, el cual es un filamento generalmente tabicado, aunque también se observan hifas no tabicadas, por ejemplo: el de algunos mohos o micromicetos.

El micelio es lo que se cultiva en el laboratorio para obtener la cepa y es a lo que se le denomina aislamiento vegetativo, aunque la cepa también puede aislarse por medio de esporas, tiene crecimiento radial y por ello forma una masa discoidal sobre la superficie donde crece. Técnicamente, a estas cepas se les llama colonias, aunque el término mal aplicado debe evitarse, ya que la colonia sería un conjunto de varios individuos y una cepa es un solo organismo, aunque con muchas hifas y células. El micelio crece radialmente y cuando fructifica lo hace generalmente en las partes maduras, bajo condiciones favorables de fructificación.

Sin embargo, en el micelio de una caja de Petri, debido a que no hay uniformidad de las condiciones, los primordios solo se forman sobre las hifas maduras en cualquier tipo de desarrollo micelial. A esto se debe que podamos encontrar en el bosque o jardines las fructificaciones formadas en círculo a las cuales se les conoce como corros o anillos de brujas, relacionadas con la prácticas mágicas en la Edad Media. (Guzmán y Col., 1992).

El micelio es en general laxo y blanco, pero en ciertas circunstancias adversas o cuando están en etapas de maduración plena se pueden endurecer, apelotonar y oscurecer formando lo que se conoce como *esclerocios*, que son masas globosas generalmente de tamaño pequeño o grande (1 ó 20 cm), que se desarrollan sobre la superficie del micelio. Ejemplos de grandes esclerocios enterrados en el suelo, se encuentran en los hongos comestibles *Pleurotus tuber-regium*, *Polyporus tuberaster* y *Poria cocos* (en este último, solamente es comestible el esclerocio). Estos esclerocios funcionan como formas de resistencia del hongo (Guzmán y Col., 1993).

Las fructificaciones de los hongos constituyen los cuerpos fructíferos de los mismos, en donde se producen miles y millones de esporas, que es la forma de dispersión del hongo, asegurando su perpetuidad. Las esporas pueden ser blancas como la de *Pleurotus ostreatus*, negro violáceo como las de *Agaricus bisporus*, cafés o negras, entre otros colores (Guzmán, 1977).

Las partes fundamentales del cuerpo fructífero del hongo son, el sombrero o píleo, que protege a las láminas o himenio, este último es la parte fértil del hongo y en donde se producen las esporas. El sombrero es sostenido por el pié o estípite, en el cual existen a veces el anillo y la volva. El anillo es el resto de un velo que envuelve a las láminas en el estado juvenil del hongo y la volva también es el resto de una envoltura que cubría toda la fructificación cuando estaba inmadura, etapa que es conocida como la fase de huevo (**figura 1**).

La clasificación de los organismos que integran el Reino Fungi, ha motivado a una discrepancia y discusión entre los especialistas (Herrera T. y Ulloa M., 1990), debido a la complejidad y heterogeneidad del grupo, pero ha sido sintetizado y simplificado en dos grandes grupos o divisiones: Los Myxomycota y los Eucomycota (Singer R. y Harris B., 1987)

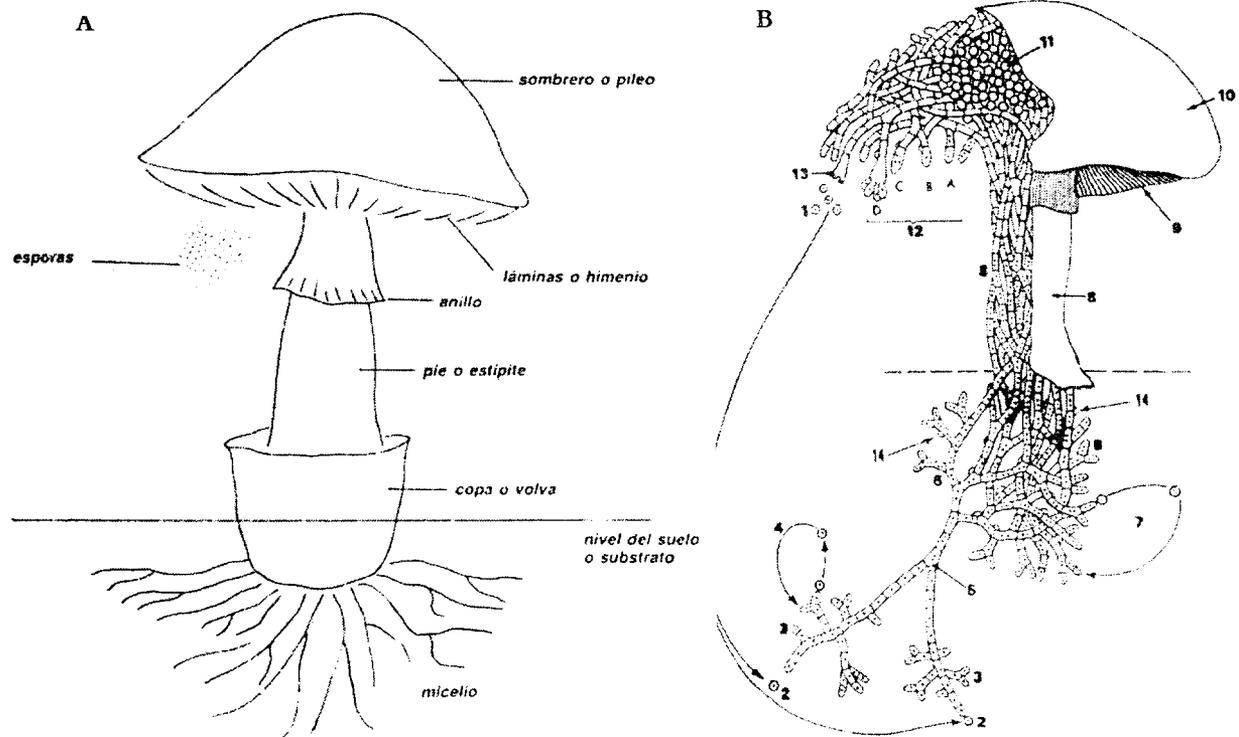


Figura. 1. (A) El esquema general del hongo donde se puede observar que la fructificación, emerge de una masa algodonosa llamada micelio. **(B)** Se esquematiza su origen a partir de las esporas (1 y 2), las cuales al germinar dan el micelio primario (3), que al fusionarse con otro (5) originan el micelio secundario (6), que forman la fructificación. La unión de dos micelios se llama plasmogamia y la de dos núcleos se llama cariogamia (Guzmán G. y Col., 1993)

El primero se refiere a ciertos hongos gelatinosos (myxos=gelatina y mycota=hongo). Los Eumycota que son los hongos verdaderos y de ahí su nombre (eu=verdadero), se dividen en cuatro grandes grupos o subdivisiones: Phycomycotina, Deuteromycotina, Ascomycotina y Basidiomycotina y que se describen en la **tabla 1**.

Tabla 1. Taxonomía de hongos (énfasis en la especie *Pleurotus*).

REINO	DIVISIÓN	SUBDIVISIÓN	ORDEN
Fungi (Hongos)	Myxomycota		
	Eumycota	Phycomycotina	Mohos
		Ascomycotina	Levaduras
		Basidiomycotinas	Auriculariales
			Aphylllophorales
Agaricales *			
Deuteromycotina	Mohos		

*Orden perteneciente de la especie *Pleurotus* (Guzmán G. y Col., 1993)

Los hongos macroscópicos o macromicetos tienen la misma forma de crecimiento vegetativo, que los hongos microscópicos, sin embargo tienen la particularidad de formar un cuerpo fructífero visible aéreo llamado carpóforo, que es lo que la gente identifica como hongo. Al hongo *Pleurotus*, modernamente se le adscribe en los basidiomicetes, del grupo de los pariales, en la familia Lentinaceae (Hawksworth y Col., 1995)

Características morfológicas en el género *Pleurotus*

Las setas como comercialmente se le conoce a éste hongo comestible, pertenece al grupo de basidiomicetes llamado *Pleurotus* sp. En nuestro país, al *Pleurotus* se le conoce como hongo de Izote, hongo de maguey, oreja de cazahuate, etc. Existen diferentes especies de este género, pero las que se estudiaron en esta investigación son *Pleurotus ostreatus* (UATPo7) y *Pleurotus pulmonarius* (HKPP127). La morfología y las diferencias fisiológicas son pocas y por lo regular es difícil distinguir una especie de la otra en la naturaleza y así como en condiciones de cultivo. Basado en estudios hechos por Bresinsky y colaboradores (1987), *P. ostreatus* y *P. Pulmonarius* se distinguen morfológicamente en la siguiente forma:

Pleurotus pulmonarius tiene en el píleo una extensión lateral menor de 10 (~13 cm), la superficie es lisa, el píleo puede crecer en forma solitaria o en racimo, de color blanco, blanquecino u ocre a pálido, o casi violáceo; el estípite más excéntrico que lateral; fructifica en épocas veraniegas, ocasionalmente después de la primavera o en etapas tempranas al otoño.

Estructuras como la lamélula (pequeña lámina que no se extiende a todo lo largo desde el margen del píleo hasta el estípite), el contexto (tejido fibroso que constituye la carne o cuerpo del píleo y del estípite del basidiocarpo) y algunas veces la superficie del píleo, desarrolla manchas amarillentas cuando el hongo esta seco. El hongo tiene un olor parecido al anís. El tamaño promedio de las esporas es de $9.15 (\pm 0.6) \times 3.8 (\pm 0.2) \mu\text{m}$.

Por su parte *Pleurotus ostreatus* tiene el sombrero en forma de ménsula semicircular aplastada y cóncava; gris o castaño; de láminas blancas, y posteriormente color crema. El pie es excéntrico o lateral, con la base adelgazada; blanco pero grisáceo y en la parte más próxima al sombrero algo abultado. Su carne es compacta en el sombrero, fibrosa y blanca en el pie. De olor farináceo, con esporas color rosa o cenicientas, oblongadas a cilíndricas, de $8-11 \times 3-4.5 \mu$ de tamaño. *Pleurotus* normalmente crece en forma silvestre y fructifica de marzo a septiembre, crece sobre troncos de varias latifolias y raramente en las coníferas (Bresinsky A. y Col., 1992).

El cultivo de hongo comestible *Pleurotus ostreatus* es una alternativa importante en la producción de alimentos, así como una fuente de ingresos y bienestar por su industrialización y los rendimientos que se han obtenido de él.

La materia prima que se utiliza como sustrato para el cultivo de *Pleurotus*, son desechos agrícolas, principalmente bagazos, pulpas y rastrojos. El micelio es inoculado sobre un sustrato lignocelulósico, que es tratado con calor, como método de pasteurizado, esto con la finalidad de adquirir la humedad necesaria y otro de reducir la población microbiana presente en el sustrato y favorecer la condiciones de crecimiento para el hongo. El desarrollo micelial se lleva a cabo en oscuridad a una temperatura de 27 ± 1 °C; para el proceso fructificación, es necesaria la misma temperatura, luz y humedad entre el 80-90% y circulación de aire (Guzmán y Col, 1992).

Para la degradación del sustrato, donde este basidiomicete crece en forma natural o aplicando tecnologías para la producción, se necesitan de la producción de enzimas llamadas ligninolíticas, que les permitan adquirir nutrientes, para llevar a cabo sus funciones. La transformación de celulosa o hemicelulosa a monosacáridos, es llevada a cabo por hongos ligninolíticos entre ellos *Pleurotus*, que usan un amplio rango de hidrolasas para la degradación de la madera (Leonowicz A., 1999).

Degradación de la lignina

La lignina es un complejo estructuralmente rígido que le confiere estabilidad a muchas fibras vegetales, debido a que esta formado por unidades fenólicas. El resto de las fibras vegetales esta compuesto de celulosa y hemicelulosa, que a su vez están formados de polisacáridos, que están densamente empacadas en capas de lignina, ésta la protege contra la actividad de enzimas hidrolíticas u otros factores externos, y tiene la función de estabilizar la estructura. El término de lignina deriva de la palabra latina “lignum” que significa madera, término que fue introducido por Auselme (Payen A., 1838), para representar sustancias incrustadas en la celulosa en plantas con pared celular lignificada. Este esquema de la lignina (**figura 2**) comprende 16 unidades de fenilpropano unidas C-O o C-C (Adler E., 1977). Se han hecho muchos intentos para determinar la estructura secundaria de la lignina por medio de uniones hidrógeno (Brauns F. E., 1962). Freudenberg (1965) publicó un modelo de lignina basado en 18 unidades de C₉ como parte entera de la molécula. Forss y colaboradores (1966) hicieron modificaciones en la teoría de la degradación de lignina, proponiendo fragmentos de lignina que contenían 16 guayacilpropanos y dos hidroxifenilpropanos en cada unidad para carbohidratos. Por su parte Nimz (1974), propuso un modelo para la lignina de Angiospermas y Glasser para Coníferas; introduciendo dos modelos basados en sus estudios de resonancia magnética nuclear. Finalmente Sakakibara (1983), publicó su esquema de la estructura de la lignina, basado en estudios realizados en Japón.

La lignina es el segundo polímero estructural más abundante en la naturaleza (después de la celulosa) y el material aromático más abundante, responsable del almacenamiento de alrededor del 40% de la energía solar captada por las plantas (Leonowicz A., 1999).

Este dato es de gran importancia para considerarse como la principal fuente renovable de compuestos aromáticos. Lamentablemente, debido a su función estructural como agente protector de las fibras, es también un polímero difícil de romper en forma suave y ordenada, pues los procesos industriales para deslignificar las fibras y producir celulosa y hemicelulosa, son muy drásticos.

Esto da lugar a la formación de muchos compuestos oxidados de poco aprovechamiento químico, que además contaminan. Por eso desde hace cerca de 30 años, se han desarrollado muchos estudios para aprovechar los procesos biológicos en la degradación específica de la lignina, y han sido descritos por Leonowicz y colaboradores continuación (Leonowicz A. y Col., 1999).

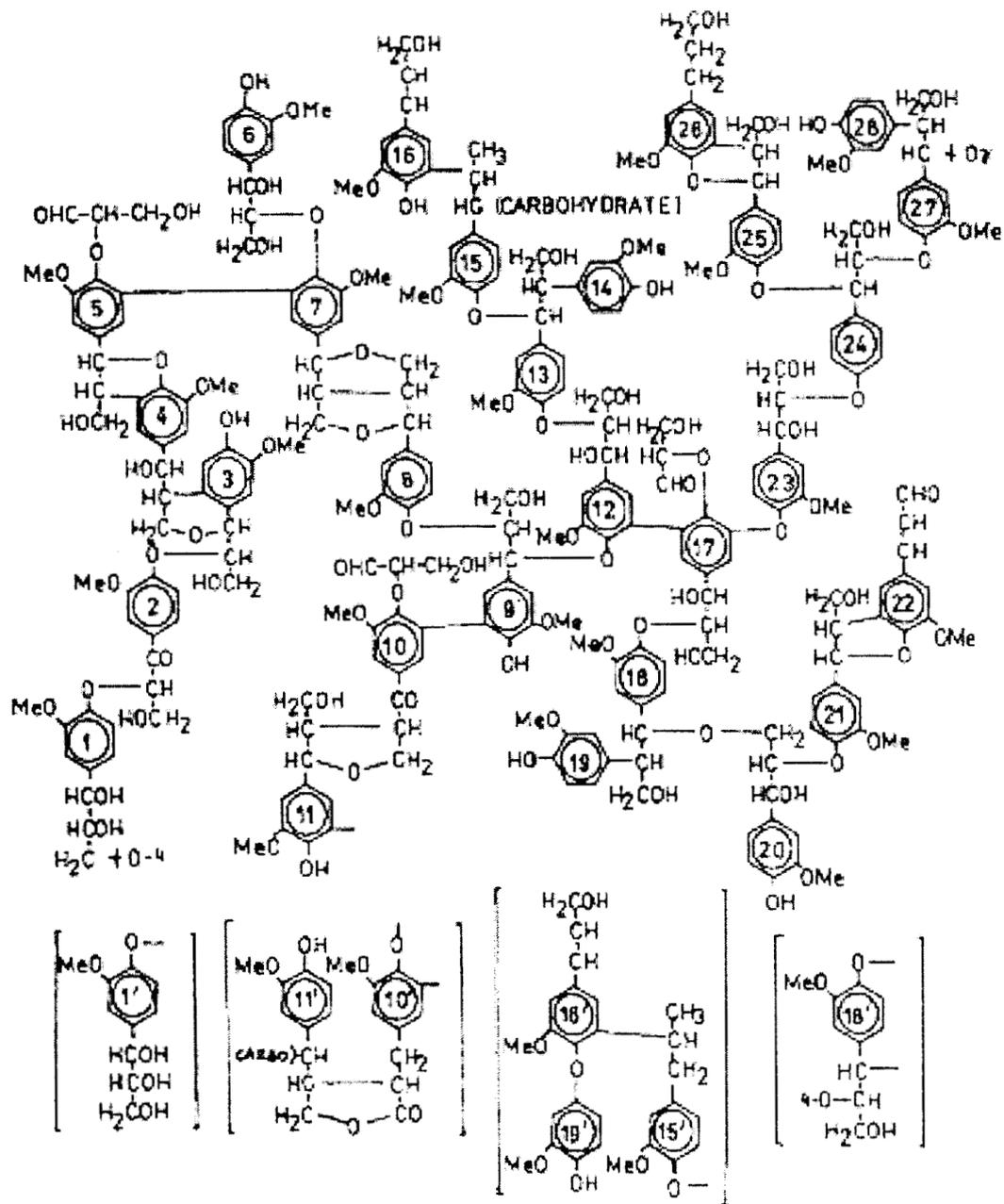


Figura. 2. Modelo estructural de la lignina en la madera (Leonowicz A, 1999)

Enzimas ligninolíticas y la lacasa

La biodegradación de la lignina representa una etapa clave en el reciclamiento de la fuente de carbono de la Tierra, porque los ecosistemas forestales contienen alrededor de 150,000 millones de toneladas de madera. Esto es confirmado por Leonowics y colaboradores (1999). También afirman, que aunque los principales constituyentes de la madera, por ejemplo la celulosa, pueda ser utilizados por varios organismos, su hidrólisis *in situ* por muchos de estos, esta limitado por la degradación del polímero de lignina recalcitrante, el cual esta formado por la polimerización de p-hidroxicinamil alcoholes (**figura 2**).

Sin embargo, los hongos de la clase de los basidiomicetes, han desarrollado una remarcable capacidad para la despolimerización oxidativa y subsiguiente mineralización de la lignina, que permite la utilización de la celulosa por otros microorganismos. En años recientes muchos estudios de la biodegradación de la lignina han sido llevados a cabo en el hongo *Phanerochaete chrysosporium*. Las primeras evidencias de las peroxidasas involucradas se remontan a la inhibición de la degradación de lignina por catalasa (Shuttleworth K., 1986).

Así dos de las peroxidasas involucradas en la degradación de la lignina, son la ligninoperoxidasa (LiP) y la enzima manganeso peroxidasa o peroxidasa dependiente de manganeso (MnP).

La ligninoperoxidasa es caracterizada por poseer un potencial redox de oxidación alto y por la degradación de compuestos aromáticos no fenólicos, tales como alcohol veratrílico y bencenos metoxilados (Staszczak M. y Col. 1996). La manganeso peroxidasa de *P. chrysosporium*, requiere estrictamente de Mn^{2+} para completar el ciclo catalítico y quelar el Mn^{3+} formado, el cual puede actuar como un oxidante eficiente de fenoles y otros compuestos (Han Young-Hoon, 1996).

A causa de que muchas estructuras que constituyen al complejo de la lignina son no fenólicas, la enzima LiP, fue considerada la principal responsable de la despolimerización de la lignina (Ander P. y Marzullo L., 1997). Esta idea es aceptada generalmente, aunque las evidencias sugieren que la biodegradación de la lignina puede proceder siempre y cuando exista un ataque del Mn^{3+} quelado, como fuerte oxidante químico generado por la MnP (Szkwarz G., 1989).

El hongo *Pleurotus eryngii*, tiene la capacidad de remover selectivamente la lignina cuando crece en los sustratos naturales y de ahí que sea considerado como un organismo modelo para estudios de la biodegradación de la lignina en plantas de ciclo anual y relacionadas con aplicaciones biotecnológicas (Klibanov A. M. y Alberti B., 1981; Ferrer I. y Col., 1991; Heinfling A., 1998).

Las peroxidasas y las lacasas han sido observadas en cultivos líquidos crecidos con *Pleurotus* y como responsables de la generación de H_2O_2 junto de lacasas. Se ha medido la degradación ligninocelulósica y la tasa de despolimerización por especies de *Pleurotus*, por medio de la utilización de paja y por la detección de enzimas ligninolíticas (tabla 2). Además de las enzimas LiP, MnP y lacasas la especie *Pleurotus* posee otra enzima que es la Aril Alcohol Oxidasa (AAO), encargada de la ruptura de las unidades fenólicas y oxidación de alcoholes bencílicos y que es dependiente de H_2O_2 .

Tabla 2. Actividad enzimática extracelular y la descomposición ligninocelulósica de la paja por varias especies de hongos.

Fue detectada actividad no peroxidasa sobre el alcohol veratrílico (LiP) y de lacasas, AAO y MnP que se muestran como Unidades/100 g de paja Inicial

	MnP	AAO	Lacasa	Polisacárido/ Lignina*
<i>P. ostreatus</i>	300	4	66	4.4
<i>P. chrysosporium</i>	70	0	0	2.2
<i>Trametes versicolor</i>	20	0	12	2.5
Paja control	0	0	0	2.6

* Hasta el final del periodo de incubación (Caramelo L. y Col., 1999)

Las lacasas (p-difenol-dioxígeno reductasa; EC 1.10.3.2) han sido muy estudiadas. Se les ha llamado enzima cuproproteicas o enzimas con cobre. Este grupo de enzimas utiliza oxígeno como un aceptor de electrones para remover hidrógenos de los grupos hidroxilo fenólicos, reacción que conduce a la formación de radicales libres, como los obtenidos con compuestos parecidos a las unidades fenólicas de la lignina. Las cuproproteínas pueden despolimerizar a la lignina por: el rompimiento de los enlaces alquil-arílicos, la oxidación de alcoholes bencílicos y el rompimiento de las cadenas laterales y los anillos aromáticos (Solomon E., 1996).

La lacasa puede también oxidar sustratos no fenólicos en presencia de mediadores redox apropiados. Estas enzimas tienen una amplia especificidad por los sustratos así como de mediadores redox (Johannes C., 2000).

La especificidad de las lacasas por ciertos sustratos puede ser explicado por sus funciones fisiológicas. Estas son esencialmente tres que han sido designadas para las lacasas de hongos en general: formación de pigmentos, degradación de lignina y eliminación de compuestos tóxicos (Temp U. y Eggert C., 1999).

El papel de las lacasas en la degradación de la lignina ha sido el punto central de un gran número de estudios biotecnológicos. La capacidad de las enzimas lacasas de catalizar la oxidoreducción dependiente de oxígeno por mecanismos de mediadores libres, se ha tomado con mucha atención en áreas de la cinética y también de sus propiedades electro-catalíticas (Wong K. y Col., 1999).

También se ha considerado el uso de las lacasas para el desarrollo de inmunoensayos enzimáticos, como biosensores y para el desarrollo de sistemas de transformación energética (D'Souza T., 1996). Todas estas investigaciones requieren grandes cantidades de enzima. El uso de los hongos es prometedor por su generación simple y rápida, especialmente si se usan hongos saprobios de rápido crecimiento.

Las lacasas han sido detectadas y purificadas de muchas especies de hongos, así mismo muchas de estas especies producen múltiples isoenzimas (Muñoz C. y Guillen F., 1997; Palmieri G. y Col., 1997, Palmieri G. y Col., 2000). Un gran número son extracelulares y están asociadas al crecimiento, esto ha impulsado estudios donde se han establecido las condiciones de crecimiento de muchas especies de hongos; posteriormente estas investigaciones se han encaminado a promover la producción de enzimas.

Un método simple para fomentar la síntesis de enzimas de interés es la utilización de inductores. Estos son usualmente sustratos de la enzima, es decir sustancias que pueden ser estructuralmente similares a los sustratos, o análogos de los sustratos de crecimiento natural utilizados por muchas especies de hongos que crecen en forma silvestre, que sirven de señal para que las células fúngicas produzcan alguna enzima específica.

Se han hecho varios intentos para encontrar el inductor adecuado de la síntesis de lacasas para diferentes hongos. Por ejemplo, en cultivos del hongo *Pleurotus ostreatus*, se ha notado un incremento en la producción de lacasas en cultivos cuando se les adicionan sustratos fenólicos. (Koroljova-Skorobogat'ko O. y Col., 1998). Después de la búsqueda en una colección de basidiomicetes, se encontró que *Coriolus hirsutus* (Wulf. : Fr.) Quél., produce lacasas extracelulares con una alta actividad específica.

También se ha demostrado, que la adición de CuSO_4 a medios de cultivo líquido donde se efectúa el crecimiento de la especie *C. hirsutus*, promueve una mayor producción de lacasas. Una lista parcial de diversos inductores se indican en la **tabla 3**, donde destaca a la Siringaldazina como potente inductor para promover la síntesis de la lacasa y por ello se considera como un sustrato modelo para determinar la actividad de este tipo de enzimas. Pero vale la pena tener en cuenta que los estudios con *C. hirsutus*, sugieren a las enzimas lacasas, como un complejo enzimático con especificidad muy laxa y que también posee un tipo de actividad inductiva, promovida por una gama muy amplia de compuestos aromáticos. Estos estudios fueron retomados en esta investigación para promover la producción de lacasas en *Pleurotus ostreatus* y *P. pulmonarius* con la utilización de CuSO_4 .

Tabla 3. Efecto de diferentes inductores sobre la producción de lacasas en el hongo *C. hirsutus* en medio líquido.

Inductor	UE/mL	% Respecto al control
Control (CuSO_4)	5.0	100
3,4 Xilidina (0.25 mM)	7.5	150
Ácido Húmico (0.1g /100 mL)	9.0	180
Ácido Caféico (0.2 mM)	10.5	210
Guayacol (0.26mM)	13	260
Ácido sinapínico (0.2mM)	14.5	290
o-Toluidina	18.0	360
Compuestos quelantes de la lignina (0.03 g/ 100mL)	22.5	450
Siringaldazina (0.11 μM)	50	1000

(Koroljova-Skorobogat'ko O. V. y Col., 1998)

La función de la lacasa: el papel que desempeña durante la degradación de la lignina

Las enzimas lacasas en las plantas, han sido constantemente estudiadas y en los hongos basidiomicetos forman parte relevante de la maquinaria enzimática, que se encarga de la mineralización de la lignina, ya que es el único grupo de organismos capaz de efectuar esta función. Al respecto, la completa mineralización *in vitro*, no se ha alcanzado, los mejores estudios sobre la deslignificación se han efectuado con el hongo *Phanerochaete chrysosporium*, el cual contiene las dos peroxidases mencionadas anteriormente (LiP y MnP), que son capaces de romper enlaces fundamentales en la estructura de la lignina, además de un amplio rango de compuestos formados por anillos (Farell y Col., 1989).

Algunas especies de hongos, son buenas degradadoras de la lignina, pero desafortunadamente no expresan a la lacasa. La función de esta enzima se efectúa por fuera de las fibras de la madera, en conjunto con las peroxidasa (Galliano H. y Col., 1991).

Por otro lado, algunas investigaciones concuerdan con la asociación de la actividad de la lacasa con la ligninólisis. La lacasa del hongo *Fomes annosus* puede ser inhibida por adición de ácido tioglicólico (secuestrador de cobre), al medio nutritivo donde este crece, además de que influye en un crecimiento menor del micelio. Este efecto también fue observado en el proceso de blanqueamiento de la pulpa para la manufactura del papel (Haars A. y Huttermann A., 1980). La lacasa puede romper porciones de las estructuras fenólicas que componen a la lignina, directa o indirectamente. El factor de que la lacasa tienda a polimerizar los sustratos fenólicos en condiciones *in vitro*, no elimina la posibilidad de que esta enzima contribuya al rompimiento de la lignina y en vez de ella, las enzimas peroxidasa polimericen algunos sustratos en condiciones *in vitro*.

De Jong y colaboradores (1992), confirmaron que la combinación de la lacasa y la enzima LiP es necesaria, para complementar a otras enzimas que se encargan de la degradación de la lignina para la formación de compuestos altamente reactivos o tóxicos, que le confieren protección al micelio en crecimiento. Otra función de esos compuestos, es el ataque para la despolimerización química de la lignina y con ello una invasión mayor de la madera por los hongos. En especies de hongos no productoras de las lacasas, como en *P. chrysosporium*, este efecto de protección para el micelio se lleva a cabo por la secreción de glucanos (Bes B. y Col., 1987). Existen otras funciones de esta enzima que requieren de más investigación, y algunas de ellas tratarán en la siguiente sección.

La función de la lacasa en la morfogénesis

En algunos hongos, la lacasa tiene una función bien conocida que esta relacionada con la ligninólisis. Sin embargo en otras especies, la enzima puede tener otras funciones diferentes, por ejemplo en el hongo *Aspergillus nidulans*, en el cual se han caracterizado dos lacasas con actividades diferentes. El producto del gen γ A esta involucrado en la formación del color verde de los conidios (Clutterbuck A., 1972). La segunda lacasa esta localizada en los primordios y esta involucrado en la pigmentación del hongo (Hermann y Col., 1983). En hongos como *Daldinia concentrica* y *Lentinula edodes*, la función de la enzima lacasa esta asociada a la pigmentación de estructuras más rígidas como un agregado miceliar.

En la formación de cuerpos fructíferos puede estar involucrada la generación de pigmentos, catalizados por la lacasa, fenómeno que está acoplado a la despolimerización oxidativa de los componentes de la pared celular en la madera, como lo son las uniones adhesivas entre célula y célula (Leatham G. y Stahmann M. A., 1981).

La formación de rizomorfos (red micelial formada por un gran número de hifas estrechamente asociadas y que forman parte final del estípite), es un cambio diferente en el desarrollo de los hongos que está asociado con la síntesis de la lacasa en *Armillaria mellea* (Worrell J. y Col., 1986). Es posible que también, la acción de la lacasa esté encaminada a la formación de una goma polifenólica que une a las hifas, unas con otras. En medios de cultivos con *Armillaria mellea*, la lacasa se acumuló en el medio, al cual se le cambió el pH. Esto provocó un cambio en la actividad de la lacasa que tuvo un efecto significativo sobre la densidad de la masa micelial del rizomorfo formado (Rehman A. y Thurston C., 1992).

En la forma dicariótica del hongo *Schizophyllum commune*, los cuerpos fructíferos pueden excretar cantidades considerables de lacasas, que en las especies monocarióticas no se realiza. Curiosamente, las condiciones máximas de síntesis de lacasas en estos cultivos en oscuridad se dan a 30°C, en comparación con la etapa de formación de los cuerpos fructíferos, y que es en presencia de luz, donde la mayor producción de la enzima se da a 25°C. La actividad de la lacasa en el medio se da en periodos de máximo consumo de glucosa, después del cual la enzima se inactiva (síntesis y actividad de la enzima son controlados) (De Vries O. y Col., 1986).

Este comportamiento también se ha observado en cultivos de *Agaricus bisporus*, donde la producción de la lacasa tiene un comportamiento en paralelo con el crecimiento vegetativo y producción de masa micelial (Wood, 1980). Este ciclo de acumulación-inactivación se repite cuando se producen más cuerpos fructíferos, por ejemplo durante la producción comercial del hongo. También se ha observado una interacción entre la enzima lacasa y la tirosinasa, que desempeñan un papel muy importante en la colonización del sustrato por algunos basidiomicetes (Ainsworth A. y Rayner A., 1991).

Otras investigaciones se han enfocado al estudio de otro tipo de basidiomicetes, en el proceso de formación de pigmentos, se ha encontrado que el hongo es un buen degradador de la lignina por medio de sus fenoloxidasas, pero también produce una lacasa, que media la formación de pigmentos, por ejemplo el ácido cinabarinico (AC), el cual le proporciona un color rosado a los cuerpos fructíferos y

sirve también como agente antimicrobiano (Temp U. y Eggert C., 1999). A este respecto, Temp y Eggert (1999) encontraron que existe una interacción entre la enzima lacasa y la celobiosa deshidrogenasa, para la síntesis de un precursor del compuesto AC, el ácido 3-hidroxi antranílico.

Por otro lado, recientemente Iakovlev y Stenlid (2000), investigaron los patrones de variación de la actividad de las lacasas, en interacción del micelio con la madera en descomposición, efectuada por algunos basidiomicetes, además de los vínculos con otros hongos. Ellos observaron que dependiendo de las condiciones de cultivo, la actividad de las enzimas fenoloxidasas y peroxidasas se incrementa o desciende durante las interacciones con otros hongos o bacterias. La actividad de la lacasa está implicada, en una variedad de hongos, en la producción de melaninas y también en la de síntesis de compuestos tóxicos para otros hongos.

Esto sugiere que el micelio en los basidiomicetes posee un sistema indeterminado, energéticamente eficiente y no lineal de regulación. Tales sistemas están regulados por mecanismos de retroalimentación y tienen una dinámica compleja que afecta la síntesis de metabolitos hidrofóbicos, su liberación al exterior de la hifa y su conversión hacia la formación de radicales libres y polímeros, en presencia de las enzimas lacasa y fenoloxidasas.

Otros estudios sobre las lacasas en hongos, ha permitido descubrir que éstas, están asociadas con la lignificación y procesos biológicos como la esporulación y producción de pigmentos durante el desarrollo del cuerpo fructífero. Esta actividad parece estar muy regulada en los hongos *Agaricus bisporus* (Smith J. F. y Claydon N., 1989) y *Lentinula edodes* (Leatham G. y Stahmann M. A., 1981).

La exposición a la luz, de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus*, influye en cambios de la producción de las enzimas, ya que se ha reportado una pigmentación de color amarillo en estos hongos, dependiendo de la intensidad de la luz a las que se someten los cultivos (Delgado G y Col., 1992).

La producción de exopolisacáridos es otro mecanismo, que está asociado a la producción de lacasas y celulasas. Burns y colaboradores (1994), estudiaron su intervención en especies de *Pleurotus*, que son los que producen más exopolisacáridos, por la capacidad para conferirle adherencia al micelio con su sustrato, prevenir la deshidratación y almacenamiento de nutrientes.

La función de la lacasa en el micelio de los hongos es bastante compleja y se necesitarán más investigaciones, para descubrir como las lacasas intervienen en el crecimiento y maduración de los hongos, en cualesquiera de las etapas (miceliar o de fructificación). Por lo tanto lo presentado en esta investigación proporcionará otra evidencia más, de cómo la lacasa esta vinculada en el sistema de desarrollo de los hongos.

La importancia de la lacasa en la patogénesis relacionada con las plantas

El hongo *Botrytis cinerea* causa infecciones en la raíz de muchas plantas, que están destinadas a la horticultura (zanahoria y pepino), así como en las raíces de algunos viñedos. Este hongo produce lacasas extracelulares que están involucradas en el proceso patogénico, porque las curcubitacinas, tetraciclinas, triterpenoides producidas por el pepino, protegen a la planta de algunas infecciones (Bar-Nun N. y Mayer A., 1990) y esta protección esta vinculada con la represión específica de la síntesis de la lacasa por los hongos (Viterbo A. y Col., 1993). El sistema de inducción es complejo e involucra acción concertada de sustancias fenólicas y pécticas, que promueven la formación de múltiples formas de lacasas en diferentes medios y esas isoformas tienen diferentes especificidades hacia los sustratos (Marbach I. y Col., 1985).

La evidencia más tangible del papel que desempeña la enzima lacasa en la patogénesis se ha observado en la roya castaña provocada por el hongo *Cryphonectria parasitica*, que es una especie hipovirulenta, en la cual la disminución de la virulencia, esta asociada con la presencia de una doble hebra de RNA de origen viral. Esta especie reprime la síntesis de la lacasa por acumulación de RNAm (Rigling D. y Van Alfen N., 1991).

La lacasa y sus genes

Durante varios años las secuencias de genes o cDNA para la expresión de la enzima lacasa, han sido descritas de varias fuentes, de las cuales, las primeras fueron reportadas para el hongo de la especie *Neurospora crassa* (Germann y Col., 1988). Posteriormente, se han publicado las secuencias de la enzima lacasa en otros hongos de la familia de los Deuteromicetes, como *Aspergillus nidulans* (Aramayo R. y Timberlake W., 1990) y de tres basidiomicetos como *Coriolus hirsutus* (Kojima Y. y Col., 1990), *Phlebia radiata* (Saloheimo M. y Col., 1991) y *Agaricus bisporus* (Perry C. y Col., 1993).

Esas secuencias muestran un patrón común, en las que se codifican polipéptidos de aproximadamente 520-550 residuos de aminoácidos, incluyendo el péptido amino terminal de secreción.

Además, las enzimas poseen una cisteína y diez residuos de histidina en el sitio de unión formado por cuatro átomos de cobre, que están conservados. Otro grupo pequeño de secuencias, es conservado y se encuentran alrededor de cuatro regiones en las cuales los átomos de cobre están agrupados, incluyendo el carbono amino terminal.

En general, la distribución de la cadena polipeptídica y los componentes estructurales antes mencionados, son similares a la enzima ascorbato oxidasa, inclusive tiene una significativa homología con la proteína plasmática ceruloplasmina (Saloheimo M. y Col., 1991).

Todas las enzimas descubiertas en los hongos, se han clasificado en varios grupos. Algunos de esos grupos comprenden enzimas que atacan directamente a los constituyentes de la madera; incluyendo enzimas que actúan sobre los componentes de carbohidratos (celulosa, hemicelulosa) y los que actúan sobre la lignina (Solomon E., 1996). Todas estas enzimas actúan separadamente o en cooperación una con la otra. La maduración en hongos, puede estar acompañada por la participación simultánea de enzimas proteolíticas (Larraya L. y Col., 2000).

Algunas de estas enzimas y sus isoenzimas han sido investigadas y caracterizadas genéticamente. Por ejemplo en *Phanerochaete chrysosporium*, se han detectado al menos 10 genes en el grupo de las enzimas llamadas lignino peroxidasas (LiP), en una familia multigénica que también codifica para enzimas de la clase manganeso peroxidasa (MnP). En el caso de las enzimas lacasas se han reconocido al menos 15 genes, no solo en hongos ligninolíticos, también en hongos filamentosos como *Neurospora crassa*, *Cryphonectria parasitica* y *Aspergillus nidulans*. Cuatro genes han sido reconocidos en hongos patógenicos de plantas como *Rhizoctonia solani* (Larraya L. y Col., 2000).

Una cantidad considerable de genes de las lacasas, también se han caracterizado en hongos ligninolíticos como *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Trametes villosa* y *Picnoporus cinnabarinus*, con un medio inducido con Xilidina (2-amino-1,4-dimetilbenzol). La mayoría de estas enzimas degradadoras de lignina y de la celulosa, son descritas por Eriksson y algunos otros (Leonowicz A. y Grzywnowicz K., 1981; Eriksson K., 1993; Gold M. H. y Alice M., 1993; Broda P. y Col., 1994; Thurston C., 1994; Cullen P. y Col., 1997; Sarikaya A. y Ladish M., 1997; Ander P. y Marzullo L., 1997).

Aspectos importantes en la genética de las lacasas en hongos

Fen Xu y colaboradores (1998), han observado que las lacasas de *Coprinus cinereus*, son activadas a pH alcalino, una propiedad potencial para las aplicaciones en la biotecnología. Para demostrar la diversidad enzimática en hongos, obtuvieron la secuencia y clonaron 3 genes de las lacasas de este hongo (lcc1, lcc2 y lcc3). El gen de la proteína lcc1 contiene 7 intrones, comparado con los genes de lacasas lcc2 y lcc3 que contienen 13 intrones. La secuencia de aminoácidos de las lacasas que codifican los genes lcc1 y lcc3 son 58 y 80 en aminoácidos respectivamente. La proteína que es codificada por el gen lcc2 contiene 23 aminoácidos en el extremo C-terminal, una extensión rica en arginina y lisina. Se ha purificado y expresado el gen que codifica a la proteína lcc1 en *Aspergillus oryzae*, mostrando una masa molecular aparente de 66 KDa en un gel SDS-PAGE y una absorción máxima a 278 y 614 nm por resonancia magnética paranuclear.

Basado en el extremo N-terminal de las lacasas, fueron procesados 4 residuos polipeptídicos durante la maduración de la enzima. Algunas propiedades catalíticas de estas enzimas, muestra un K_m aparente de $22 \pm 2 \mu M$ y la constante catalítica (k_{cat}) de 200 min^{-1} , para O_2 con ABTS como sustrato reductor a pH 5.5. La lacasa codificada por el gen lcc1 de *A. oryzae* puede ser producido industrialmente (Fen Xu, 1998). Muñoz y Guillen (1997), compararon las secuencias N-terminal de las lacasas de *Pleurotus*, con las obtenidas en otros hongos, mostrando que existe una homología considerable, presentando algunas diferencias principalmente en los aminoácidos treonina, serina e isoleucina, esto sugiere que son verdaderas isoenzimas codificadas por diferentes genes (figura 3).

A	X	K	K	L	-	D	F	H	I	I	N	N	<i>Pleurotus eryngii</i> laccase I
A	I	K	K	L	-	D	F	H	I	I	N	N	<i>Pleurotus eryngii</i> laccase II
K	T	R	-	T	F	D	F	D	L	V	N	T	<i>Agaricus bisporus</i> laccase I (41)
D	T	K	-	T	F	N	F	D	L	V	N	T	<i>Agaricus bisporus</i> laccase II (41)
A	I	G	P	T	A	D	L	T	I	S	N	A	<i>Coriolus hirsutus</i> laccase (31)
A	I	G	P	T	G	D	M	Y	I	V	N	E	<i>Pleurotus ostreatus</i> laccase I (18)
A	I	G	P	A	G	N	M	Y	I	V	N	E	<i>Pleurotus ostreatus</i> laccase II (17)
S	I	G	P	V	A	D	L	T	I	S	N	G	<i>Basidiomycele PM1</i> laccase (10)
A	I	G	P	V	T	D	L	E	I	T	D	A	<i>Coriporiopsis subvermispora</i> laccase (16)
S	I	G	P	V	T	D	F	H	I	V	N	A	<i>Phlebia radiata</i> laccase (45)
A	I	G	P	V	A	S	L	V	V	A	N	A	<i>Trametes versicolor</i> laccase I (7)
G	I	G	P	V	A	D	L	T	I	T	N	A	<i>Trametes versicolor</i> laccase II (7)
G	I	G	P	V	A	D	L	T	I	T	N	A	<i>Trametes villosa</i> laccase I (58)
A	I	G	P	V	A	S	L	V	V	A	N	A	<i>Trametes villosa</i> laccase II (58)
A	I	G	P	V	A	D	L	T	L	T	N	A	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i> laccase (13)

Figura 3. Comparación del N- terminal de las lacasas de algunas de especie de *Pleurotus* y otros hongos (Muñoz C. y Col., 1997)

Por lo tanto las lacasas de los basidiomicetos tienen un origen multigénico, aunque su estructura primaria tenga una elevada porción de homología. Estas diferencias genéticas y estructurales permiten considerar que estos microorganismos puedan producir distintas isoformas de lacasas, bajo condiciones fisiológicas cambiantes y ello, justifica el estudio de esas isoformas durante distintas fases de crecimiento de un basidiomiceto que es objetivo importante de esta tesis.

Mediadores de bajo peso molecular

De acuerdo con varias teorías, las enzimas ligninocelósicas no penetran en la estructura rígida de la madera debido su elevada masa molecular (Evans C. S. y Col., 1994). Por ello, las células de los hongos que invaden la madera, poseen un potencial redox suficientemente alto, para producir compuestos oxidantes de bajo peso molecular de origen interno u externo. Estos migran hacia las enzimas que los oxidan y luego penetran las fibras para oxidar la lignina.

Los precursores de los mediadores internos son producidos como resultado del metabolismo de la maduración del hongo, con la participación de enzimas que degradan la lignina. Muchos compuestos de masa molecular baja y radicales libres, se han sugerido como los factores móviles, que difunden en la madera e inician su descomposición.

Algunos de estos mediadores naturales son: el veratrol, el oxalato, el malato, el fumarato y el ácido 3-hidroxi antranílico. Se producen como resultado del metabolismo de hongos y su producción causa una colonización y degradación más efectiva por los hongos en la madera. Fue reportada la síntesis de veratrol en *Phanerochaete chrysosporium* por Lundquist y Kirk (1978). Por su parte Traquair (1987), encontró que el oxalato era producido en *Leucostoma cineta* y *L. Personii*. Años después Eggert y colaboradores (1996) identificaron el ácido 3-hidroxi antranílico, como componente extracelular en *Pycnoporus cinnabarinus*.

El veratrol y el oxalato son metabolitos secundarios utilizados por *Phanerochaete chrysosporium* y a su vez sirven como sustrato para otros hongos, que producen las enzimas lignino peroxidasa (LiP) y la peroxidasa dependiente de manganeso (MnP), que oxida el Mn^{2+} a Mn^{3+} (Solomon E., 1996).

La reacción de las lignino peroxidasas con el veratrol, da como resultado la producción de un radical catiónico, que es transformado en veratraldehído o en otras quinonas. Si la acción de las enzimas se efectúa por la degradación directa de lignina, del derivado del radical catiónico formado por la oxidación de un fenol, probablemente actuará como mediador redox en reacciones donde se efectúe una transformación de la lignina. A pesar de que la vida media de este radical catiónico es extremadamente corta, sus funciones como mediador de difusión, son altamente dudosas.

En el sistema de la peroxidasa dependiente del manganeso, los mediadores se encuentran como un oxalato unido al Mn^{3+} u otros radicales dicarboxílicos complejos, los cuales son capaces de oxidar una variedad de sustratos relacionados con la lignina. Los oxalatos quelantes de cationes como Ca^{2+} , Fe^{2+} y NH_4^+ dan como resultado en ensanchamiento del tamaño del poro de la pared celular, lo cual permite acceder a las moléculas de enzimas dentro de las fibras, también estos oxalatos regulan la concentración de los iones hierro por medio de la reacción de Fenton. Esta reacción abastece el ambiente de la degradación de la lignina en la madera con iones hidronio altamente reactivos (H_3O^+) y radicales hidroxilo (HO^+ y HO), los cuales inician la despolimerización de la lignina.

Aparte de la ligninólisis llevada a cabo por el 3-hidroxi antranilato producido por *Pycnoporus cinnabarinus*, que es el mejor mediador conocido en la lacasa, se ha encontrado que la deslignificación de la pulpa de papel por la lacasa, puede ser estimulada por la adición al mismo tiempo de un colorante de bajo peso molecular u otros donadores aromáticos de hidrógenos, que actúan como mediadores, por ejemplo el ácido 2,2 azinobis (3-etilbencenotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) (Bourbonais R., 1999) o el 1-hidroxibenzotriazol (HBT) (Call H. P., 1994), que son mediadores artificiales.

El descubrimiento del HBT introdujo una nueva clase de mediadores que tienen grupos funcionales N-OH, y son productores de radicales NO, pues estos grupos químicos estabilizan la estructura de los propios mediadores y por ello son seleccionados en diversos estudios para la oxidación de la lignina. Otros eficientes mediadores incluyen el ácido violúrico y la N-Hidroxiacetanilida (Amman M., 1997).

Cooperación de enzimas en la degradación de lignina y celulosa

Hasta hace poco tiempo la enzima lacasa no había sido considerada como un agente oxidante de la lignina, porque su acción catalítica produce un cambio más pequeño del potencial rédox, comparado con el catalizado por las enzimas peroxidasas. Pero gracias a los estudios del grupo de Bourbonais (1999) y de Ericksson (1993), ahora se reconoce que la enzima lacasa también puede oxidar la lignina.

En una revisión hecha por Leonowickz y colaboradores (1999), se postula la interdependencia tipo retroalimentación del proceso de deslignificación y degradación de celulosa. Esta hipótesis es válida, así como el reporte por Gottlieb y colaboradores (1950), de que el crecimiento del micelio sobre la madera y degradación de lignina esta relacionado con la acción cooperativa de varias enzimas. Por ejemplo: la celobiosa quinona oxidoreductasa, que coopera con la lacasa y la celulasa en la despolimerización de los componentes del complejo ligninocelulósico.

Además la lacasa puede funcionar como parte de la vía biosintética, generando compuestos que se destinan a la cadena del transporte de electrones. Este modelo de degradación, ha sido modificado para incluir enzimas que recientemente se han descubierto y radicales que son activos en la transformación del complejo ligninocelulósico. En este sistema, las enzimas son secretadas por la hifa del hongo al ambiente en la cual la citada acción cooperativa, junto con la de intervención de los mediadores, citada en la sección anterior.

Un aspecto importante, es la producción de agentes quelantes y de radicales, llamados “mediadores” y que son exportados dentro de la madera, actuando como moléculas clave en la degradación de las fibras. El sistema de oxidasas-lacasa, oxida radicales de la lignina hasta convertirlas en quinonas, que sirven como fuente de oxígeno para la glucosa oxidasa (GOD) y/o la oxidasa de veratrol (VAO).

Las enzimas que actúan posteriormente, producen peróxidos y previenen polimerización provocada por la lacasa, con la formación de H_2O_2 , el cual sirve como co-sustrato de la actividad ligninolítica de las enzimas LiP y MnP. La GOD y la (VAO) previenen la polimerización y despolimerización acelerada de la lignina ocasionada por lacasa (Szkwarz G. y Leonowicz A., 1986). La GOD posee dos funciones necesarias para la aceleración del rompimiento: la oxidación de glucosa y producción de H_2O_2 necesaria para la actividad peroxidasa.

Esto también reduce los radicales fenoxi y quinoides, producidos por la lacasa durante la oxidación de lignina. Cuando el oxígeno es consumido en la segunda etapa de la reacción glucosa-GOD se producen radicales o quinonas.

Por otro lado, el mismo exceso de las quinonas producidas por la lacasa inhibe a esta enzima. De acuerdo a este mecanismo, la GOD coopera con la degradación de lignina y la enzima MnP produce en esta reacción al H_2O_2 , que junto con la lacasa, reducen las quinonas producidas por esta enzima, lo cual facilita la formación de fenoles adecuados.

La glucosa es producida como resultado de la hidrólisis de celulosa, con lo cual se origina el sustrato para la GOD. El oxígeno necesario para la GOD puede ser reemplazado por quinonas producidas por la lacasa, a partir de oligómeros de lignina.

Como resultado de la oxidación de la glucosa, se forma D-Glucosa- δ -lactona, la cual mediante ciertas transformaciones apoya el metabolismo de hongos en el ciclo pentosa fosfato y glucólisis. Por otro lado las lacasas desmetilan oligómeros que son producidos por las peroxidases y las degrada a fragmentos de bajo peso.

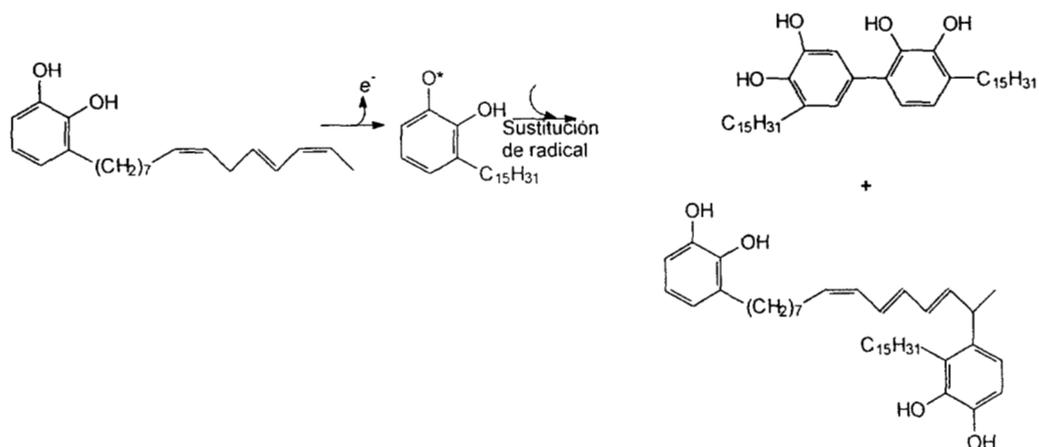
Los fenoles son el sustrato de la protocatecuato-3,4-dioxigenasa o de otras dioxigenasas como la 1,2,4-trihidroxibenceno-1,2 dioxigenasa o la catecol-1,2-dioxigenasa, presente en hongos (Rogalski J. y Col., 1996), que por su parte interviene en diversas reacciones de rompimiento de los anillos aromáticos, formando cetoácidos que rápidamente entran en el ciclo de Krebs.

Estos mecanismos cooperativos pueden ocurrir en hongos que poseen todas las enzimas aquí presentes como *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Trametes versicolor* y algunas especies de *Pleurotus*. Sin embargo la existencia de otro tipo de mecanismos y sistemas de cooperación y con retroalimentación del proceso de degradación de lignina y celulosa puede ser posible.

La **figura 4 y 5**, muestran el mecanismo de acción de las diferentes enzimas, resaltando la acción de las lacasas en la reducción de oxígeno y oxidación de derivados metoxifenílicos.

A
Lacasa de *Rhus vernicifera*

227420



B
Lacasa de Hongos

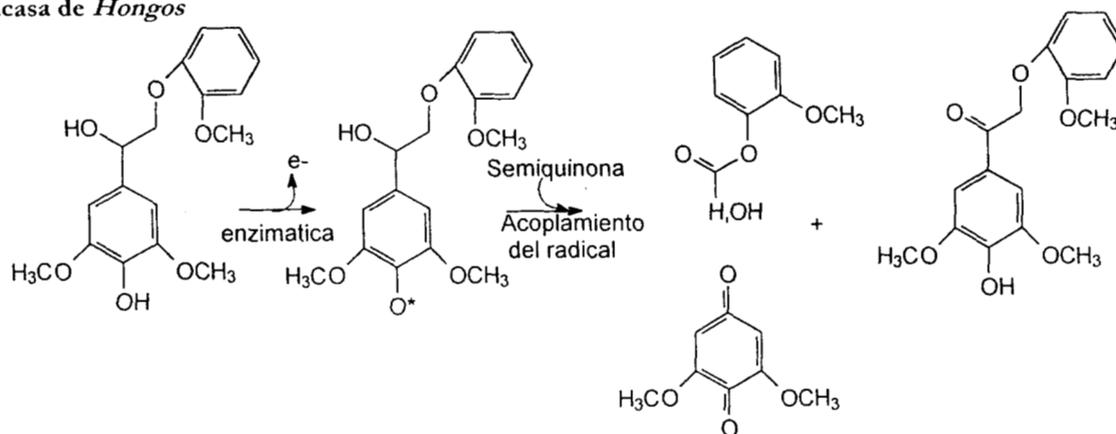


Figura 4. La relevancia fisiológica de las reacciones catalizadas por las lacasas de plantas y hongos. **(A)** Intervención de la lacasa del árbol de la laca (*Rhus vernicifera*), que interviene en la formación de radicales libres, por medio de la oxidación de compuestos fenólicos, que posteriormente polimerizarán, para la formación de la lignina, parte importante de la pared celular de la planta (Solomon E., 1996). **(B)** Reacción típica de despolimerización de la enzima lacasa perteneciente a los hongos: la enzima oxida los grupos hidroxilo de las subunidades fenólicas de la lignina, en cooperación con las polifenoloxidasas, formando un radical o semiquinona, que posteriormente ataca otras subunidades (Solomon E., 1996).

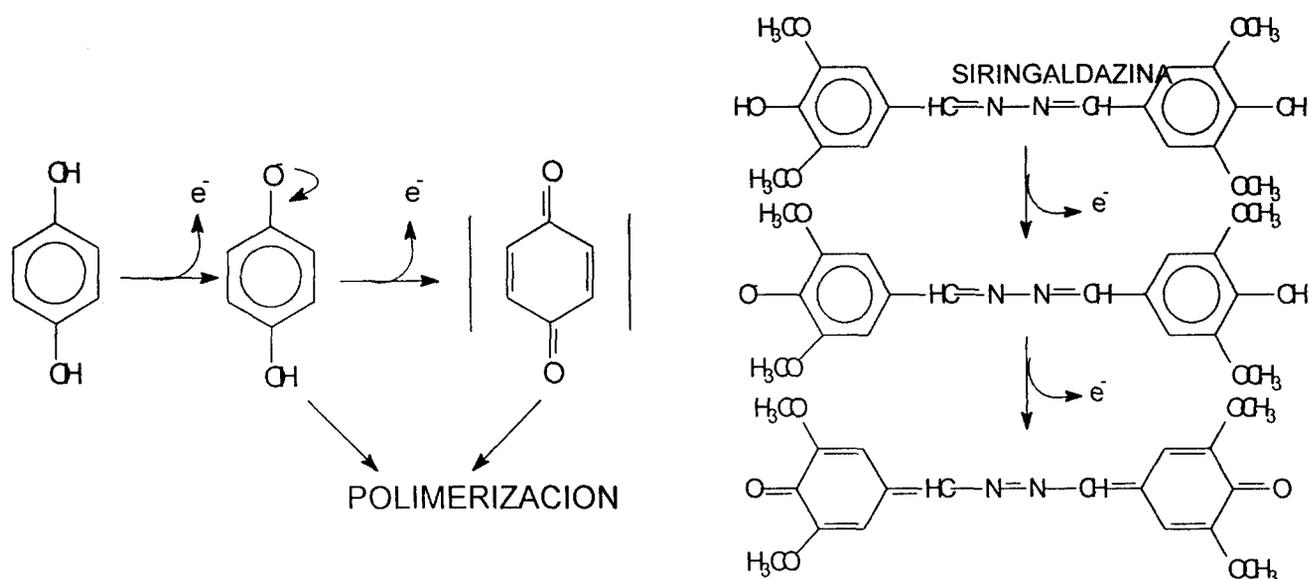


Figura 5. Oxidación de la siringaldazina por lacasas de hongos. **Izquierda:** una reacción típica donde un difenol pierde un electrón por la oxidación para formar un radical libre, que puede convertirse en una quinona, catalizada por la enzima o por reacomodo espontáneo (Thurston C., 1994). **Derecha:** La reacción típica con la siringaldazina, donde el primer producto de la reacción es un radical libre y la formación de la quinona puede ser enzimática o por reacomodo de electrones (Thurston C., 1994).

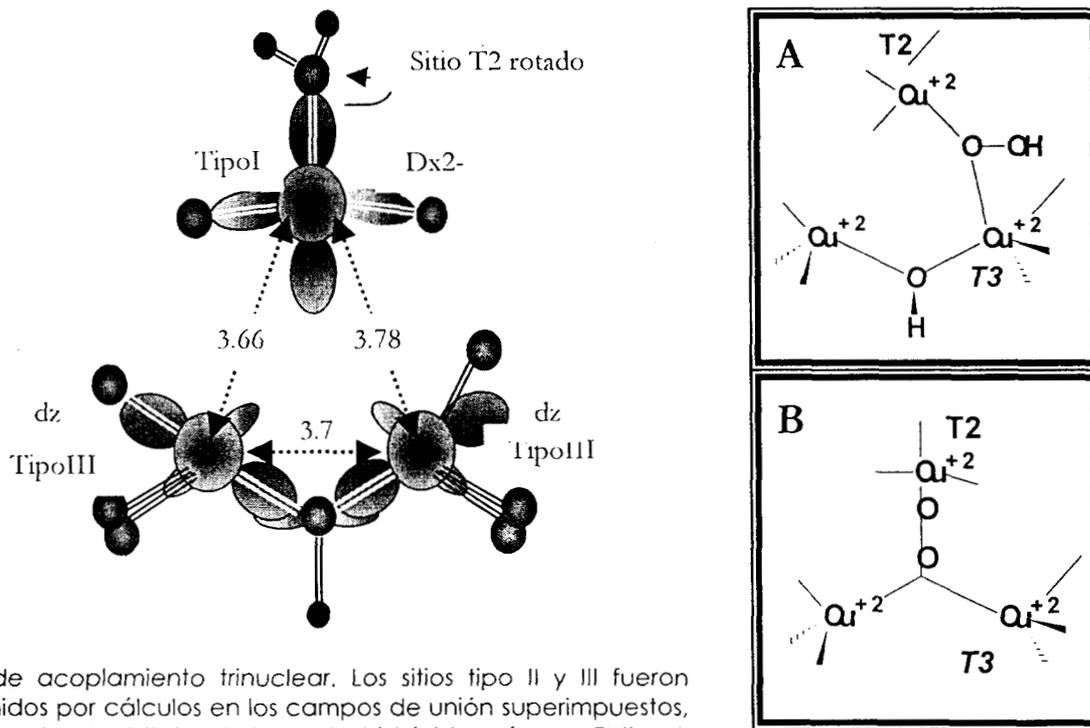
Estructura de la lacasa

En las **plantas** el sistema de la lacasa es un componente de la síntesis de lignina, pero en las lacasas de los **hongos** esta función no se realiza, puesto que no están constituidos de lignina, aunque si requiere degradarla, para obtener los nutrientes mediante la oxidación de las unidades fenólicas. Los primeros estudios para elucidar la estructura de las lacasas de hongos fueron en *Phanerochaete chrysosporium*. Se ha observado que al purificarse tiene una considerable homogeneidad. Estas enzimas son clasificadas dentro de la familia de las *oxidasas multicobre*. Poseen en su sitio activo 4 cobres clasificados de la manera siguiente: 1 tipo I, 1 tipo II, y un par acoplado binuclear tipo III. Las características hasta este momento indican que el sitio tipo I (o cobre azul), es en donde existe la transferencia de carga del metal que involucra un azufre de una cisteína y el Cu tipo II el cual absorbe la luz a 605nm.

El Cu tipo II exhibe una baja absorbancia y el sitio III involucra un acoplamiento de dos centros de cobre, involucrados en la absorbancia a 330nm. Todos los cobres están involucrados en el mecanismo catalítico para la transferencia de electrones, durante el mecanismo enzimático de oxidación de compuestos fenólicos para la formación de quinonas.

En la **figura 6** se observa el acoplamiento de dichos átomos de cobre y las distancias en Ångstrom, así como su intervención en la oxidación de compuestos fenólicos. Hasta estos momentos, en el basidiomicete *Pleurotus ostreatus* se han observado isoenzimas con dos átomos de zinc, un átomo de hierro, y solo un átomo de cobre por molécula enzimática. Aunque otras isoenzimas que se han extraído de diversos hongos tienen características diversas.

Figura 6. Estructura del sitio activo de las oxidasas multicobre y formación del puente peróxido



Sitio de acoplamiento trinuclear. Los sitios tipo II y III fueron obtenidos por cálculos en los campos de unión superimpuestos, incluyendo el orbital p Del puente hidróxido oxígeno. El tipo II esta rotado 90° para su claridad (Solomon E., 1996)

Dos posibles modelos para el puente peróxido. Al acoplamiento trinuclear: (A) Puente entre el Cu tipo 2 y tipo 3 (B) Puente entre los tres Cu (Solomon E., 1996)

Estas consideraciones son útiles para explicar porque es crucial para las enzimas lacasas, tener un suministro adecuado de cobre en el medio de cultivo y porque este tipo de metal podría ser inductor de las enzimas. Además en diversas investigaciones efectuadas extrayendo las enzimas lacasas de diversos hongos, se han descubierto características cada vez más distintas, que serán mencionadas en la siguiente sección.

Propiedades de las lacasas de hongos

En la **tabla 4** se muestran las propiedades de las lacasas que han sido investigadas hasta 1999 comparando entre las diferentes lacasas de hongos, así como algunas propiedades (Thurston C. y Col., 1994; Szklarz G. y Col., 1989; Böckle B. y Col., 1999; Das N. y Col., 1997; Ardón O. y Col., 1998; Leonowicz A, 1999), resaltando las 5 lacasas tanto en *Pleurotus pulmonarius* como en *Pleurotus ostreatus*.

Tabla 4: Comparación entre las características de las lacasas en hongos

Organismo	Enzimas	Masa (KDa)	Carbohidratos %	Cobre (átomos/mol)
<i>Polyporus versicolor</i>	2	60 y 65	14	4
<i>Podospora anserina</i>	3	70, 80 y 390	25, 23 y 22	3
<i>Neurospora crassa</i>	1	65	11	3
<i>Agaricus bisporus</i>	2	100 y 65	15	2
<i>Aspergillus nidulans (conidial)</i>	1	110	12	
<i>Botritis cinerea</i>	2	72	80	
<i>Schizophyllum commune</i>	1	62		
<i>Phebeia radiata</i>	1	64		
<i>Pycnoporus coccinus</i>	1	70		
<i>Lentinus edodes</i>	1	66		
<i>Armillaria mellea</i>	2	59 y ?		
<i>Monocillium indicum</i>	1	100 y 72		
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	5	55	40	
<i>Pleurotus ostreatus</i>	5	62-70	45	
<i>Lycoperdon sp.</i>	1	78	.40	2

La similitud con la enzima ascorbato oxidasa es muy significativa. Esta proteína ha sido cristalizada y analizada por difracción de rayos X (Messerschmidt A. y Huber R., 1990), y se comparó con la estructura tridimensional de la lacasa obtenida del hongo *Neurospora crassa*.

Los estudios se encaminaron a investigar la estructura del sitio activo comparando a la lacasa con la ascorbato oxidasa. Estas enzimas contienen tres tipos de cobres que se distinguen por sus características espectroscópicas, antes mencionadas. El análisis de la secuencia de aminoácidos de la enzima lacasa perteneciente al hongo *Neurospora crassa* y la de la especie *Phlebia radiata*, muestran una estructura en forma de β -rizo parecida a la descrita a la perteneciente a la enzima ascorbato oxidasa (Saloheimo y Col., 1991).

Otras evidencias muestran una similitud del 50% en los aminoácidos de las lacasas en micromicetos como *Aspergillus nidulans* y *Neurospora crassa* con las de basidiomicetes como *Pleurotus* (Leonowicz A., 1999).

Se conoce que muchos basidiomicetes producen múltiples formas electroforéticas de lacasas, tanto intra y extracelulares como lo demostraron en gel de poliacrilamida (PAGE) -zimograma o electroenfoque (Wood, 1980; De Vries y Col., 1986; Choi y Col., 1987). Blaich y Esser (1975), encontraron que las múltiples isoformas de la enzima lacasa, en basidiomicetes que degradan la madera, fueron parecidas en grupos taxonómicos del mismo nivel, pero no en grupos de hongos de un orden superior. Prillinger y Militaris (1979), observaron diferencias en las electroformas de las enzimas lacasas, entre poblaciones alelopáticas en el hongo *Pleurotus ostreatus*. Kerrigan y Ross (1988) corroboraron estos estudios en *Agaricus bisporus*, observaron similitudes aparentes entre las lacasas de esta especie, afirmando que se puede aplicar esta técnica en hongos de diferente grupo taxonómico. Este método puede aplicarse para la identificación de cepas productoras de lacasas y también para la diferenciación entre especies de *Pleurotus*, que son motivo de esta tesis.

Mecanismos de desactivación de peroxidasas en cultivo líquido

La degradación de lignina por basidiomicetes, como *Pleurotus*, es la mejor estudiada, por su potencial industrial y como degradadores de lignina de las pajas. Estudios hechos por el grupo de Böckle y Martínez (1999), etiquetando con C_{14} , algunos compuestos parecidos a la lignina, demostraron que la oxidación del Mn^{2+} en *Pleurotus pulmonarius*, estimula la mineralización de la lignina cuando el hongo crecía en fermentación sólida (SSF).

El Mn^{3+} está involucrado, y puede ser generado por la oxidación de Mn^{2+} por peroxidasas, que son secretadas por el hongo. En presencia de quelantes secretados por el hongo, el Mn^{3+} formado, puede ser el responsable del ataque a la lignina a larga distancia por el micelio del hongo. Se han purificado siete MnP de cultivos líquidos y SSF de *P. eryngii* y *P. pulmonarius* (Martínez M. J., Ruiz-Dueñas F. J. y Col., 1996). Dos peroxidasas se han obtenido de cultivos líquidos de *Pleurotus ostreatus*. Seis de ellas, las de *Pleurotus pulmonarius* tienen actividad sobre sustratos aromáticos fenólicos y no fenólicos y colorantes, el pH óptimo de estas enzimas es de tres.

La caracterización de nuevas peroxidasas aisladas del hongo *Pleurotus eryngii* se han investigado a partir de los aminoácidos y de la arquitectura molecular de esas enzimas, que son parecidas a las de *P. chrysosporium*. Estas tienen sitios de unión a Mn^{3+} , que poseen la habilidad de oxidar Mn^{2+} (Martínez M. J., Böckle B. y Col., 1996).

Estudios hechos en *P. pulmonarius*, por los mismos autores, demostraron que es un hongo ligninolítico, que ha mostrado una gran mineralización de la lignina. Se han descrito grandes niveles de peroxidasas en medios que contienen peptona donde crece *P. pulmonarius*. La producción eficiente y purificación de estas enzimas en cultivos líquidos muestra un muy rápido declive en la actividad peroxidasa. *Pleurotus pulmonarius* secreta peroxidasas versátiles que oxidan Mn^{2+} , así como diferentes compuestos aromáticos fenólicos y no fenólicos. Durante el cultivo, la producción de enzima mostró un pico tan alto como 1000U/L, que fue medido por la formación de Tartrato- Mn^{3+} , este pico fue muy efímero, debido a la estabilidad de la enzima (arriba del 80% de la actividad se perdió a las 15 h).

En filtrados obtenidos de estos cultivos, la desactivación fue más rápida, por la acción de proteasas y por un aumento de H_2O_2 , que perdió la actividad en pocas horas. Por otro lado el anisol es un sustrato natural de la Aril Alcohol oxidasa, otra enzima que es importante en la degradación de lignina y es la

principal fuente de H_2O_2 en cultivos de *Pleurotus*, se ha visto que la adición de anisol a filtrados conteniendo enzima estable de peroxidasa, dio como resultado la desactivación rápida. El descenso en el pH también puede afectar dramáticamente la estabilidad de la peroxidasa de *Pleurotus pulmonarius*, ya que se ha observado que en un intervalo de pH de 3.2-6, hay un incremento del nivel de desactivación por peróxido de 5 a 80% después de una hora (figura 7) (Muñoz C. y Guillen F., 1997).

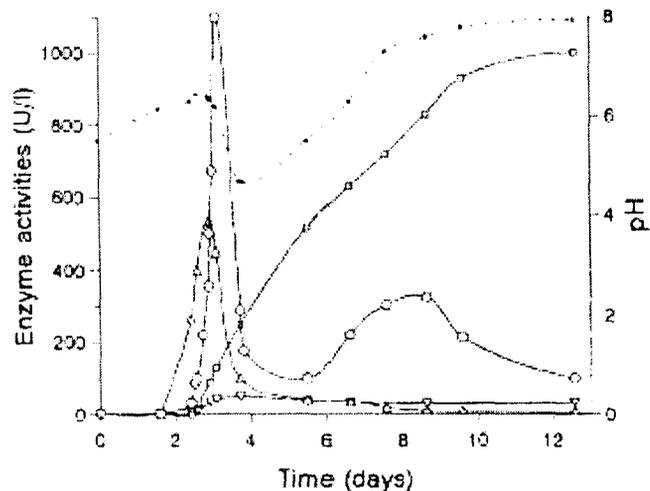


Fig. 7. Actividad de las diferentes enzimas durante 13 días de crecimiento de *Pleurotus pulmonarius* en Medio Líquido lacasa \triangle Aril Alcohol Oxidasa \square proteasa ∇ , peroxidasa \circ y pH(...)

Sin embargo, la estabilidad de la enzima se observó después de la adición con catalasa y Mn^{2+} . Se ha visto que entonces la producción de H_2O_2 por el hongo durante la oxidación de metabolitos aromáticos, es responsable de la desactivación de la peroxidasa y que la enzima puede protegerse en parte en presencia de otros azúcares reductores. En estudios sobre la estimación de peroxidasa, se ha observado que existe una secreción enzimática diferente para cultivos líquidos (Böckle B. y Col., 1999).

Como se ha visto en esta sección, la acción de las peroxidasas es importante para la deslignificación y en la oxidación de compuestos fenólicos importantes, en acción concertada con la enzima lacasa. La presencia de pequeñas cantidades de peróxido, provoca una acción catalizada por las peroxidasas en el medio donde crecen los hongos y esto también a su vez inactiva la oxidación enzimática de la enzima lacasa (Muñoz C. y Guillen F. 1997).

Böckle, Martínez y colaboradores (1997), hacen evidente una forma de inactivar a las enzimas MnP y LiP, por medio de la adición de 100 UE/mL de catalasa a los extractos obtenidos de hongos. Esto es importante para los fines que persigue esta tesis, ya que al cuantificarse las lacasas en extractos totales, la presencia de las peroxidasas influye en la estimación efectiva de la actividad de la enzima lacasa en las cepas de *Pleurotus*.

Otro aspecto importante, es que los sustratos utilizados para la determinación de la actividad enzimática de la lacasa, como son el ABTS y la Siringaldazina, no son tan específicos para la determinación de lacasas. Esto hace énfasis en inactivar a las enzimas peroxidasas en los extractos obtenidos del micelio de *Pleurotus*.

Por otro lado, se han descubierto algunas isoenzimas de las lacasas con propiedades interesantes, que podrían ser útiles con fines aplicativos, como es la búsqueda de enzimas con características especiales: termotolerantes, resistentes a las condiciones drásticas de pH o a catalizar reacciones en fase no acuosa, degradación de colorantes, etc. Este aspecto se tocará en la siguiente sección.

Isoenzimas de lacasa en otros hongos

Otros hongos como *Pleurotus eryngii*, generan una gran variedad de lacasas, con propiedades distintas (isoenzimas). La importancia de su actividad y el probar distintos sustratos, las ha llevado a purificar, por diversas técnicas, con un rendimiento variable (figura 8 y tabla 5).

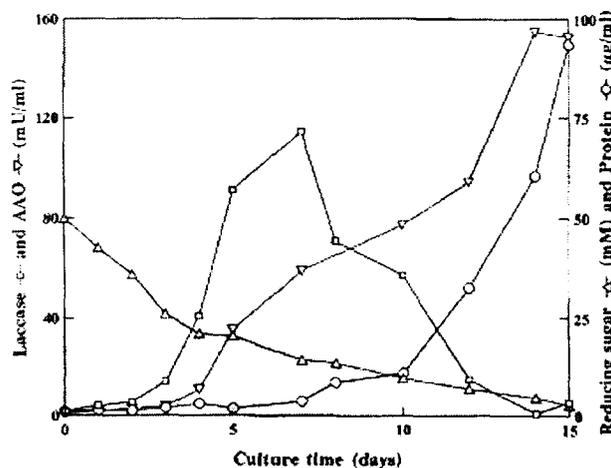


Figura 8. Registro de la actividad de las lacasas y AAO, proteína y azúcares reductores en cultivos de *Pleurotus eryngii*

Tabla 5. Purificación de isoenzimas de lacasas de *P. eryngii*

Etapa	Actividad (U)	Proteína (mg)	Rendimiento (%)	Actividad Específica (UE/mg)	Factor de Pureza
Cultivo Líquido	250	19	100	12.8	1.0
Ultrafiltración	237.5	5.02	95.0	47.3	3.7
Shephadex G-100	228.4	1.55	91.3	147.4	11.5
Mono-Q (1°)					
Lacasa I	128.3	0.26	51.3	492.3	38.5
Lacasa II	82.4	0.25	32.8	329.6	25.7
Mono-Q (2°)					
Lacasa I	85.5	0.17	34.2	502.9	39.3
Lacasa II	65.7	0.12	26.3	547.5	42.8
Superosa (Lacasa I)	75.0	0.14	30.0	535.7	41.9

Las lacasas fueron purificadas a partir de 3 litros de cultivo. La actividad fue calculada con 0.05 mM de siringaldazina como sustrato (Muñoz y Col., 1997)

Las lacasas I y II de este hongo son gluco-proteínas monoméricas con 7% y 1% de contenido de carbohidratos, masa molecular (por PAGE-SDS) de 65 y 61 KDa, y con pI de 4.1 y 4.2, respectivamente. Ambas isoenzimas son estables a pH altos, reteniendo el 60 a 70% de actividad después de 24h hasta pH 8 a 12. La composición de aminoácidos y secuencias N-terminal fueron determinadas, difiriendo altamente de las lacasas de otros basidiomicetes. La aplicación de anticuerpos contra la lacasa I han sido probadas con la lacasa II, así como con las lacasas de *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* y *P. florindannus* (Muñoz C. y Guillen F., 1997).

La oxidación de diferentes fenoles hidroxilados y metoxilados y aminas aromáticas, por las dos isoenzimas de lacasas de *P. eryngii* ha sido variable, debido a la naturaleza, número y disposición de grupos funcionales en los anillos aromáticos sobre las constantes cinéticas (tabla 6). Ambas presentan afinidades similares, la tasa máxima de reacción catalizada por la lacasa I fue más alta que para la Lacasa II. En reacciones con hidroquinona y semiquinonas producidas por isoenzimas de lacasa, fueron producidas quinonas vía enzimática y en segundo término por un reacomodo de electrones.

Tabla 6. Constantes cinéticas de las lacasas de *P. eryngii*

Compuesto	λ (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Lacasa I			Lacasa II		
			K _{cat} (mM)	V _{max} (U/mg)	V _{max} /K _{cat}	K _{cat} (mM)	V _{max} (U/mg)	K _{cat} (mM)
p-amifenol	246	15627	08	5.0	6.2	1.0	0.8	0.8
p-anisidina	542	1173	3.1	20.6	6.6	3.3	17.9	5.4
p-Metoxifenol	253	4990	0.8	10.8	13.5	0.9	0.8	0.9
Guayacol	465	12100	7.6	5.9	0.8	8.0	1.3	0.2
Catecol	392	1456	2.2	32.1	14.6	4.1	15.4	3.8
Q H ₂	247	21028	4.6	21.2	4.6	2.5	2.6	1.0
Me QH ₂	250	21112	2.1	122.2	58.2	1.6	8.4	5.2
2,6-Dimetoxifenol	468	27500	1.4	54.2	38.7	0.4	3.3	8.2

Reacciones de las lacasas I y II con diferentes compuestos, en condiciones de amortiguador de acetatos 100 mM a pH 4 y 5.3 respectivamente. La λ y ϵ fueron usados por estimación espectrofotométrica de los productos de reacción formados (Muñoz y Col., 1997)

En la especie *Pleurotus* se han aislado varias isoenzimas de la lacasa con características especiales, como ya se observó. Este aspecto es importante ya que se necesitan integrar enzimas que puedan ser de aplicación industrial. Esto es importante, para los fines que esta investigación pretende aportar en el descubrimiento de enzimas que tengan vínculo con el crecimiento micelial de los basidiomicetes.

Utilización y búsqueda de mediadores de la lacasa

Las técnicas de blanqueamiento de la pulpa de papel con cloro o químicos con cloro como base, generan compuestos que son tóxicos en el ambiente. Los métodos de blanqueado enzimático han tomado mucha atención, puesto que las empresas necesitan reducir las cantidades de clorofenoles. Junto con la xilanasas, la lacasa se ha incluido en estos métodos por su versatilidad. A expensas de mediadores redox, la lacasa puede ser implementada en el blanqueamiento de la pulpa. La lacasa tiene importantes aplicaciones ya que también participa en la biosíntesis de la lignina, degradación de la pared celular de plantas, esclerotización en insectos, formación de melanina en bacterias y virulencia relacionada con la melanina en humanos.

Por otro lado el potencial redox de la enzima es crucial para la degradación, al natural o con compuestos fenólicos y no fenólicos, ya que las subunidades no fenólicas, son las más predominantes de las estructuras de la lignina en la madera, tienen altos potenciales redox.

227420

Por ello se había estudiado, que la peroxidasa es capaz de oxidar compuestos aromáticos no fenólicos con muy altos potenciales de ionización como el 1,2 dimetoxinbenzeno ($E_{1/2} = 1500\text{mV}$) y el alcohol veratrílico (Feng Xu., 1996).

Se creía que esta enzima era importante porque la lacasa no podía oxidar el alcohol veratrílico. Aunque se ha demostrado que la lacasa es capaz de oxidar algunos compuestos (mediadores redox) con un potencial redox alto, pero no se han demostrado los mecanismos de cómo se efectúa. Se han hecho muchos esfuerzos por buscar mediadores redox más efectivos para la lacasa, con el fin de degradación u oxidación de compuestos.

Feng Xu (1996) ha observado, que la lacasa puede degradar compuestos, ya que se han determinado los parámetros de lacasas puras, mediante a oxidación de dímeros β -O-4, que son las más predominantes subestructuras de la lignina y el rojo de fenol, usando mediadores. Las estructuras de los mediadores redox, que se probaron con las lacasas para este estudio fueron de cuatro fuentes: *Pycnoporus cinnabarinus*, *Trametes villosa*, *Myceliophthora termophila* y *Botrytis cinerea*. Un efectivo sistema mediador de la lacasa para la degradación de la lignina, puede tener las siguientes características: una alta K_{cat} para un mediador efectivo de lacasa, alto potencial redox y que sea resistente a la desactivación por radicales libres del mediador de la lacasa.

Los descubrimientos concernientes al papel que juegan las lacasas y en particular los mediadores tanto sintéticos y naturales en la biodegradación de la lignina, están apoyadas en varios fundamentos y estudios, sin embargo es posible que existan mecanismos que puedan ser descubiertos, para el funcionamiento de la lacasa y de otras enzimas cooperativas, apoyando las transformaciones del proceso ligninocelulósico e investigaciones referentes a la estructura en particular de las lacasas.

La fermentación en medio sólido

La fermentación en medio sólido es un proceso microbiano que ocurre principalmente sobre la superficie de materiales sólidos, que tienen la propiedad de absorber o contener agua con o sin nutrientes solubles y materiales que pueden ser o no biodegradables. Algunas características que determinan y controlan la fermentación en estado son: la humedad y aire necesarios en el soporte, para el crecimiento y cultivo de los microorganismos u hongos, el intercambio de gases (oxígeno y CO_2) a través de los poros del soporte, la salida de metabolitos secundarios y productos que posiblemente sean tóxicos para el crecimiento y control de la temperatura por medio de la circulación de los gases (Zadrazil F., 1992).

La variedad de productos que han sido obtenidos y las características de este proceso han sido extensivamente revisadas por Auria y colaboradores (1992). En fermentación en estado sólido, son usados generalmente los subproductos de la agricultura, en el cuál el crecimiento ocurre dentro o en la superficie de este. A causa de que el crecimiento está íntimamente ligado al soporte, es muy difícil el medir la biomasa directamente. Uno de los métodos más usados para estimar el crecimiento, es por medio del consumo de O_2 y/o producción de CO_2 . La estructura del fermentador cambia dependiendo del tipo de microorganismo cultivado y composición química del soporte.

Por otro lado los microorganismos invaden los poros disponibles y cambian la composición química del soporte, ya que el crecimiento cubre la superficie del soporte. La modificación del soporte por consecuencia del crecimiento cambia el coeficiente de transferencia del gas en este medio.

La fermentación en estado sólido, también se lleva a cabo en soportes inertes, como una alternativa a la fermentación en cultivo sumergido y en sustrato biodegradable.

En años recientes se ha reconocido las ventajas de la fermentación en medio sólido, sobre la fermentación en medio líquido, sobre todo en la producción de metabolitos fúngicos y en la producción de enzimas (Romero-Gómez y Col., 2000).

En fermentación en estado sólido, no existe un método universal para la determinación de la biomasa. El mismo problema existe en la fermentación sumergida. En muchos de los casos la estimación es esencial, para lo cual, existen métodos directos e indirectos. El escoger el camino por el cual se va a estimar, depende del proceso y su escala (laboratorio o industrial), el objetivo, la necesidad de que sea un método simple y rápido. La fermentación en medio sólido, también se utiliza para los alimentos, producción de enzimas y ácidos orgánicos.

El mismo problema se tiene en la estimación del crecimiento, es decir calcular la velocidad específica de crecimiento (μ), que es característica para cada especie de hongos, ya sean micromicetes, en este caso hongos filamentosos y/o macromicetes, como lo es *Pleurotus*.

A este respecto, Viniegra-González y colaboradores (1993) sugieren que los datos morfométricos, junto con un apropiado modelo cinético, es una manera de estimar la velocidad de crecimiento (μ), de los hongos crecidos en sustrato sólido. La validación de este sistema modelo, puede ayudar a mejorar la medición de diferentes especies de hongos y formulación de medios de cultivo a escala de laboratorio.

La aplicación práctica de este tipo de fermentación y su relación con el modelo matemático, esta relacionada al posible uso de *Aspergillus niger* para la producción de ácido cítrico por medio de fermentación sólida (Gutiérrez-Rojas y Col., 1995) como se indica a continuación:

$$\mu_{\text{calc}} \approx \frac{u_r \ln 2}{A L_{av} + B \ln(L_{av}/2D_h)}$$

(Viniegra-González G. y Col., 1997)

Estos modelos y otros ya propuestos relacionan las características morfológicas de los hongos, como son el **diámetro promedio de las hifas** (D_h [μm]), **velocidad de extensión radial** (u_r [$\mu\text{m}/\text{h}$]), **longitud promedio de la hifa en el cultivo** (L_{av}) y **constantes** que son específicas para cada especie de hongo (**A** y **B**). Este mismo modelo es utilizado para estimar la velocidad específica de crecimiento experimental en *Pleurotus*, modelo que ya fue aplicado en *Aspergillus niger* (Larralde-Corona P. y Col., 1997).

Prosser y Trinci (1979), en este campo de estudio, han propuesto un modelo de crecimiento hifal y de ramificación, que relaciona los eventos citológicos dentro de la hifa junto con la cinética de crecimiento miceliar. El modelo es capaz de predecir los cambios en la longitud hifal y el número y posición de las ramificaciones y septos. Este modelo se basa en los cambios en la concentración de vesículas y núcleos.

Prosser (1990), afirma que son tres los mecanismos que contribuyen a la formación del micelio. Primero: que el crecimiento se comporta en forma polarizada, es decir, un crecimiento en los extremos de las hifas, además de que las hifas se extienden en sus puntas. Esta característica permite que las hifas alcancen una velocidad de extensión elevada. Del mismo modo la longitud de las hifas (el crecimiento en la zona periférica), contribuye al crecimiento en pequeñas zonas hacia sus puntas (extensión radial). Segundo: que la frecuencia de iniciación de las ramificaciones esta cuidadosamente regulada. Por último, que los mecanismos, como el autotropismo, regulan la distribución espacial de la hifa dentro del micelio.

Esto sugiere que la iniciación de la ramificación puede estar regulada por un sistema, involucra la producción, absorción y distribución de vesículas dentro del micelio. Las vesículas iniciarán el engrosamiento de la pared celular de la hifa ayudando a la extensión de la misma (Prosser J. I. y Trinci A. P. J. y 1979), pero también tendrán la función de transporte, tanto de metabolitos importantes para los hongos, como de enzimas que permiten la degradación, y posteriormente estas vesículas se encargarán del transporte interno para asimilación de nutrientes.

La producción enzimática por fermentación sólida, aplicada a los hongos es una alternativa viable. Se han comparado la producción de enzimas por fermentación sólida y líquida, sugiriendo que la fermentación en medio sólido es más productiva que la fermentación en medio líquido. Las principales ventajas de la fermentación sólida es la menor represión catabólica para la producción de enzimas. Se han utilizado como soportes, desechos agrícolas como bagazo de caña.

Sin embargo una de las desventajas de la fermentación sólida es el uso de materiales biodegradables, debido a la dificultad para medir la biomasa producida, que nos proporciona la velocidad de crecimiento de los microorganismos (Zhu Y. y Col., 1996). Para solucionar este problema, fue utilizada la espuma de poliuretano (PUF), para la producción de enzimas de hongos (Zhu Y. y Col., 1996).

La espuma de poliuretano ha sido utilizada como soporte sólido en la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger* (Young H. y Col., 1989; Romero-Gómez y Col., 2000), ácido fumárico por *Rhizopus arrhizus* y en la producción de enzimas (Zhu Y. y Col., 1996). En la fermentación sólida utilizando espuma de poliuretano, se utiliza un exceso de agua y la pureza que ofrece durante la extracción de enzimas o cuantificación de biomasa es formidable, y su principal ventaja es que es un soporte inerte, no degradable. Los resultados son reproducibles al utilizarlo para el crecimiento (Zhu Y. y Col., 1996).

En el caso del micelio de macromicetes, como *Pleurotus*, nunca se ha utilizado este tipo de soporte inerte, esto abre un campo importante para su utilización con fines en la estimación de la velocidad de crecimiento e inclusive de la formación de cuerpos fructíferos para estimar la eficiencia biológica, que tanta variabilidad produce en la estimación estadística.

En este estudio se ha propuesto la utilización de la espuma de poliuretano para el crecimiento de *Pleurotus*, como un soporte inerte, que permite una adecuada estimación de la biomasa, además de facilitar una extracción de las enzimas y una cuantificación adecuada de la actividad de la lacasa en extractos provenientes del micelio, dependiendo de la etapa de crecimiento de los basidiomicetes, aplicándose los modelos antes mencionados.

OBJETIVOS

Objetivo General

Contribuir al estudio del papel de las enzimas lacasas en la morfogénesis de las especies del género *Pleurotus* mediante la caracterización de las enzimas lacasas del micelio en estadio joven y maduro de *Pleurotus pulmonarius* (HKPPI27) y *Pleurotus ostreatus* (UATPo7).

Objetivos Particulares:

- Aplicar métodos histoquímicos y bioquímicos, para determinar la temporalidad y localización y características de las enzimas lacasas del micelio maduro y joven de *Pleurotus*, crecido sobre poliuretano (PUF).
- Desarrollar un modelo cinético espacial de la producción de lacasas durante el desarrollo del micelio de *Pleurotus* sobre PUF.
- Comparar las propiedades de las enzimas lacasas producidas por *Pleurotus*.
- Caracterizar la distribución temporal y espacial de la actividad enzimática de la lacasa, durante el desarrollo de dos especies de *Pleurotus* y determinar sus posibles diferencias moleculares.

HIPÓTESIS

- La producción de lacasas que oxidan fenoles en las cepas de *Pleurotus ostreatus* (Po7) y *Pleurotus pulmonarius* (Pp127) puede cambiar durante el proceso de crecimiento micelial, desde la etapa joven a la madura y depende del tipo de cepa utilizada.
- Se supone que las enzimas lacasas, juegan un papel importante en la morfogénesis de *Pleurotus* y que su actividad enzimática esta asociada primariamente, con la emergencia de hifas maduras y que después se difunden hacia el resto del micelio.
- Se supone que esta actividad enzimática se expresa al final del crecimiento micelial del hongo
- Se supone que las distintas especies de *Pleurotus*, pueden producir diversas isoformas de la lacasa con distintas propiedades fisicoquímicas.

JUSTIFICACIÓN

Algunas especies de genero *Pleurotus*, han tenido repercusiones comerciales y de investigación actual profundas. En el campo de la investigación se ha tratado de verificar como se efectúa la degradación natural de los hongos en general y la cooperación de las diferentes enzimas, pero los mecanismos aún son poco conocidos tanto en esta área, como en la de efectos fisiológicos *in vivo*.

Por otro lado, las enzimas de algunos hongos han tenido un auge pleno industrialmente, por ser versátiles en propiedades bioquímicas y por su producción fisiológica abundante. Una de estas enzimas es la lacasa, que en los años recientes ha sobresalido por poseer todas estas virtudes.

Las lacasas se han tratado de purificar, pero los métodos aplicados para ello son bastante largos, para finalmente obtener una pureza enzimática adecuada. Se ha buscado una manera segura de cuantificación de la actividad en extractos enzimáticos mediante la desactivación de otro tipo de enzimas que puedan participar en los extractos enzimáticos, como las peroxidasa. Se ha investigado que las enzimas Ligninoperoxidasa (LiP) y Manganese peroxidasa (MnP) están ausentes en la especie *Pleurotus ostreatus*, pero que esta especie posee dos oxidasa descubiertas por Young-Hoon Han y colaboradores (1996), la D-glucosa oxidasa y la peroxidasa extracelular (PoP) como generadoras de H₂O₂. En la especie *Pleurotus pulmonarius* se han detectado peroxidasa (Böckle B. y Col., 1999). Una forma de desactivación de estas peroxidasa es la utilización de catalasa que es dependiente de peróxido con el fin de que estas enzimas sean desactivadas.

Se han hecho estudios sobre los sustratos más adecuados para medición de la actividad de las lacasas, aunque la gran mayoría son inespecíficos, ya que también pueden ser oxidados por las peroxidasa. Entre los más utilizados esta el ABTS (Bourbonais R., 1999) y la siringaldazina, que es el más específico para las lacasas (Leonowicz A. y Grzywnowicz A., 1980).

Por otro lado, se han efectuado los estudios sobre el crecimiento de algunas especies de hongos micromicetes, en espuma de poliuretano (PUF) (Romero-Gómez S. J. y Col., 2000), con la finalidad de síntesis y secreción de enzimas de interés, ya que es una manera limpia y fácil para su obtención. Este tipo de soporte no biodegradable, no se ha aplicado en particular sobre especies de basidiomicetes como *Pleurotus*, hasta años recientes (Dombrowskaia E. N. y Col., 1997).

Lo anterior hace más atractivo el aislamiento y el estudio de las lacasas del género *Pleurotus*, que por lo general se ha cultivado sobre desechos agroindustriales (Mata G. y Martínez-Carrera D., 1988), y que no permiten una extracción enzimática adecuada.

Se sabe que los hongos ligninolíticos son productores considerables de lacasas en forma natural, pero en cultivo sólido o líquido, en algunas especie de *Pleurotus*, la producción se ve disminuida por los fenómenos de represión catabólica. Las investigaciones hechas para una mayor producción de lacasas (Koroljova-Skorobogat'ko y Col.,1998; Das N y Col., 1997; Palmieri G. y Col., 2000), permiten que se obtengan en cantidades considerables durante el cultivo de *Pleurotus*, por medio de la utilización de inductores de estas enzimas.

Las investigaciones con las especies *Pleurotus*, han mostrado que pueden producir una cantidad considerable de lacasas con respecto al tiempo de crecimiento y que posiblemente esta enzima tiene vínculos con el crecimiento micelial, además del desarrollo de carpóforos (Das N. y Col., 1997). El seguimiento de los patrones enzimáticos de *Pleurotus*, ayudará en la mejoría de las condiciones de producción y calidad de las cepas utilizadas, pudiéndose plantear como una forma más de selección de cepas con alta capacidad ligninolítica, además de la posibilidad de identificar nuevas lacasas con propiedades interesantes.

Obtención de las cepas inicial

A partir de cepas *Pleurotus pulmonarius* (HKPPI27) y *Pleurotus ostreatus* (UATPo7) (proporcionadas por el laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala) se inocularon cajas de Petri con agar extracto de malta (33.6 g/L), e incubaron durante un periodo de 12 días de crecimiento, a una temperatura de 25°C.

Obtención de la cepa maestra

Se inocularon cepas del hongo *Pleurotus ostreatus* (UATPo7) y *Pleurotus pulmonarius* (HKPPI27) provenientes de cajas con agar extracto de malta (33.6 g/L) en condiciones de esterilidad, en matraces Erlenmeyer conteniendo 2 g de cubos de poliuretano de 0.25 cm por lado, impregnados con 20 mL de extracto de malta líquido (33.6 g/L, Bioxon). Los matraces fueron incubados de 12 a 14 días a 28° C y en condiciones de oscuridad para la invasión micelial. Se incubaron matraces Erlenmeyer con un medio mínimo para verificar si existía la degradación del soporte (0.50 g MgSO₄, 0.46 KH₂PO₄, 1.0 g K₂PO₄, 20.0 g dextrosa) (Martínez C. y Cruz F., 1982), con una proporción de 20 mL de líquido por dos gramos de soporte.

Inoculación en cajas de Petri con discos de poliuretano (PUF)

Se prepararon cajas de Petri conteniendo discos de poliuretano de 7 cm de diámetro, para inoculación en condiciones estériles, a partir de inóculos con micelio provenientes de los matraces con las cepas UATPo7 y HKPPI27. Los discos fueron impregnados con 20 mL de medio de cultivo extracto de malta (33.6 g/L, Bioxon) conteniendo ácido tánico (0.001M, Sigma) y CuSO₄ (0.0015M, Sigma) como inductores de lacasas. Las cajas fueron incubadas en oscuridad durante periodos de 3, 5, 7, 9, 12, 15, 18, 21 días de crecimiento a temperatura entre 27-29° C.

Determinación de la Masa Micelial

Las determinaciones de masa micelial se efectuaron a los 3, 5, 7, 9, 13, 15 y 21 días de crecimiento por triplicado. Se determinó la extensión radial total de la colonia. El disco se tomó, con unas pinzas de disección y fue colocado en un embudo de talle largo, para su posterior lavado, evitando arrastrar el micelio y secado en una estufa a 40° C, durante 10-12 h y se calculó el crecimiento por diferencia de peso.

Se determinó la velocidad específica de crecimiento, por medio de la siguiente relación.

$$dx/dt = \mu x$$

$$\frac{dx}{dt} = \mu [1 - x/K] x$$

227426

integrando entre x_0 y x en un tiempo 0 a t y $t \rightarrow \infty$ a $x \rightarrow k$ (ecuación 1)

$$x_{calc} = \frac{K}{1 + ((K-x_0)/K) * e^{-\mu t}}$$

Donde:

μ es la velocidad específica de crecimiento

K es la capacidad máxima de carga o de densidad de la población de hifas en el sustrato, que esta limitada por los nutrientes o por el espacio físico

x es la cantidad de micelio producido en un tiempo t

x_0 es el inoculo con el cual se inicia el cultivo

Esta ecuación esta justificada cuando la concentración del sustrato limitante en el cultivo, es mucho menor que el K_s , porque según Monod (1942).

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S}$$

Donde:

S = concentración de sustrato

μ = velocidad específica de crecimiento

K_s = constante de disociación del complejo enzimático

Ecuación de Monod

Si $S \gg K_s$ y $\mu \approx \mu_{max}$.

Para estimar en buena medida el crecimiento de las cepas de *Pleurotus*, fue usada la ecuación propuesta por Larralde-Corona, Viniegra-González y colaboradores (1997) (ecuación 2).

$$\mu_{\text{calc}} \approx \frac{u \cdot \ln 2}{A L_{\text{av}} + B \ln(L_{\text{av}}/2D_h)}$$

Se calcularon los parámetros fisiológicos A y B, característicos de cada cepa de *Pleurotus*, basándose en la velocidad de crecimiento calculado por la ecuación 1.

Tinción convencional y selectiva de hifas de *Pleurotus*

A las colonias de *Pleurotus* desarrolladas sobre PUF, se le adicionó 10 mL de azul de toluidina 1% (Hycel de México) en ácido bórico (J. T. Baker) al 1%, dejando teñir durante un periodo de 10 minutos. Se eliminó el colorante por decantación y se adicionaron 20 mL de agua destilada agitando por 1 minuto para eliminar el exceso de colorante. El micelio central es teñido, pero no el de los alrededores. La técnica se confirma por microscopía y densitometría, para evaluar con una mayor certeza el área de tinción de hifas jóvenes y maduras (Sánchez C. y Moore D., 1999).

Extracción enzimática de la lacasa de *Pleurotus*

Las determinaciones se efectuaron a los 3, 5, 7, 9, 13, 15 y 21 días de crecimiento en discos de poliuretano, con crecimiento micelial diferenciado en zonas maduras y jóvenes, determinando la intensidad de color, por medio de un analizador de imágenes acoplado a un microscopio (Zeiss). Cada zona fue aislada por medio de un bisturí y tomadas con pinzas de disección y colocadas en un embudo de talle largo. Posteriormente se efectuaron lavados con agua destilada, evitando arrastrar el micelio y se colectaron las aguas de filtración. Se colocó en un mortero la zona diferenciada de poliuretano invadida de la colonia, adicionando con precaución nitrógeno líquido y se molió hasta obtener un polvo fino. Se adicionaron 10 mL de buffer de acetatos pH 5 para la cepa *P. ostreatus* y 5.5 para la cepa *P. pulmonarius*, a concentración 0.1M.

Se filtró al vacío el extracto primeramente por medio de un papel Whatman No 42 y posteriormente con un papel Millipor No 2 y se recolectó el filtrado en un tubo de centrifuga. Se adicionaron 30 mL de acetona incubada en frío (hielo, acetona y sal), a los tubos con extracto proveniente del micelio y de las aguas de filtración y se centrifugó a 10,000 rpm a -4°C durante 15 minutos.

Eliminado el sobrenadante se conservó el precipitado. Se secaron los restos de acetona por medio de aire para evaporar totalmente. Se añadieron 0.3 mL (300 μ L) de amortiguador de acetatos con un pH 3, 4, 5 y 6; y de fosfatos a pH 7 u 8 a una concentración 1M, conteniendo una mezcla de inhibidor de proteasas (50 μ L de inhibidor de proteasa por 1g de hongos o levaduras, Sigma) y 100 U/mL de catalasa (catalasa, Sigma) (1999), y se adicionaron 2.7 mL de agua desionizada. Se efectuó una prueba de medición de proteína para determinar la cantidad extraída (Böckle B. y Col., 1999).

Determinación de los patrones de actividad enzimática para las cepas de *Pleurotus* crecidas en PUF

Se inocularon cepas de *Pleurotus*, como se indicó en la sección de **inoculación en cajas de Petri con PUF**, incluyendo los inductores enzimáticos CuSO_4 y ácido tánico a la misma concentración y además se añadió al medio de cultivo extracto malta (33.6 g/L), una cantidad de ABTS en una concentración 5mM, que actuó como patrón de seguimiento de la actividad lacasa. Las cajas fueron incubadas durante 21 días y se fotografiaron durante este periodo. La prueba tiene como finalidad verificar, de una forma fácil, si las enzimas generadas están asociadas al crecimiento o son extracelulares.

Determinación de proteína total (proteína unida a colorante) Bradford

Se determinó la cantidad de proteína total proveniente de los extractos del micelio en estadio joven y maduro de las cepas UATPo7 y HKPPI27, para los distintos días de crecimiento (3, 5, 7, 9, 12, 15, 18 y 21 días) en caja de Petri con poliuretano. Se tomaron 800 μ L de extracto en buffer de acetatos 0.1M a pH 5 y 5.5, añadiendo 200 μ L de reactivo de Bradford (Sigma). La reacción se efectuó por 5 minutos y posteriormente se leyó espectrofotométricamente, en celdas de acrílico a 595nm. Se calculó la cantidad de proteína, tomando como base una curva patrón de seroalbúmina bovina en solución de NaCl 0.15M a concentraciones de 1.25, 2.5, 5, 8.3, 12.5 y 25 μ g/mL.

Se efectuó una curva de la cantidad de proteína extraída contra el tiempo de invasión del soporte para los dos estadios de crecimiento. Para cada una de las determinaciones posteriores, la cantidad proteica se determinó por este método de Bradford (Bradford M., 1976).

Estimación de los parámetros cinéticos K_m y V_{max} de la lacasa con siringaldazina

Se colocaron y etiquetaron 9 tubos de ensaye limpios y secos en una gradilla. Se les adicionaron las siguientes cantidades para el ensayo siringaldazina 0.5 mM en metanol grado HPLC, para medir la actividad de las lacasas extraídas del micelio total, con amortiguador de acetatos 1M, para las cepas UATPo7 a pH 5 y HKPPI27 a pH 5.5 (tabla 8).

Tabla 8. Ensayo para la determinación de K_m y V_{max} de las lacasas de la especie *Pleurotus*

Tubo No.	Amortiguador de acetatos 1M pH 5 ó 5.5 (µL)	H ₂ Od (µL)	Extracto (µL)	Siringaldazina 0.5 mM (µL)	Concent. (mM)
B	100	800	0	100	
1	100	795	100	5	0.0025
2	100	790	100	10	0.005
3	100	780	100	20	0.01
4	100	760	100	40	0.02
5	100	740	100	60	0.03
6	100	720	100	80	0.04
7	100	700	100	100	0.05
8	100	600	100	200	0.1
9	100	500	100	300	0.15

Se efectuó la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 530 nm para el ensayo con Siringaldazina, determinando la actividad lacasa por lapsos de 15 segundos durante 2 minutos, en espectrofotómetro (Beckman). Una unidad de actividad enzimática, se definió como el incremento de una unidad de absorbancia/min en un mililitro, la actividad específica se definió como unidades de enzima/mg de proteína.

Determinación del efecto del pH sobre la actividad de la lacasa

Se distribuyeron en tubos de ensaye, diferentes cantidades del extracto proveniente del micelio total de *Pleurotus*, con el fin de determinar el pH óptimo de actividad de la lacasa con siringaldazina (tabla 9). Los amortiguadores correspondientes al pH de 3, 4, 5 y 6 son de acetatos, los amortiguadores a pH 6 y 7 son de fosfatos a una concentración 1M. Cabe resaltar que los amortiguadores utilizados contienen 50µL de inhibidor de proteasas y catalasa en una concentración de 100 U/mL (Sigma).

Tabla 9. Ensayo del efecto del pH sobre la actividad de las lacasas de *Pleurotus*

Tubo No.	Amortiguador 1		H ₂ O _d (μL)	Extracto (μL)	Siringaldazina 0.5 mM (μL)	Concent. (mM)
	M (μL)					
pH3 B	100		800	0	100	
pH3	100		700	100	100	0.05
pH4 B	100		800	0	100	
pH4	100		700	100	100	0.05
pH5 B	100		800	0	100	
pH5	100		700	100	100	0.05
pH6 B	100		800	0	100	
pH6	100		700	100	100	0.05
pH7 B	100		800	0	100	
pH7	100		700	100	100	0.05
pH8 B	100		800	0	100	
pH8	100		700	100	100	0.05

Se determinó la actividad espectrofotométricamente a 530 nm para siringaldazina, por lapsos de 15 segundos durante 2 minutos en un espectrofotómetro Beckman.

Determinación de la actividad zimográfica de la lacasa de *Pleurotus*

Se preparó la solución de monómero por combinación de todos los reactivos elaborados para la electroforesis mencionados en la **tabla 12**, excepto el persulfato de amonio (APS) (Biorad) y N,N,N',N'-tetrametil etilen diamina (TEMED) (Biorad) que se adicionaron al final de la mezcla con el fin de que polimerizara, de acuerdo a las siguientes cantidades para un gel al 10% (**tabla 10**).

Tabla 10. Preparación del gel de separación

Reactivo	12%	7.5%	10%
Agua Destilada	3.35 mL	4.85 mL	3.95 mL
1.5 M Tris-HCl<8.8	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
SDS al 10% (w/v)	100μL	100μL	100μL
Acilamida/bis (30%)	4.0 mL	2.5 mL	3.33 mL
APS 10% (Fresco)	50μL	50μL	75μL
TEMED	5μL	5μL	7.5μL
Monómero Total	10 mL	10 mL	10mL

Para hacer el APS al 10% (disuelva 100 mg de APS en 1 mL de agua desionizada)

Se adicionaron 3.5 mL de esta solución en el aparato de moldeado para polimerizar el gel (aproximadamente 45 minutos), evitando que existan fugas en el sistema. Posteriormente se preparó el gel de apilamiento por medio de la adición de los siguientes componentes mencionados en la **tabla 11** y se colocó el peine.

Tabla 11. Preparación del gel de apilamiento al 4%, 0.125M Tris pH 6.8.

Reactivo	4%
Agua Destilada	6 mL
1.5 M Tris-HCl<6.8	2.5 mL
SDS al 10% (w/v)	100µL
Acilamida/bis (30%)	1.33 mL
APS 10% (Fresco)	50µL
TEMED	10µL
Monómero Total	10 mL

Se adicionó amortiguador 1X de corrimiento (dilución de 60 mL del stock 5X, pH 8.3 con 240 mL de agua desionizada), en almacén intermedio de amortiguador hasta un nivel mayor al de los pocillos formados. Se prepararon las muestras en una dilución 1:4 con el buffer de muestra sin agente desnaturante y a la misma concentración, en un tubo Ependorf de 500 µL e incubó en frío hasta la carga.

Se efectuaron replicas con agente desnaturante, mercaptoetanol y dodecil sulfato de sodio (SDS) en el buffer de muestra, e incubó a 95°C durante 4 minutos. Se adicionaron con precaución a cada pocillo 15 µL de esta muestra, incluyéndose en cada gel un patrón de proteínas de bajo peso molecular (Biorad). Se corrieron geles de electroforesis programando la fuente de poder a 180 V durante 45 minutos y 400 mA. Una vez realizado el corrimiento, se desmontó el aparato y con mucho cuidado se retiraron las placas para separar el gel. Se procedió a lavarlo con agua desionizada y a teñirlo con azul de Coomassie para efectuar la zimografía (Laemmli U., K., 1970).

Tabla 12. Reactivos para la preparación de geles de poliacrilamida (PAGE)

Solución	Reactivo	Cantidad/ 50mL	Cantidad/ 100mL
A	Acrilamida/bis (30% T, 2.67% C)	14.6 g	29.5g
	N, N-bis-metilenacrilamida	0.4 g	0.8
Almacenar a 4°C en oscuridad 30 días máximo			
B	1.5M Tris-HCl pH 8.8		
	Tris-Base	18.15 g	18.15
	Agua desionizada	≈80 ml.	
Ajustar el pH 8.8 con HCl 6N, hacer hasta 100 mL almacenar a 4°C			
C	0.5M Tris-HCl, pH 6.8		
	Tris Base	6 g	
	H ₂ O _d	60 ml.	
Ajustar el pH 6.8 con HCl y aforar a 100 mL			
D	10% de Dodecil Sulfato de Sodio		
	SDS	10 g	
	H ₂ O _d	90 ml.	
Agitar levemente y aforar a 100 mL			
E	Buffer de Muestra	40 mL Total	8 mL Total
	0.5 M Tris-HCl pH 6.8	5 ml.	1 ml.
	H ₂ O desionizada	19 ml.	3.8 ml.
	Glicerol	4 ml.	0.8 ml.
	*10% w/v SDS	8 ml.	1.6 ml.
	*2 Mercaptoetanol	2 ml.	0.4 ml.
	1% Azul de Bromofenol (0.1g/10ml)	2ml.	0.4 ml.
Diluir la muestra 1:4 y calentar a 95°C 4 minutos, sin desnaturalizar no se aplican (**)			
F	Buffer de Corrida 5X pH 8.3	500 mL Total	
	Tris -Base	7.5 g	15 g/l.
	Glicina	36 g	72 g/l.
	SDS	2.5 g	5 g/l.
≈ 450 mL agregar todos los reactivos y agitar levemente, Almacenar a 4°C. Si ocurre precipitación incubar a temperatura ambiente			
G	Solución de Revelado de Gel		
	Azul de Coomassie 0.1%	0.5 g/500 ml.	0.1 g/100 ml.
	Metanol 40%	200 ml./500 ml.	40 ml./ 100 ml.
	Ácido Acético Glacial	50 ml./ 500 ml.	10 ml./ 100 ml.
H	Solución de Desteñido de Gel		
	Metanol 40%	200 ml./500 ml.	40 ml./ 100 ml.
	Ácido Acético Glacial	50 ml./ 500 ml.	10 ml./ 100 ml.

(Laemmli U., K., 1970)

Actividad zimográfica de la lacasa

Se suspendió el gel de electroforesis sin agentes desnaturalizantes (mercaptoetanol y SDS, sin calentamiento a 95°C) y corrido en frío, en 15 mL de siringaldazina por 5 a 10 minutos, para situar las bandas con actividad lacasa (**tabla 13**).

Tabla 13. Solución de actividad zimográfica para gel PAGE

Reactivo	Cantidad
Amortiguador de Acetatos pH5 1M	1.5 mL
Agua Desionizada	12 mL
Siringaldazina 0.5mM	1.5 mL

Una vez mostrada la actividad, el gel se fijó en papel celofán y éstos, se suspendieron en una solución de glicerol al 10% e isopropanol al 20% y se colocaron en un cuadro extensor de acrílico. Se procedió a secarlo por medio de un ventilador de aire caliente por 20 minutos, se enfrió a temperatura ambiente y se recortó.

Determinación del punto isoelectrico (pI)

Se precipitó por medio de acetona al 75% en frío, 1g de proteína proveniente del micelio de las cepas UATPo7 y HKPPI27. La proteína fue disuelta en una disolución de 2mL de rotolitos de amplio rango (pH 3-10) (Biorad) en 48 mL de agua desionizada e inyectada en un aparato rotoford (Biorad), efectuando el corrimiento por un periodo de 4 horas hasta alcanzar un voltaje estable y a una temperatura de 4°C. Las fracciones fueron colectadas al vacío en tubos de ensaye, se verificó el pH de cada fracción y se midió la actividad con siringaldazina por periodos de 15 segundos durante 2 minutos. Las fracciones que presentaron actividad fueron corridas en el gel de zimografía para determinar la cantidad de enzimas (Dhugga y Col., 1991).

Estimación de la temperatura óptima de actividad y estabilidad medida por zimografía

A partir de la proteína precipitada de los extractos enzimáticos del micelio de las cepas evaluadas, crecidas a los 21 días, se efectuó la incubación a temperaturas de 10, 20, 30, 40, 45, 50, 55 y 60°C, en amortiguador de acetatos 0.1M con catalasa (100 U/mL).

La proteína obtenida de la cepa UATPo7 se suspendió en amortiguador de acetatos 0.1M pH 5 y para la cepa HKPPI27 en amortiguador a pH 5.5. La determinación espectrofotométrica de la actividad se efectuó a 530 nm con siringaldazina, en un espectrofotómetro UV-160A SHIMADZU, estimándose cada 15 segundos hasta un periodo de 2 minutos.

Se determinó la velocidad de reacción a las temperaturas indicadas y se estimó la constante de activación y desactivación por medio de la ecuación de Arrhenius, así como la temperatura óptima de actividad.

La temperatura afecta el crecimiento de manera notable, principalmente porque los microorganismos de una especie solo pueden crecer en un intervalo restringido de temperatura. La ecuación de Arrhenius es en teoría, la más frecuentemente empleada, para relacionar la dependencia de la temperatura sobre la velocidad de reacción en el campo de las enzimas (1889). A medida que aumenta la temperatura ocurren dos reacciones simultáneas:

1. La velocidad de reacción aumenta como sucede en la mayoría de las reacciones químicas.
2. La estabilidad de la enzima disminuye por inactivación térmica.

Las constantes de reacción aumentan con la temperatura, de acuerdo con la ecuación de Arrhenius. Esta relación se expresa matemáticamente como sigue:

$$k = A \exp^{-E_a/RT}$$

o en su forma lineal:

$$\log k = \frac{E_a}{2.3 R} \frac{1}{T} + \log A$$

La forma integrada de la ecuación de Arrhenius es:

$$\log \frac{k_2}{k_1} = \frac{E_a}{2.3 R} \times \frac{(T_2 - T_1)}{T_2 T_1}$$

k_1 y k_2 = son las constantes específicas de reacción (activación o desactivación (min^{-1}) a las temperaturas T_1 y T_2

A = factor de frecuencia (min^{-1})

E_a = energía de activación o desactivación (Kcal/mol)

R = constante universal de los gases (Kcal/mol °K)

T = temperatura de incubación (°K)

Por otra parte se incubó la proteína extraída por 20 minutos, a las diferentes temperaturas y fueron corridas a la misma concentración en un gel de zimografía, sin agentes desnaturalizantes para determinar el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática con siringaldazina 0.5mM en etanol como sustrato.

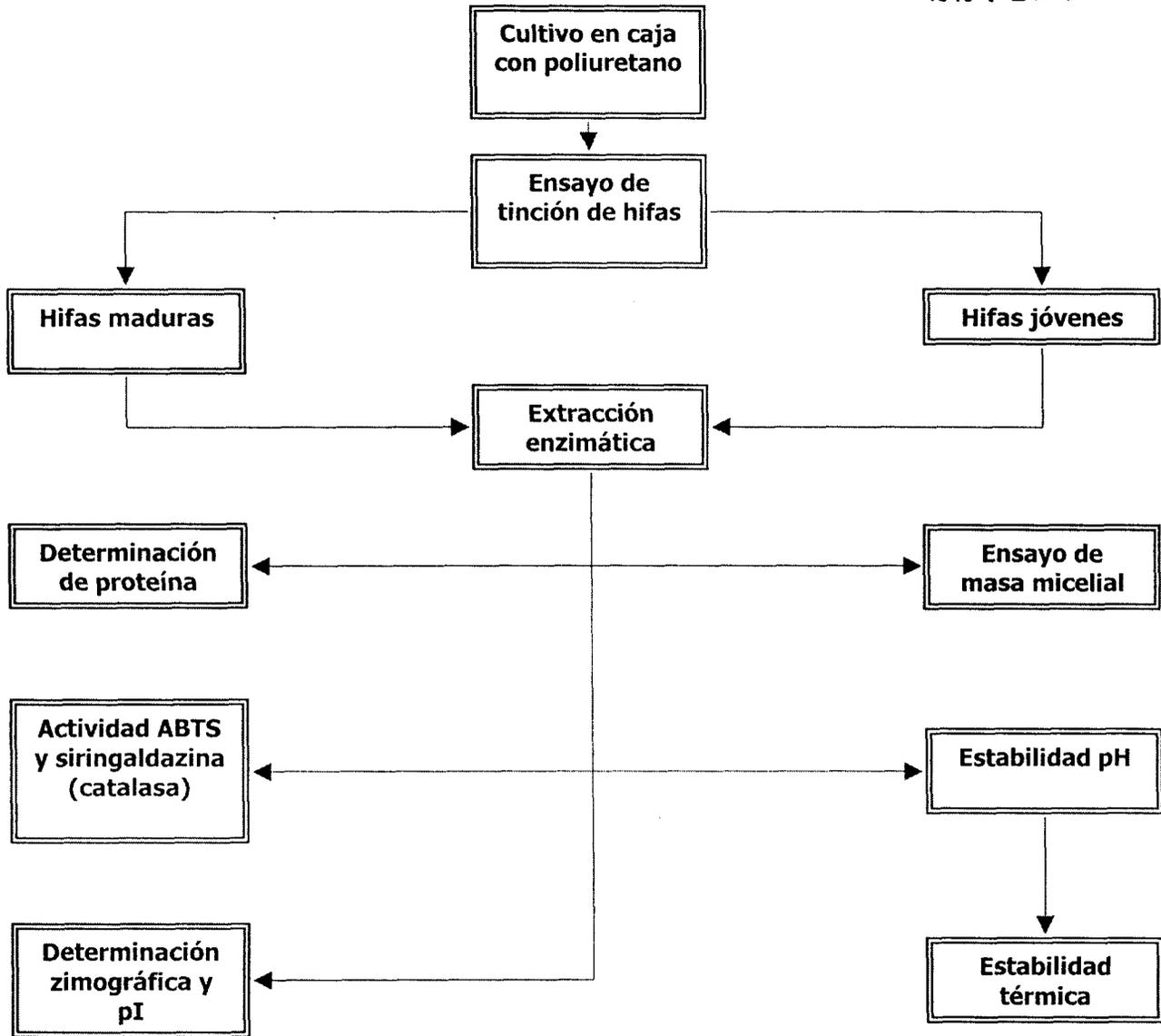
Determinación de la estabilidad térmica de la lacasa de *Pleurotus*

Se incubaron los extractos proteicos de las cepas UATPo7 y HKPPI27, 5°C por arriba de la temperatura óptima, determinándose la actividad lacasa por periodos de 30 minutos, hasta obtener una mínima actividad. La determinación espectrofotométrica de la actividad para cada periodo, fue obtenida por lapsos de 15 segundos hasta un tiempo de dos minutos, a una longitud de onda de 530 nm, con siringaldazina 0.5 mM en etanol como sustrato.

RESULTADOS

El diseño experimental de este trabajo, sobre las lacasa de las cepas de *Pleurotus pulmonarius* (HKPP127) y *Pleurotus ostreatus* (UATPo7), se muestra en el siguiente esquema. En los apartados siguientes se desarrollarán cada uno de estos.

227420



Obtención de cepas de *Pleurotus*

Cepas de *Pleurotus ostreatus* (UATPo7) y *Pleurotus pulmonarius* (HKPPI27) se hicieron crecer en matraces de 500 mL con tubos de poliuretano (PUF) de 0.125 cm³, impregnados de extracto de malta líquido, incubados durante un periodo de 21 días a 27-28° C. Los cubos invadidos de micelio, sirvieron para la inoculación en cajas de Petri con discos de poliuretano. Dichas cepas se inocularon en un medio mínimo basado en sales (ver materiales y métodos) (Martínez C. y Cruz F., 1982) y se observó que las cepas no tuvieron crecimiento en dicho soporte, lo cual indicó que el poliuretano no fue una fuente principal para el hongo y que no fue capaz de degradarlo. Pero el crecimiento micelial en dicho soporte con medio de extracto de malta fue abundante durante el periodo de incubación, y mejor en la cepa UATPo7; esto permite su utilización en determinaciones de la biomasa producida (**figura 10**).

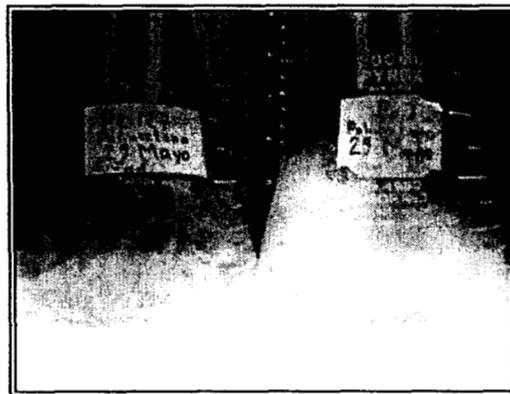


Figura 10. Crecimiento de cepas de *Pleurotus* en matraces con PUF, matraz derecho cepa UATPo7, matraz izquierdo cepa HKPPI27, incubados por 21 días 27-28°C.

Crecimiento micelial sobre poliuretano

Durante el proceso de incubación de las cajas con discos de poliuretano, se efectuaron mediciones de la biomasa generada a los 3, 5, 9, 12, 15, 18 y 21 días de crecimiento, en presencia y ausencia de ácido tánico y CuSO₄ como inductores de lacasas. Las determinaciones se hicieron por el método de peso seco, efectuándose estas en el micelio total generado y por el método de radio de crecimiento.

Los resultados sobre estas determinaciones, mostraron que no existía influencia de los inductores sobre la biomasa generada. La velocidad específica de crecimiento y la biomasa máxima generada para las cepas UATPo7 y HKPPI27 se muestran en la **tabla 14**.

Tabla 14. Parámetros de crecimiento de las cepas de *Pleurotus* crecidas en PUF

Cepa	X_0 (g /g PUF)	μ (h ⁻¹)	X_{max} (g/g PUF)	R^2
<i>P. ostreatus</i>	0.07	0.13	1.51	0.70
<i>P. pulmonarius</i>	0.03	0.11	0.8	0.98

*Los ajustes con las curvas de la **figura 11**, se realizaron por minimización de la curva de los residuos cuadrados. Se determinó la biomasa inicial (X_0) y la biomasa máxima producida (X_{max}), la velocidad específica de crecimiento (μ) y el valor del ajuste de los datos experimentales (R^2).

Los resultados confirman que la cepa UATPo7 tiene, tanto una velocidad de crecimiento como una invasión mayor del poliuretano comparada con la cepa de *P. pulmonarius*. Los resultados sobre el crecimiento de las dos cepas se observan en la **figura 11**.

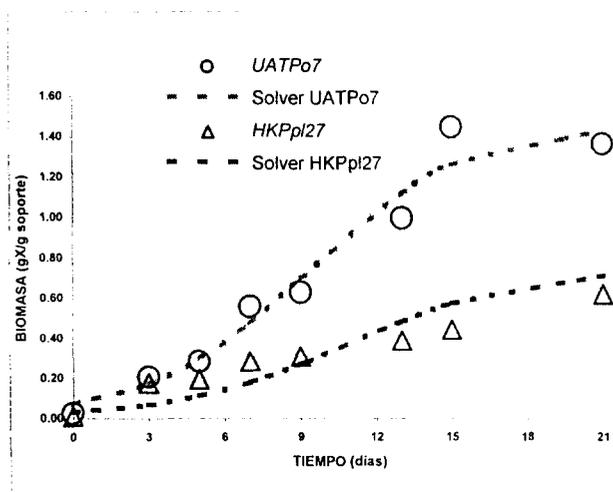


Figura 11. Crecimiento de cepas de *Pleurotus* con $CuSO_4$ (0.0015M) y ácido Tánico (0.001M). Se muestran los datos experimentales (Δ y \circ) y el ajuste logístico por método de aproximación "Solver" (línea punteada).

Estos resultados se apoyan en la estimación de los parámetros calculados en la **ecuación 2** (ver **Materiales y Métodos**), para el cultivo de las cepas de *Pleurotus*, en caja de Petri con PUF, en donde se retomó el valor de la velocidad radial de crecimiento (u_r [$\mu\text{m}/\text{h}$]) para cada cepa (**figura 14**), además de que se calculó el valor promedio del diámetro de las hifas (D_h [μm]), la longitud promedio de la hifa en el cultivo (L_{av}) por método de microscopía electrónica de barrido, constantes que son específicas para cada especie (A y B).

Los resultados del análisis para calcular la velocidad de crecimiento específica (μ_{calc}), a través de la expresión logística y los parámetros morfométricos para cada cepa, se muestran en la **tabla 15**.

Tabla 15. Parámetros morfométricos de ajuste para cultivos de *Pleurotus* crecido sobre PUF

Parámetro	UATPo7	HKPPI27
μ_{calc} [h^{-1}]	0.13	0.11
u_r [$\mu m/h$]	232.3	187.2
L_{av} [μm]	360	220
D_h [μm]	24	15
A	1.85	0.92
B	2.3	1.16

Ecuación logística de ajuste para estimar la velocidad específica de crecimiento, considerando los parámetros morfológicos:

$$\mu_{calc} \approx \frac{u_r \ln 2}{A L_{av} + B \ln(L_{av}/2D_h)}$$

La relación de las características morfológicas microscópicas y las obtenidas en el soporte por métodos gravimétricos de ajuste, confirman que la cepa de *P. ostreatus* (UATPo7) crece más rápido, comparado con la de *P. pulmonarius* (HKPPI27), ya que su velocidad radial de crecimiento es mayor y aún más, los parámetros morfométricos A y B, indican que la densidad de invasión micelial en el soporte se comporta en igual manera. Los parámetros morfométricos A y B, relacionan la velocidad de aparición de ramificaciones en cada hifa. Las cepas UATPo7 y HKPPI27, tiene una velocidad promedio de 430 $\mu m/h$ para la aparición de una ramificación, comprobando que el cultivo de este tipo de basidiomicetes es bastante prolongado. El ciclo de vida de estos macromicetes, no es equiparable con el obtenido para las especies de micromicetes, que por lo regular son crecidos en tiempos de incubación cortos, por ejemplo *Aspergillus niger*, en el cual la velocidad específica y radial de crecimiento es mayor ($\approx 0.20 h^{-1}$ y 614 $\mu m/h$, respectivamente) y su velocidad de aparición de ramificaciones en las hifas es aproximadamente 1 $\mu m/h$ (Larralde-Corona P y col., 1997), lo cual los hace cultivos bastante densos en áreas superficiales de crecimiento pequeñas, comparados con las especies de *Pleurotus*, donde la invasión micelial se da en zonas de crecimiento más extensas.

Diferenciación de hifas maduras y jóvenes

Se diferenciaron las zonas de hifas jóvenes y maduras, por el método de tinción con o-toluidina en H_3BO_4 . Las determinaciones se efectuaron durante un periodo de incubación de 21 días. Las muestras una vez teñidas fueron observadas al microscopio, diferenciando cada zona con el analizador de imágenes.

Se distinguieron dos zonas definidas y el criterio se basó en la metodología propuesta por Sánchez C. y Moore D. (1999). El micelio de la zona joven fue teñido en menor cantidad que el maduro. Se determinó la biomasa generada para las dos cepas para estas zonas.

Debido al mayor crecimiento de la cepa UATPo7 y en abundancia, la cantidad de hifas jóvenes y maduras, tanto en biomasa como en radio de crecimiento, fue mayor comparado con la cepa HKPP127, que generó más hifas jóvenes durante el periodo de incubación (**figura 12**)

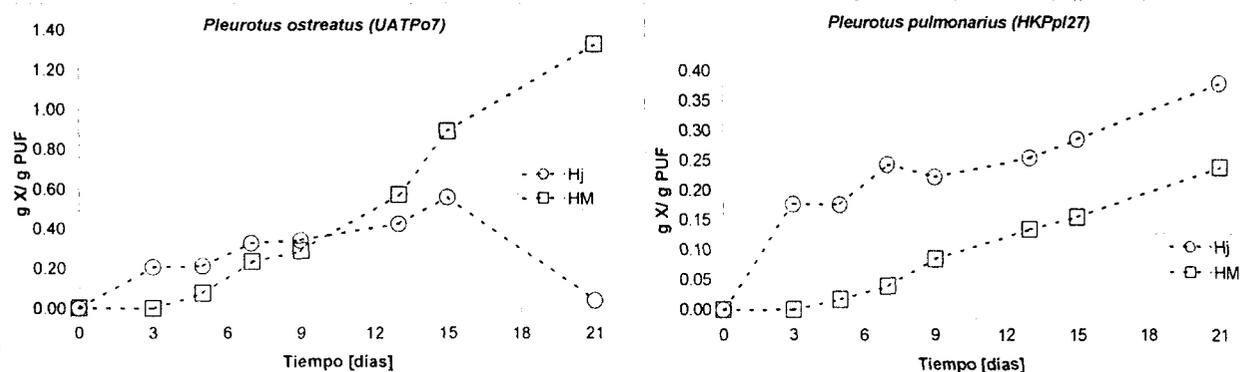


Figura 12. Cinética de crecimiento de *Pleurotus*: La biomasa producida por la zona de hifas jóvenes (Hj) (O) e Hifas Maduras(HM) (□), de las cepas crecidas en poliuretano (PUF) durante 21 días.

Los resultados muestran que la cepa UATPo7, genera una mayor cantidad de hifas maduras y que las hifas jóvenes que se desarrollan, van disminuyendo rápido debido a la maduración (**figura 14**). El desarrollo micelial de la cepa HKPP127, tiene un comportamiento paralelo en lo que respecta a las zonas en desarrollo y maduración (**figura 13**).

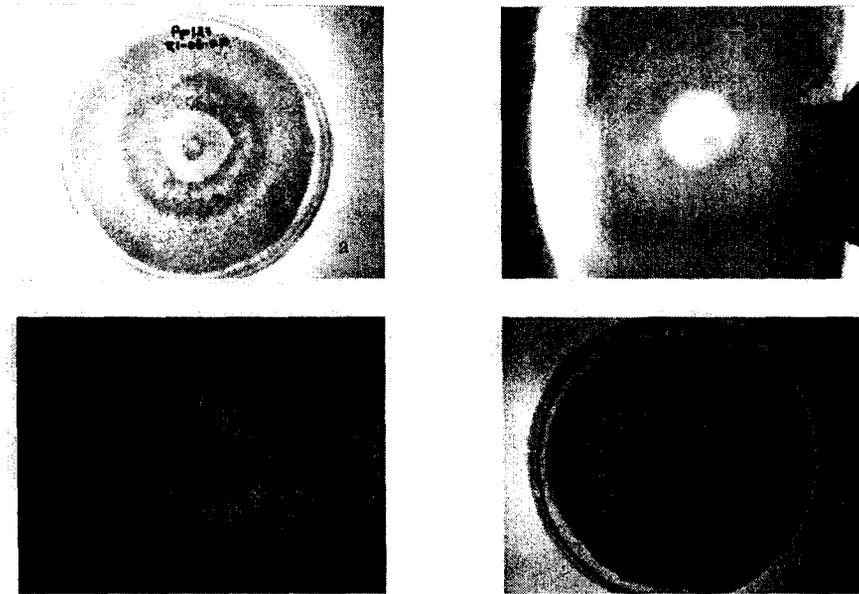


Figura. 13. Diferenciación de hifas maduras (H_M) e hifas jóvenes (H_j) con o-toluidina (1%) en H_3BO_3 (1%). Las zonas oscuras pertenecen a la zona de H_M y las zonas más claras a las H_j . Cajas: a) cepa UATPo7 y b) cepa HKPPI27 sin tratamiento y cajas c) cepa UATPo7 y d) cepa HKPPI27 teñidas.

Se efectuaron observaciones por microscopía electrónica de barrido, para la zona de hifas jóvenes y maduras, con el fin de determinar la invasión en el soporte de poliuretano (**figura 15**). Las micrografías muestran una invasión total a través de las trabéculas del poliuretano y de la superficie. La invasión fue abundante y se midieron hifas (**tabla 15**). Se hicieron muestreos en diferentes zonas, tanto de hifas jóvenes y maduras en las dos cepas, patrones tintoreales efectuados con o-toluidina. Esto nos indica que el micelio maduro, se tiñe en una proporción mayor comparado con el micelio joven, indicándonos que la etapa de maduración se da desde el centro de la caja a la periferia. Los resultados sobre los patrones tintoriales de las zonas jóvenes y maduras en el micelio de *Pleurotus*, se presentan en las **figuras 12, 13 y 14**. Estos resultados comprueban que la velocidad de maduración es mayor en *Pleurotus ostreatus* y que además, la biomasa producida por esta zona es mayor, debido a la mayor velocidad de crecimiento.

Determinación de la velocidad radial (u_r) de crecimiento

RESULTADOS

Se diferenciaron zonas radiales en ambas cepas, con la finalidad de calcular la velocidad de radial de crecimiento (u_r) y mostrar el comportamiento de la diferencia radial de las hifas maduras, respecto a las de las hifas jóvenes. Los resultados sobre los análisis en dichas zonas son mostradas en la **figura 14**.

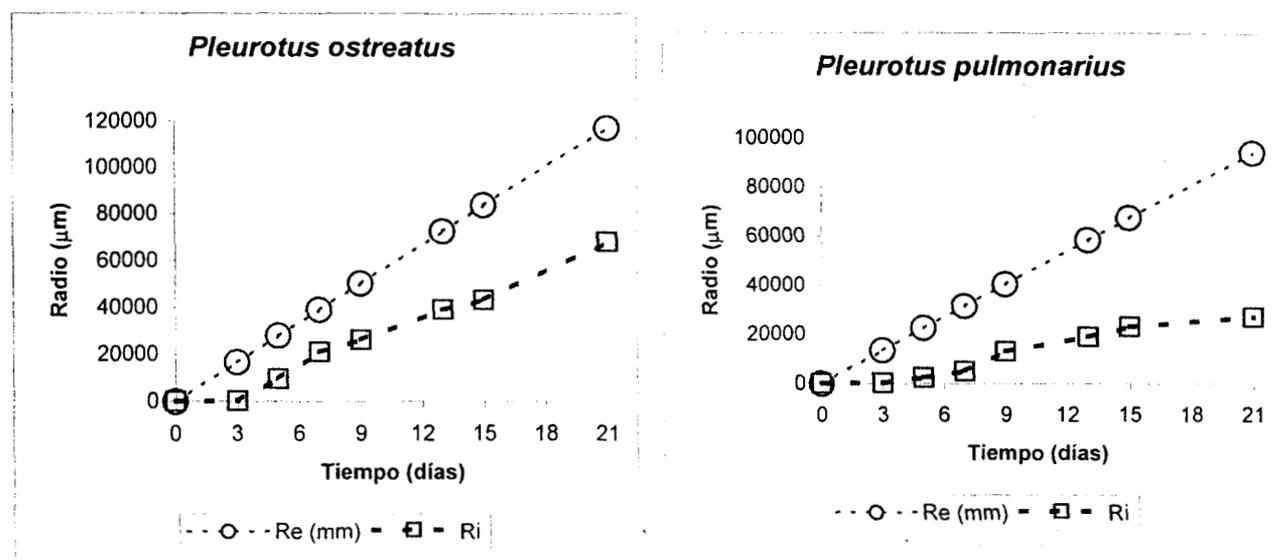


Figura 14 Incremento radial de las hifas maduras (R_i) y del radio externo total (R_e), para las cepas de *Pleurotus* crecidas en caja de Petri sobre PUF.

Tabla 16. Parámetros cinéticos que determinan la velocidad de crecimiento de *Pleurotus*

Cepa	u_{R_c} ($\mu\text{m}/\text{h}$)	u_{R_i} ($\mu\text{m}/\text{h}$)	u_{R_c}/u_{R_i}
UATPo7	233	140	0.60
HKPPI27	187	64	0.34

La **figura 14** y **tabla 16**, muestra el aumento radial, tanto interno como externo, en el micelio diferenciado por toluidina en ácido bórico. El parámetro R_i , representa la magnitud radial de la zona madura (H_m) y el parámetro R_c , la magnitud radial total en la caja. El cambio en el estadio de crecimiento, es decir zona de cambio morfológico joven-maduro, que es la magnitud diferencial radial en la zona joven (H_j) con respecto a la zona madura (H_m) muestran, que la cepa HKPPI27 tiene una magnitud radial menor con respecto a la cepa UATPo7, esto se refleja en una menor producción micelial, velocidad de crecimiento específico menor (μ) y una velocidad radial (u_r) baja.

En otras palabras, el cambio morfológico del estadio joven al maduro, es más lento en *Pleurotus pulmonarius*, es decir existe una zona de cambio morfológico micelial joven-maduro, más amplia que en UATPo7. Esto concuerda con el comportamiento que muestran las dos cepas, en la producción

RESULTADOS

enzimática (**figuras 11, 14 y 18**), donde la mayor producción de biomasa, viene acompañada con un aumento en la actividad enzimática.

Por otro lado, se observó la presencia de micelio secundario y el desarrollo de fíbulas o nodulaciones, indicándose en la **figura 15 C**, por la unión de hifas en las zonas maduras, con una mayor presencia en el centro de la caja, e indica que el desarrollo del micelio se lleva a cabo en el espacio intertrabecular. (**figura 15**).



Figura 15. Microscopía electrónica de barrido de muestras en la zona micelial correspondiente a las hifas jóvenes y maduras: a) zona de hifas jóvenes de la cepa HKPPI27 (aumento 90 x), b) hifas jóvenes de la cepa UATPo7 (aumento 120x) y c) Hifas maduras de la cepa UATPo7 (aumento 3500 x). La flecha indica la presencia de fíbulas.

Extracción enzimática de la lacasa de *Pleurotus*

Para las determinaciones de la extracción enzimática de la lacasa, se diferenciaron las zonas de crecimiento de hifas jóvenes y maduras en las cepas UATPo7 y HKPPI27 hasta los 21 días, obteniéndose el extracto como es descrito en la metodología, tanto del micelio generado en estas zonas, como de un extracto de las lacasas que se encontraban en el medio de cultivo, es decir con actividad lacasa extracelular. Al mismo tiempo se efectuaron determinaciones de la cantidad de proteína obtenida al final del proceso por la técnica de Bradford. La actividad lacasa fue determinada con 0.5 mM de Siringaldazina en metanol. La enzima fue suspendida en 2mL de amortiguador de acetatos 1M de pH 5 para la cepa UATPo7 y pH 5.5 para la cepa HKPPI27, incluyéndose catalasa para la desactivación de peroxidasas en el extracto en esta determinación (100 U/mL) (Böckle B. y col., 1999).

RESULTADOS

Los resultados sobre la determinación de las lacasas de hifas jóvenes y maduras en las dos cepas, muestran que la actividad lacasa en la cepa UATPo7 es mayor, al igual que la actividad en las hifas maduras, comparado con la de las hifas jóvenes para ambas cepas de *Pleurotus*. Los resultados indican que el mayor desarrollo predetermina una mayor movilización de nutrientes, así como los mecanismos de desarrollo morfológico en la fase madura, que permitirán a los hongos la formación de estructuras superiores como los basidiocarpos ó primordios (figura 16).

Una mayor actividad enzimática predispone una adaptación mejor al soporte, así como un mecanismo de competencia natural con especies alternas. En lo que respecta a la actividad de la lacasa extracelular las mayores actividades se encuentran en la cepa UATPo7, indicando una mejor adaptación con una velocidad específica de crecimiento mayor. El efecto de una actividad mayor en la cepa HKPPI27 fue analizado por zimografía, para corroborar la presencia de diferentes isoenzimas, lo cuál se tratará más adelante.

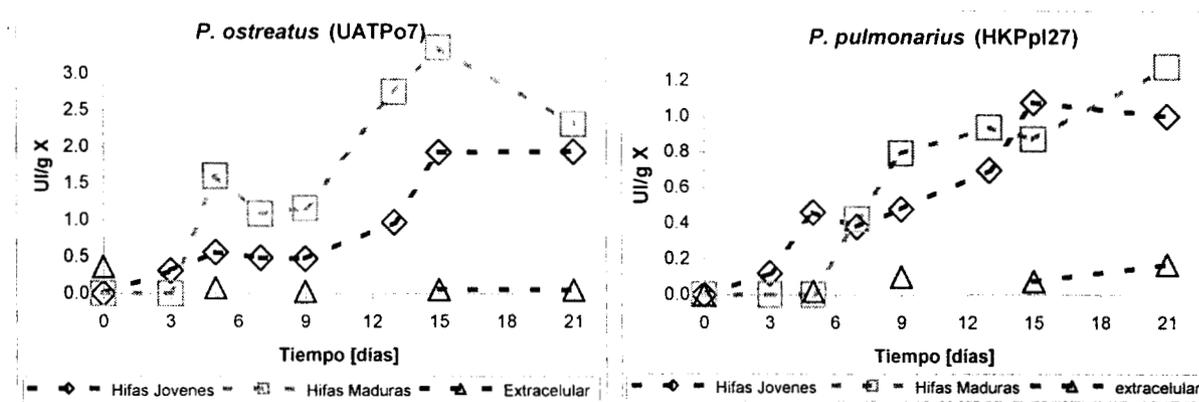


Figura 16. Actividad de las lacasas de *Pleurotus* con respecto a la biomasa producida por la zona de Hifas Jóvenes (H_J) e Hifas Maduras (H_M) de las cepas de *Pleurotus* crecidas en poliuretano (PUF) en un periodo de 21 días. Se midió la actividad de la lacasa extracelular producida.

Las velocidades radiales de micelio vegetativo en las cepas UATPo7 y HKPPI27, son mayores que la velocidad de extensión radial de la zona de maduración, indicando que los dos procesos tienen una cinética distinta y que la maduración de todo el micelio, ocurre cuando el micelio ha invadido todo el espacio disponible. Además de que la producción máxima enzimática, se da cuando el micelio ha entrado en la etapa de madurez.

Efecto del inductor sobre la actividad lacasa proveniente del micelio total

En lo que respecta al efecto de la inducción, los resultados muestran aumento en la actividad de las lacasas en ambas cepas, además de que no hay efecto del inductor sobre la biomasa total de *Pleurotus*, mostrándose en el rendimiento de la extracción sobre la actividad (figura 17 y tabla 17).

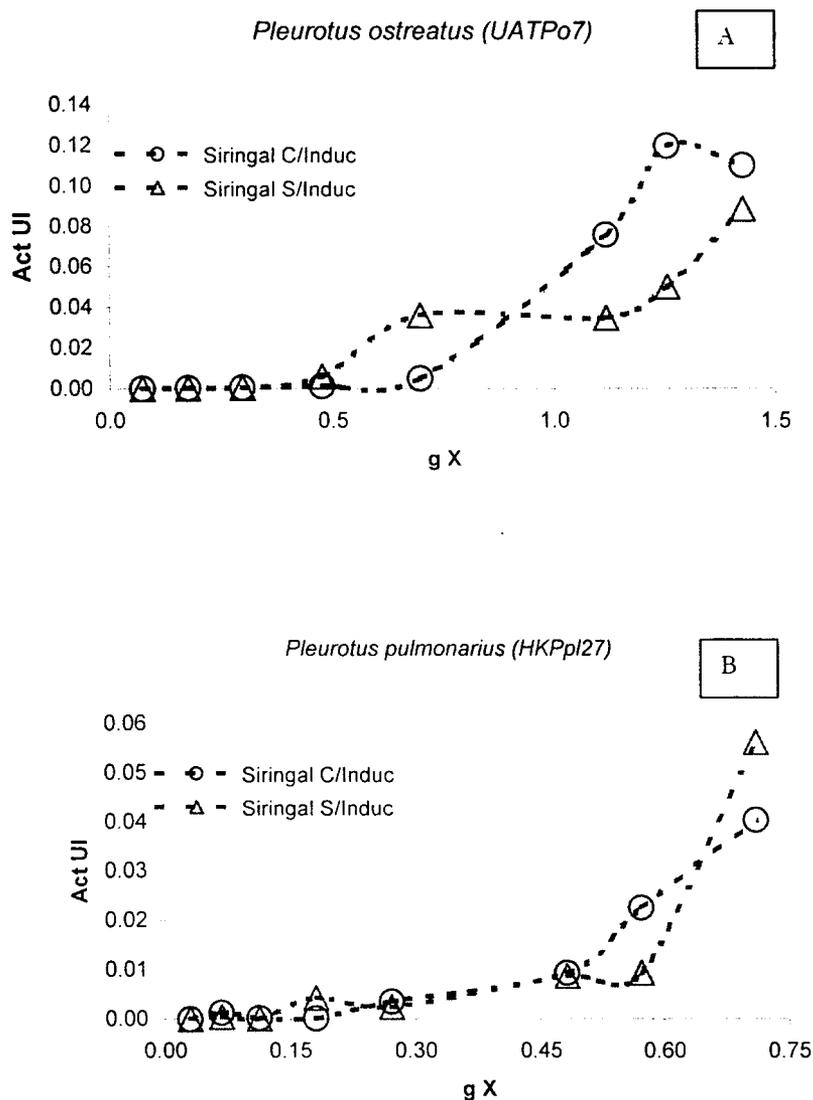


Figura 17. Extracción enzimática de las lacasas de *Pleurotus* y efecto del inductor (CuSO₄ 0.0015M y ácido tánico 0.001M) sobre la actividad en el micelio total. **A:** cepa *Pleurotus ostreatus* UATPo7, **B:** Cepa *Pleurotus pulmonarius* HKPPI27, incubadas durante un periodo de 21 días a 25-28°C.

En la **figura 17**, se muestra el perfil de actividades con y sin inductor (ácido tánico, 0.001M y CuSO₄, 0.0015M). En ambas cepas se encontró que la adición del inductor solo tiene efecto cuando el nivel de

RESULTADOS

la biomasa había sobrepasado la mitad del nivel máximo de la biomasa (X_{max}) (tabla 17 y figura 11), lo cual indica que la inducción de las lacasas es un proceso tardío, asociado con la segunda mitad del ciclo de crecimiento de los micelios de *Pleurotus* y que es en esta etapa del ciclo, cuando se nota el efecto positivo del inductor, especialmente en el caso de *P. ostreatus*.

Tabla 17. Producción y efecto del inductor sobre la actividad de las lacasas por las cepas de *Pleurotus*

Cepa UATPo7	Inductor $Y_{E/X}$ (UI/gX)	S/inductor $Y_{E/X}$ (UI/gX)
Siringaldazina	0.09	0.07
Cepa HKPPL27		
Siringaldazina	0.08	0.06

Los resultados sobre la producción de enzima con respecto a la biomasa, es decir la eficiencia en la producción enzimática micelial ($Y_{E/X}$), fueron ajustados por el modelo de Luedeking y Piret. La forma de estas curvas de producción enzimática corresponde a un modelo no asociado al crecimiento (figura 18)

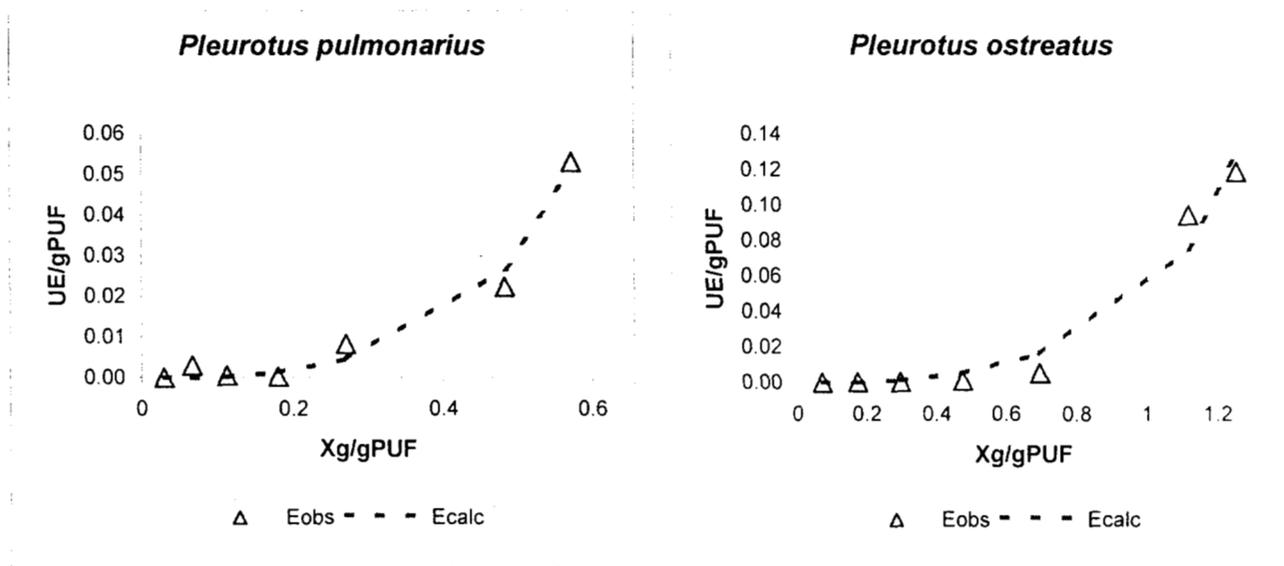


Figura 18. Producción enzimática de las cepas de *Pleurotus* crecidas en PUF. Se muestran los datos experimentales (Δ) y los ajustados con el modelo logístico (- - -).

Cuando aumenta la producción micelial, la actividad enzimática tiene el mismo comportamiento. La cepa UATPo7 tiene un comportamiento mayor en la producción tanto de biomasa, como de actividad. Los parámetros calculados en este ajuste se muestran en la tabla 18 y en la ecuación.

Tabla 18. Parámetros de ajuste de la producción de enzima y su asociación con el micelio de *Pleurotus*

Cepa	$Y_{E/X}$ (UI/gX)	$Y_{E/X}\mu$ (UI*h ⁻¹ /gX)	k (UI h ⁻¹ /gPUF)
UATPo7	0.09	0.012	0.009
HKPPI27	0.08	0.009	0.01

Ecuación de ajuste para un modelo no asociado al crecimiento (Ludeking y Piret):

$$E = E_0 + Y_{E/X} (X - X_0) + \frac{k X_{max}}{\mu} \ln \frac{(X_{max} - X_0)}{(X_{max} - X)}$$

Los parámetros de ajuste, muestran que UATPo7 produce una cantidad mayor de enzima, comparados con los de la cepa HKPPI27. El parámetro k, indica que la producción enzimática asociada al crecimiento, mostrando son del mismo orden para cada cepa. Como $k > 0$ y $\mu Y_{E/X}$ es bajo, esto demuestra que las lacasas efectivamente son necesarias en la etapa de maduración, ya que se observa en la **figura 18**, un aumento en la producción de enzima, con respecto a la biomasa generada.

Patrones de actividad enzimática en caja con poliuretano

Para verificar el patrón de asociación de las lacasas al micelio de *Pleurotus*, fueron inoculadas las cepas sobre poliuretano, adicionando al medio de cultivo los inductores ya mencionados, además del sustrato enzimático ABTS (Acido 2,2' Azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) (**figura 19**).

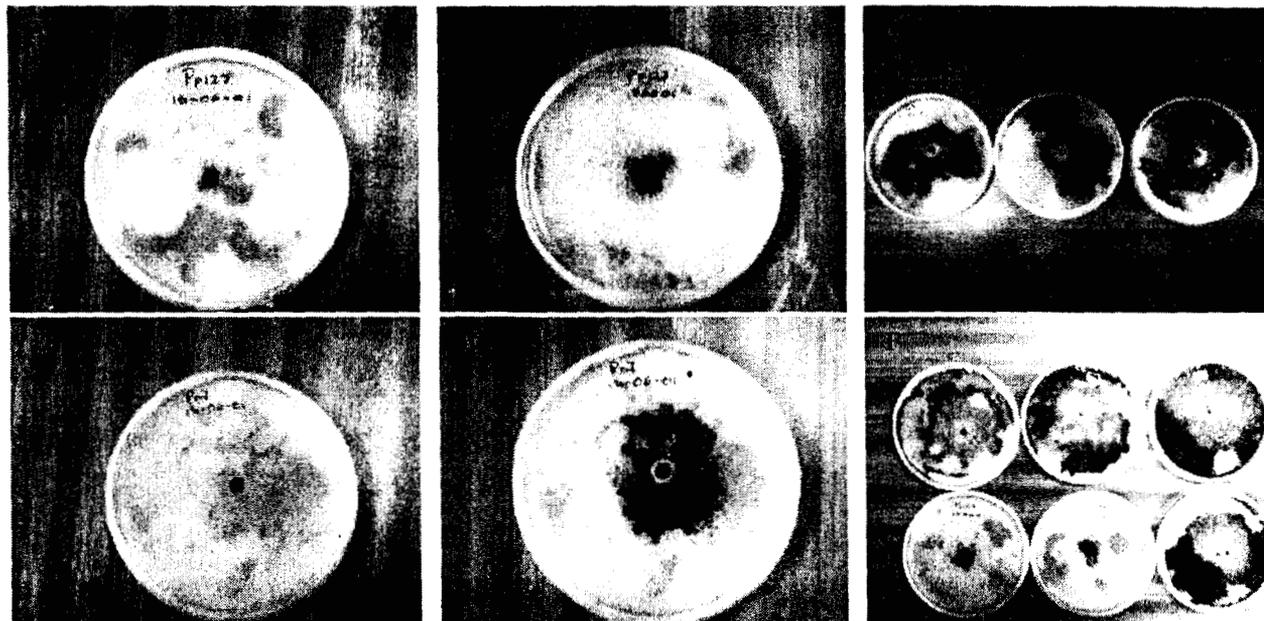


Figura 19. Actividad enzimática del micelio de *Pleurotus* crecido en PUF a diferentes días de crecimiento. cepa HKPPI27: **A** (1 día), **B** (3 días) y **C** (11, 15 y 16 d); cepa UATPo7: **D** (1 día), **E** (3 días) y **F** (3, 5, 7, 11, 15 y 16 días).

En la **figura 19**, se observa que existe un patrón desordenado de secreción de las lacasas (zonas oscuras). Esto se debe a que existen zonas de alta humedad, puesto que el PUF es una red desordenada de trabéculas, por donde difunden los nutrientes, así también el sustrato enzimático, se encuentra en una manera aleatoria. A medida que se da el crecimiento micelial, se presenta una cantidad importante de actividad oxidativa y es mayor en la cepa UATPo7. Los resultados comprueban que las enzimas producidas son extracelulares y que tienen una asociación importante con el micelio a los 12 días de crecimiento, ya que es en ésta, en la cual se produce la mayor cantidad de enzima (**figura 12** y **figura 17**). La coloración asociada a la oxidación de ABTS, parece estar asociada a la actividad en el centro de la caja (**figura 19B**), para después difundirse hacia la periferia. Es de notarse que al final del cultivo, la coloración del ABTS oxidado (**figuras 19C** y **F**), no aparece como en el micelio central. Lo cual indicaría que la lacasa solo se produce en una etapa intermedia de la maduración, pero como después se excreta al medio en forma abundante, se observa como producto final en toda la caja, indicando que también se produce al final del crecimiento (**figura 18**).

Determinación de los parámetros cinéticos K_m y V_{max}

Se determinaron los parámetros cinéticos de K_m y V_{max} de las cepas de *Pleurotus*, midiendo la actividad con siringaldazina. En la **tabla 18** se muestran los resultados de los análisis cinéticos.

Tabla 18. Datos cinéticos en las cepas de *Pleurotus*

Cepa	K_m (μM)	V_{max} (nmol/min)	R^2
<i>P. ostreatus</i>	12	9	0.92
<i>P. pulmonarius</i>	16	11	0.88

Los datos experimentales fueron ajustados por el método Lineweaver-Burck para calcular el K_m y V_{max} y corroborados por el método de aproximación Solver (**figura 20**).

Estos resultados cinéticos indican que las enzimas lacasas de estos extractos, tienen alta afinidad por la siringaldazina, pero es tan baja la cantidad, pues la k_{cat} de estas enzimas es del orden de 10^2 molP/mL E min^{-1} y su peso molecular es cercano a 80 kDa. Por lo tanto la concentración de estas enzimas es del orden de 0.09 y 0.08 UE/gX y de 0.7 y 0.67 UE/g PUF para las cepas UATPo7 y HKPPI27, respectivamente en un volumen de muestra de 1 mL.

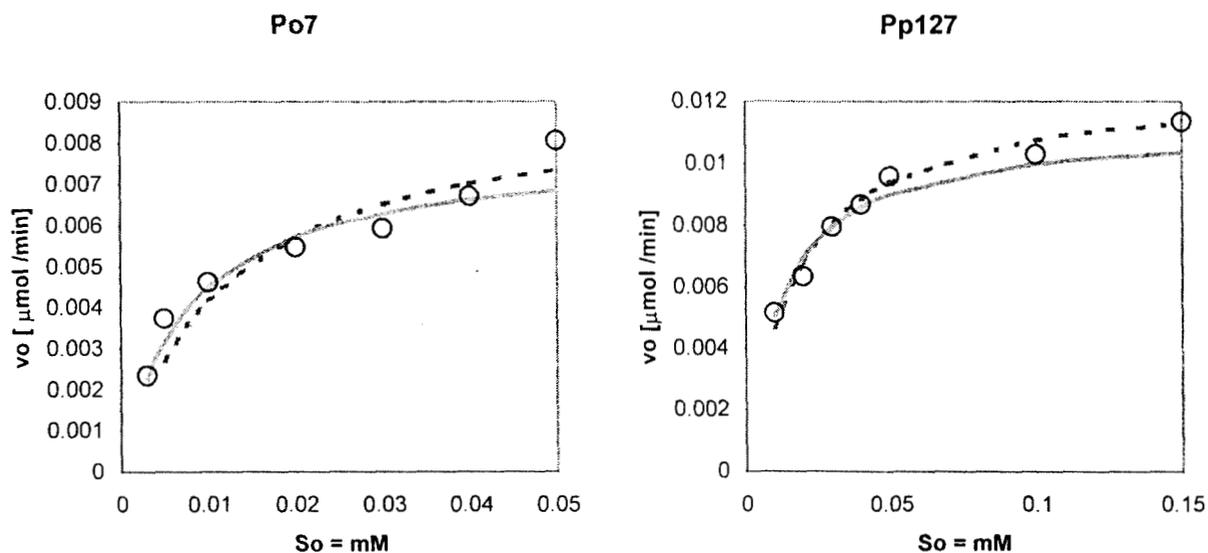
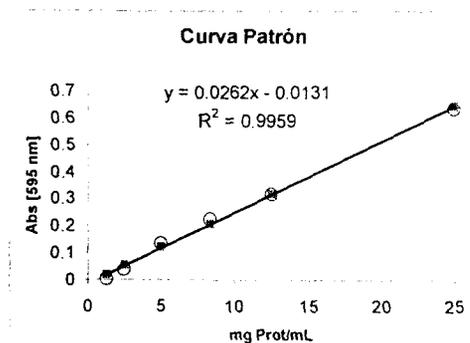


Figura 20. Cinética de oxidación de la siringaldazina para las lacasas de las cepas de *Pleurotus* y la determinación de K_m y V_{max} . Datos experimentales (Círculos), ajustados por el modelo de Lineweaver- Burk (línea punteada), ajuste logístico por el método de ajuste "solver" (línea sólida).

Determinación proteica de los extractos

Las determinaciones proteicas de los extractos fueron estimadas por el método de unión de colorante ligado a la proteína (Bradford) al final del proceso de extracción. Los cálculos se basaron en la curva patrón de 10 µg/mL de seroalbúmina bovina en disolución de 0.15M de NaCl ($r = 0.99$) (figura 21 y tabla 19).

Figura 21. Curva Patrón de Seroalbúmina Bovina



La curva fue determinada por el método de Bradford

Tabla 19. Curva estándar de seroalbúmina bovina

SAP µg/mL	ABS
1.25	0.0067
2.5	0.0379
5.0	0.1323
8.3	0.2265
12.5	0.3141
25.0	0.6347

Para cada una de las determinaciones efectuadas, se estimó la cantidad de proteína obtenida, basándose en la curva patrón de seroalbúmina bovina (595nm).

Se determinó la cantidad de proteína de los extractos provenientes del micelio total de las cepas de *Pleurotus*, mostrando que debido un mejor crecimiento de la cepa UATPo7, la cantidad de proteína es mayor con respecto al tiempo, además de que esta vinculada con el ciclo de crecimiento de las cepas (figura 22).

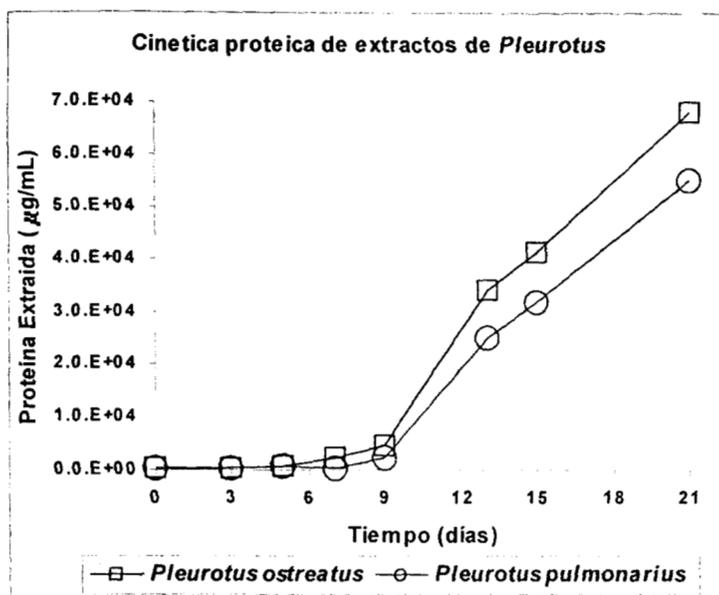


Figura 22. Cuantificación de los extractos proteicos provenientes del micelio total de las cepas de *Pleurotus*.

Se observa que al nivel máximo de la biomasa (X_{max}), la cantidad de proteína total producida por las dos cepas de *Pleurotus* es considerable a los 13 días de crecimiento, demostrando que a medida que la cantidad de proteína aumenta, también lo hace la cantidad de enzima (figura 17 y 19). Esto demuestra otra evidencia que la cantidad de enzima, parece estar vinculada con la maduración de los hongos, ya que se puede ver en la figura 12, que al comportarse en forma ascendente la cantidad de hifas maduras, lo hace también la proporción proteica.

Determinación del pH óptimo para la actividad de las lacasas de *Pleurotus*

Se efectuó la determinación de la actividad de la lacasa del micelio total de las cepas UATPo7 y HKPpl27 a diferentes valores de pH (3, 4, 5, 5.5, 6, 7, 8), con la finalidad de encontrar la máxima actividad de los extractos. Los resultados sobre la actividad de la lacasa de las cepas de *Pleurotus* (figura 23), mostrando que a pH de 5 se obtiene la mayor actividad para UATPo7 y a pH 5.5 para la cepa HKPpl27, coincidiendo con lo obtenido por Koroljova-Skorobogat'k y colaboradores (1998), donde se estipula que la mayoría de las lacasas producidos por los basidiomicetes tienen su mayor actividad en un intervalo de pH de 3 a 7.

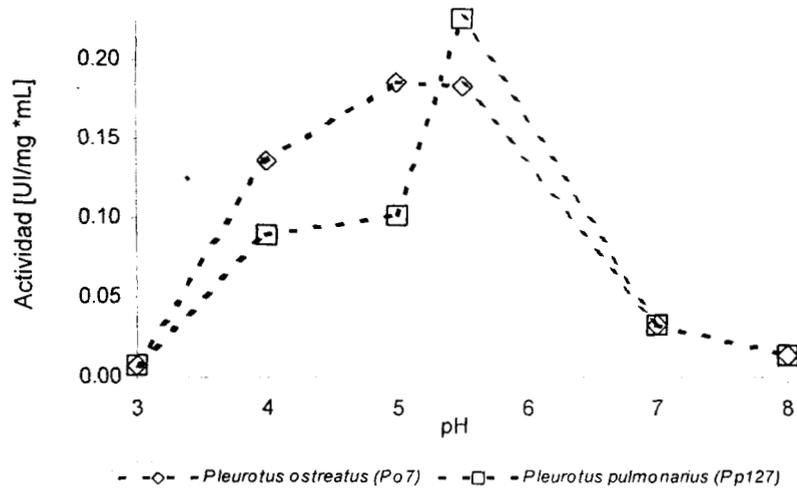


Figura 23. Estabilidad de las lacasas de *Pleurotus* a diferentes valores de pH. La actividad fue determinada con siringaldazina como sustrato.

La estabilidad de las lacasas en las dos cepas de *Pleurotus* se encuentra entre un intervalo de pH de 5-5.5, con actividad máxima de 0.22 y 0.18 U/mg prot*ml para las cepas HKPp127 y UATPo7 respectivamente.

Zimografía de lacasas del micelio total de *Pleurotus*

Se efectuaron zimografías por medio de geles de poliacrilamida no desnaturizante (sin mercaptoetanol ni SDS). Se obtuvieron extractos del micelio diferenciado de las cepas UATPo7 y HKPp127, a los diferentes días de crecimiento (3, 5, 7, 9, 12, 15, 18 y 21 días) y se determinó la concentración proteica total, así como la actividad con siringaldazina (figura 25).

Una vez terminado el corrimiento, los geles fueron suspendidos en una solución de siringaldazina 0.1mM en amortiguador de acetatos pH 5 para la determinación de las bandas de actividad. Debido a la inestabilidad de los productos de reacción con siringaldazina, en este caso la producción de siringaldehído que se degrada, se tomaron imágenes de las preparaciones frescas, para no perder las bandas producidas.

RESULTADOS

Las tomas se efectuaron con una analizador de imágenes. Por otro lado se efectuó un gel en condiciones desnaturalizantes con el fin de determinar las bandas proteicas, con una concentración del 10% para corroborar el peso molecular de las lacasas de las especies de *Pleurotus* con su correspondiente zimograma (figura 24).

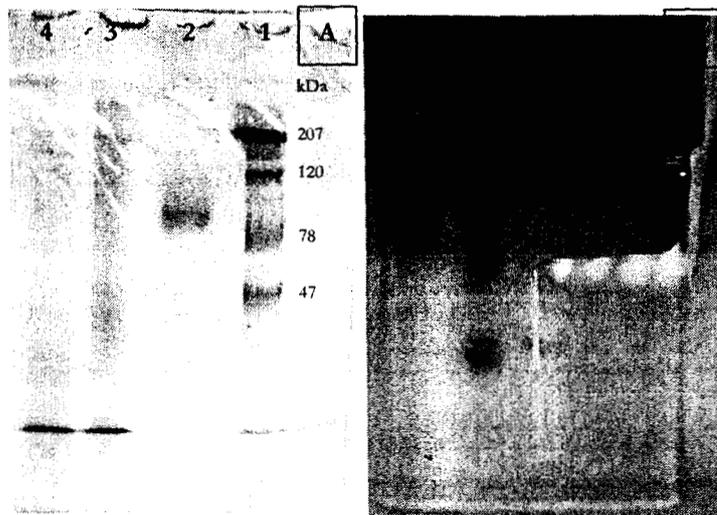
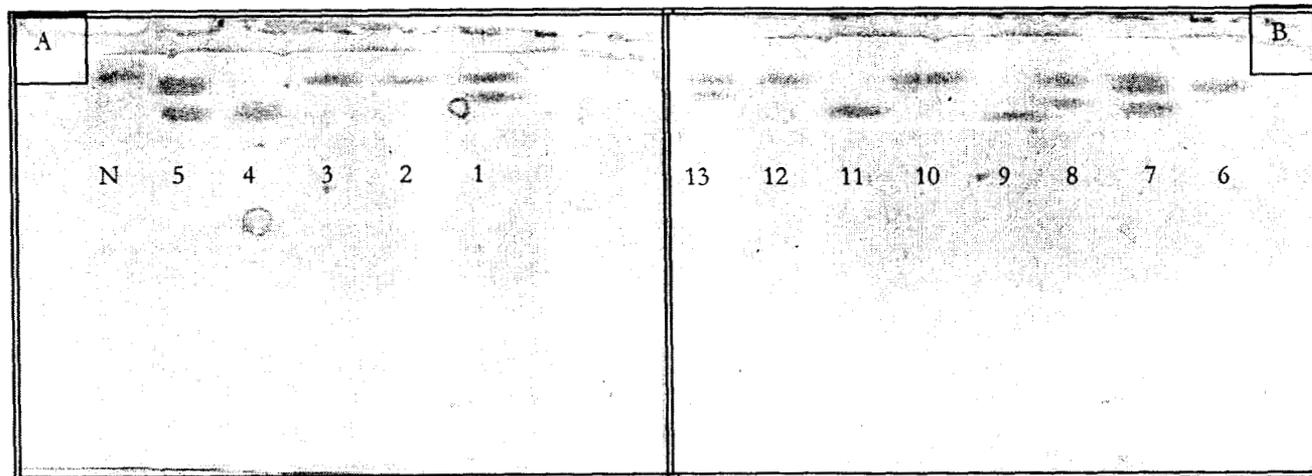


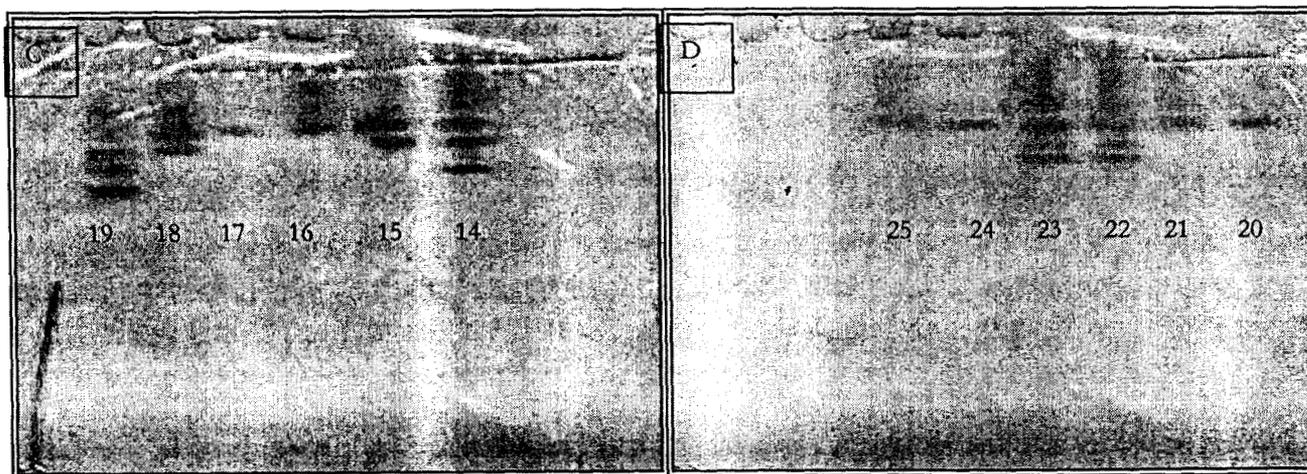
Figura 24. Gel de SDS-PAGE al 10% (A) y zimografía (B) de las lacasas de *Pleurotus*. (A) Carril 1: estándares (miosina 207KDa, β - galactosidasa 120KDa, seroalbúmina 78KDa, ovoalbúmina 47 kDa), Carril 2: Lacasa de *Miceliophthora termophila*, Carril 3: extracto proteico de la cepa UATPo7, Carril 4: extracto proteico de la cepa HKPpI27. (B) Carril 1: extracto proteico de la cepa HKPpI27, Carril 2: extracto proteico de la cepa UATPo7, Carril 3: Lacasa de *Miceliophthora termophila*.

Comparación zimográfica de los extractos de hifas jóvenes y maduras de *Pleurotus*

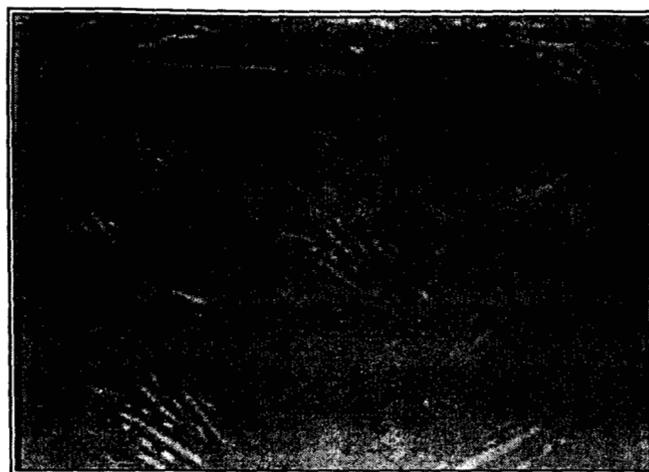
Se efectuaron zimografías de los extractos obtenidos de las hifas jóvenes y maduras, para las cepas UATPo7 y HKPpl27, incubadas durante un periodo de 21 días de crecimiento a temperatura de 25-28°C y de la proteína obtenida de lavados efectuados en el poliuretano (proteína extracelular) (**figura 25: A, B, C, D y E**). En la **tabla 21** se marca el contenido de cada carril, así como los días en los cuales las muestras fueron extraídas.



Zimografía de lacasas de *Pleurotus*: (A) Día 3: carriles 1 al 4, Día 5: carril 5; (B) Día 5 Carril: 6, Día 7 Carriles: 7 al 11, Día 9 Carriles: 12 al 13.



Zimografía de lacasas de *Pleurotus*: (C) Día 13: carriles 14 al 17, Día 15: carril 18 y 19; (D) Día 15 Carril: 20 y 21 Día 18 Carriles: 22 al 25.



Zimografía de lacasa de *Pleurotus*: (D) Día 18 Carriles: 26 y 27, Día 21 Carriles 28 al 33

Figura 25. Zimografías de las lacasa extraídas de hifas jóvenes y maduras en cepas de *Pleurotus* incubadas durante 21 días (A) a la (D). Los geles fueron hechos a una concentración del 10% e incubados con siringaldazina.

Tabla 21. Asignación en las zimografía

Cepa	Hifas	3	5	7	9	13	15	18	21
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Jóvenes (H _J)	1**	5**	7**		14***	19***	22***	28****
	Maduras (H _M)			8**	13**	15**	18**	23***	29*
	Extracelular	2*		9*	12*			24*	30*
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Jóvenes (H _J)	3*	6*	10*		16*	20*	26*	31*
	Maduras (H _M)					17*		25*	32*
	Extracelular	4*		11*			21*	27*	33*

Se describe cada asignación efectuada los carriles de la figura 25 (A-D) indicando el día y de la cepa de *Pleurotus* de la que fue extraída. Los (*) indican el número de bandas encontradas en cada zimograma efectuado.

Se corrieron muestras de hifas jóvenes y maduras, además de extractos con actividad extracelular, por PAGE, mostrando la actividad con siringaldazina a los diferentes tiempos de incubación de las cepas. Los resultados muestran que existen diferencias entre las lacasas expresadas entre cada cepa, así como de las expresadas contra el tiempo. La cepa HKPpl27 solo presentó una banda por carril, mientras que la cepa UATPo7 dos o más bandas. Los resultados muestran que UATPo7, produce más bandas cuando el tiempo fue mayor de los 12 días. Aparentemente la mayor velocidad de maduración y de producción de bandas de lacasas, está asociada también con la mayor oxidación de ABTS (figura 19) y en forma más ampliamente distribuida en la colonia.

RESULTADOS

La cepa UATPo7 presentó hasta tres bandas de actividad a los 15 días. La producción de lacasas en las hifas jóvenes, mostró una cantidad de lacasas mayor que las hifas maduras para esta cepa, contrario a la cepa de *P. pulmonarius*, que solo tiene una banda de actividad. La banda de expresión de las lacasas intracelulares respecto a las exportadas es diferente en peso.

Tanto la lacasa en hifas jóvenes y maduras de las dos cepas fueron más pesadas que la expresada extracelularmente o extraída de los lavados del poliuretano. Los resultados indican que una expresión mayor de lacasas es determinante durante el periodo de invasión del micelio. Se ha estipulado que la producción de lacasa es importante para una mayor degradación del sustrato, producción de pigmentos antioxidantes y que es un factor determinante en la producción de cuerpos fructíferos en las especies de *Pleurotus* (Das N. y Col., 1997). Las diferencias en el número de bandas de isoenzimas, no son raras en *Pleurotus*. Martínez y González (1992), indicaron una regulación compleja de diversas enzimas, la cual varía de una cepa a otra y cuyo significado fisiológico aún no ha sido esclarecido.

Electroenfoque de lacasas de *Pleurotus*

Una proteína con carga neta positiva, en una región en particular del gradiente de pH tiende a migrar hacia el cátodo donde se agrupan los protones. Este mismo efecto se produce para las proteínas con cargas negativas hacia el ánodo. Para el caso de una proteína con carga neutra la migración dentro del gradiente electroquímico es nula. Una vez efectuado el corrimiento, se colectaron las fracciones en tubos de ensaye, verificándose el gradiente de pH para cada fracción así como la cantidad de proteína colectada en cada tubo por el método de Bradford, obteniéndose hasta un 60% de recuperación de la proteína total en los experimentos.

La actividad lacasa fue determinada con siringaldazina y las fracciones con actividad fueron corroboradas por zimografía, en PAGE al 10%. Se mostraron actividades considerables para la cepa UATPo7 en un intervalo de valores de pH de 7.4 a 3.5, con un máximo pH de 6 y para la cepa HKPpl27, en un intervalo de pH de 7.0 a 4.8 con máximo pH de 6.3 (**figura 26**). Cuatro de las fracciones a la misma concentración proteica y con la más alta actividad para cada una de las cepas, se muestran en el gel de electroforesis (**figura 27**).

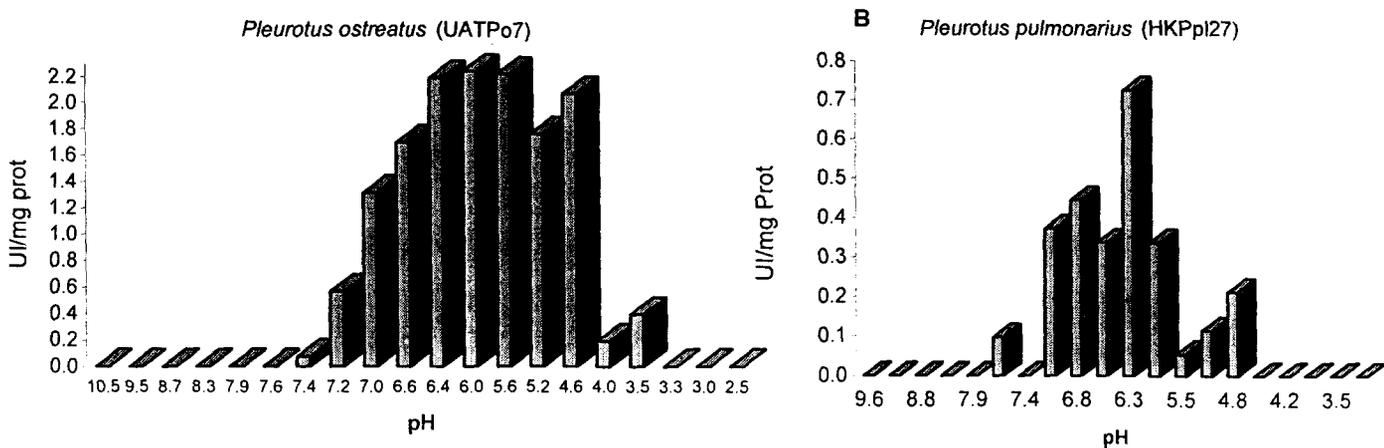


Figura 26. Electroenfoque de las lacasas extraídas del micelio total de las cepas *Pleurotus*. Se presenta el intervalo de valores de pH en los cuales se mostró actividad en las fracciones colectadas. **(A)** Actividad de las lacasas de la cepa *Pleurotus ostreatus* (UATPo7) en un intervalo de valores de pH de 7.4-3.5; **(B)** Actividad de las lacasas de la cepa de *Pleurotus pulmonarius* (HKPp127) en un rango de valores de pH de 7.9-4.8.

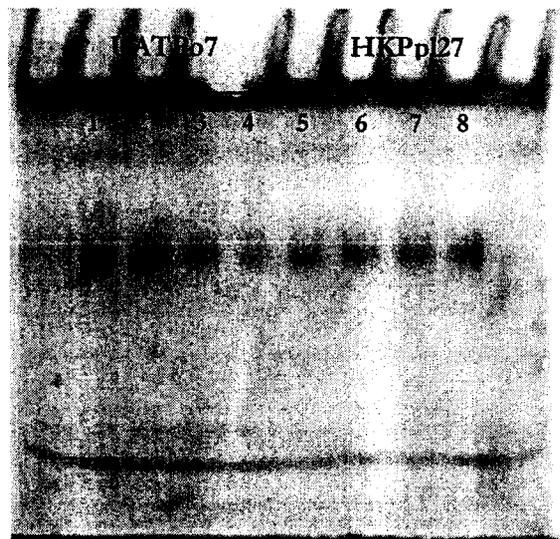


Figura 27. Zimografía de las fracciones con actividad lacasa colectadas por electroenfoque para cepas de *Pleurotus*. Se colocaron 4 de las fracciones con la más alta actividad. **Cepa UATPo7:** Carril 1 (pH 6.4), Carril 2 (pH 6.0), Carril 3 (pH 5.6), Carril 4 (pH 4.6); **Cepa HKPp127:** Carril 8 (pH 7.1), Carril 7 (pH 6.8), Carril 6 (pH 6.3), Carril 5 (pH 6).

Las fracciones muestran la presencia de solo una banda de actividad, indicando que en estas solo había una lacasa (**figura 27**).

Efecto de la temperatura y termoestabilidad de la lacasa de *Pleurotus*

Se incubaron muestras de proteína del micelio total de las cepas de UATPo7 y HKPp127, con una concentración de 600 y 500µg/mL respectivamente, a temperaturas desde 10 hasta 60°C, con el fin de determinar la temperatura óptima de actividad para las lacasas de *Pleurotus*.

La proteína fue disuelta en amortiguador de acetatos 0.1M a un valor de pH de 5 para la cepa UATPo7 y a pH 5.5 para la cepa HKPp127 y fue incubada. Los resultados del efecto de la temperatura sobre la actividad de la lacasa se ajustaron por medio de la ecuación de Arrhenius, para determinar las constantes de activación y desactivación para cada una las cepas (figura 28).

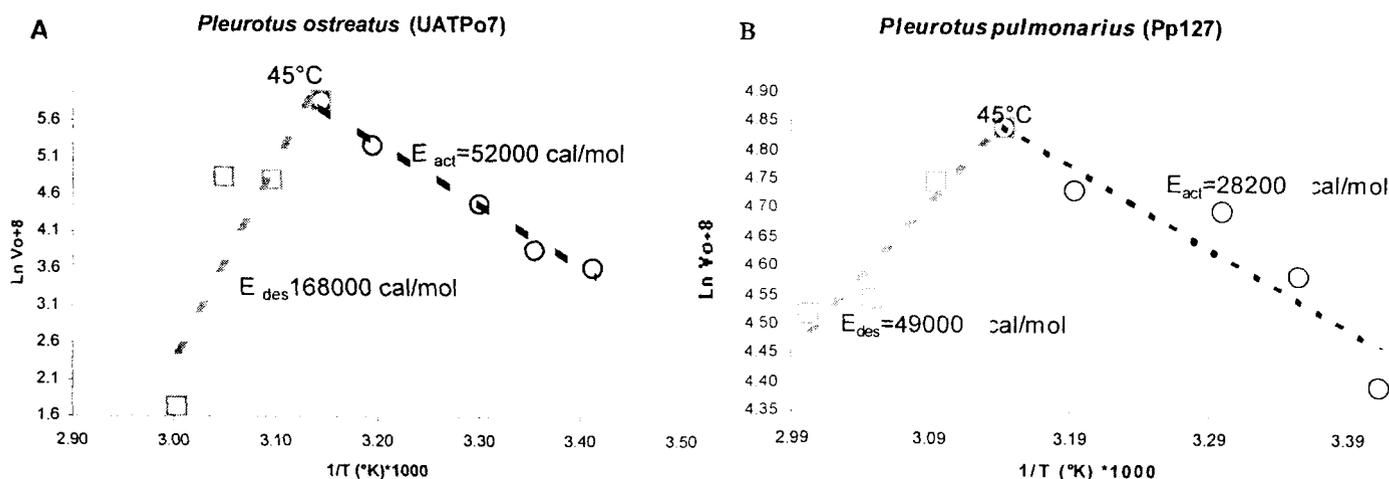


Figura 28. Determinación de la estabilidad térmica y constante de Arrhenius para las lacasas obtenidas del extracto micelial total de las cepas de *Pleurotus*. (A) *Pleurotus ostreatus*, (B) *Pleurotus pulmonarius*. El Ln Vo+8, es el ln de la velocidad de reacción de las lacasas, solo sumado con 8 unidades por conveniencia de obtener números positivos.

Los resultados muestran que a una temperatura de 45°C se alcanza la máxima actividad para la cepa UATPo7 con 0.042 UI/ml mg Proteína, con una constante de activación de 52000 cal/mol y de desactivación de 168000 cal/mol. Por lo tanto si E, es grande, el efecto de la temperatura es pequeño, ya que en la figura 28, la temperatura aparece como inverso.

Se tomaron muestras incubadas a las temperaturas ya indicadas por 20 minutos y fueron cargadas en electroforesis, para efectuar el zimograma.

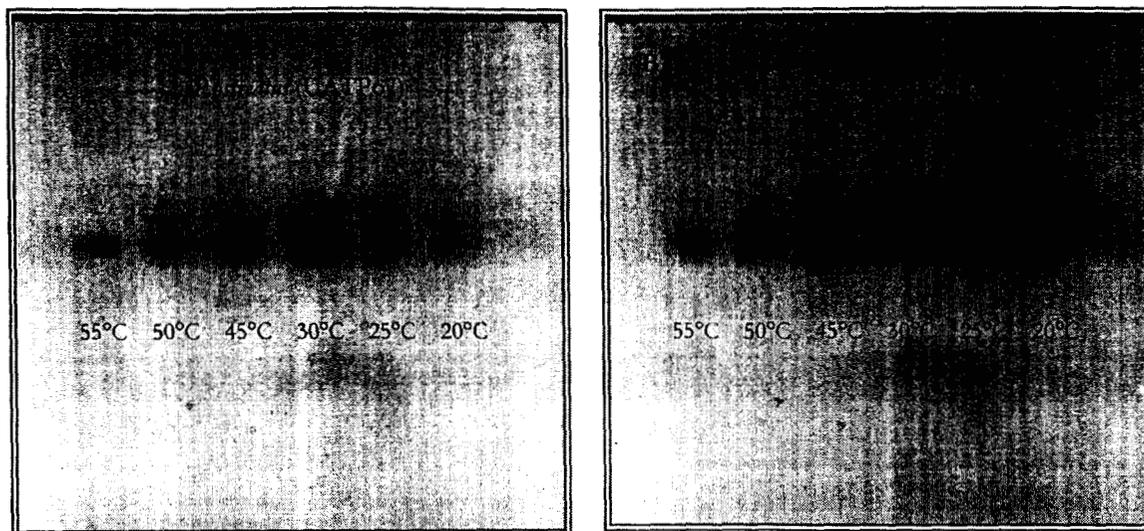


Figura 29. Efecto de la temperatura sobre la actividad de las lacasas de *Pleurotus*. Zimografía de lacasas en PAGE al 10% de los extractos del micelio total de las hifas de *Pleurotus*, tratadas a las temperaturas de 20 hasta 55°C. (A) *Pleurotus ostreatus* y (B) *Pleurotus pulmonarius*.

Los zimogramas muestran la desaparición total de una de las bandas de 50 a 55°C, para la cepa de *Pleurotus ostreatus* (UATPo7) así como la disminución de la actividad de las bandas para las dos cepas por el aumento de la temperatura.

Las muestras fueron incubadas a 55°C para determinar la termoestabilidad de la lacasa hasta obtener la mínima actividad, con muestreos cada 30 minutos, determinando la actividad con siringaldazina. En paralelo se incubó a 70°C una muestra de la lacasa termoestable de *Miceliophthora termophila*. Las lacasas de las cepas UATPo7 y HKPp127 presentaron actividad durante 2.5 y 3.5 h a 55°C respectivamente, mientras que la lacasa de *M. termophila* tuvo actividad hasta de 12 h a 70°C (**figura 30**).

Esto demuestra que las lacasas de la especie *Pleurotus* tiene una resistencia desde 21 hasta el 30% de la actividad con respecto a la especie del hongo termófilo. Se efectuó el cálculo de la constante cinética de inactivación térmica (**tabla 22**), por medio de la ecuación de Arrhenius, escalando los cálculos a partir de una temperatura de 55°C hacia 45°C.

Con ello se determinó que a temperatura óptima, las lacasas de las cepas de *Pleurotus*, tienen una estabilidad hasta de 12.5 horas, comparadas con la lacasa de *M. termophila* en condiciones óptimas hasta de 21 horas.

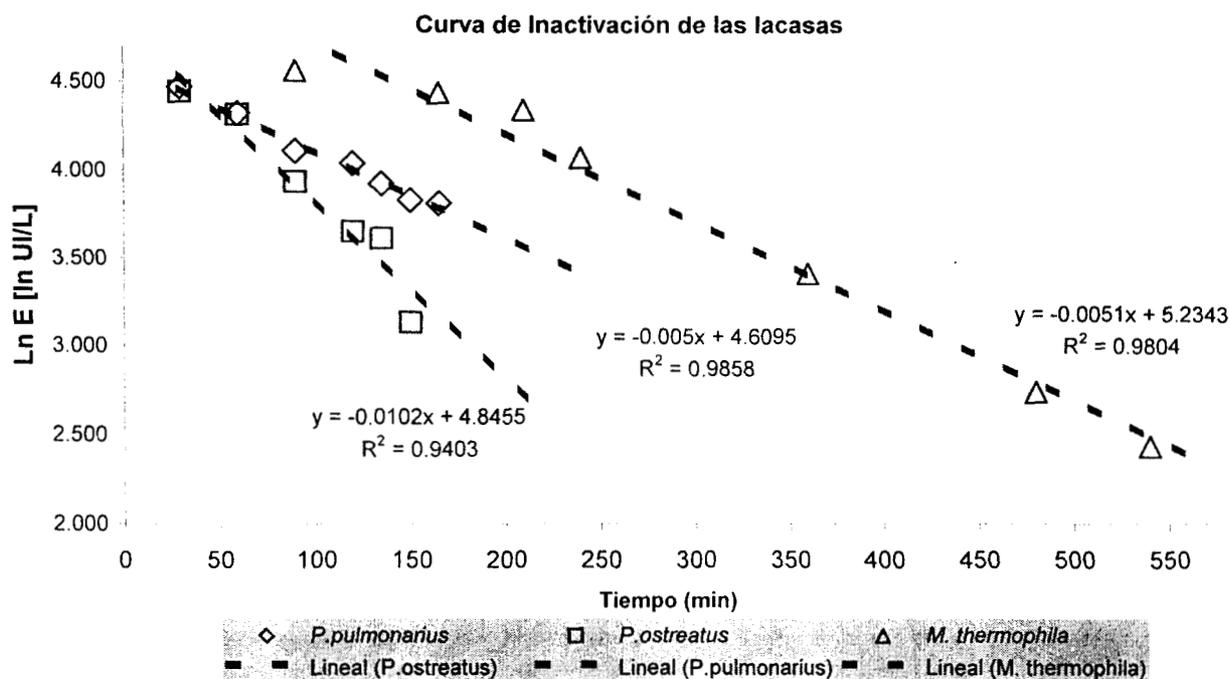


Figura 30. Termoestabilidad de las lacasas extraídas del micelio de *Pleurotus*. Actividad en extractos del micelio total incubados a una temperatura de 55°C para la cepa UATPo7 y HKPpl27; y actividad de la lacasa de *M. thermophila* a una temperatura de 70°C (Símbolos: datos experimentales, Línea punteada: ajuste por regresión lineal).

Los resultados sobre la inactivación térmica enzimática, muestran que *P. ostreatus* y *M. thermophila*, tienen la misma velocidad específica de inactivación a 45°C, en cambio *P. pulmonarius* tiene lacasas que se inactivan al doble de la velocidad, a esta temperatura. Estos datos concuerdan con lo presentado en la **figura 29**, en la cual una de las bandas tiene una termoestabilidad considerable en la cepa UATPo7. Posiblemente el efecto de una menor velocidad específica de inactivación, sea debido a esta banda. Por lo cual la estabilidad es debida a la cooperación entre las diferentes isoenzimas encontradas.

Tabla 22. Constantes cinéticas de inactivación para las lacasas de *Pleurotus* y *Miceliophthora termophila*

Cepa	E _o (U/L)	k (min ⁻¹) (45°C)
<i>P. ostreatus</i>	127.10	0.010
<i>P. pulmonarius</i>	100.40	0.005
<i>M. thermophila</i>	187.60	0.005

Columna 2: Constantes de velocidad específica de inactivación para las lacasas de las cepas de *P. ostreatus* (UATPo7) y *P. pulmonarius* (HKPpl27) a de 55°C y para la lacasa de *M. thermophila* a 70° C. Columna 3: constantes de velocidad específica de inactivación de las lacasas calculadas por medio de la ecuación de Arrhenius a temperatura óptima de 45°C para las cepas de *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius* y para la lacasa de *M. thermophila* a 60°C.

Lo anterior confirma que *P. ostreatus* y *P. pulmonarius* tienen diferencias fisiológicas importantes, respecto a la producción de las enzimas lacasas. Estas diferencias se hacen más evidentes, durante las etapas de maduración, ya que se demostró por zimografía (**figura 25**), que existe un aumento en la cantidad de las bandas. Es decir que a medida que el estado morfológico en el micelio pasa del joven al maduro, existen señales “regulatorias”, que promueven la formación de pigmentos, así como estructuras superiores, como lo es el basidiocarpo. Los resultados confirman que existe un vínculo estrecho entre el estadio de crecimiento micelial con la expresión y número de lacasas formadas. Esto hace presuponer, que existe un mecanismo complejo de regulación morfológica. Aunque se ha estudiado en varias ocasiones, que dependiendo de las condiciones de crecimiento en varias especies de hongos, los mecanismos de expresión enzimática cambian (Das N. y col., 1997).

Por otro lado las características de estas isoenzimas cambian con respecto a la etapa de crecimiento micelial y que tienen propiedades sobresalientes, como lo es la estabilidad térmica. Algo bastante novedoso es la desaparición de una las bandas cuando se incuban a diferentes temperaturas.

Los cambios morfológicos en el micelio son bastante complejos y se requerirán herramientas de investigación sofisticada, para tratar de elucidar estos mecanismos. Esta investigación trató de aportar datos y técnicas sencillas que permiten, seguir los patrones enzimáticos y morfológicos, en una manera fácil, ello permitirá abrir campos de investigación tanto en el campo morfológico y cinético, para tratar de descubrir nuevas enzimas con características novedosas, así como especies de hongos con una actividad ligninolítica mayor.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

A continuación se discuten los resultados sobre la producción de lacasas de dos especies de *Pleurotus*: *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius* y algunos aspectos sobre la influencia durante el desarrollo micelial.

La metodología empleada sobre el cultivo de macromicetes como *Pleurotus*, sobre espuma de poliuretano (PUF), permitió una forma fácil de medición de la biomasa producida, ya que por largos años se han implantado técnicas de medición, cuando se efectúa por fermentación en sustrato sólido (FSS), además de que estas especies nunca se habían cultivado en un soporte inerte. En años recientes la producción de micelio sobre PUF se ha desarrollado en micromicetes, como *Aspergillus niger* (Romero-Gómez S.J. y Col., 1999). Esta propuesta de cultivo en PUF, de diferentes especies de hongos y microorganismos abrirá un campo importante en el apoyo de las técnicas analíticas para la determinación de la biomasa.

Las especies *Pleurotus ostreatus* (UATPo7) y *Pleurotus pulmonarius* (HKPpl27), presentaron buena invasión en el soporte de PUF impregnado de extracto de malta. La cepa UATPo7 mostró características de invasión mayor a 25°C; en cambio en la cepa HKPpl27, debido a que la temperatura de incubación es mayor ($\pm 28^\circ\text{C}$) hubo variación en la humedad y esta se observó que debe de mantenerse al 70%.

Se demostró que las cepas son incapaces de degradar el PUF, ya que no hubo crecimiento en las cajas cuando se hicieron crecer en un medio mínimo (basándose en sales, sin fuente adicional de carbono). La μ y la biomasa máxima alcanzada para la cepa UATPo7 de 0.13 h⁻¹ y 1.5 de micelio/g soporte, mientras que para la cepa HKPpl27 se obtuvieron valores de 0.11 h⁻¹ y 0.8 g de micelio/g soporte, durante 21 días de incubación.

Aunque no se probaron variaciones en el medio de cultivo propuesto, se han hecho varios estudios sobre el crecimiento de *Pleurotus* en medios sólidos comerciales como papa dextrosa agar (PDA), extracto de malta agar (EMA) y Dextrosa Sabouraud agar (DSA) con buenos crecimientos (Martínez C. y Cruz F., 1982). En medios líquidos se ha propuesto que la variación de la fuente de carbono es un factor que influye en la cantidad de biomasa producida en *Pleurotus florida* (Das N. y Col., 1997). Esto podría probarse para el cultivo de otros hongos donde se requiera un mejor crecimiento y por ende una mayor cantidad de biomasa.

Los hongos son fuente de lacasas en forma considerable, aunque en medio de cultivo la cantidad enzimática obtenida es menor, se requieren condiciones en las cuales a los hongos se les pueda inducir una producción enzimática mayor. De aquí que primero sea optimizar las condiciones de crecimiento y segundo promover la producción de enzimas con la utilización de inductores.

Las investigaciones han sugerido que los inductores que se pueden utilizar son de tres tipos: sustratos de la enzima, sustancias estructuralmente similares a los sustratos u análogos de sustratos de crecimiento natural de razas silvestres (Koroljova-Skorobogat'ko O.V. y Col., 1998). La utilización de sales metálicas se han sugerido (Palmieri G. y col., 2000), por ejemplo el CuSO_4 , promueve también la inducción de la lacasa en *Pleurotus*, ya que no tiene repercusiones en la biomasa generada.

Los resultados apoyan esta evidencia, además que se observó una producción mayor de lacasa comparada con el control. La velocidad específica de crecimiento no varió en presencia y en ausencia del inductor. Esto indica que la cantidad de cobre en el medio de cultivo permite una asimilación dentro del micelio de *Pleurotus*, y que es necesario para la formación de los centros cobre en el sitio catalítico. Una cantidad extremadamente pequeña de cobre permite la incorporación de este al sitio catalítico de la enzima, ya que el micelio del hongo secreta lacasa aún sin el inductor.

El método de tinción de hifas jóvenes y maduras propuesto Sánchez y Moore (1999), demuestra que la cantidad de proteoglicanos que componen la pared celular del micelio de los hongos, es clave en la determinación del estadio de crecimiento. Los resultados obtenidos en esta investigación se basan en los criterios encontrados por Sánchez y Moore (1999). Una mayor cantidad de proteoglicanos implica una tonalidad en tinción mayor, es decir el estadio maduro producirá una mayor tinción, mientras que en el estadio joven será menor.

Los resultados sobre la diferenciación de hifas jóvenes y maduras muestran que la velocidad de crecimientos y generación de biomasa es determinante en la generación de hifas jóvenes y posteriormente en la maduración.

La cantidad de hifas maduras se generó en una cantidad mayor en la cepa UATPo7, debido a una mayor velocidad de crecimiento del micelio en caja con poliuretano. Las micrografías por microscopía de barrido de las zonas maduras de la cepa UATPo7, muestran la presencia de fíbulas, que son características del micelio secundario y de estadio maduro.

Para las dos cepas la invasión en los espacios que conforman al PUF es total formando una red micelial interna, que es favorable en la medición de la biomasa.

En lo que respecta a la velocidad de conversión del sustrato, los parámetros cinéticos de las lacasas obtenidas de las cepas UATPo7 y HKPpl27, se encuentran en el intervalo de velocidad de conversión para la siringaldazina en esta especie de hongo, reportados en la literatura de 0.0172 mM (Leonowicz A. y Grzywnowicz K., 1981; Palmieri G. y Col., 1997).

Los resultados muestran un valor K_m y V_{max} para la cepa UATPo7 de 9×10^{-6} mmol/min y de 0.011mM, mientras que para la cepa HKPpl27 fue de 2×10^{-6} mmol/min y de 0.016mM respectivamente. La razón K_m/V_{max} fue parecida para las lacasas de UATPo7 y HKPpl27, indicándonos que la especificidad sobre la oxidación del sustrato es similar.

En lo que respecta al efecto del inductor, la cantidad de cobre es esencial como fuente de formación de cuproproteínas como lo es la lacasa. Palmieri y colaboradores (2000), investigaron que las sales de cobre fueron excelentes inductores sobre la producción de lacasa, obteniendo alrededor de un incremento de 50 veces con una concentración de 100 μ M en un periodo de 6 días.

Una vez diferenciadas las zonas fisiológicas de los diferentes estadios se comprobó que la cantidad de lacasa aumento en toda la colonia, hasta en un 30% con respecto a la producción de lacasa generada del micelio crecido sin el inductor $CuSO_4$ y que la etapa fisiológica madura es determinante en la actividad en dicha enzima, para cumplir con funciones preparativas a la formación de basidiocarpos, en donde el estrés oxidativo es mayor, siendo necesaria la formación de pigmentos y asimilación de nutrientes en una cantidad mayor. Se obtuvo una cantidad de proteína total mayor con respecto al tiempo como respuesta al aumento de la masa micelial y de la cantidad de lacasa producida.

Las lacasas obtenidas para las cepas de *Pleurotus* fueron estables a pH de 5 a 5.5. Una vez determinado el pH óptimos para la actividad enzimática, los ensayos experimentales fueron hechos en este pH. Las lacasas medidas para la cepa HKPpl27 fueron más estables a pH de 5.5, comparadas con la cepa UATPo7 que lo hicieron a pH5. Estos resultados concuerdan con las investigaciones hechas por Giardina y col en 1999, donde se hicieron estudios sobre la lacasa de *Pleurotus*, encontrándose que la estabilidad de ésta enzima esta entre 3-6 y que depende del sustrato empleado, siendo pH 6 para la siringaldazina.

Muchas de las lacasas reportadas en literatura tienen pesos moleculares entre 56 y 94 KDa, además de se han descubierto hasta 5 isoenzimas para las especies de *Pleurotus* hasta el momento (Thurston C., 1994; Solomon E., 1996; Palmieri G. y Col., 1997; Martínez T. A. y Col., 1999; Larraya L. y Col., 2000). En esta investigación se encontraron para la cepa UATPo7 y HKPpl27, tres y dos enzimas lacasas oxidantes de la siringaldazina respectivamente, mostradas mediante zimografía PAGE. Las zimografías mostraron que existen diferencias marcadas en la cantidad de enzimas que se producen en el micelio en el estadio maduro para la cepa UATPo7, hasta de 3 bandas de actividad en los 21 días de crecimiento y que la adaptación del micelio en el soporte, es un factor que contribuye.

Se ha reportado que existen diferencias en el peso molecular de las enzimas extracelulares e intracelulares y que una secuencia de 20 aminoácidos en la posición N-terminal es la importante para la exportación de enzimas lacasas en *Pleurotus* y que existe una homología entre las variedades de esta especie (Giardina P. y Col., 1999; Larraya L. y Col., 2000). Se observó que existe un peso diferente entre las lacasas que son extracelulares por zimografía. Giardina P. y colaboradores (1999), concuerdan que muchas especies de hongos estudiados producen más de una isoenzima lacasa y que se han obtenido diferentes patrones de isoenzimas de acuerdo con las condiciones de crecimiento y que estas son importantes para la eficiente colonización del sustrato (Das N. y Col., 1997), además de que algunas de las enzimas lacasas están asociadas al crecimiento.

Se especula en esta investigación que las tres bandas que se encuentran para la cepa UATPo7 y una para HKPpl27, están vinculadas a las etapas tempranas de maduración de las hifas y que la presencia de la última banda en la cepa UATPo7 a los 15 días, se estaría expresando al final del proceso de maduración. Es interesante indicar que una de las bandas de *P. ostreatus*, que corrió con el marcador de 47 kDa fue termolábil y en cambio las otras bandas de mayor peso molecular resultaron termo resistentes. Esto indica que este hongo produce isoenzimas con propiedades bioquímicas diferentes, que pudieran ser parte de su capacidad de adaptación a distintos ambientes. En cambio, *P. pulmonarius*, solamente produjo una banda de lacasa termolábil (ca. 78 kDa). La variedad de isoenzimas encontradas para las dos cepas se refleja en los resultados que se obtuvieron por electroenfoque y que concuerdan con lo ya reportado (Solomon E., 1996; Larraya L. y Col., 2000), encontrándose que la actividad se presenta en un rango de pH de 7.4 a 3.5. Este hallazgo coincide con lo encontrado por el grupo del Dr. Aldo González en el Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid, España (comunicación personal).

Ellos han demostrado que en los cultivos de *Corioloopsis gallica* se producen distintas isoenzimas durante el curso de su maduración, según lo han observado usando la técnica de PCR. Queda por estudiarse el papel que desempeña cada tipo de isoenzimas en el proceso de maduración de las hifas y en la capacidad adaptativa de los hongos a distintos ambientes.

Las fracciones colectadas muestran que la separación fue eficiente ya que solo hay una banda en la zimografía PAGE. La mayor cantidad de isoenzimas en la cepa UATPo7 se refleja en un intervalo amplio de mayor actividad, suponiéndose que tiene las mejores características tanto de adaptación como de invasión en el soporte por una mejor movilización de nutrientes. En la naturaleza aunque el género *Pleurotus* es un buen degradador de la lignina; en forma de producción comercial no se ha llegado a una degradación máxima de los sustratos ligninocelulósicos.

La cepa HKPpl27, con invasión de PUF a 28°C, produce enzimas con un grado de tolerancia, y actividad óptima mayor que la cepa UATPo7. Además la tolerancia de las isoenzimas es variada en la misma especie. Este efecto se determinó en la zimografía por la desaparición de una banda termolábil y por la disminución en la actividad de una de las bandas en la cepa *Pleurotus ostreatus*. Por otro lado las enzimas de las dos cepas son poco estables a la temperatura en función del tiempo, ya que solo tuvieron actividad hasta 3.5 h a 55°C, es decir, 5°C por encima de su temperatura óptima que fue de 45°C, que comparado con la lacasa de *M. thermophila* que tiene una resistencia hasta de 19 horas a 70°C.

Las características, tanto bioquímicas, como moleculares de las lacasas intra y extracelulares producidas por el micelio de las cepas de *Pleurotus*, son diferentes. Las lacasas generadas en los diferentes estadios de crecimiento dan indicios de la expresión de los genes que controlan el crecimiento de este hongo. Se han hecho estudios a cerca de la estructura, expresión y mecanismos, por los cuales las lacasas en el género *Pleurotus* son diferentes (Dan, 1997, Giardina, 1999; Larraya y col, 2000). Estos autores concuerdan, en que los fenómenos de adaptación conllevan a la generación de lacasas con características diferentes, tanto estructural como bioquímicamente, y que ello tiene repercusiones fisiológicas en el desarrollo del micelio y formación de los cuerpos fructíferos, es decir en etapas tempranas de la maduración.

Los resultados demuestran que la producción de lacasas, está asociada con principio del crecimiento logístico, además que la oxidación de ABTS, se inicia a los tres días, en el centro de la placa, que tiene hifas maduras y luego se difunde hacia el micelio joven, siguiendo el patrón de distribución del agua. Lo que indica que la enzima fue excretada al medio de cultivo, después de los diez días. Además que el micelio maduro, deja de oxidar el ABTS, indicando que la actividad lacasa no parece estar ligada al proceso final de maduración del micelio.

Con ello se apoyan aún más el hecho de que la expresión y producción de la lacasa tiene importancia en el desarrollo y más en la primera etapa de crecimiento como lo es el micelio de los basidiomicetes como *Pleurotus*, ya que esta enzima es importante en el sistema enzimático de la degradación parcial de la lignina, formación de pigmentos que protegen al hongo del estrés oxidativo causado por la luz y en la competencia con otros hongos por su proliferación, ya que un sistema eficiente de degradación proporciona estas ventajas.

Las velocidades radiales del micelio vegetativo de *P. ostreatus* y *P. pulmonarius* son mayores que la velocidad de extensión de la zona de maduración, indicando que esos dos procesos, tienen una cinética distinta y que la maduración de todo el micelio ocurre, cuando el micelio ha invadido todo el medio disponible. Esto puede ser útil, para la selección de cepas de rápida maduración. Por lo tanto distintas especies producen isoformas, que tienen distinto grado de tolerancia a la temperatura elevada. Esto puede significar, un diverso grado de adaptación evolutiva de las especies a distintos ambientes. Así también las isoformas de lacasa producida, variarían en termotolerancia si los hongos crecen a una temperatura mayor.

Los resultados apoyan aún más el hecho de que la expresión y la producción de la lacasa, tiene importancia en el desarrollo y más en la primera etapa de crecimiento como es el micelio de los basidiomicetes como *Pleurotus*, ya que esta enzima es importante en el sistema enzimático de la degradación parcial de la lignina, formación de pigmentos que protegen al hongo del estrés oxidativo causado por la luz y en la competencia con otros hongos por su proliferación, ya que un sistema eficiente de degradación proporciona estas ventajas.

Estos resultados confirman la hipótesis en este trabajo, a cerca de que la producción de lacasas que oxidan fenoles, pueden cambiar durante el proceso de crecimiento y que dependen de la especie utilizada. Los estudios efectuados proporcionan grandes ventajas y abren un campo extenso, primeramente sobre el cultivo *Pleurotus* y otras especies de hongos en poliuretano, además de innovación ya que nunca se ha cultivado en esta forma, segundo como una forma fácil de estimación de parámetros difíciles de calcular como es la velocidad de crecimiento y como una manera limpia y rápida de la extracción de lacasas, además de una metodología para la selección e identificación de cepas con alta capacidad de producción de lacasas y permitiría la identificación de lacasas nuevas para la inserción de genes de *Pleurotus* u otros hongos térmofilos, en otras especies que no produzcan estas enzimas. Por último el aprovechamiento de la producción de lacasas con propiedades catalíticas sobresalientes y estables para la degradación de compuestos difíciles de eliminar, y que por todo ello las lacasas de *Pleurotus*, tengan cabida de tomarse en cuenta

RESUMEN DE LAS CONCLUSIONES

Los resultados confirmaron que: la cepa más productiva (*P. ostreatus*) creció más rápido y por lo tanto, produjo más enzima lacasa puesto que el nivel de lacasa no estuvo asociada al crecimiento pero sí a la cantidad final de la biomasa, ya que se producían en mayor cantidad al final de la maduración. En la cepa más productiva, se observaron más bandas de isoenzimas de lacasa que en la menos productiva y el número de bandas aumentó conforme avanzó el grado de madurez del micelio. *P. ostreatus* produce más isoenzimas que *P. pulmonarius* y su actividad es más estable frente a cambios de pH y temperatura. Esto indica que un ambiente de adaptación más general predetermina una expresión mayor de enzimas, en comparación con la cepa que crece más restringido y con una adaptación menor. Queda por estudiarse el papel que desempeña cada tipo de isoenzimas en el proceso de maduración de las hifas.

LITERATURA CITADA

1. Adler E. (1977) Lignin chemistry-past, present and future. *Wood Sci. Technol.* **11**: 169-218
2. Ainsworth A. M. y Rayner A. D. M. (1991) Ontogenic stages from conocyte to basidiome and their relation to phenoloxidase activity and colonization processes in *Phanerochaete magnoliae*. *Mycol. Res.* **95**: 1414-1422.
3. Amman M. (1997) The lignozym Process Coming closer to the mill. 9th Int. Symp. on Wood and Pulping Chem. June 9-12, 1997, Montreal, Canadá, pp. F4-1-F4-5.
4. Ander P. y Marzullo L. (1997) Sugar oxidoreductases and veratryl alcohol oxidase as related to lignin degradation. *J. Biotechnol.* **53**: 115-131.
5. Aramayo R. y Timberlake W. E. (1990) Sequence and molecular structure of the *Aspergillus nidulans* *yA* (laccase 1) gene. *Nucleic Acids Res.* **18**: 3415.
6. Ardon O. (1994) The structure and function of fungal lacasses. *Microbiology.* **140**: 19-26.
7. Ardon O., Kerem Z. y Hadar Y. (1998) Enhancement of lignin degradation and laccase activity in *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract. *Can J. Microbiol.* **44**: 676-680.
8. Arora D. S. y Gill P. K. (2001) Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. *Bioresource Technology.* **77**: 89-91.
9. Auria R., Palacios J. y Revah S. (1992) Determination of the interparticular effective diffusion coefficient for CO₂ and O₂ in solid state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering.* **39**: 898-902.
10. Bar-Nun N y Mayer A. M. (1990) Curcubitacins-repressors cucumber tissue against infection by *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry.* **29**: 787-791.
11. Bes B., Pettersson B., Lennholm H., Iversen T. y Eriksson K. E. (1987) Synthesis, structure and enzymatic degradation of an extracellular glucan produced in nitrogen-starved cultures of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **9**: 310-318.
12. Bezalel L. (1997) Enzymatic Mechanisms Involved in Phenanthrene Degradation by the White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology.* **63**(7): 2495-2501.
13. Blaich R. y Esser K. (1975) Function of enzymes in wood destroying fungi. II. Multiple forms of laccase in white rot fungi. *Arch. Microbiol.* **103**: 271-277.
14. Böckle B., Martínez M. J., Guillén F. y Martínez A. (1999) Mechanism of Peroxidase Inactivation in Liquid Cultures of the Ligninolytic Fungus *Pleurotus pulmonarius*. *Applied and Environmental Microbiology.* **65** (3): 923-928.
15. Bourbonais R. (1999) Lignin Oxidation by Laccase Isoenzymes from *Trametes versicolor* and Role of the Mediator 2,2,9-Azinobis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate) in Kraft Lignin Depolymerization. *Applied and Environmental Microbiology.* **61**(5): 1876-1808.

16. Bradford M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248.
17. Brauns F. E. (1962) Soluble native lignin milled wood lignin, synthetic lignin and structure of lignin. *Holzforschung*. **16**: 97-102.
18. Bresinsky A., Fischer M., Meixner B. y Paulus W. (1987) Speciation in *Pleurotus*. *Mycologia*. **79**(2): 234-245.
19. Broda P., Birch P., Brooks P., Copa-Patizo J., Sinnott M. L. y Tempe-laars (1994) *Phanerochaete chrysosporium* and its natural substrate. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**: 189–195.
20. Burns P. J. Yeo P., Keshavarz T., Roller S. y Evans C. S. (1994) Physiological studies of exopolysaccharide production from the Basidiomycete *Pleurotus* sp. florida. *Enzyme Microb. Technol.* **16**: 566-572.
21. Call H. P. (1994) Process for modifying, breaking down or bleaching lignin, materials containing lignin or like substances. PCT. *World patent application*. **94**: 29510.
22. Caramelo L. (1999) A Search for Ligninolytic Peroxidases in the Fungus *Pleurotus eryngii* Involving a Keto- γ -Thiomethylbutyric Acid and Lignin Model Dimers. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**(3) 916–922.
23. Chakar F. (1998) Overview of laccase biobleaching technology for kraft pulps (thesis).
24. Choi H. T., Wilks R. L. y Ross I. K. (1987). Formation of sclerotia in liquid cultures of *Coprinus congregatus* and their phenoloxidase isoenzymes. *Mycologia*. **79**: 166-172.
25. Clutterbuck A. J. (1972) Absence of laccase from yellow spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *Journal General Microbiology*. **70**: 423-435.
26. Collins P. (1998) Reduction of the 2,2'-Azinobis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate) Cation Radical by Physiological Organic Acids in the Absence and Presence of Manganese. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**(6): 2026–2031.
27. Cullen P., Fernández-Abalos J., Villanueva J., Santamaría R. y Pérez P. (1997) Purification and characterization of a phenoloxidase (laccase) from the lignin-degrading basidiomycete PM1 (CECT 2971). *Applied and Environmental Microbiology*. **59** (8): 2607-2613.
28. D'Souza T. (1996) Isolation of Laccase Gene-Specific Sequences from White Rot and Brown Rot Fungi by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. **62** (10): 3739–3744.
29. D'Souza T. (1999) Lignin-Modifying Enzymes of the White Rot Basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied and Environmental Microbiology*. **65** (12): 5307–5313.
30. Das N., Sengupta S. y Mukherjee M. (1997) Importance of Laccase in Vegetative Growth of *Pleurotus florida* *Applied and Environmental Microbiology*. **63**(10): 4120–4122.

31. De Jong E., De Vries F. P., Field J. A., Van De Zwan R. P. and De Bont J. A. M. (1992) Isolation of basidiomycetes with high peroxidative activity. *Mycol. Res.* **96**: 1098-1104.
32. De Vries O. M. H., Kooistra W. H. C. F. y Wessels G. H. (1986) Formation of an extracellular laccase by *Schizophyllum commune* dikaryon. *Journal General Microbiology.* **132**: 2817-2826.
33. Delgado C., Guillén F., Martínez M. J. González A. E. y Martínez A. T. (1992) Light stimulation of aryl-alcohol oxidase activity in *Pleurotus eryngii*. *Mycol. Res.* **96** (11): 984-986.
34. Dhugga Kanwarpal S. (1991) Isoelectric Focusing of Plant Plasma Membrane Proteins Protease from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology.* **95**: 1302-1305.
35. Drombovskaia E. N. Kostyshin S. S. (1997). Effect of lignin preparations and cultivation conditions on the ligninolytic complex of the fungus *Pleurotus floridae*, the wood white rot pathogen. *Ukr Biokhim Zh.* **69**(1): 26-31.
36. Eggert C. (1996) The Ligninolytic System of the White Rot Fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and Characterization of the Laccase. *Applied and Environmental Microbiology.* **62**(4): 1151-1158.
37. Eggert C., LaFayette P. R., Temp U., Eriksson K.-E. L. y Dean J. F. D. (1998) Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied Environmental. Microbiology.* **64**(4): 1766-1772.
38. Eriksson, K. (1993) Concluding remarks: Where do we stand and where are we going? Lignin Biodegradation and Practical Utilization. *Journal Biotechnology.* **30**: 149-158.
39. Evans C. S., Dutton M. V., Guillen F., y Veness R. G. (1994) Enzymes and small molecular agents involved with lignocellulose degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**: 235-240.
40. Farrel R., Murtagh K. E., Tien M., y Kirk K. T. (1989) Physical and enzymatic properties of lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microbiology and Technology.* **11**: 322-328.
41. Feng Xu. (1996) Oxidation of Phenols, anilines and Benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and Redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry.* **35**: 7608-7614.
42. Feng Xu. (1998) Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. *Biochemical Journal.* **334**: 63-70.
43. Ferrer I., Dezotti M. y Durán N. (1991) Decolorization of Kraft by free and immobilized lignin peroxidases and horseradish peroxidase. *Biotechnol. Letters.* **13**: 577-582.
44. Figueroa María-Cruz. (1998). Effect of Lysine, Tyrosine, Cysteine, and Glutathione on the Oxidative Cross-Linking of Feruloylated Arabinoxylans by a Fungal Laccase. *Agric. Food Chem.* **46**: 2583-2589.
45. Forss K., Framer K. E. y Stenlund B. (1966) Spruce lignin and its reactions in sulfite cooking. I. The structure of lignin. *Paperi Puu.* **48**: 565-574.

46. Freudenberg K. (1965) Lignin: Its constitution and formation from p-hydroxycinnamylalcohols. *Science*. **148**: 1–6.
47. Galliano H., Gas G., Seris J. L. y Boudet A. M. (1991) Lignin degradation by *Rigidoporus lignosus* involves synergistic action of two enzymes: Mn-peroxidase and laccase. *Enzyme Microbial Technology*. **13**: 478-482.
48. German U. A., Muller G., Hunziker P. E. y Lerch K. (1988). Characterization of two allelic form of *Neurospora crassa* laccase: Amino- and carboxyl-terminal processing of a precursor. *J. Biol. Chem.* **263**: 885-896.
49. Giardina P, Cannio R., Martirani L., Marzullo L., Gianna P. y 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.
50. Giardina P., Palmieri G., Scaloni A., Fontanella B., Faraco V., Cenamo G. y Sannia G. (1999) Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Journal*. **341**: 655-663.
51. Glasser W. G. y Glasser H. R. (1974) Simulation of reactions with lignin by computer (Simrel) II. A model for softwood lignin. *Holzforschung* **28**: 5–11.
52. Gold M. H. y Alice M. (1993) Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiol. Rev.* **57**: 605–622.
53. Gottlieb S., Day W. C. y Pelczar M. J. Jr. (1950) The biological degradation of lignin. II. The adaptation of white-rot fungi to growth on lignin media. *Phytopathology*. **40**: 926–935.
54. Guillén F., Martínez M. J. C. y Martínez A. T. (2000) Oxygen Activation during Oxidation of Methoxyhydroquinones by Laccase from *Pleurotus eryngii*. *Applied and Environmental Microbiology*. **66** (1): 170–175.
55. Guillén F., Martínez M. J. C., y Martínez A. T. (1997) Quinone redox in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii* leading to extracellular production of superoxide anion radical. *Arch. Biochem. Biophys.* **339**: 190-199.
56. Gutierrez-Rojas M., Auria R., Benet J. C. y Revah S. (1995) A mathematical model of state solid fermentation of mycelia fungi on inert support. *Chem Eng J.* **60**: 189-198.
57. Guzmán G. (1977) Identificación de los hongos. Ed. LIMUSA. México D.F.
58. Guzmán G. (1990) La micología en México: Morfología e identificación de los hongos comestibles, venenosos, alucinantes y destructores de la madera. México. Editorial LIMUSA. pp: 1-29.
59. Guzmán G., Mata G., Salmenes D., Soto-Velasco C. y Guzmán-Dávalos L. (1993) El cultivo de los hongos comestibles. 1ª Edición, Editorial IPN-SEP. México.

60. Guzmán G., Montoya L., Bandala V. N. y Salmones D. (1993) Studies on the genus *Pleurotus* (Basidiomicotina) II. *Pleurotus djamour* in México and in other Latin-American countries: taxonomic, confusions, distribution and semi-culture. *Cryptogamic Botany*. 3: 213-220.
61. Haars A. y Huttermann A. (1980) Function of laccase in the white rot fungus *Fomes annosus*. *Arch. Microbiol.* 125: 233-237.
62. Han Young-Hoon. (1996) Mode of action and active site of an extracellular peroxidase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Journal*. 314: 421-426.
63. Hawksworth D. L., Kirk P. M., Sutton B. C. y Peyley D. N. (1995) Ainsworth and Bisby's Dictionary of the fungi. 8a Edition. International Mycol. Institute, Surrey.
64. Heinfling A. (1998) Transformation of Industrial Dyes by Manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a Manganese-Independent Reaction. *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (8): 2788-2793.
65. Heinzkill M. (1998) Characterization of laccases and peroxidases from Wood-Rotting Fungi (Family *Coprinaceae*). *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (5): 1601-1606.
66. Hermann T. E. Kurtz M. B. y Champe S. P. (1983) Laccase localized in hülle cells and cleistothecial primordia of *Aspergillus nidulus*. *Journal Bacteriology*. 154: 955-964.
67. Herrera, T. y Ulloa M. (1990) El reino de los hongos: Micología básica y aplicada. UNAM y Fondo de Cultura Económica. México DF.
68. Iakovlev A. y Stenlid I. (2000) Spatiotemporal patterns of laccase activity in interacting mycelia of wood-decaying basidiomycete fungi. *Microbial Ecology*. 39: 236-245.
69. Johannes C. (2000) Natural Mediators in the Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase Mediator Systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (2): 524-528.
70. Kaichang Li. (1998) Mechanistic studies of the oxidation of a non-phenolic lignin model compound by the laccase/1-hydroxybenzotriazole redox system. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 27: 239-243.
71. Kaichang Li., Feng Xu y Eriksson K-E. (1999) Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(6): 2654-2660.
72. Kerrigan R. W. y Ross I. K. (1988) Extracellular laccases: biochemical markers for *Agaricus* systematic. *Mycologia*. 80(5): 689-695.
73. Kim Yeon-Ran. (1996) A Heme-containing Ascorbate Oxidase from *Pleurotus ostreatus*. *J. Biol. Chem.* 271(6): 3105-3111.
74. Klibanov A. M. y Alberti B. (1981) Enzymatic removal of dissolved aromatics from industrial aqueous effluents. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 2: 373-379.

75. Kobayashi S. (1996) Novel Synthetic Pathway to a Poly(phenylene oxide): Laccase-Catalyzed Oxidative Polymerization of Syringic Acid. *Macromolecules*. **29**: 3053-3054.
76. Kojima Y., Tsukuda Y., Kawai Y., Tsukamoto A., Sugiura J., Sakaimo M. y Kita Y. (1990) Cloning, sequence analysis and expression of ligninolytic phenoloxidase genes of the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *Journal Biological Chemistry*. **265**: 15224-15230.
77. Koroljova-Skorobogat'ko O.V., Stepanova E. V., Gavrilova V. P., Morozova O. V. Lubimova N. V., Dzchafarova A N., Jaropolov A. I. y Makower A. (1998) Purification and characterization of the constitutive form of laccase from the basidiomycete *Coriolus hirsutus* and effect of inducers on laccase synthesis. *Biotechnology Applied Biochemistry*. **27**: 48-54.
78. Laemmli, U, K., (1970). *Nature*, **227**: 680
79. Larralde-Corona P., López-Isunza F. y Viniegra-González G. (1997) Morphometric evaluation of the specific growth rate of *Aspergillus niger* grow in agar plates at high glucose levels. *Biotechnology and Bioengineering*. **56(3)**: 287-294.
80. Larraya L., Pérez G., Ritter E., Pisabarro A. y Ramírez L. (2000) Genetic Linkage Map of the edible Basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. **66 (12)**: 5290-5300.
81. Leatham G. y Stahman M. A. (1981) Studies on the laccase of *Lentinus edodes*: specificity, localization and association with the development of fruiting bodies. *Journal General Microbiology*. **125**: 147-157.
82. Leonowicz A. (1999) Biodegradation of Lignin by White Rot Fungi. *Fungal Genetics and Biology* **27**: 175-185.
83. Leonowicz A. y Grzywnowicz K. (1981) Quantitative estimation of laccases forms in some white rot fungi using syringaldazine as a substrate. *Enzyme Microbiology and Technology*. **2**: 337-341.
84. Leonowicz A., Rogalski J., Jaszek M., Luterek J., Wojtas-Wasilewska M., Malarczyk E., Ginalska G., Fink-Boots M. y Cho N. S. (1999) Cooperation of fungal laccase and glucose 1-oxidase in transformation of lignin and some phenolic compounds. *Holzforschung* **53**.
85. Lundquist K. y Kirk T. K. (1978) De novo synthesis and decomposition of veratryl alcohol by a lignin-degrading basidiomycete. *Phytochemistry* **17**: 1676.
86. Machuca A. (1998) Production and characterization of thermostable phenol oxidases of the ascomycete *Thermoascus aurantiacus*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **27**: 217-223.
87. Mansur M. (1997) Identification of a Laccase Gene Family in the New Lignin-Degrading Basidiomycete CECT 20197. *Applied and Environmental Microbiology*. **63 (7)**: 2637-2646.
88. Mansur M. (1998). Differential Gene Expression in the Laccase Gene Family from Basidiomycete I-62 (CECT 20197). *Applied and Environmental Microbiology*. **64 (2)**: 771-774.

89. Marbach I., Harrel E. y Mayer A. M. (1985) Pectin, a second inducer for laccase production by *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*. **23**: 2713-2717.
90. Martínez C. y Cruz F. (1982) Manual de Medios para la propagación de Hongos de importancia comercial. Academic Press, México. 1ª Edición.
91. Martínez-Carrera D., Leben R., Morales P., Sobal M. y Larqué-Saavedra A. (1991). Historia del cultivo comercial de hongos comestibles en México. *Ciencia y Desarrollo*. **96**: 33-43.
92. Martínez- Carrera D. (1993) La biotecnología de hongos comestibles en México. *Ciencia y Desarrollo*. Enero-Febrero: 41-49.
93. Martínez M. J., Böckle B., Camarero S., Guillén F. y Martínez A. T. (1996) MnP isoenzymes produced by two *Pleurotus* species in liquid culture and during wheat straw solid-state fermentation. p. 183–196. In T. W. Jeffries y L. Viikari (ed.), *Enzymes for pulp and paper processing*. American Chemical Society, Washington, D.C.
94. Martínez M. J., Ruiz-Dueñas F. J., Guillén F. y Martínez A. T. (1996) Purification and catalytic properties of two manganese-peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *Eur. J. Biochem.* **237**:424-432.
95. Martínez T. A., Varela E. y Martínez M. J. (1999) Molecular cloning of aryl-alcohol oxidase from the fungus *Pleurotus eryngii*, an enzyme involved in lignin degradation. *Biochemical Journal*. **341**:113-117.
96. Mata G. y Martínez-Carrera D. (1988) Estimación de la producción de residuos agroindustriales potencialmente utilizables para el cultivo de hongos comestibles en México. *Revista Mexicana de Micología*. **4**: 287-296.
97. Matcham S. E. y Wood D. A. (1992) Purification of *Agaricus bisporus* extracellular laccase from mushroom compost. *Biotechnology Letters*. **14**: 297-300.
98. Messerschmidt A. y Huber R. (1990) The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. Modeling and Structural relationships. *Eur. J. Biochem.* **187**:341-352.
99. Muñoz C. y Guillen F. (1997) Laccase Isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: Characterization, Catalytic Properties and Participation in Activation of Molecular Oxygen and Mn²⁺ Oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**(6): 2166-2174.
100. Nimz H. (1974) Beech lignin-Proposal of a constitutional scheme. *Angew. Chem.* **13**: 313–321.
101. Okazaki Shin-Ya. (2000) Characterization and Catalytic Property of Surfactant-Laccase Complex in Organic Media. *Biotechnol. Prog.* **16**: 583-588.
102. Paice M. y Jurasek L. (1984) Peroxidase catalyzed color removal from bleach plant effluent. *Biotechnology and Bioengineering*. **26**: 477-480.

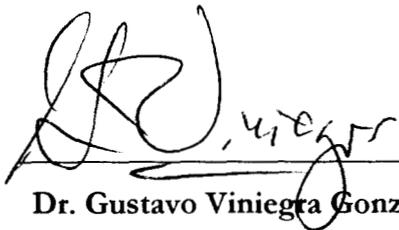
103. Palmieri G., Giardina P., Bianco C., Fontanella B. y Sannia G. (2000) Copper Induction of Laccase Isoenzymes in the Ligninolytic Fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (3): 920-924.
104. Palmieri G., Giardina P., Bianco C., Scaloni A., Capasso A. y Sannia G. (1997) A Novel White Laccase from *Pleurotus ostreatus*. *J. Biol. Chem.* 272 (50): 31301-31307.
105. Payen A. M. (1838) Me'moire sur la composition du tissue des plantes et du ligneux. *Compt. Rend.* 7: 1052-1056.
106. Perry C. R., Smith M., Britnell C. H., Wood D. A. y Thurston C. F. (1993) Identification of two laccases genes in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Journal General Microbiology*. 139: 1209-1218.
107. Pickard M., Román R., Tinoco R. y Vázquez-Duhalt R. (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Corioloopsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (9): 3805-3809.
108. Prilliger R. J. y Militoris N. (1979) Electroforms in the laccase in poblacion allelopatic in the fungus *Pleurotus ostreatus*. *The Mycologist* 5(7): 126-132.
109. Prosser J. I. (1990) Growth of Fungal Branching Systems. *The Mycologist*. 4(2): 60-65.
110. Prosser J. I. y Trinci A. P. J. (1979) A model for hyphal growth and branching. *Journal General Microbiology*. 111: 153-164.
111. Rehman A. U. y Thurston C. F. (1992) Purification of laccase 1 from *Armillaria mellea*. *Journal General Microbiology*. 138: 1251-1257.
112. Reinhammar B. (1970) Purification and Proprieties of Laccase and Stellacyanin from *Rhus vernicifera*. *Biochim. Biophys. Acta*. 205: 35-47.
113. Rigling D. y Van Alfen N. K. (1991) Regulation of laccase biosynthesis in the plant-pathogenic fungus *Cryphometria parasitica* by double-stranded RNA. *Journal Bacteriology*. 173: 8000-8003
114. Rogalski J., Wojtas'-Wasilewska M., Bialy B., Luterek J. y Leonowicz A. (1996). A study of aromatic ring cleavage enzymes in *Phlebia radiata*. In Proc. 6 th Intern. Conf. *Biotechnol. Pulp Paper Ind.* (E. Srebotnik y K. Messner, Eds), pp. 447-450, Facultas-Universita" tsverlag Vienna. Austria.
115. Romero-Gómez S.J., Augur C. y Viniegra-González G. (2000) Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnology Letters* 22: 1255-1258.
116. Runge Troy (1999) A review of the chemistry involved de deslignification of pulps kraft (tesis).
117. Saloheimo M., Nikku-Paavola M. L. y Konowles J. K. C. (1991) Isolation and structural analysis of the laccase from the lignin-degrading fungus *Phlebia radiata*. *Journal General Microbiology*. 137: 1537-1544.

118. Sánchez C. y Moore D. (1999) Conventional histological stains selectively stain fruit body initials of basidiomycetes. *Mycol. Res.* 103 (3): 315-318.
119. Santucci R. (1998) Unmediated heterogeneous electron transfer reaction of ascorbate oxidase and laccase at a gold electrode. *Biochemical Journal.* 332: 611-615.
120. Sarikaya A. y Ladish M. R. (1997) Mechanisms and potential applications of bio-ligninolytic systems in a cells. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 62: 131-149.
121. Shuttleworth K. (1986) Soluble and immobilized laccase as catalysts for transformation of substituted phenol. *Enzyme Microbiology Technology.* 8: 171-177.
122. Singer R. y Harris B. (1987) Mushroom and Truffles Botany, Cultivation and utilization, Koeltz Scientific Book, Koenigstein.
123. Smith J. F. y Claydon N. (1989) Effect of substrate depth on extracellular endocellulase and laccase production on *Agaricus bisporus*. *Mycol. Res.* 93: 292-296.
124. Solomon E. (1996) Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chem. Rev.* 96: 2563-2605.
125. Staszczak M., Nowak G., Grzynowicz K. y Leonowicz A. (1996). Proteolytic Activities in cultures of selected white-rot fungi. *J. Basic Microbiol.* 3: 193-203.
126. Stirt J. G. y Crawford R L. (1985) Microbial degradation of chlorinated phenols. *Trends Biotechnol.* 3: 300-305.
127. Sundaram U. (1997) Spectroscopic Investigation of Peroxide Binding to the Trinuclear Copper Cluster Site in Laccase: Correlation with the Peroxy-Level Intermediate and Relevance to Catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* 119: 12525-12540.
128. Szklarz G. (1989) Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. *Mycologia.* 81(2): 234-240.
129. Szklarz G. y Leonowicz A. (1986) Cooperation between fungal laccase and glucose oxidase in the degradation of lignin derivatives. *Phytochemistry.* 25: 2537-2539.
130. Temp U. y Eggert C. (1999) Novel Interaction between Laccase and Cellobiose Dehydrogenase during Pigment Synthesis in the White Rot Fungus *Pleurotus*. *Applied and Environmental Microbiology.* 65(2): 389-395.
131. Thurston C. (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology.* 140: 19-26
132. Traquair J. A. (1987) Oxalic acid and calcium oxalate produced by *Leucostoloma cincta* and *L. personii* in cultures and in peach bark tissue. *Can. J. Bot.* 65: 1952-1956.
133. Trudeau F. (1997) Reagentless Mediated Laccase Electrode for the Detection of Enzyme Modulators *Anal. Chem.* 69: 882-886.

134. Varela E. (1999) Molecular cloning of aryl-alcohol oxidase from the fungus *Pleurotus eryngii*, an enzyme involved in lignin. *Biochemical Journal*. **341**: 113-117.
135. Vazquez-Duhalt R., Westlake D. W. y Fedorak P.M. (1994) Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing aromatic solvents. *Applied Environmental Microbiology*. **60**: 459-466.
136. Viniegra-González G., Saucedo-Castañeda G., López-Isunza F. y Favela-Torres E. (1993) Symmetric branching model for the kinetics of mycelia growth. *Biotechnology and Bioengineering*. **42**: 1-10.
137. Viterbo A., Yagen B. y Mayer A. M. (1993). Cucurbitacins attack enzymes and laccase in *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*. **32**: 61-65.
138. Wessels J. (1999) Fungi in their own right. *Fungal genetic and Biology*. **27**: 134-145.
139. Whittaker R. H. (1969) New concept of kingdoms of organisms. *Science*. **163**: 150-160.
140. Wong Ken K. Y., Kathryn A. B. y Kibblewhite R. P. (1999) Effects of the laccase-mediator system on the handsheet properties of two high kappa Kraft pulps. *Enzyme and Microbial Technology* **25**: 125-131.
141. Wood D. A. (1980) Inactivation of extracellular laccase during fruiting of *Agaricus bisporus*. *Journal General Microbiology*. **117**: 339-345.
142. Worrel J. J., Chet I. y Huttermann A. (1986) Association of rhizomorph formation with laccase activity in *Armillaria spp.* *Journal General Microbiology*. **132**: 2527-2533.
143. Yaver P. y Feng Xu. (1998) Purification, Characterization, Molecular Cloning, and Expression of Two Laccase Genes from the White Rot Basidiomycete *Trametes villosa*. *Applied and Environmental Microbiology*. **62(3)**: 834-841.
144. Young H. L., Chang W. L. y Chang H. N. (1989). Citric acid production by *Aspergillus niger* immobilized or polyurethane foam. *Applied Microbiology Biotechnology*. **30**: 141-143.
145. Zadrazil F. (1992) In Solid Substrate Cultivation, Edited By H. W. Doelle, D. A. Mitchell y C. F. Rolz. *Elsevier Applied Science*, London and New York, pp 321.
146. Zhu Y., Knol W. y Boll S. (1996) Medium optimization for nuclease P1 production by *Penicillium citrinum* in solid-state fermentation using polyurethane foam as inert carrier. *Enzyme and Microbial Technology*. **18**: 108-112.

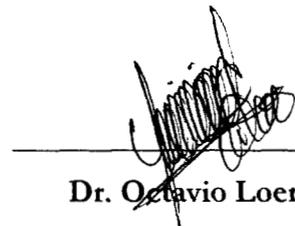
El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, aprobó la presente tesis el 17 de septiembre de 2001.

PRESIDENTE



Dr. Gustavo Viniegra González

SECRETARIO



Dr. Octavio Loera Corral

1er VOCAL



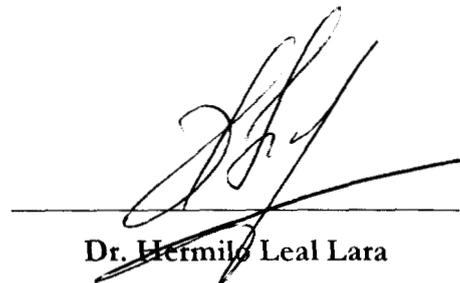
Dra. Carmen Sánchez Hernández

2º VOCAL



Dr. Rigoberto Gaytan Hernández

3er VOCAL



Dr. Hermilo Leal Lara