



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS EN BIOTECNOLOGÍA**

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD EXTRACELULAR DE
LACASA EN CEPAS DE HONGOS SILVESTRES**

TESIS QUE PRESENTA:

Q.F.B. MARINA ARREDONDO SANTOYO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

BIOTECNOLOGÍA PECUARIA

ASESOR:

DR. GERARDO VÁZQUEZ MARRUFO

SINODALES:

DR. EVERARDO LÓPEZ ROMERO

DRA. GUADALUPE ZAVALA PARAMO

DRA. MA. SOLEDAD VÁZQUEZ GARCIDUEÑAS

DR. HORACIO CANO CAMACHO

RESUMEN

Los hongos se han empleado en la obtención de enzimas líticas extracelulares para el tratamiento de rastrojo destinado a la alimentación de animales de granja, incrementado la digestibilidad y aprovechamiento del mismo. Los hongos filamentosos son los principales degradadores del complejo de lignocelulosa de las plantas, ya que producen isoformas de enzimas oxidativas extracelulares como la lacasa, involucradas en la degradación de los polímeros de la pared celular. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de producción de lacasa extracelular de 13 cepas silvestres de hongos filamentosos. Estas cepas fueron crecidas en medio Agar Extracto de Malta (AEM) adicionado con 9 sustratos fenólicos en ensayos independientes para revelar la producción de lacasa extracelular con base en la decoloración/oxidación del medio. Se emplearon los colorantes naranja de metilo, azul ácido, chicago azul cielo 6B, índigo carmín, azul remazol brillante R, azul directo 71 y fucsina ácida a una concentración de 250 mg/mL, así como los compuestos fenólicos guayacol (0.01% w/v) y ácido tánico (0.5% w/v). Las cepas que mostraron tener la mayor capacidad de decoloración fueron 149-CMU, TA-CMU y TC-CMU y las que mostraron una mayor actividad oxidativa sobre el guayacol y el ácido tánico fueron 29-CMU, 39-CMU, TA-CMU. Con base en estos resultados, las cepas 149-CMU (*Pleurotus djamour*), TA-CMU (*Trametes versicolor*) y 29-CMU (*Pestalotiopsis paeonicola*) fueron seleccionadas para realizar ensayos de actividad de lacasa en cultivo líquido empleando caldo de extracto de papa (PDB), extracto de rastrojo o rastrojo molido. La cepa que mostró mayor actividad específica de lacasa fue TA-CMU con 370 U/mg en extracto de papa, 460 U/mg con extracto de rastrojo (10% v/v) y 440 U/mg con rastrojo molido (2% p/v). La cepa 149-CMU mostró una actividad específica basal de 40 U/mg en extracto de papa, 350 U/mg con extracto de rastrojo y de 225 U/mg con rastrojo molido. La cepa 29-CMU sólo presentó actividad basal de 25 U/mg en extracto de papa.

Palabras clave. hongos silvestres, lacasa extracelular, inducción enzimática, rastrojo.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
I.- INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. Estructura de la pared celular vegetal: papel de la lignina.....	1
I.2. Mecanismos de degradación de la pared celular vegetal: degradación de lignina.....	3
I.2.1. Tipos de degradación de madera por ataque fúngico	4
I.2.2. Enzimas oxidativas ligninolíticas extracelulares	5
I.2.3. Lacasa y mecanismo de degradación	8
I.3. Genes de lacasas de hongos	11
I.4. Inductores de lacasas en hongos.....	12
I.5. Aplicaciones biotecnológicas de lacasas.....	13
I.6. Estrategia de búsqueda de nuevas cepas silvestres con potencial biotecnológico.....	15
II.-JUSTIFICACIÓN.....	16
III.- HIPÓTESIS.....	17
IV.- OBJETIVOS.....	17
IV.1. Objetivo General.....	17
IV.2. Objetivos específicos.....	17

V.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	18
VI.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
VI.1. Cepas de estudio.....	19
VI.2. Medios de cultivo.....	19
VI.3. Cinéticas de crecimiento.....	21
VI.4. Ensayos de actividad enzimática.....	22
VI.5. Determinación de proteína.....	23
VII.- RESULTADOS.....	24
VII.1 Aislamiento y recuperación de las cepas seleccionadas	24
VII. 2. Selección de cepas con actividad fenol-oxidasa extracelular.....	25
VII. 2.1 Ensayos de decoloración en medio sólido.....	25
VII. 2.2. Cinéticas de crecimiento en medio sólido AEM.....	30
VII.3. Actividad de lacasa extracelular basal e inducida en las cepas seleccionadas.....	39
VII.3.1. Comparación de distintas condiciones de cultivo para una misma cepa.....	39
VII.3.1.1. CEPA 29-CMU (<i>P. paeonicola</i>).....	39
VII.3.1.2. CEPA 149-CMU (<i>P. djamour</i>)	40
VII.3.1.3. CEPA TA-CMU (<i>T. versicolor</i>)	41
VII.3.2. Comparación entre cepas por condiciones de cultivo	43

VII.3.2.1. Condiciones basales	43
VII.3.2.2. Inducción con extracto de rastrojo	44
VII.3.2.3. Inducción con rastrojo molido	44
VIII. DISCUSIÓN.....	47
IX. CONCLUSIONES.....	52
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Nombre	Página
1	Representación esquemática de la pared celular vegetal.....	1
2	Estructura química de la lignina.....	3
3	Proceso de degradación de lignina.	8
4	Imagen cristalográfica de una lacasa.....	9
5	Sitio catalítico de la lacasa.....	9
6	Ciclo catalítico de la lacasa.....	10
7	Representación esquemática de los ciclos redox catalizados por lacasas para la oxidación de los substratos en ausencia (a) o en la presencia (b y c) de mediadores químicos.....	11
8	Cepas recuperadas del Cepario Michoacano Universitario	24
9	Ensayos positivos de decoloración en medio sólido.....	26
10	Ensayo de decoloración de índigo carmín en medio sólido.....	27
11	Ensayo de decoloración de índigo carmín en medio sólido.....	28
12	Ensayo de oxidación de guayacol en medio sólido.....	29
13	Cinética de crecimiento de la cepa 26-CMU (<i>N. sitophila</i>).....	30
14	Cinética de crecimiento de la cepa 29-CMU (<i>P. paeonicola</i>).....	31
15	Cinética de crecimiento de la cepa 39-CMU (<i>L. theobromae</i>).....	32
16	Cinética de crecimiento de la cepa 48-CMU (<i>D. ambigua</i>).....	32
17	Cinética de crecimiento de la cepa 59-CMU (<i>G. pusillum</i>).....	33
18	Cinética de crecimiento de la cepa 81-CMU (<i>U. ramaniana</i>).	34

ÍNDICE DE FIGURAS (continuación)

Figura	Nombre	Página
19	Cinética de crecimiento de la cepa 89-CMU (<i>D. bryoniae</i>).....	34
20	Cinética de crecimiento de la cepa 96-CMU (<i>M. hiemalis</i>).....	35
21	Cinética de crecimiento de la cepa 149-CMU (<i>P. djamour</i>).....	36
22	Cinética de crecimiento de la cepa 219-CMU (<i>F. incarnatum</i>)	36
23	Cinética de crecimiento de la cepa 234-CMU (<i>I. gibba</i>).	37
24	Cinética de crecimiento de la cepa TA-CMU (<i>T. versicolor</i>).....	38
25	Cinética de crecimiento de la cepa TC-CMU (<i>T. cervina</i>).....	38
26	Actividad específica de lacasa extracelular basal e inducida y cinéticas de crecimiento en las mismas condiciones.....	40
27	Actividad específica de lacasa extracelular basal e inducida y cinéticas de crecimiento en las mismas condiciones. Cepa 149-CMU.....	41
28	Actividad específica de lacasa extracelular basal e inducida y cinéticas de crecimiento en las mismas condiciones. Cepa TA-CMU.....	42
29	Actividad específica de lacasa extracelular basal y cinética de crecimiento en la misma condición. Cepas 29-CMU, 149-CMU y TA-CMU.....	43
30	Actividad específica de lacasa extracelular inducida con extracto de rastrojo y cinética de crecimiento en la misma condición. Cepas 29-CMU, 149-CMU y TA-CMU.....	44
31	Actividad específica de lacasa extracelular inducida con rastrojo molido y cinética de crecimiento en la misma condición.....	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Nombre	Página
I	Características químicas y anatómicas de diversos tipos de descomposición de la madera y tipos de hongos que las generan...	5
II	Principales características de los dos grupos de enzimas ligninolíticas de hongos.....	5
III	Primera Selección de cepas empleada.....	19
IV	Decoloración/oxidación de las cepas ensayadas.	29

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Estructura de la pared celular vegetal: papel de la lignina

Las plantas en general y la madera de las plantas leñosas en particular constituyen el material renovable principal en la tierra, los cuales son utilizados como material de construcción y en la alimentación animal, y en un gran número de aplicaciones industriales. La pared celular de las plantas está constituida por el complejo llamado lignocelulosa, el cual es el biopolímero orgánico más abundante en la naturaleza y el componente estructural principal de las plantas (Dashtban *et al.*, 2010). El material lignocelulósico está formado por tres polímeros principales; la celulosa, la hemicelulosa y la lignina (Sánchez *et al.*, 2009) (Figura 1).

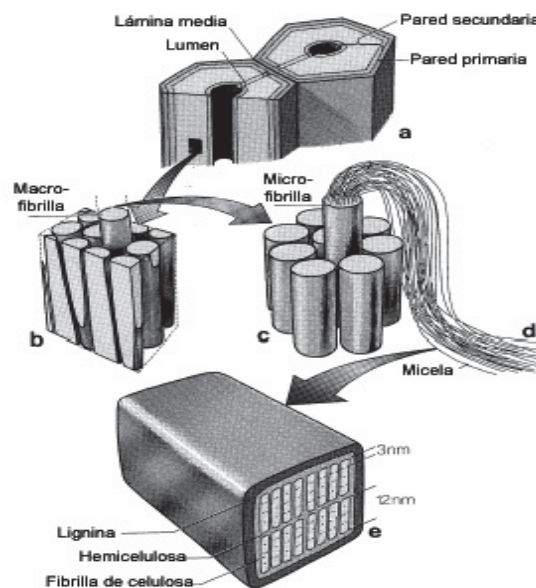


Figura 1. Representación esquemática de la pared celular vegetal. **a)** Corte transversal de una fibra de madera mostrando la lámina media y la pared celular primaria y secundaria. **b)** Sección transversal de una porción de la pared secundaria con macrofibrillas. **c)** microfibrillas. **d)** Filamentos micelares. **e)** Corte transversal de una micela, mostrando la composición ultraestructural: la lignina, la hemicelulosa y la celulosa. El espacio entre las fibras vegetales (lámina media), macrofibrillas, microfibrillas y los filamentos micelares está ocupado por lignina

(Gustavo Dávila, 2001)

La celulosa es el componente principal de todo el material vegetal y la molécula orgánica más abundante en la tierra. Es un biopolímero lineal constituido por moléculas del anhidroglucopiranososa (glucosa) conectadas por enlaces glucosídicos β -1,4. El acoplamiento de cadenas adyacentes de celulosa vía enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals da lugar a la alineación paralela de estructuras cristalinas conocidas como microfibrillas (Zhang *et al.*, 2006).

La hemicelulosa tiene un grado intermedio de complejidad, es un polímero heterogéneo de pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (principalmente manosa, menos glucosa y galactosa) (Dashtban *et al.*, 2010) que habitualmente están acetiladas formando cadenas ramificadas (Martínez *et al.*, 2005).

La lignina es el segundo biopolímero más abundante en la tierra, es un polímero heterogéneo muy complejo, constituido a partir de la polimerización de tres precursores: el alcohol *p*-hidroxicinámico (cumarílico), el alcohol 4-hidroxi-3-metoxicinámico (coniferílico) y el alcohol 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (sinapílico). El acoplamiento oxidativo de estos monómeros de alcoholes aromáticos crea una estructura compleja que es altamente resistente hacia la degradación química y biológica, y confiere rigidez y resistencia mecánica a las plantas (Martínez *et al.*, 2005). El polímero de la lignina abarca una variedad de monómeros conectados por varios enlaces no hidrolizables de C-C y de C-O-C, con un arreglo irregular de enlaces monoméricos e intermonoméricos sucesivos (figura 2). Químicamente este polímero es amorfo, altamente ramificado y de alto peso molecular. La concentración más alta de este polímero se encuentra en la laminilla media, donde actúa como cementante de las fibras de la madera, pero también está presente en las capas de la pared celular (especialmente la pared celular secundaria), formando junto con la hemicelulosa una matriz amorfa en la cual las fibrillas de celulosa se encajan y se protegen de la biodegradación (Martínez *et al.*, 2005). El contenido de lignina varía entre los diversos tipos de plantas (Dashtban *et al.*, 2010).

Otros componentes no estructurales de la pared celular de las plantas incluyen compuestos extraíbles de solventes orgánicos que pueden ser polares (taninos y fenoles) o no polares (grasas y esteroides), compuestos solubles en agua (azúcares y almidón), así como proteínas. Estos componentes juntos representan menos del 5% del peso seco de madera, pero pueden alcanzar el 20% en algunas maderas blandas, como algunas especies dentro de la familia *Cupressaceae* (Martínez *et al.*, 2005).

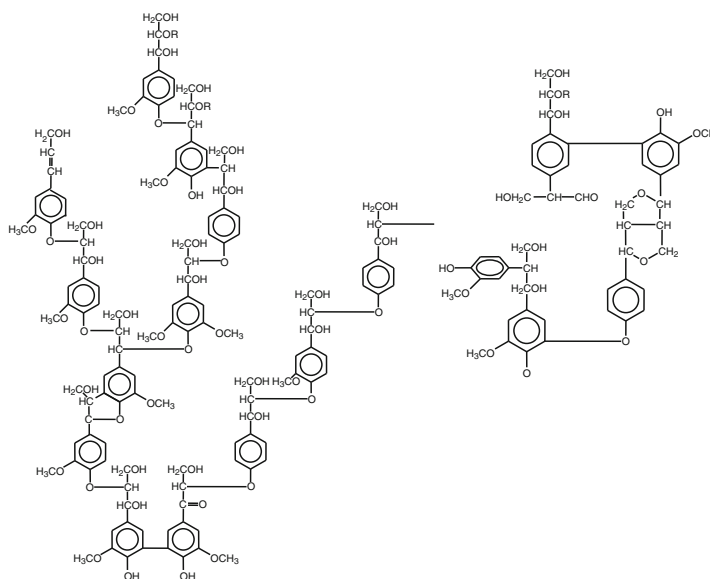


Figura 2. Estructura química de la lignina. (Arora, 2009).

I.2. Mecanismos de degradación de la pared celular vegetal: degradación de lignina

De los componentes del material lignocelulósico, la lignina es naturalmente la más resistente a la degradación (Sánchez *et al.*, 2009). Aunque la lignina resiste el ataque de la mayoría de los microorganismos, los hongos pueden degradarla eficientemente.

I.2.1. Tipos de degradación de madera por ataque fúngico

De acuerdo al mecanismo de descomposición y las características de la madera atacada, la degradación por parte de los hongos se divide en tres clases, realizadas por tres grupos distintos:

- a) *Pudrición blanca*. Los hongos de la pudrición blanca son los degradadores de madera más abundantes en la naturaleza, y se encuentran en los grupos Basidiomycota y Ascomycota. Estos hongos descomponen la lignina de la madera para poder acceder a la celulosa y a la hemicelulosa que se encuentran embebidas dentro de la matriz de lignina.
- b) *Pudrición café*. Los hongos de la pudrición café son un pequeño grupo dentro de Basidiomycota los cuales descomponen principalmente a la celulosa pero no atacan significativamente a la lignina, aunque la pueden modificar.
- c) *Pudrición blanda o suave*. Los hongos de la pudrición suave son organismos de los grupos Ascomycota y Deuteromycota que se encargan de descomponer madera saturada de agua, pero no en un ambiente totalmente anaeróbico.

En la Tabla I se describen algunas características químicas y anatómicas de diversos tipos de descomposición de la madera y tipos de hongos que las generan.

La documentación sobre la capacidad de especies de hongos para degradar lignina en el ambiente natural se ha centrado particularmente en especies de Basidiomycetes de pudrición blanca, principalmente de los géneros *Pleurotus*, *Trametes* y *Phanerochaete*, de las cuales se ha estudiado cada vez con mayor detalle el mecanismo enzimático por el cual se lleva a cabo dicho proceso (Wong *et al.*, 2009).

Tabla I. Características químicas y anatómicas de diversos tipos de descomposición de la madera y tipos de hongos que las generan.

	Pudrición blanca		Pudrición café	Pudrición suave	Mancha del hongo
<i>Aspectos y consistencia de la pudrición</i>	Aspecto blanquecino, más ligero en color que la madera sana, húmedo, suave, esponjoso, pérdida de la fuerza después de la pudrición avanzada.		Café, consistencia seca, polvorienta, frágil, se rompe como los cubos, pérdida drástica de fuerza en la etapa inicial de la pudrición.	Consistencia suave en ambientes mojados. Café y desmenuzable en ambientes secos.	Áreas de la decoloración (motas, puntos y manchas), azul (madera blanda), negro (madera dura), rojo, u otros colores. Decoloración debido al color de la hifa, o respuesta fisiológica del árbol contra el daño.
<i>Hospedero (tipo de madera)</i>	Putrefacción simultánea	Delignificación selectiva	Maderas blandas; raramente maderas duras. Ecosistemas y madera del bosque.	Generalmente maderas duras (maderas blandas degradadas muy levemente). Ecosistemas del bosque, madera arqueológica histórica, postes para uso general.	Maderas blandas y maderas duras en ecosistemas del bosque, y durante transporte y el almacenaje de la madera.
	Madera dura, raramente madera blanda.	Madera dura y madera blanda			
<i>Componentes de la degradación de la pared celular</i>	Celulosa, lignina, hemicelulosa.	Ataque inicial selectivo para hemicelulosa y lignina, posteriormente celulosa. Fibrosa.	Celulosa, hemicelulosa. La lignina se modifica levemente. En algunos casos, degradación extendida de la madera dura.	Celulosa y hemicelulosa, la lignina se altera levemente.	Extractos de madera y compuestos solubles en agua (azúcares y almidón).
<i>Características anatómicas</i>	Pared celular atacada progresivamente del lumen. Los surcos de la erosión se asociaron a los de la hifa.	Degradación de la lignina en la laminilla media y pared secundaria. La laminilla media disolvió por el mecanismo de la difusión, cavidades radiales en pared celular.	Degradación en una gran distancia de las hifas (mecanismo de difusión). Pared celular entera atacada rápidamente en las grietas y las hendiduras.	El ataque de la pared celular en la proximidad de la hifa, empieza con lumen de la célula. Cavidades cilíndricas bicónicas longitudinales en la pared secundaria (tipo 1). Erosiones de la pared secundaria (tipo - 2). Pudrición suave por algunos basidiomicetes.	Colonización que afecta sobre todo a los canales del parénquima y de la resina (producidos a través de hoyos).
	Basidiomicetos (<i>T. versicolor</i> , <i>Irpex lacteus</i> , <i>P. chrysosporium</i> y <i>Heterobasidium annosum</i>) y algunos ascomicetos (<i>Xylaria hypoxylon</i>).	Basidiomicetos (<i>Ganoderma australe</i> , <i>Phlebia tremellosa</i> , <i>C. subvermispora</i> , <i>Pleurotus</i> spp. y <i>Phellinus pini</i>).	Exclusivamente Basidiomicetos (<i>C. puteana</i> , <i>Gloeophyllum trabeum</i> , <i>Laetiporus sulphureus</i> , <i>Piptoporus betulinus</i> , <i>Postia placenta</i> y <i>Serpula lacrimans</i>).	Ascomicetos (<i>Chaetomium globosum</i> , <i>Ustulina deusta</i>) y Deuteromicetos (<i>Alternaria alternata</i> , <i>Thielavia terrestris</i> , <i>Paecilomyces</i> spp.), y algunas bacterias. Algunos basidiomicetos de pudrición blanca (<i>Inonotus hispidus</i>) y pudrición café (<i>Rigidoporus crocatus</i>).	Ascomicetos (<i>Ophiostoma</i> y <i>Ceratocystis</i> spp.) Deuteromicetos (<i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Phialophora</i> spp. y <i>Trichoderma</i> spp.).

(Martínez et al., 2005)

1.2.2. Enzimas oxidativas ligninolíticas extracelulares

Distintas enzimas oxidativas extracelulares secretadas por los hongos ligninolíticos están involucradas en la degradación de los componentes de la

pared celular de las plantas, en particular varias isoformas de oxidasas y peroxidasas cuyas características principales se resumen en la Tabla II.

Tabla II. Principales características de los dos grupos de enzimas ligninolíticas de hongos

Tipo de enzima	Reacción ¹	Cofactor	Iones metálicos ²	Mediadores	Subunidades y masa molecular (kDa)	Rango óptimo de temperatura (°C)	Rango óptimo de pH	Localización	Glicosilación
Fenol oxidasas (lacasas)	4 benzenediol + O ₂ = 4 benzosemiquinona + 2 H ₂ O	N/A	Ca ²⁺ Cd ²⁺ Cu ²⁺ H ₂ O ₂ Imidazol K ⁺ K ₂ SO ₄ Mn ²⁺ Na ₂ SO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄	Fenoles, alanina, 3-HAA, NHA, siringaldehído, hidroxibenzotriazol y ABTS	Monomérica (43-100), dimérica trimérica y oligomérica (e.g. tetrameros de ~390 KDa)	20-80	2-10	Sobre todo extracelular ³	Si (N-glicosiladas) ⁴
Peroxidasas:									
a) Lignin peroxidasas (LiP)	1,2-bis(3,4-dimetoxyfenil)propano-1,3-diol + H ₂ O ₂ = 3,4-dimetoxybenzaldehído + 1-(3,4-dimetoxyfenil)etano-1,2-diol + H ₂ O	Hemo	Hierro	Alcohol veratrílico	Monomérica (37-50)	35-55	1-5	Extracelular	Si (N-glicosiladas) ⁴
b) Manganese peroxidasas (MnP)	2Mn(II) + 2H ⁺ + H ₂ O ₂ = 2Mn(III) + 2H ₂ O	Hemo	Ca ²⁺ Cd ²⁺ Mn ²⁺ Sm ³⁺	Acidos orgánicos as chelators, tioles, unsaturated fatty acids	Monomérica (32-62.5)	30-60	2.5-6.8	Extracelular	Si (N-glicosiladas) ⁴
c) Peroxidasas Versatiles (VP)	donor + H ₂ O ₂ = donor oxidado + 2H ₂ O (e.g. negro reactivo 5 + H ₂ O ₂ = negro reactivo 5 oxidado + 2H ₂ O)	Hemo	Mn ²⁺ Ca ²⁺ Cu ²⁺ Hierro	Alcohol veratrílico compuestos similares a los mediadores de LiP y MnP	Monomérica	No se conoce	3-5	Extracelular	Si

¹Reacciones generales. ²Las enzimas de diferentes especies necesitan diferentes metal(s) o ion(s). ³Las lacasas fúngicas generalmente son extracelulares pero se han encontrado lacasas citoplásmicas principalmente en plantas y bacterias. ⁴El grado de glicosilación varía entre diversas enzimas ligninolíticas fúngicas. N/A: no aplica; 3-HAA: 3-ácido hidroxiantranílico; NHA: N-hidroxiacetanilida; ABTS: 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazol-6-sulfonato).

(Dashtban *et al.*, 2010)

La Figura 3 resume los principales pasos y las enzimas involucradas en la degradación de la lignina por los hongos de pudrición blanca.

a) Fenol oxidasas (denominadas lacasas, lac). En plantas, las lacasas participan en la formación de lignina por reacciones de polimerización, mientras que en los hongos contribuyen en varios procesos como la degradación de la lignina de manera extracelular, e intracelularmente en la esporulación, la producción de pigmentos, la formación del cuerpo fructífero y la patogénesis hacia plantas (Thurston, 1994). Son capaces de oxidar compuestos no fenólicos en presencia de un mediador como el ABTS (2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazol-6-sulfonato). Los detalles sobre el mecanismo de degradación enzimática de esta enzima se detallan en el apartado siguiente.

b) Peroxidasas

- Lignin peroxidasas (LiP). Son glicoproteínas que contienen un grupo hemo como cofactor. Catalizan la depolimerización oxidativa dependiente de H_2O_2 de una variedad de compuestos no fenólicos de la lignina y una amplia gama de los compuestos fenólicos como el guayacol, el alcohol vanilínico y el catecol, entre otros. Estas enzimas oxidan sustratos mediante varios pasos de transferencia de electrones formando radicales intermedios tales como fenóxidos y cationes del alcohol veratrílico (Figura 3e). Estos radicales intermedios experimentan reacciones no enzimáticas tales como el acoplamiento y la polimerización, la demetilación, entre otras, así como cambios intramoleculares (Figura 3f). Las LiP pueden oxidar sustratos aromáticos no fenólicos debido a su potencial redox (Figura 3g).
- Manganeso peroxidasas (MnP). Estas glicoproteínas extracelulares catalizan la oxidación dependiente de peróxido de Mn (II), como sustrato de reducción, al manganeso (III) (Figura 3h). El sustrato se une a la superficie de la enzima formando un complejo con el oxalato o con otros queladores (Figura 3i). El complejo quelado del manganeso (II) actúa como mediador redox de bajo peso molecular, difusible y reactivo (Figura 3j) de sustratos fenólicos, incluyendo fenoles simples, aminas y subestructuras fenólicas de la lignina. El potencial de oxidación por el manganeso (III) se limita solamente a las estructuras fenólicas de la lignina. Sin embargo, para la oxidación de sustratos no fenólicos por el manganeso (III) los radicales reactivos se deben formar en presencia de un segundo mediador (Figura 3k). Los ácidos orgánicos, tales como oxalato y malonato, son los compuestos primarios que actúan como segundos mediadores en la producción de radicales reactivos (Dashtban *et al.*, 2010).
- Peroxidasas versátiles (VP). Son un grupo ligninolítico de peroxidasas que poseen un grupo hemo, estas combinan estructuras y propiedades funcionales de LiP y MnP. Las VP son capaces de oxidar Mn^{+2} y

compuestos fenólicos así como compuestos aromáticos no fenólicos, tales como el alcohol veratrílico (Camarero *et al.*, 1999).

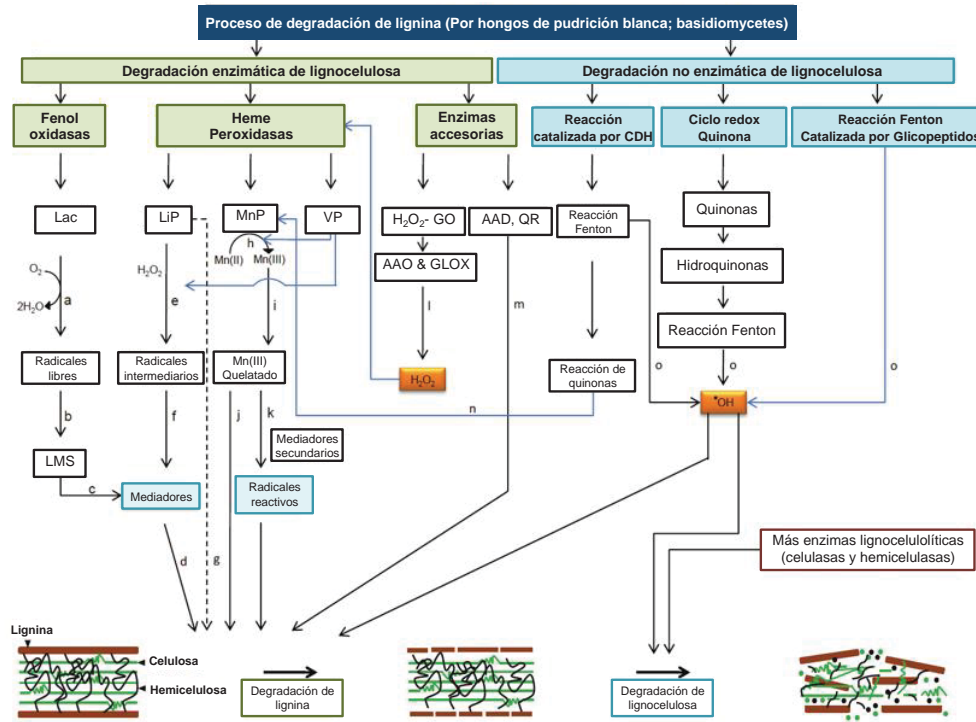


Figura 3. Proceso de degradación de lignina. Degradación enzimática y no enzimática de lignocelulosa (Dashtban *et al.*, 2010).

Cabe señalar que adicionalmente a los procesos enzimáticos de degradación de lignina existe otro tipo de reacciones no enzimáticas relacionadas en dicho proceso, las cuales se resumen en la Figura 3.

1.2.3 Lacasa y mecanismo de degradación

La lacasa es una fenol oxidasa que debe su nombre a que fue descubierta hace más de un siglo por Yoshida (1883) en el árbol japonés de la laca *Rhus vernicifera*. Esta enzima contiene átomos de cobre y se encuentra ampliamente distribuida en las plantas superiores, diversas clases de hongos y algunas bacterias (Figura 4). Las lacasas son glicoproteínas extracelulares con pesos moleculares entre 60 y 80 kDa y del 15 al 20% de su peso molecular esta dado por carbohidratos (Shah y Nerud, 2002).

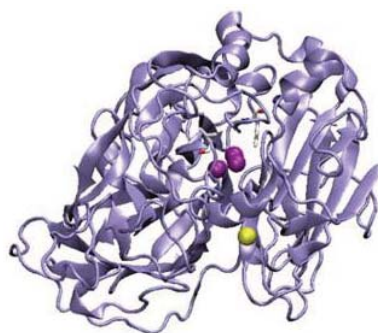


Figura 4. Imagen cristalográfica de una lacasa (Pezzella *et al.*, 2008).

El sitio catalítico de esta enzima se encuentra constituido por tres dominios (Figura 5): el cobre T_1 mononuclear, que se encuentra localizado en el dominio 3 quelado por dos histidinas y una cisteína, los otros tres cobres se encuentran acoplados trinuclearmente justo con 8 residuos de histidina perteneciente a los dominios 2 y 3. Comúnmente en las estructuras cristalográficas, el cobre T_2 se encuentra ligado a dos histidinas y a una molécula de agua o grupo dióxigeno; en cambio el sitio binuclear cobre T_3 contiene 3 histidinas ligadas a cada cobre.

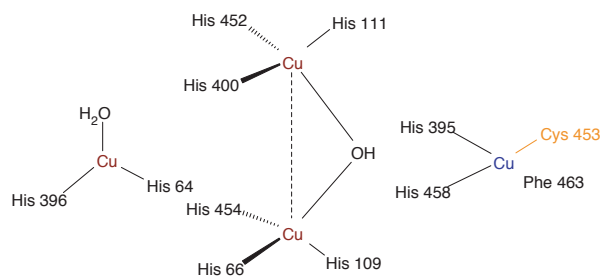


Figura 5. Sitio catalítico de la lacasa. Agrupamiento de los sitios de unión a cobre. (Sergio Riva, 2006).

La lacasa fúngica (bencendiol:oxígeno oxidoreductasa, E.C. 1.10.3.2) es una fenol oxidasa extracelular producida por el micelio de basidiomicetos, ascomicetos y deuteromicetos. Los mejores productores de esta enzima son los hongos de pudrición blanca. Bioquímicamente, la lacasa es una enzima que oxida una variedad de compuestos aromáticos.

Las reacciones catalizadas por lacasas se producen por la oxidación monoeléctrica de una molécula de sustrato (fenoles, aminas aromáticas o alifáticas) al radical reactivo correspondiente. El proceso redox toma lugar con la ayuda del agrupamiento de los cuatro átomos de cobre los cuales forman la base catalítica de la enzima, y que también confieren el color azul típico a estas enzimas debido a la intensa absorción electrónica de las uniones Cu-Cu. El resultado total del ciclo catalítico es la reducción de una molécula de oxígeno a dos moléculas de agua y la oxidación concomitante de cuatro moléculas de sustrato para producir cuatro radicales (Figura 6). Estos son los intermediarios reactivos que pueden producir dímeros, oligómeros y polímeros (Riva, 2006).

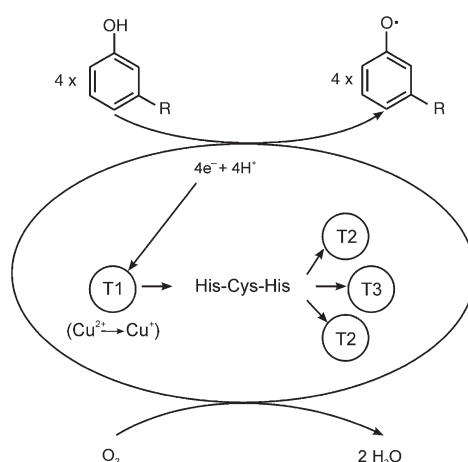


Figura 6. Ciclo catalítico de la lacasa (Baldrian, 2006).

Estas enzimas oxidan no solamente ácidos fenólicos y metoxifenólicos, sino que también los descarboxila y ataca sus grupos metoxilo mediante la desmetilación (Leonowicz *et al.*, 1984) o desmetoxilación. Todas estas reacciones pueden representar un paso importante en la transformación inicial de la lignina.

Las lacasas también reaccionan con polifenoles y otros compuestos aromáticos derivados de la lignina, los cuales pueden ser polimerizados o despolimerizados, o incluso actuar como mediadores redox de bajo peso

molecular (Figura 7). La utilización de sistemas mediador-lacasa es una alternativa promisoría para procesos biotecnológicos con aplicaciones ambientales. Entre ellos, los de blanqueo de la pulpa de papel, la decoloración de colorantes textiles y la oxidación de hidrocarburos polinucleoaromáticos (Riva, 2006).

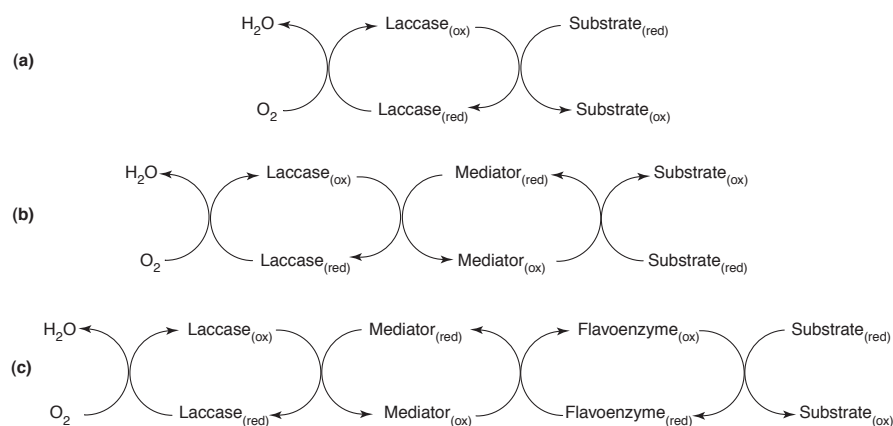


Figura 7. Representación esquemática de los ciclos redox catalizados por lacasas para la oxidación de los sustratos en ausencia (a) o en la presencia (b y c) de mediadores químicos. (Sergio Riva, 2006).

I.3. Genes de lacasas de hongos

A la fecha se han clonado y caracterizado genes de lacasas en hongos patógenos de humano, fitopatógenos y ligninolíticos. En el grupo de hongos degradadores de madera se ha visto que las lacasas se encuentran codificadas por familias complejas de genes que se encuentran estructuralmente relacionados. En cuanto a los genes de las lacasas extracelulares, directamente involucradas con la degradación de lignina, en el género *Pleurotus* han descrito recientemente siete genes para *P. ostreatus* (Pezzella *et al.*, 2008) y *P. sapidus* (Linke *et al.*, 2005), mientras que en *P. sajor-caju* se han reportado cuatro genes. En *Ceriporiopsis subvermispora* se ha caracterizado un solo gen (Karahanian *et al.*, 1998) y en *Phlebia radiata* (Mäkelä *et al.*, 2006) y *Pycnoporus cinnabarinus* (Eggert *et al.*, 1998; Temp *et al.*, 1999) se han descrito dos. Un caso extremo lo representa *Coprinopsis cinerea*, en el cual se han descrito 17 genes de lacasas distribuidos en dos

subfamilias (Kilaru *et al.*, 2006). El gen de una lacasa extracelular también ha sido reportado para el Ascomycete *Hortaea acidophyla* (Tetsch *et al.*, 2006).

1.4. Inductores de lacasas en hongos

Se ha reportado la inducción de la actividad extracelular de lacasas en distintas especies de hongos tanto con extractos de lignina de diferentes especies vegetales y sustancias orgánicas, como con iones metálicos, principalmente cationes divalentes. Así, en *Pleurotus ostreatus* se ha comprobado el aumento de la actividad extracelular de lignina con inductores como el extracto alcalino de lignina de rastrojo de maíz, el ácido vanilínico, el ácido veratrílico y la xilidina, entre otros (Muñoz *et al.*, 1997). En el caso de *Pycnoporus cinnabarius* también se ha documentado un incremento en la producción de lacasa extracelular al suplementar el medio de cultivo con xilidina, alcohol veratrílico, lignosulfonato o ácido ferúlico (Egger *et al.*, 1996; Herpoël *et al.*, 2000). Más recientemente, en esta misma especie se ha documentado la inducción de actividad de lacasa con etanol (Lomasco *et al.*, 2003). En el caso de *Coriolus hirsutus* se ha inducido la actividad enzimática extracelular con sirangaldazina, o-toluidina y ácido sinapínico, entre otros (Koroljova-Skorobogat'ko *et al.*, 1998). La inducción con Cu^{+2} ha sido reportada para especies del género *Trametes* (Collins y Dobson, 1997; Levin *et al.*, 2002), mientras que en el caso de especies del género *Pleurotus* ha sido documentada la inducción tanto con Cu^{+2} (Palmieri *et al.*, 2000; Baldrian y Gabriel, 2002; Baldrian *et al.*, 2005; Stajic *et al.*, 2006), como con Cd^{+2} (Baldrian y Gabriel, 2002). En Ascomycetes, la inducción de la actividad de lacasa extracelular por cobre se ha reportado para *Podospora anserina* (Fernandez-Larrea y Sthal, 1996), *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Litvintseva y Henson, 2002) y, recientemente, *Botryosphaeria rhodina* (Dekker *et al.*, 2007). En esta última especie también se ha evaluado el efecto de las fuentes de carbono (Dekker *et al.*, 2001; Alves *et al.*, 2003) y nitrógeno (Dekker *et al.*, 2007) sobre la actividad de lacasa constitutiva e inducida con alcohol veratrílico, así como el efecto que el fungicida imazaquin, del grupo de las imidazolinonas, tiene sobre dicha actividad (Rezende *et al.*, 2005).

I.5. Aplicaciones biotecnológicas de lacasas

Una gran variedad de plantas son utilizadas como forraje para la alimentación de animales de granja destinados a la obtención de carne, leche y otros productos. El forraje se define como la parte comestible de las plantas, además del grano, las cuales proveen alimento para animales de pastoreo o pueden ser cosechadas con fines de alimentación de distintos tipos de ganado. Por otro lado, el cultivo forrajero es utilizado comúnmente para describir cultivos de especies vegetales, generalmente plantas anuales y bianuales, las cuales se utilizan para el pastoreo o son cosechadas para utilizarse como alimento animal, como los tallos y tejido foliar remanente de la cosecha del maíz y del sorgo (Wilkins, 2000). Una característica importante de la mayoría de las plantas forrajeras es el gran porcentaje (40-80%) del peso seco constituido por carbohidratos complejos asociados a la pared celular, principalmente celulosa, hemicelulosa y lignina (Dávila *et al.*, 2001).

La habilidad de los hongos filamentosos para degradar lignina en la naturaleza ha sido aprovechada para estudiar el proceso de degradación de lignina en rastrojo destinado como alimento para animales de granja. Dichos estudios incluyen, entre otros, el proceso de degradación de lignina de distintos tipos de rastrojo utilizando de *P. chrysosporium* (Dorado *et al.*, 1999), *Nematoloma frowardi* (Hofrichter *et al.*, 1999), *Phlebia radiata* (Dorado *et al.*, 1999) y varias especies del género *Pleurotus* (Dorado *et al.*, 1999; Gutiérrez *et al.*, 2006). El proceso de degradación de lignina puede aumentar la digestibilidad de diversos tipos de rastrojo, con un consecuente incremento en la productividad de los rumiantes de granja. Se ha documentado que el proceso de degradación de la lignina mejora en algunos casos la digestibilidad *in vitro* del rastrojo por parte de microorganismos del rumen. Así, se ha reportado que la cepa K-3 de *Phanerochaete chrysosporium* y la cepa FP90031-sp de *Ceriporiopsis subvermispora* mejoran la capacidad de digestión *in vitro* de pasto de Bermuda (*Cynodon dactylon* L. Pers) por parte de microorganismos del rumen (Akin *et al.*, 1993). La digestibilidad *in vitro* del rastrojo de trigo también mejora después de la incubación con *Pleurotus ostreatus* y *Trametes gibbosa* (Jalc *et al.*, 1996). Por otra parte, la delignificación del rastrojo de maíz con *Cyathus stercoreus* y *P. chrysosporium*

puede reducir la severidad de otros tipos de tratamiento que aumentan la digestibilidad, como los requerimientos de ácido, calor o enzimas (Keller *et al.*, 2003).

Las lacasas de hongos ligninolíticos han sido ampliamente estudiadas en preparaciones de enzimas puras, en preparaciones de enzimas crudas y en el medio de cultivo, para su aplicación en procesos de biopulpeo (Messner y Srebotnik, 1994), en la degradación de compuestos tóxicos (Kremer y Anke, 1997) y en la remoción de colorantes de efluentes de la industria textil (Shah y Nerud, 2002). Estas aplicaciones potenciales se basan en la característica de la falta de especificidad que poseen las enzimas del sistema ligninolítico de los hongos degradadores de madera (Pointing, 2001; Ralph y Catchside, 2002). Así, el estudio de hongos degradadores del complejo de lignocelulosa de las plantas resulta no solo de importancia ecológica, sino que también representa una fuente de nuevas aplicaciones biotecnológicas. En ese sentido, los hongos ligninolíticos han sido empleados en procesos de biorremediación, ya que se ha documentado ampliamente su capacidad para degradar compuestos orgánicos recalcitrantes que van desde sustancias empleadas como explosivos entre las que se encuentra el TNT (2, 4, 6, trinitrotolueno) y la nitroglicerina, hasta pesticidas empleados en la agricultura (DDT, aldrin, endosulfan, etc.) y bifenilos policlorinados e hidrocarburos aromáticos policíclicos, altamente dañinos para el ser humano y los ecosistemas (Pointing, 2001). El ataque y degradación de dichas sustancias posibilita la biorremediación de suelos contaminados por actividades agrícolas o industriales (Martín-Moreno *et al.*, 2004). Por otra parte, la obtención de lacasas a partir de cultivos de hongos lignícolas tiene una amplia aplicación en diversas áreas que incluyen a la industria de los alimentos, el biopulpeo para la obtención de papel, la industria textil, la nanotecnología y la industria de los cosméticos, entre otras (Rodríguez-Couto y Toca-Herrera, 2006). El uso de lacasas en procesos de síntesis orgánica es considerada una tecnología ambientalmente más amigable que los procesos de síntesis tradicionales mediante mecanismos fisicoquímicos (Riva, 2006).

I.6. Estrategia de búsqueda de nuevas cepas silvestres con potencial biotecnológico

Por su actividad catalítica los hongos tienen la capacidad de degradar las estructuras químicas de muchos tintes y pigmentos utilizados ampliamente en la industria textil que pueden ser altamente tóxicos tales como los azo, trifenilmetano o estructuras heterocíclicas poliméricas (Levin *et al.*, 2004). En este contexto, en estudios recientes se han identificado nuevas especies de hongos filamentosos capaces de degradar este tipo de tintes y pigmentos. Así, Levin *et al.* (2004) encontraron que 10 aislados argentinos tenían la capacidad de degradar tintes como el Verde de Malaquita, Azure B, Poly R-478, Azul Antraquinona, Rojo Congo y Xilidina, sugiriendo la presencia de lacasas, ligninperoxidasas y manganeso peroxidasas en especies de *Ganoderma* y *Trametes* entre otras. Kiiskinen *et al.* (2004), utilizaron Azul remazol brillante R, PolyR-478, guayacol y ácido tánico como indicadores de la presencia de enzimas fenol oxidasas, identificándose 26 aislados de hongos filamentosos con esta propiedad, entre los que se encuentran *Mucor circinelloides*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Sporotrichum pruinosum*, *Rhizopus microsporus*, *Mucor hiemalis*, *Trichoderma atroviride* y *Trichoderma harzianum*, entre otros. Por su parte, Nazareno *et al.* (2006) encontraron que *Pestalotiopsis guepinii* también era capaz de degradar tintes sintéticos.

II. JUSTIFICACIÓN

A la fecha, los estudios bioquímicos, fisiológicos y genético-moleculares para evaluar el potencial para producir lacasas extracelulares por aislados de hongos silvestres obtenidos de ecosistemas de México son prácticamente inexistentes. El estudio de cepas silvestres aisladas a nivel local posibilita la generación de procesos y productos biotecnológicos para la resolución de problemas estatales, regionales y nacionales susceptibles de ser patentados, lo cual no es posible cuando se estudian cepas de referencia provenientes de colecciones de microorganismos de otros países. En el Laboratorio de Conservación y Biotecnología de Microorganismos del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UMSNH) se cuenta con un cepario de 150 aislados de hongos filamentosos aislados de distintos ecosistemas del estado de Michoacán (Arredondo-Santoyo, 2009). Dichas cepas se encuentran conservadas tanto en criopreservación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ como en agua desionizada a temperatura ambiente y a la fecha no se ha comprobado la viabilidad de dichas cepas ni se han evaluado sus capacidades fisiológicas de importancia biotecnológica. En este cepario se han identificado, por técnicas de genética-molecular, 50 aislados pertenecientes a distintos géneros, entre los que se encuentran *Trichoderma*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Pestalotiopsis*, *Bionectria*, *Gliocladium*, *Diaporthe*, *Phomopsis*, *Didymella*, *Phoma*, *Botryosphaeria*, *Lasiodiplodia*, *Diplodia*, *Sphaeropsis*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Neurospora*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Eupenicillium*, *Ampelomyces*, *Epicoccum*, *Sphaeriothyrium* y *Cerebella*. Además, se cuenta con trece aislados identificados a nivel de especie, los cuales incluyen a *Trichoderma tomentosum*, *Infundibulicybe gibba*, *Pestalotiopsis paeoncola*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Diaphorte ambigua*, *Didymella bryoniae*, *Fusarium incarnatum*, *Mucor hiemalis*, *Neurospora sitophila*, *Glonium pusillum*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus djamour* y *Umbelopsis ramaniana* (Arredondo-Santoyo, 2009). En el presente trabajo, se evaluó la viabilidad de algunos de estos aislados después del proceso de preservación y su potencial para producir lacasas extracelulares.

III. HIPÓTESIS

Aislados silvestres de hongos filamentosos del estado de Michoacán son capaces de producir lacasas extracelulares de manera basal y dicha actividad es inducible con rastrojo.

IV. OBJETIVOS

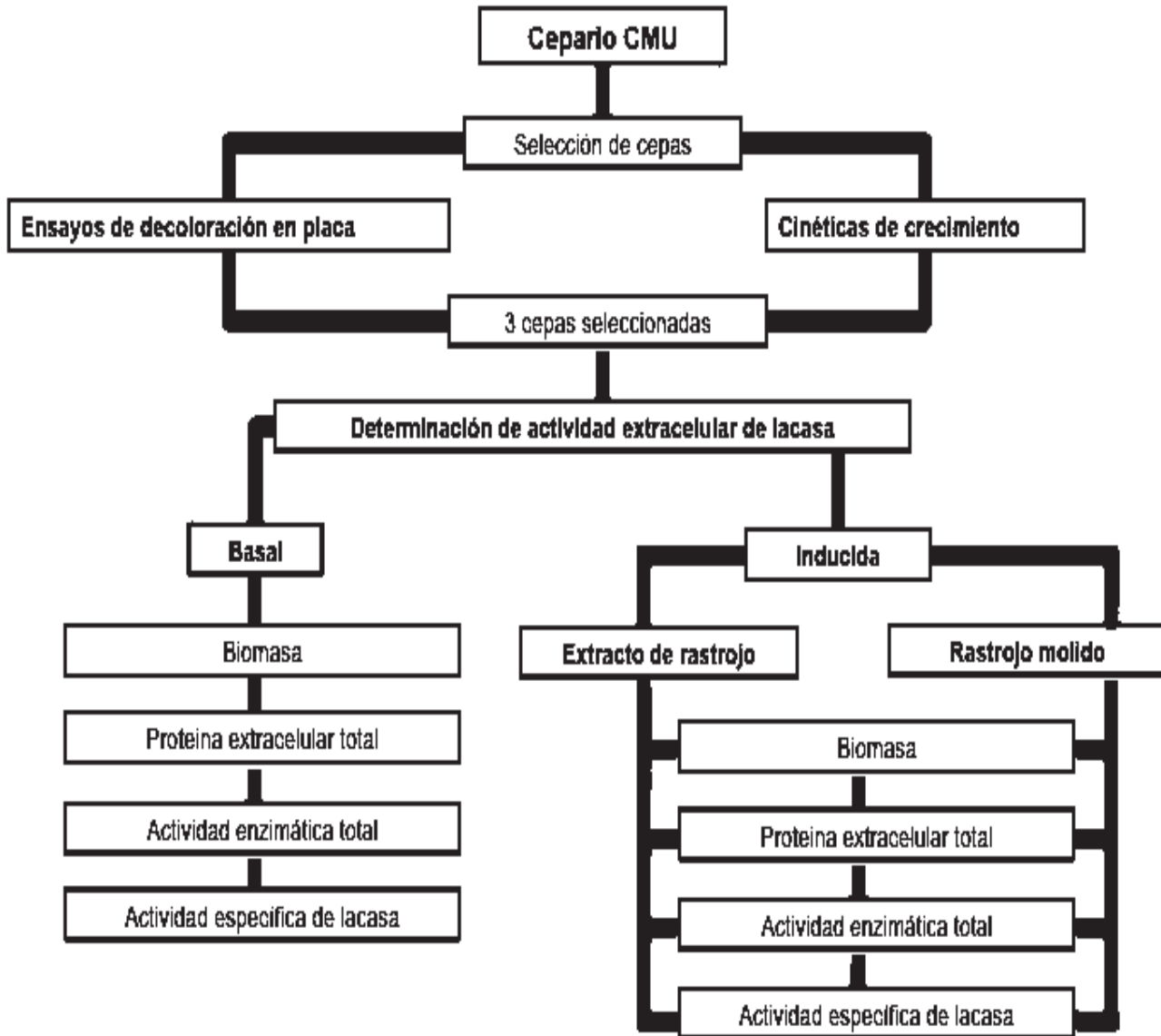
IV. 1. Objetivo general

Estudiar la actividad de lacasa extracelular en cepas seleccionadas de hongos filamentosos silvestres.

IV. 2. Objetivos específicos

- i) Seleccionar cepas de hongos filamentosos silvestres productoras de lacasas extracelulares.
- ii) Determinar la actividad basal e inducida de lacasas extracelulares de tres cepas de hongos filamentosos silvestres.
- iii) Analizar el efecto del rastrojo de maíz como inductor sobre la actividad de lacasa extracelulares de las cepas de estudio.

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1. Cepas de estudio

Se realizó una primera selección a partir de las cepas provenientes del Cepario Michoacano Universitario (CMU) que fueron tipificadas genéticamente a nivel de especie e incluyen una variedad de grupos taxonómicos (Arredondo-Santoyo, 2009) (Tabla III).

Tabla III. Primera selección de cepas empleadas a partir del CMU

Clave de cepario	Género/especie
26-CMU	<i>Neurospora sitophila</i>
29-CMU	<i>Pestalotiopsis paeonicola</i>
39-CMU	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
48-CMU	<i>Diaphorte ambigua</i>
59-CMU	<i>Glonium pusillum</i>
81-CMU	<i>Umbelopsis ramaniana</i>
87-CMU	<i>Didymella bryoniae</i>
96-CMU	<i>Mucor hiemalis</i>
149-CMU	<i>Pleurotus djamour</i>
219-CMU	<i>Fusarium incarnatum</i>
234-CMU	<i>Infundibulicybe gibba</i>
TA-CMU	<i>Trametes versicolor</i>
TC-CMU	<i>Trametes cervina</i>

VI.2. Medios de cultivo

Se utilizó agar dextrosa y papa (PDA) para la generación de inóculos. Para todos los experimentos fisiológicos se utilizaron inóculos de micelio provenientes de la cepa de interés en fase logarítmica de crecimiento. Los inóculos se obtuvieron de los bordes de la colonia con un sacabocados de 6 mm de diámetro. Los cultivos de micelio fueron incubados a 28 °C y crecidos por 48 h.

Para la preparación del PDA se utilizaron 250 g de papa los cuales se hirvieron por 20 min en 1 L de agua destilada, posteriormente se recuperó el extracto acuoso por filtración a través de una gasa, con la finalidad de desechar todos los residuos sólidos. Al filtrado recuperado se le agregaron 20 g de dextrosa y 20 g de agar bacteriológico aforándose a 1 L con agua destilada. Los medios comerciales (BD Bioxon y DIFCO®, USA) se prepararon agregando 39 g en 1 L de agua destilada acorde a las indicaciones del fabricante, esterilizándose en autoclave a 121 °C (15 lb/pulg²) por 15 min.

Se utilizó medio líquido de papa dextrosa (PDB) para realizar cinéticas de crecimiento en medio líquido, determinación de actividad enzimática basal e inducida, así como para los ensayos de determinación de proteína en las cepas seleccionadas. Se empleó el medio comercial DIFCO® el cual se preparó acorde a las indicaciones del fabricante disolviéndose 22 g en 1 L de agua destilada. Las cepas fueron crecidas en 25 mL de este medio para estos ensayos.

Para los ensayos de inducción en medio líquido se utilizó rastrojo de maíz; tanto como extracto acuoso de rastrojo (10%) el cual se preparó disolviendo el rastrojo en un volumen de 2 L de agua, se realizó una evaporación del líquido excedente haciéndose extracciones repetidas hasta obtener el extracto concentrado, y rastrojo molido (2% p/v) el cual fue previamente secado y triturado a través de un molino, las dos formas de inductor se adicionaron de manera independiente al medio de cultivo PDB estéril, el extracto fue esterilizado por filtración a través de una membrana millipore® tipo HA de 0.045 µm de poro mientras que el rastrojo molido se esterilizó en autoclave.

Para los ensayos de decoloración, las cepas seleccionadas fueron inoculadas en placas de medio agar extracto de malta (AEM) el cual se preparó con 12.7 g/L de extracto de malta (DIFCO®), 10 g/L glucosa (BD Bioxon) y 20 g/L de agar (BD Bioxon) suplementado con nueve sustratos fenólicos en ensayos independientes. Este medio se esterilizó de la manera anteriormente descrita. Se emplearon los colorantes naranja de metilo, azul ácido, azul cielo

chicago 6B, índigo carmín, azul remazol brillante R, azul directo 71 y fucsina ácida a una concentración de 250 mg/mL los cuales fueron esterilizados por filtración a través de una membrana Millipore® tipo HA de 0.045 μm de poro y adicionados al medio previamente esterilizado. También se emplearon los compuestos fenólicos guayacol (0.01% p/v) y ácido tánico (0.5% p/v) los cuales se incorporaron al medio antes de ser esterilizado en autoclave a 121 °C (15 lb/pulg²) por 15 min. Las placas fueron inoculadas con las cepas de interés (Tabla I) e incubadas a 28 °C por 2-15 días dependiendo de la velocidad de crecimiento del hongo.

Estos ensayos cualitativos fueron realizados para seleccionar cepas productoras de fenol-oxidasas extracelulares ya que, en el caso de los colorantes, se espera que al atacar la estructura fenólica se genere una zona de decoloración al degradar el tinte. En el caso de los sustratos ácido tánico y guayacol, se indica la presencia de fenol-oxidasas extracelulares al desarrollarse una coloración marrón cuando se oxida el anillo fenólico de su estructura. De este ensayo se seleccionaron 3 cepas para ensayos posteriores, aquellas que mostraron tener mayor capacidad de decolorar/oxidar.

VI. 3. Cinéticas de crecimiento

Los ensayos de crecimiento en medio sólido tuvieron el doble objetivo de determinar la velocidad de crecimiento de las cepas de estudio y observar si éstas presentaban inhibición del desarrollo del micelio a las concentraciones empleadas de los distintos sustratos indicadores de la presencia de lacasas. Las cinéticas de crecimiento de las cepas de interés (Tabla III) se realizaron en el medio AEM adicionado con colorantes como se describió anteriormente midiendo el diámetro colonial y el área de decoloración cada 12 a 24 h dependiendo de la velocidad de crecimiento de cada cepa. En los cultivos control las cepas se inocularon en el mismo medio pero sin sustrato fenólico. Todas las cinéticas se realizaron en tres ensayos independientes por triplicado y el resultado de las mediciones se promedió, obteniéndose la desviación estándar para cada punto de la curva de crecimiento.

Para realizar cinéticas de crecimiento en medio PDB, se tomaron 3 inóculos obtenidos de la manera anteriormente descrita provenientes de las cepas de interés (3 cepas seleccionadas) crecidas en medio PDA, se colocaron en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 25 mL de medio PDB. Los cultivos así inoculados se incubaron a 28 °C con agitación de 120 rpm. El micelio se cosechó cada 24 h durante 15 días filtrando el contenido de cada matraz a través de papel Whatman® #41 a peso constante (el papel fue secado a 50 °C por 12 h, se colocó en un desecador y se pesó). El micelio se lavó con agua destilada, el papel filtro con el micelio se secó a 50 °C por 24 h, se colocó en un desecador y se pesó. El peso seco del micelio se determinó por la diferencia de peso al restar el peso del papel. Todas las cinéticas se realizaron en tres ensayos independientes por triplicado y el resultado de las mediciones se promedió, obteniéndose la desviación estándar para cada punto de la curva de crecimiento.

VI. 4. Ensayos de actividad enzimática

Para medir la actividad enzimática los cultivos miceliales en medio líquido PDB y PDB suplementados con extracto acuoso de rastrojo (10%) ó rastrojo molido (2% p/v) fueron incubados a 28 °C con agitación de 120 rpm durante 15 días. La determinación de actividad enzimática fue realizada de acuerdo a Nagai *et al.*, (2002) cada 24h. Para este ensayo se tomó una primera alícuota de 200 µL del medio de cultivo. La mezcla de reacción estaba compuesta de 500 µL de buffer Macllvaine pH 4.0 (0.1 M de ácido cítrico, 0.2 M de fosfato de sodio dibásico), 300 µL de H₂O destilada estéril, 100 µL de ABTS 1M (2, 2'- azino-bis (3- etilbenztiazolina- 6- sulfonato) y 100 µL del sobrenadante del medio de cultivo centrifugado a 10 000 rpm. Las muestras se incubaron a 30 °C durante 20 min y la reacción se detuvo añadiendo 100 µL de ácido tricloroacético al 5 % (v/v en agua). La formación del radical catiónico se determinó midiendo el incremento en la absorbancia a 420 nm ($\epsilon_{420} = 36\ 000\ M^{-1}\ cm^{-1}$) en un espectrofotómetro de luz visible. Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 µmol de ABTS en una reacción de 100 µL a 30 °C en 1 min. La actividad

específica de lacasa extracelular se determinó tomando las U resultantes por mg de proteína (U/mg de proteína). Este ensayo se realizó para las tres cepas de interés previamente seleccionadas en tres ensayos independientes por triplicado, los resultados se promediaron y se determinó la desviación estándar de los resultados obtenidos.

VI.5. Determinación de Proteína

La determinación de proteína fue realizada en 800 μ L del medio de cultivo cada 24 horas por un periodo de quince días mediante el método de Bradford empleando el kit Bio-Rad Protein Assay de acuerdo a las indicaciones del proveedor (Bio-Rad, USA), utilizando como estándar albúmina de suero bovino y leyendo la concentración a 590 nm. Este ensayo fue realizado para las 3 cepas de estudio seleccionadas en condiciones basales de actividad enzimática. Se llevaron a cabo por triplicado, los resultados se promediaron y se determinó la desviación estándar de los resultados obtenidos.

VII. RESULTADOS

VII.1 Aislamiento y recuperación de las cepas seleccionadas

Las 13 cepas seleccionadas fueron rescatadas del cepario CMU en el cual se habían criopreservado durante tres años (Figura 8).



Figura 8. Cepas recuperadas del CMU incubadas a 28°C en medio de PDA. Claves: 26-CMU, *N. sitophila*; 29-CMU, *P. paeonicola*; 39-CMU, *L. theobromae*; 48-CMU, *D. ambigua*; 59-CMU, *G. pusillum*; 81-CMU, *U. ramaniana*; 87-CMU, *D. bryoniae*; 96-CMU, *M. hiemalis*; 219-CMU, *F. incarnatum*; 234-CMU, *I. Gibba*.

Las cepas presentaron características morfológicas muy diversas entre sí pero iguales a las reportadas con anterioridad (Arredondo-Santoyo, 2009) algunas presentaban un aspecto algodonoso y de color blanco con bordes regulares (figura 8; cepas 26-CMU, 29-CMU, 59-CMU, 149-CMU, TA-CMU y TC-CMU). Las cepas 29 CMU, 39-CMU, 48-CMU, 96-CMU y 234-CMU mostraron micelio aéreo abundante, mostraban micelio aéreo abundante donde, pudiéndose observar que al cabo de pocos días de incubación desbordaba la caja.

Se observaron también características particulares de cada cepa como en el caso de la cepa 81-CMU, que exhibe un micelio compacto de tonalidad rosada y bordes regulares. Una característica específica de la cepa 89-CMU es que concentra su crecimiento en el centro de la placa extendiéndose de manera lenta e irregular en la superficie y través del medio de cultivo. El micelio aéreo y abundante de tonalidad amarilla de la cepa 96-CMU son propiedades

que la caracterizan, mientras que la cepa 219-CMU mostró un micelio abundante compacto y poco algodonoso, destacándose por la presencia de tonalidades cafés intensas en distintos sitios principalmente en el centro de la placa así como una secreción viscosa en forma de gotas.

VII. 2. Selección de cepas con actividad de fenol-oxidasa extracelular

VII. 2.1. Ensayos de decoloración en medio sólido

Estos ensayos se realizaron con la finalidad de seleccionar cepas con actividad fenol-oxidasa extracelular, la cual se observó por la decoloración de los medios de cultivo adicionados con sustratos fenólicos. Se probaron las 13 cepas seleccionadas con siete colorantes y dos agentes oxidantes.

En el caso de los ensayos con naranja de metilo, azul ácido, azul cielo chicao 6B, índigo carmín, azul remazol brillante R, azul directo 71 y fucsina ácida se pudo observar que las cepas que presentaron mayor actividad de decoloración con respecto al control fueron las cepas 149-CMU, TA-CMU y TC-CMU las cuales conservaron las características coloniales en todos los medios. En los cultivos de dichas cepas se presentó un halo de decoloración en etapas iniciales del crecimiento del micelio (Figura 9). Las demás cepas aunque mantuvieron un buen desarrollo en las diferentes condiciones de cultivo conservando sus características morfológicas coloniales, no mostraron decoloración significativa.

La cepa TA-CMU fue la primera que presentó halo de decoloración en una etapa temprana de su estado fisiológico de crecimiento, a partir de las 12 h de incubación. El nivel de decoloración fue mayor conforme se incrementaba la masa de micelio. La decoloración originada por la cepa TC-CMU fue mejor en presencia de naranja de metilo y azul ácido que con el resto de los colorantes, aunque en todos los casos se observó decoloración.

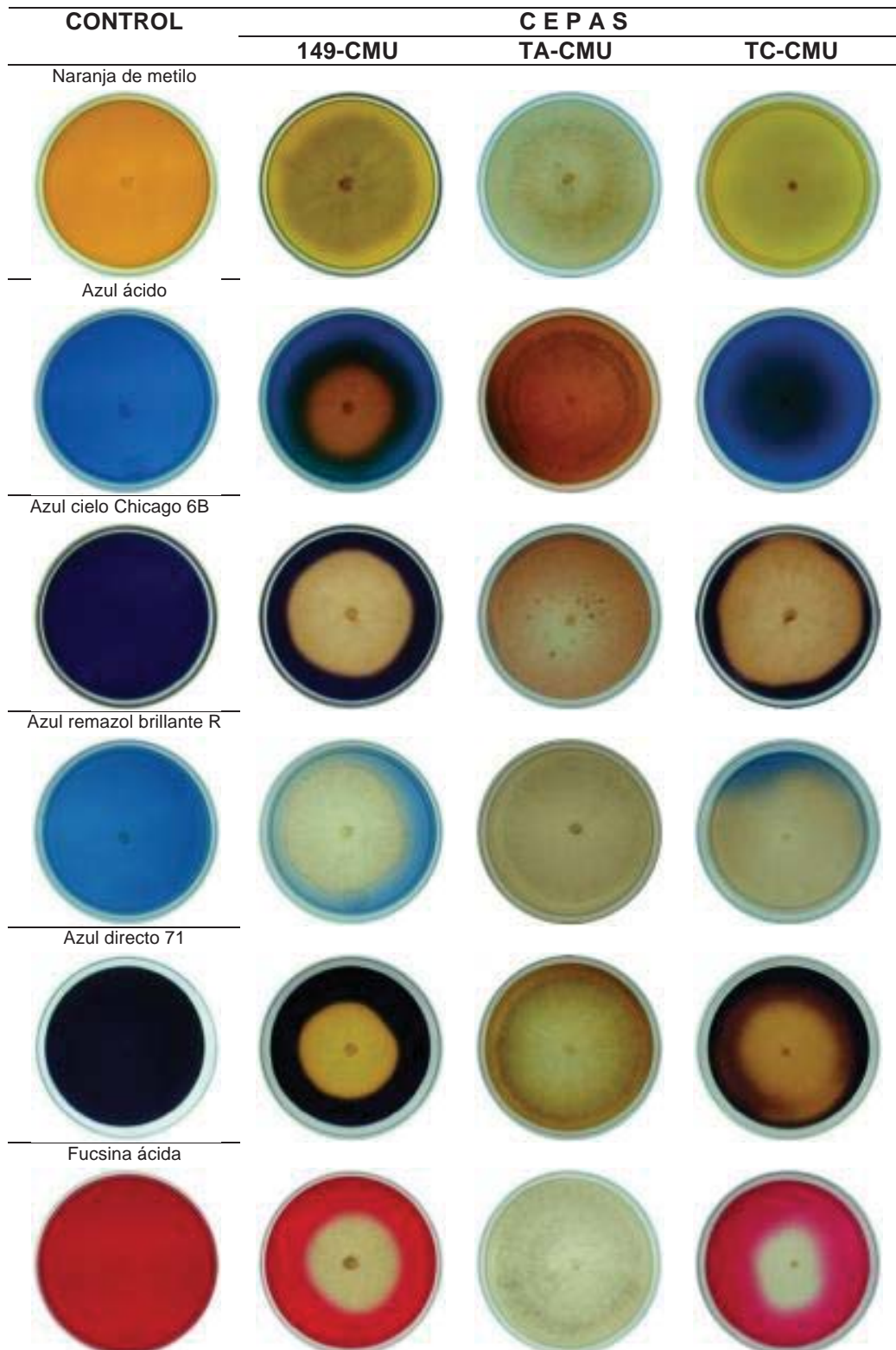


Figura 9. Ensayos positivos de decoloración en medio sólido conteniendo los colorantes indicados. Las cepas fueron inoculadas en medio AEM adicionado con los colorantes e incubadas a 28°C. Cepas: 149-CMU, *P. djamour*; TA-CMU, *T. versicolor*; TC-CMU, *T. cervina*.

En el medio de cultivo suplementado con índigo carmín fue notoria la decoloración por parte las 13 cepas analizadas con respecto a los medios control (Figura 10). Todas las cepas conservaron sus características morfológicas coloniales, las cepas que mostraron tener mayor capacidad de decoloración fueron las cepas 39-CMU, 59-CMU, 81-CMU, 96-CMU, 149-CMU, TA-CMU y TC-CMU. La cepa 26-CMU presentó una actividad de decoloración menor a las demás cepas aunque la decoloración fue notoria.

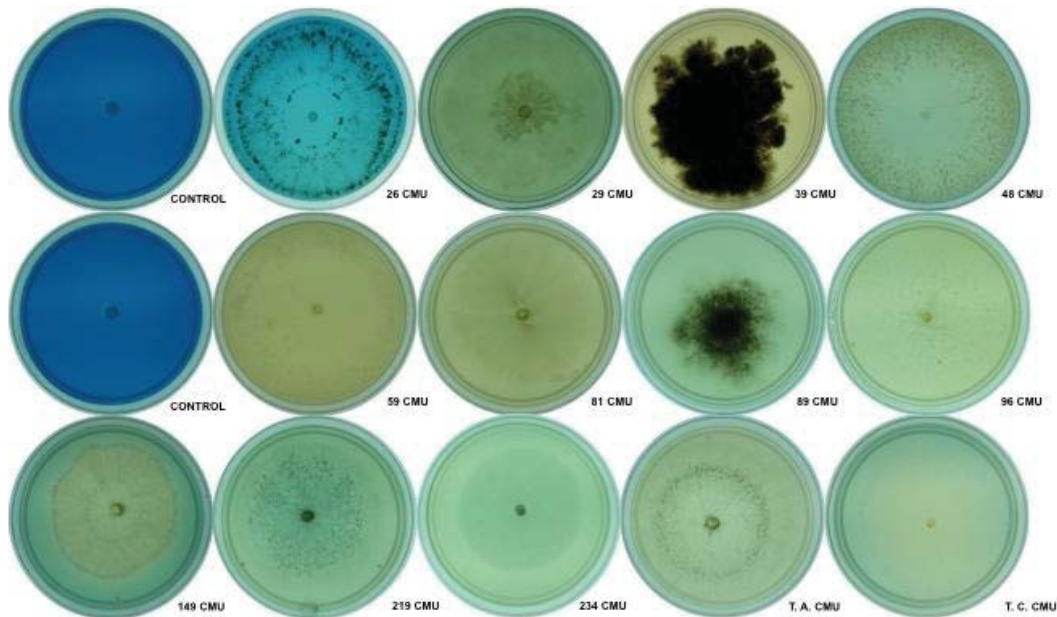


Figura 10. Ensayo de decoloración de índigo carmín en medio sólido. Las cepas fueron inoculadas en medio AEM adicionado con el colorante e incubadas a 28°C. Control, medio AEM suplementado con colorante, no inoculado e incubado en las mismas condiciones.

Las cepas que presentaron mayor capacidad oxidativa de ácido tánico fueron las cepas 26-CMU, 29-CMU, 48-CMU, TA-CMU y 219-CMU, mostrando un halo oxidativo de tonalidad marrón. Las cepas 39-CMU, 89-CMU y 234-CMU exhibieron un halo transparente en la periferia colonial. La mayoría de las cepas estudiadas redujeron la velocidad de crecimiento en presencia de dicho sustrato. Un aspecto importante que destaca en este ensayo fue la inhibición del crecimiento micelial presentado en las cepas 81-CMU, 16-CMU, 149-CMU y TC-CMU (Figura 11).

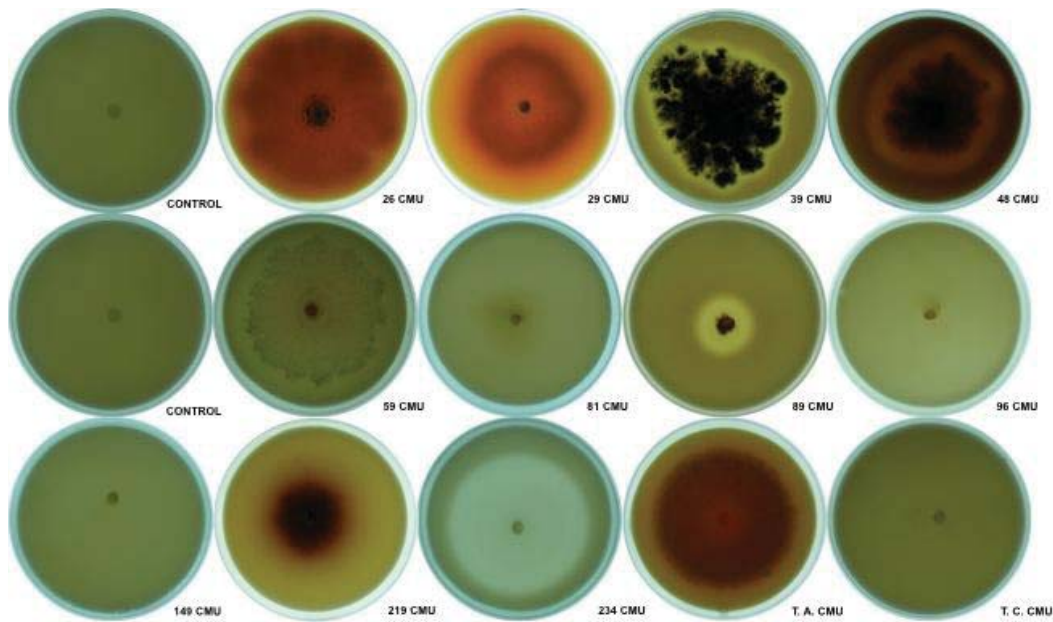


Figura 11. Ensayo de oxidación con ácido tánico en medio sólido. Las cepas se inocularon en medio AEM adicionado con el sustrato fenólico y se incubaron a 28°C. Control, Medio AEM suplementado con el agente oxidante, no inoculado e incubado en las mismas condiciones.

En la figura 12 se muestra el ensayo de oxidación del medio de cultivo suplementado con guayacol a la concentración anteriormente descrita. Aquí las 13 cepas ensayadas conservaron las características morfológicas propias de cada de cepa. La cepa 29-CMU presentó un halo de oxidación marrón muy intenso, seguida de las cepas 149-CMU, TA-CMU y TC-CMU. La oxidación fue evidentemente más notoria en el centro de la placa. La cepa 48-CMU exhibió una ligera tonalidad marrón en la periferia colonial. La tabla IV resume los resultados de todos los ensayos de decoloración/oxidación.

Las cepas que mostraron la mejor actividad de decoloración fueron 149-CMU, TA-CMU y TC-CMU, ya que se observó decoloración del medio con la mayoría de los colorantes empleados a partir de las 12 horas de incubación. Las cepas que mostraron una mayor actividad oxidativa sobre el guayacol y el ácido tánico fueron 29-CMU, 39-CMU, TA-CMU, las cuales mostraron una mancha marrón indicativa de oxidación del sustrato a partir de las 12 horas de incubación.

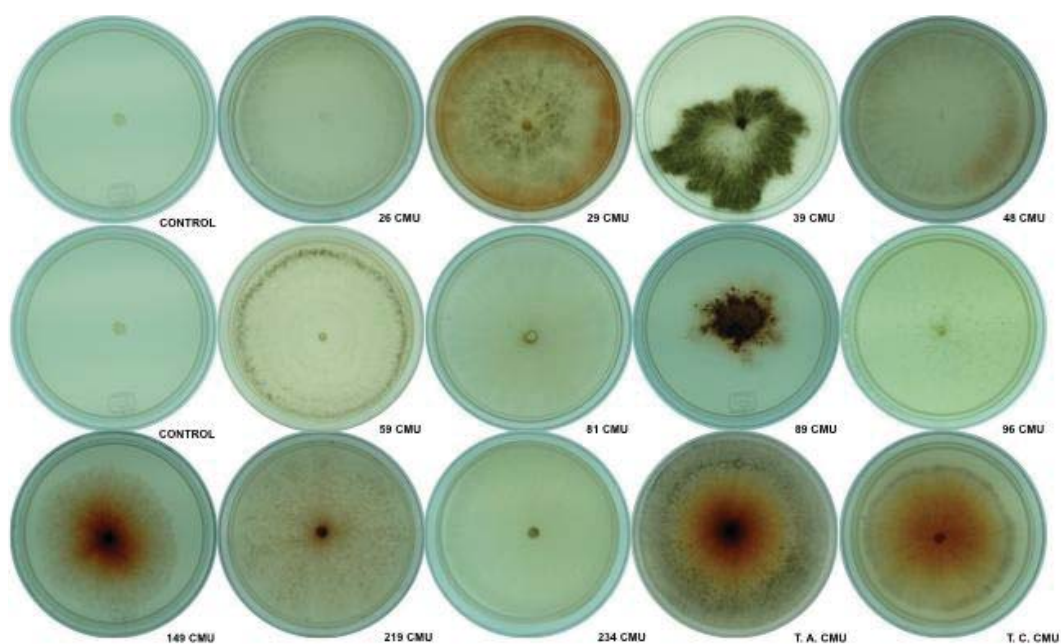


Figura 12. Ensayo de oxidación con guayacol en medio sólido. Las cepas se incubaron en medio AEM adicionado con el sustrato y fueron incubadas a 28°C. Control, Medio AEM suplementado con el agente oxidante, no inoculado e incubado en las mismas condiciones.

Tabla IV. Resultados de los ensayos de decoloración/oxidación de las cepas estudiadas.

C E P A S													
COLORANTE	26- CMU	29- CMU	39- CMU	48- CMU	59- CMU	81- CMU	89- CMU	96- CMU	149- CMU	219- CMU	234- CMU	TA- CMU	TC- CMU
Naranja de metilo	+	-	-	+	+	-	-	-	++	+	-	+++	++
Azul ácido	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	+++	+
Azul cielo Chicago 6B	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	+++	+
Índigo carmín	+	++	+++	++	++	++	++	++	+++	++	++	+++	+++
Azul remazol brillante R	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	+++	++
Azul directo 71	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	+++	++
Fucsina ácida	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	+++	++
Ácido tánico	++	+++	++	+++	+	-	+	-	-	++	+	++	-
Guayacol	-	+++	-	+	+	-	++	-	+	+	-	++	++

+ Decolora/oxida moderadamente, ++ Decolora/oxida con buena intensidad, +++ Decolora/oxida intensamente, - No decolora/oxida.

VII. 2.2. Cinéticas de crecimiento en medio sólido AEM

Estas cinéticas se realizaron de la manera descrita con anterioridad determinándose la velocidad de crecimiento de las cepas de estudio (Tabla III) y el efecto de los sustratos fenólicos sobre ésta.

La cinética de crecimiento de la cepa 26-CMU (*N. sitophila*) en medio AEM con naranja de metilo, azul ácido, chicago azul cielo 6B, índigo carmín, azul remazol brillante R, azul directo 71 y fucsina ácida no presentó variaciones significativas con respecto a la cinética control. En esta cepa la fase logarítmica de crecimiento comenzó a partir de las 12 h de incubación, y el micelio cubrió en su totalidad el medio de cultivo al tercer día. El ácido tánico retrasó el crecimiento de micelio, con lo cual se extendió el periodo hasta los cuatro días (Figura 13).

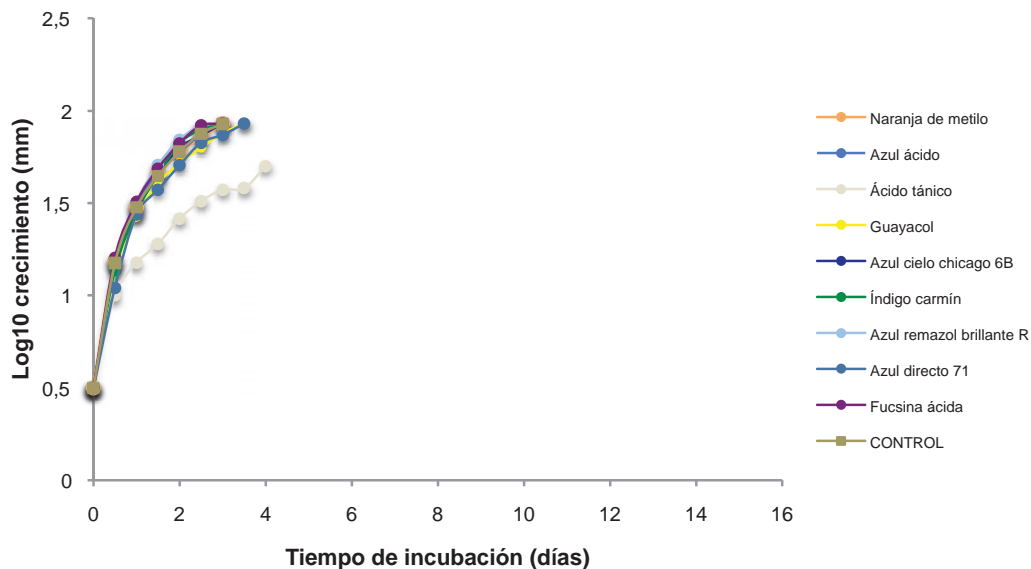


Figura 13. Cinética de crecimiento de la cepa 26-CMU (*N. sitophila*) en medio AEM en presencia de distintos colorantes y agentes oxidantes.

En la figura 14 se muestra la curva de crecimiento de la cepa 29-CMU (*P. paeoncola*), en la que se puede observar que no existe variación significativa del crecimiento en los diferentes sustratos fenólicos con respecto a la cinética control. Dicha cepa inició la fase logarítmica a partir del primer día de incubación, presentando la fase estacionaria después del día 8. Esta cepa

cubre en su totalidad el medio de cultivo al noveno día de incubación, y en presencia de naranja de metilo y ácido tánico se prolonga hasta el día 11.

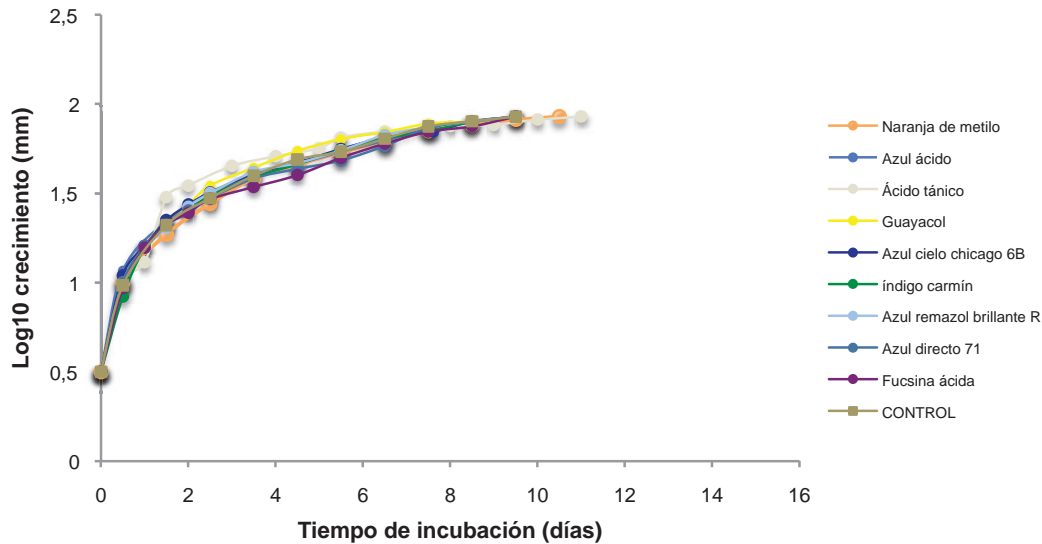


Figura 14. Cinética de crecimiento de la cepa 29-CMU (*P. paeonicola*) en medio AEM en presencia de distintos colorantes y agentes oxidantes.

El crecimiento de la cepa 39-CMU (*L. theobromae*) en presencia de naranja de metilo resulta ser más rápido que con los demás sustratos (Figura 15). Se observa que el micelio llegó a su crecimiento máximo al tercer día de incubación, a diferencia de los otros que la alcanzaron alrededor del octavo día. En los demás sustratos la variación fue mínima con respecto a la cinética control comenzando la fase logarítmica a partir de las primeras 12 h de incubación y alcanzando la fase estacionaria a partir del tercer día.

La velocidad de crecimiento de la cepa 48-CMU (*D. ambigua*) es relativamente rápida, cubriendo el medio de cultivo en su totalidad alrededor del día 5. La cinética de crecimiento de esta cepa en presencia de ocho de los nueve sustratos no varía con respecto a la cinética control, comenzando la fase logarítmica a partir de las primeras 12 h de incubación. En presencia de ácido tánico se observa un efecto inhibitorio del crecimiento (Figura 16).

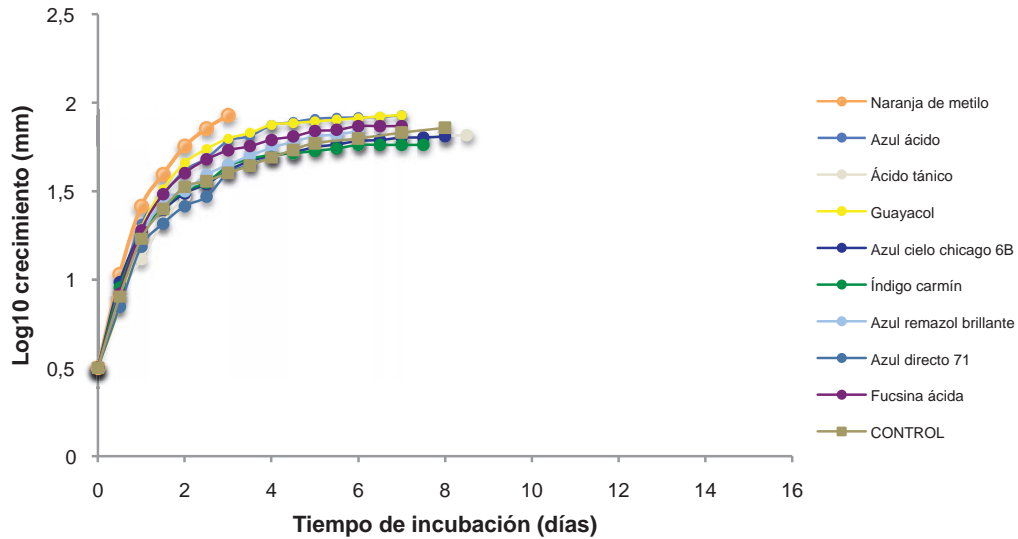


Figura 15. Cinética de crecimiento de la cepa 39-CMU (*L. theobromae*) en medio AEM en presencia de distintos colorantes y agentes oxidantes.

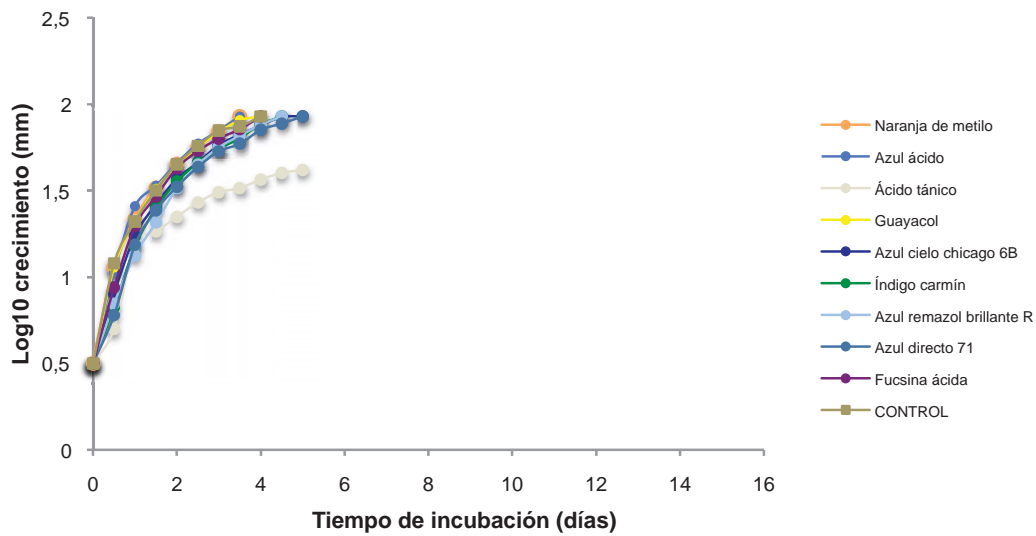


Figura 16. Cinética de crecimiento de la cepa 48-CMU (*D. ambigua*) en medio AEM en presencia de distintos colorantes y agentes oxidantes.

En la figura 17 se observa el crecimiento de la cepa 59-CMU (*G. pusillum*), la cual mostró uno de los más rápidos entre las cepas estudiadas. El cultivo control de dicha cepa llena en su totalidad el medio de cultivo entre los 4 y 5 días de incubación. En presencia de los colorantes azul cielo chicago 6B, índigo carmín, azul remazol brillante R y azul directo 71, el crecimiento se

prolongó un día más con respecto al control. En presencia de ácido tánico se inhibió el crecimiento, prolongándose más allá del día 6.

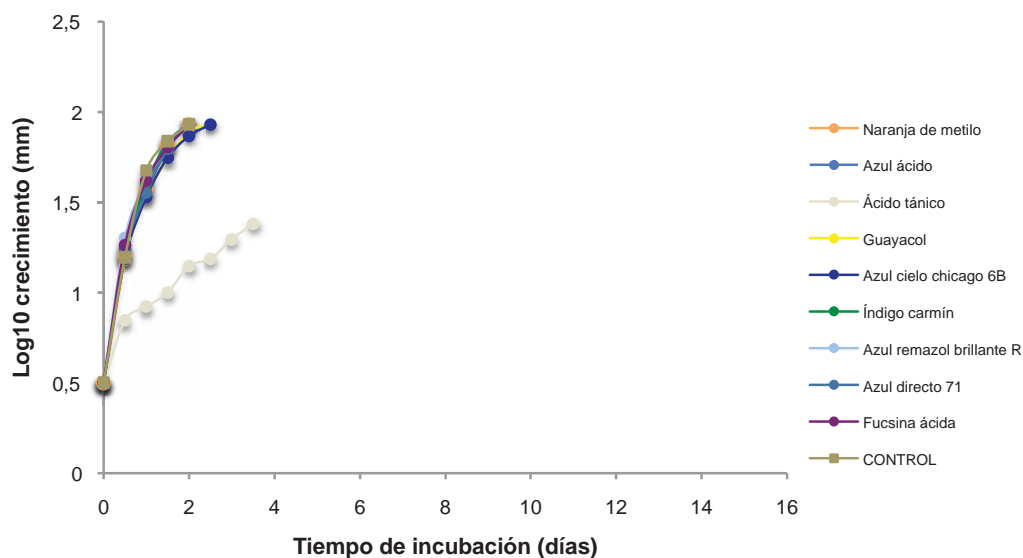


Figura 17. Cinética de crecimiento de la cepa 59-CMU (*G. pusillum*) en medio AEM en presencia de distintos colorantes y agentes oxidantes.

Las cinéticas de crecimiento de las cepas 81-CMU (*U. ramaniana*) y 89-CMU (*D. bryoniae*) fueron de las más lentas. La cepa 81-CMU (Figura 18) llegó a su máximo crecimiento al día 14 cubriendo en su totalidad el medio de cultivo. La cinética fue uniforme en presencia de los 7 colorantes con respecto a la cinética control. En presencia de guayacol el crecimiento se prolongó hasta el día 17, mientras que a la concentración de ácido tánico empleada puede observarse una inhibición total del crecimiento miceliar durante los 15 días de la cinética.

La cepa 89-CMU fue la única que después de 16 días de incubación no logró llenar en su totalidad la placa de medio de cultivo. Esta cepa alcanzó la fase estacionaria temprana a partir del día 3, y se observó una cinética de crecimiento en presencia de los nueve sustratos fenólicos con considerables variaciones, notándose que en presencia de ácido tánico se detuvo el crecimiento a partir del día 8 (Figura 19).

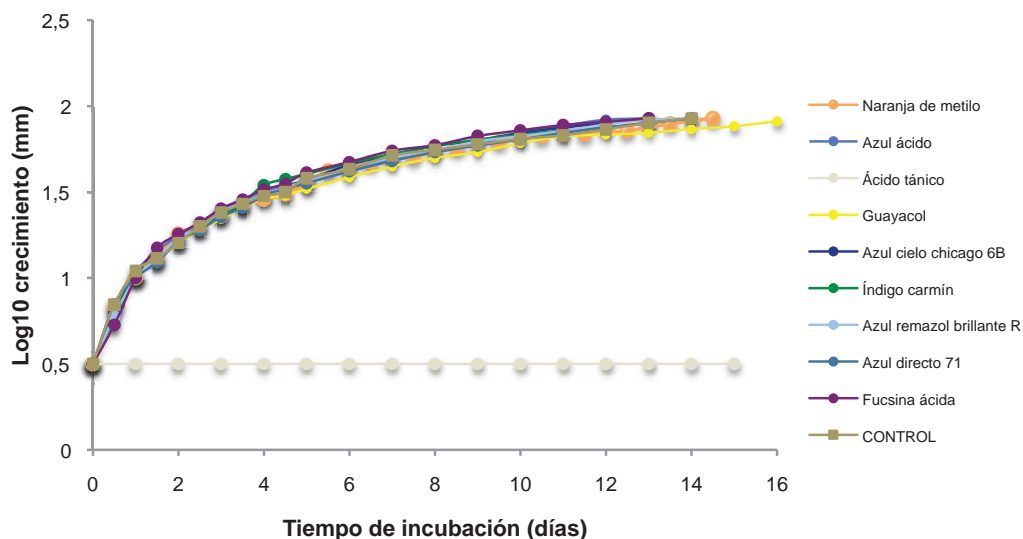


Figura 18. Cinética de crecimiento de la cepa 81-CMU (*U. ramaniana*) en medio AEM en presencia de distintos colorantes y agentes oxidantes.

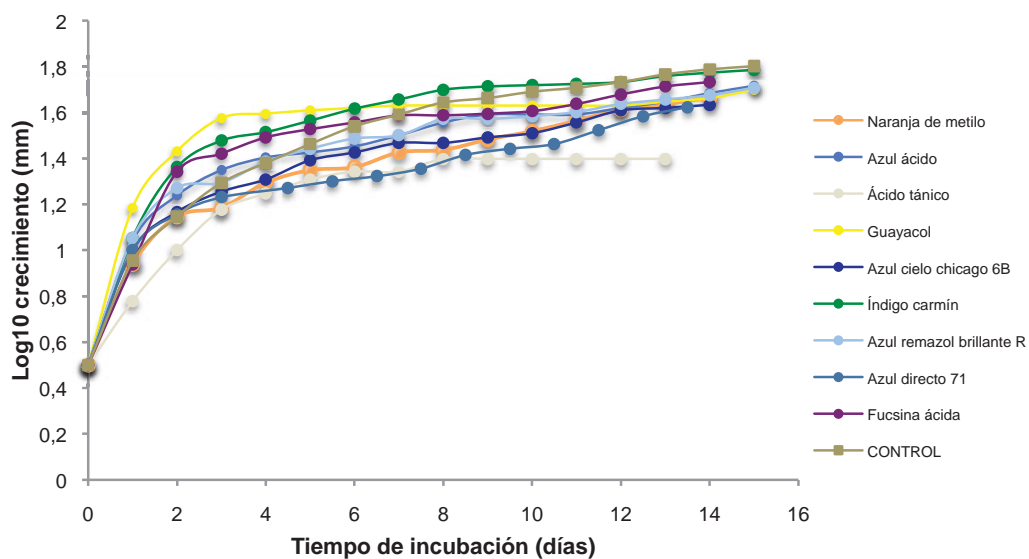


Figura 19. Cinética de crecimiento de la cepa 89-CMU (*D. bryoniae*) en medio AEM en presencia de distintos colorantes y agentes oxidantes.

El crecimiento de la cepa 96-CMU (*M. hiemalis*) fue constante en presencia de la mayoría de los sustratos que suplementan el medio de cultivo, llenando en su totalidad la superficie del mismo entre los días 4 y 5 de incubación. En presencia del colorante azul directo 71 se observó una inhibición del crecimiento entre los días 1 y 3 con respecto a los demás

cultivos, efecto que se extendió hasta después del día 5. Al igual que otras cepas, el ácido tánico también inhibió el crecimiento del micelio (Figura 20).

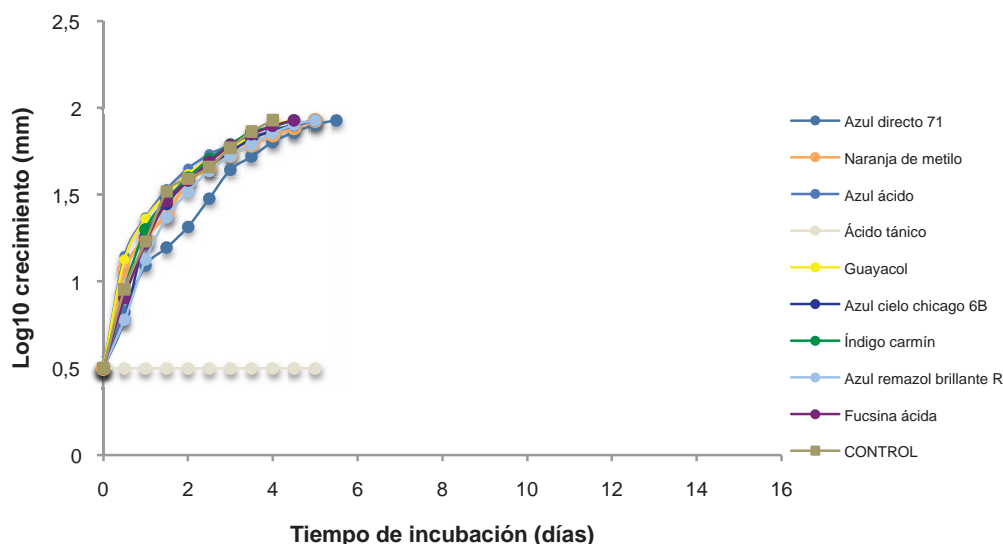


Figura 20. Cinética de crecimiento de la cepa 96-CMU (*M. hiemalis*) en medio AEM en presencia de distintos colorantes y agentes oxidantes.

En la figura 21 se observa la cinética de crecimiento de la cepa 149-CMU (*P. djamour*), la cual no presentó variaciones significativas en el crecimiento en presencia de ocho de los sustratos probados. El micelio alcanzó a llenar la caja del medio de cultivo entre los días 12 y 16. En presencia de fucsina ácida alcanzó su máxima biomasa a los 10 días de incubación, mientras que con azul cielo chicago 6B y naranja de metilo la alcanzó hasta el día 16. Un fenómeno particular sucedió en presencia de ácido tánico, en donde se observó un crecimiento similar al de los otros cultivos en los primeros días de incubación, pero después del día 5 se inhibió el crecimiento del micelio.

El crecimiento de la cepa 219-CMU (*F. incarnatum*) en ocho de los nueve sustratos presentó una cinética muy similar con respecto al control, comenzando la fase logarítmica a partir de las primeras 12 h de incubación y extendiéndose hasta llenar la placa de medio alrededor del día 10 (Figura 22). En presencia de ácido tánico el crecimiento se inhibió a partir del primer día y después de 15 días no alcanzó a cubrir en su totalidad el medio de cultivo.

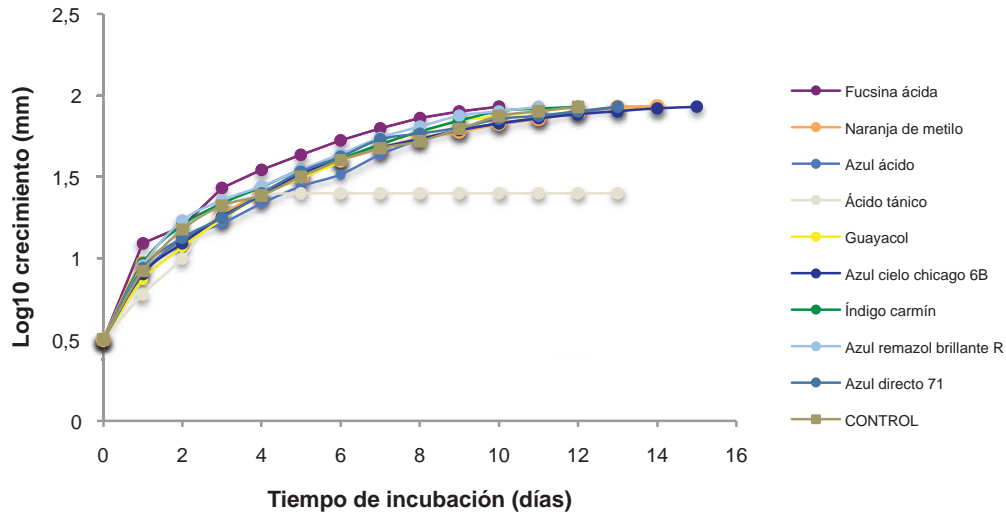


Figura 21. Cinética de crecimiento de la cepa 149-CMU (*P. djamour*) en medio AEM en presencia de distintos colorantes y agentes oxidantes.

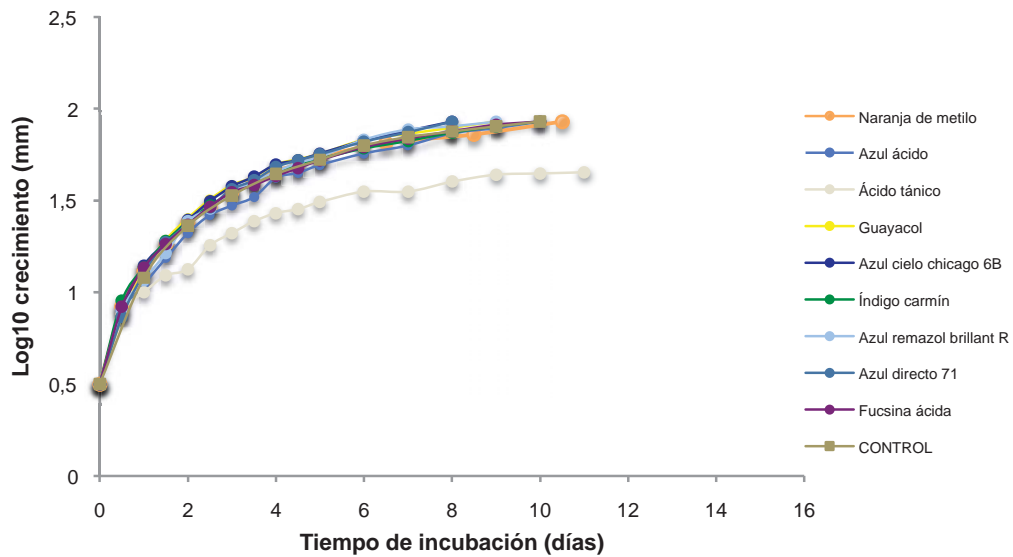


Figura 22. Cinética de crecimiento de la cepa 219-CMU (*F. incarnatum*) en medio AEM en presencia de distintos colorantes y agentes oxidantes.

La cinética de crecimiento de la cepa 234-CMU (*I. gibba*) fue lenta, requiriendo del periodo de 15 días para llenar la placa de medio de cultivo (Figura 23). Puede observarse que no hubo diferencias significativas en el

patrón de crecimiento de esta cepa crecida en las diferentes condiciones a excepción del ácido tánico, en el cual después del cuarto día de incubación se inhibió el crecimiento con respecto al control y a los otros compuestos fenólicos.

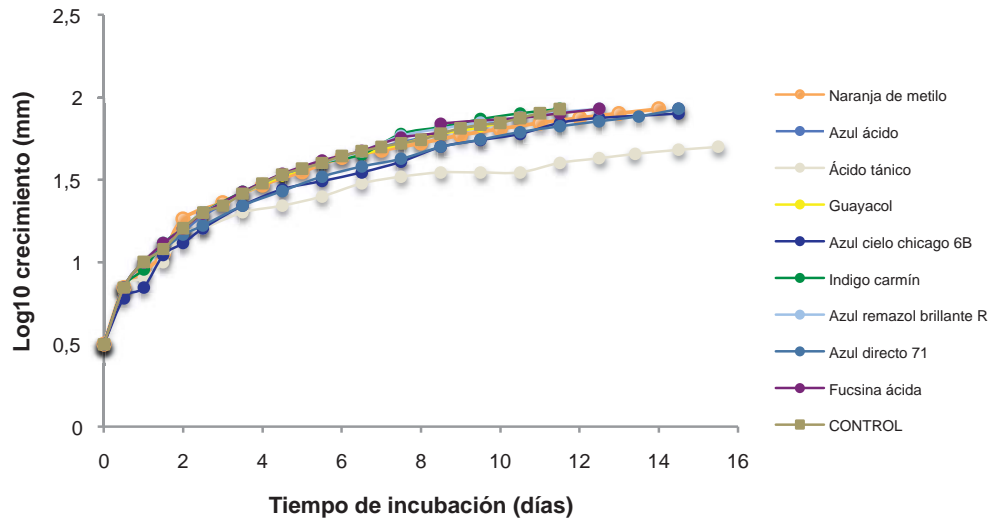


Figura 23. Cinética de crecimiento de la cepa 234-CMU (*I. gibba*) en medio AEM en presencia de distintos colorantes y agentes oxidantes.

En el caso de la cepa TA-CMU (*T. versicolor*) tampoco se observó una diferencia significativa en relación a la velocidad de crecimiento del micelio en presencia de los distintos compuestos fenólicos. Puede observarse que la fase logarítmica se disparó a partir de las primeras 12 h de incubación, llegando a la fase estacionaria a partir del día 5. A excepción del chicago azul cielo 6B, en el cual esta cepa llenó la caja de medio al día 8 de incubación, en presencia de los demás compuestos se alcanzó dicha fase el día 7 al igual que en el control. El ácido tánico inhibió el crecimiento de la cepa a partir del día 3, retrasando el crecimiento sin llenar la placa hasta el día 11 (Figura 24).

La cinética de crecimiento de la cepa TC-CMU (*T. cervina*) siguió el mismo patrón con la mayoría de los sustratos ensayados, pero en presencia de guayacol, azul cielo chicago 6R y azul remazol brillante R el crecimiento fue menor en relación al control, cultivo alcanzando su máxima producción de biomasa hacia el día 7. En presencia de fucsina ácida se presentó una mayor

velocidad de crecimiento que el del control, llenando la totalidad del medio de cultivo el día 6. El medio suplementado con ácido tánico inhibió totalmente el crecimiento del micelio de esta cepa (Figura 25).

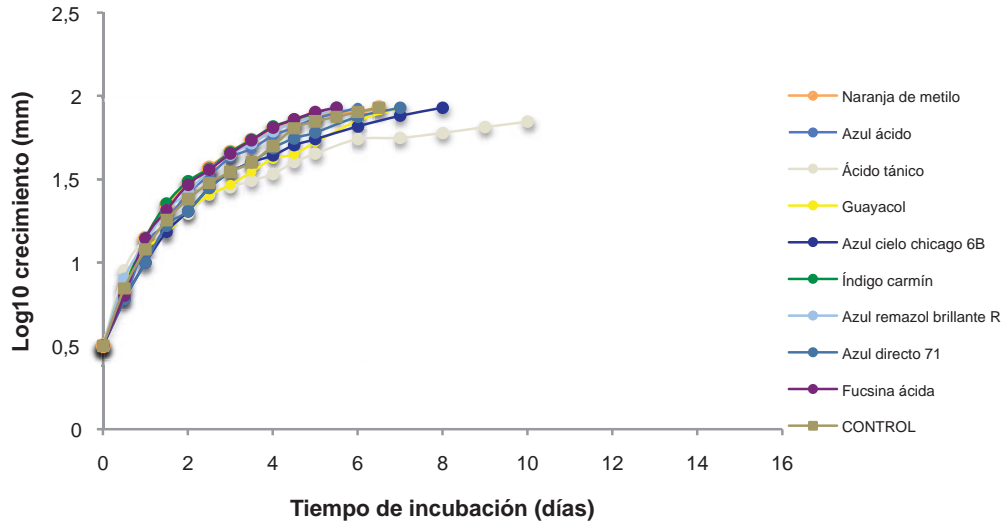


Figura 24. Cinética de crecimiento de la cepa TA-CMU (*T. versicolor*) en medio AEM en presencia de distintos colorantes y agentes oxidantes.

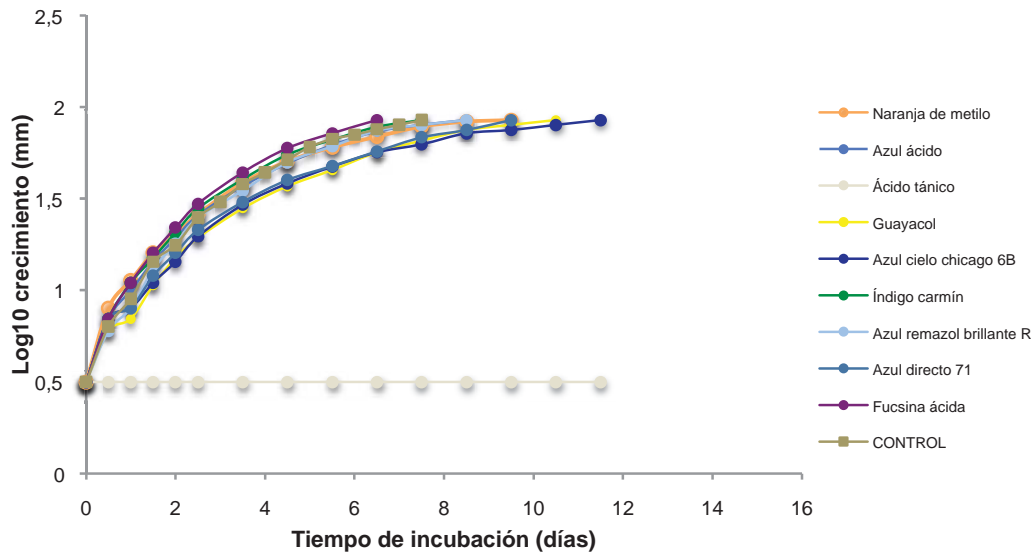


Figura 25. Cinética de crecimiento de la cepa TC-CMU (*T. cervina*) en medio AEM, en presencia de distintos colorantes y agentes oxidantes.

En general, los compuestos empleados no inhibieron de manera significativa la velocidad de crecimiento de las cepas de estudio en comparación con el medio control. La cepa de crecimiento más rápido fue la

59-CMU, alcanzando la fase logarítmica media a las 48 h (2 días) de incubación, mientras que la cepa de crecimiento más lento fue la 89-CMU, la cual alcanzó la fase logarítmica media hasta las 336 h (14 días) de incubación.

Con base a la velocidad de crecimiento y los resultados de los ensayos de decoloración/oxidación, las cepas 149-CMU, TA-CMU y 29-CMU fueron las que presentaron mayor potencial biotecnológico para la degradación de sustancias fenólicas, por lo que fueron seleccionadas para su estudio en medio líquido, determinación de proteína extracelular y evaluación de producción de fenol-oxidasas extracelulares.

VII.3. Actividad de lacasa extracelular basal e inducida en las cepas seleccionadas

Los ensayos de actividad enzimática basal e inducida así como la cinética de crecimiento correspondientes se realizaron para las 3 cepas seleccionadas, determinándose cada parámetro diariamente durante un periodo de 15 días.

VII.3.1 Comparación de distintas condiciones de cultivo para una misma cepa

VII.3.1.1 CEPA 29-CMU (*P. paeonicola*)

La actividad de lacasa extracelular basal e inducida de la cepa 29-CMU así como la cinética de crecimiento se muestran en la figura 26. La cinética de crecimiento en PDB mostró el inicio de la fase logarítmica a partir del primer día de incubación, prolongándose hasta el día 4, momento en que inició la fase estacionara que se mantuvo hasta el día 12. Posteriormente se observó un nuevo incremento del crecimiento, obteniéndose la máxima cantidad de biomasa al día 13. El crecimiento en medio PDB con extracto de rastrojo fue bajo en los primeros días de incubación, sobrepasando al nivel de crecimiento observado en medio PDB después del día 9. En presencia de rastrojo molido el crecimiento del micelio presento el máximo nivel, observándose un desarrollo de biomasa notable desde el primer día de incubación, llegando a un máximo crecimiento el sexto día de incubación, a partir del cual no se pudo seguir la

cinética debido al crecimiento excesivo y la saturación del medio con la masa del micelio.

En presencia de rastrojo la actividad enzimática de lacasa extracelular no fue detectada. La actividad específica basal en cultivo con PDB mostró un máximo de 25 U/mg de proteína hacia el quinto día de incubación.

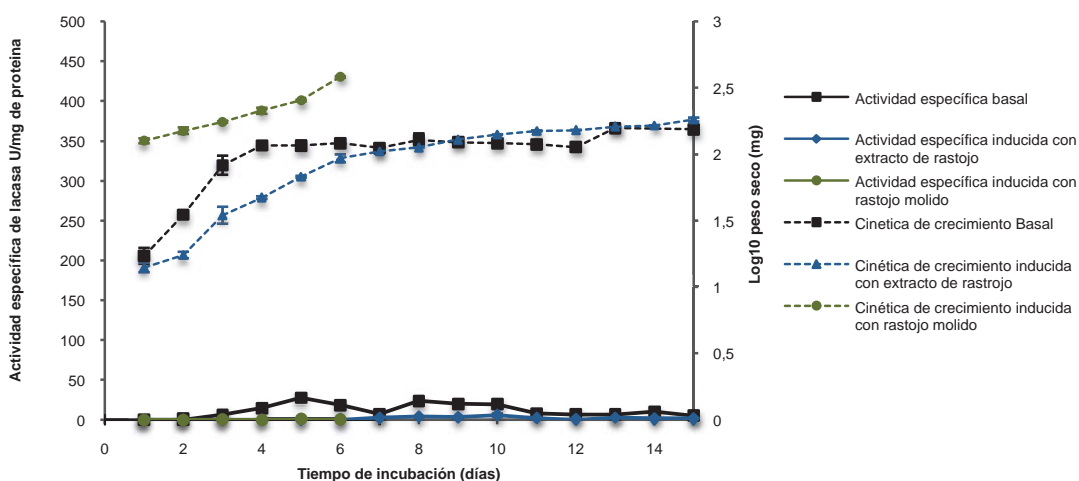


Figura 26. Actividad específica de lacasa extracelular basal e inducida y cinética de crecimiento de la cepa 29-CMU. La cepa se inoculó en medio líquido PDB (control) y PDB suplementado con extracto de rastrojo (10%, v/v) o con rastrojo molido al 2% (p/v) y se incubó a 28°C y a 120 rpm.

VII.3.1.2. CEPA 149-CMU (*P. djamour*)

El crecimiento del micelio de esta cepa en medio PDB presentó dos fases muy bien diferenciadas. En la primera fase se observó una etapa de crecimiento logarítmico desde el primer día de incubación hasta el día 6, entrando a una etapa estacionaria que se mantuvo hasta el día 10. Después de este día comenzó una nueva fase logarítmica de crecimiento que se extendió hasta el día 15, último día de medición (Figura 27). En el caso del cultivo en PDB con extracto de rastrojo la fase logarítmica media se presentó hacia el día 6, llegando posteriormente a una máxima producción de biomasa igual a la observada en el crecimiento del hongo con PDB. Por otro lado, el crecimiento del micelio en PDB con rastrojo molido se incrementó significativamente desde

el primer día de incubación a partir del cual comenzó la fase logarítmica que se prolongó hasta el día 15.

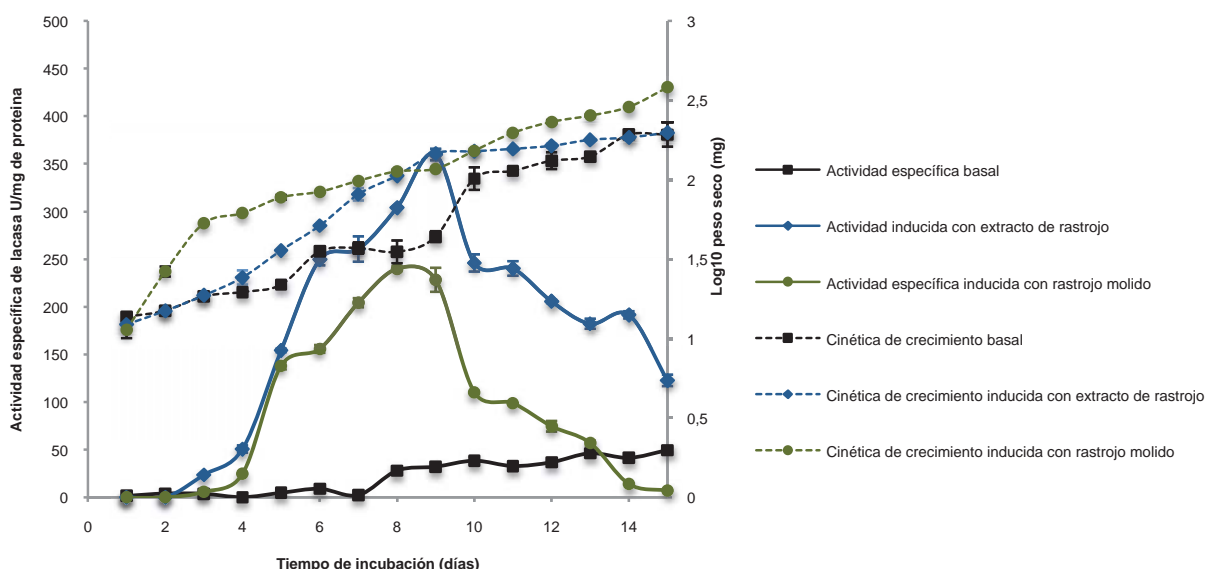


Figura 27. Actividad específica de lacasa extracelular basal e inducida y cinética de crecimiento de la cepa 149-CMU. La cepa se inoculó en medio líquido PDB (control) y PDB adicionado con extracto de rastrojo (10%, v/v) o con rastrojo molido al 2% (p/v) y se incubó a 28°C y 120 rpm.

La actividad enzimática de la cepa 149-CMU en cultivo con PDB mostró un ligero incremento a partir del día 8 con un valor de 40 U/mg de proteína, llegando a un máximo de 50 U/mg al día 15 (Figura 27). En el caso del cultivo en PDB con extracto de rastrojo se detectaron los niveles más altos de la actividad, con un máximo de 350 U/mg el día 9 y posteriormente una disminución hasta llegar a 125 U/mg de proteína el día 15. En el caso del cultivo en PDB con extracto de rastrojo, la actividad también mostró un incremento con respecto al cultivo en PDB, con un máximo de actividad de 225 U/mg de proteína al octavo día de incubación y posteriormente una disminución hasta un valor de 5 U/mg de proteína el día 15.

VII.3.1.3. CEPA TA-CMU (*T. versicolor*)

En la figura 28 se muestra la cinética de crecimiento de la cepa TA-CMU, en medio PDB en la que se observa un incremento gradual en la

producción de biomasa desde el primer día de incubación, presentándose la fase logarítmica media el día 8. El cultivo en medio PDB con extracto de rastrojo incrementó el crecimiento del micelio de esta cepa a partir del día 4, disparándose el crecimiento a partir de este momento, y llegó a una máxima producción de biomasa al día 15. El tratamiento con rastrojo molido incrementa el crecimiento desde el primer día de incubación hasta el cuarto día, a partir del cual se empareja a la cinética inducida con extracto de rastrojo.

La actividad enzimática de lacasa extracelular de esta cepa es significativamente alta, tanto en medio PDB en donde presenta un máximo de 370 U/mg de proteína, como en medio PDB con extracto de rastrojo ó con rastrojo molido. En el caso del cultivo en PDB con extracto de rastrojo se obtuvo un incremento de actividad desde el primer día de incubación muy similar al cultivo en PDB, con un máximo de actividad de 460 U/mg de proteína el día 8, con una posterior disminución hasta llegar a 125 U/mg de proteína el día 15. En el caso del cultivo en PDB con rastrojo molido, se observó un aumento de actividad a partir del día 4, con un pico máximo de 440 U/mg de proteína el día 8, que decae a 75 U/mg al final de la cinética.

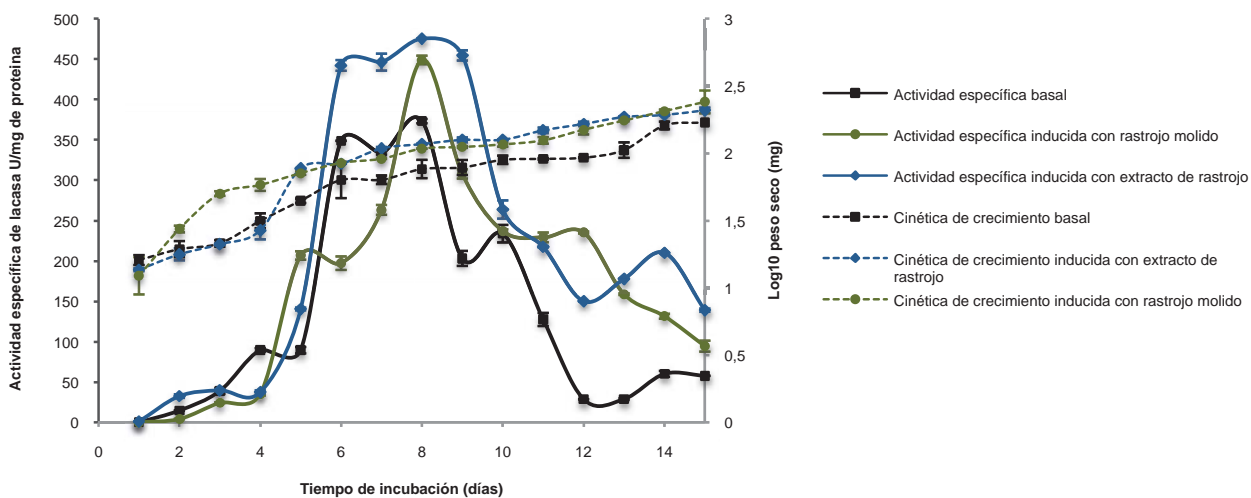


Figura 28. Actividad específica de lacasa extracelular basal e inducida y cinética de crecimiento de la cepa TA-CMU. La cepa se inoculó en medio líquido PDB (control) y PDB adicionado con extracto de rastrojo (10%, v/v) o con rastrojo molido al 2% (p/v) y se incubó a 28°C y 120 rpm.

VII.3.2. Comparación entre cepas en las distintas condiciones de cultivo

Estos análisis se hicieron con la finalidad de comparar el comportamiento de las tres cepas en las distintas condiciones de cultivo.

VII.3.2.1. Condiciones basales

En la Figura 29 puede observarse tanto el crecimiento como la actividad enzimática de cada una de las cepas estudiadas en la ausencia de inductores. Con respecto al crecimiento del micelio puede notarse que la cepa 29-CMU fue la que presentó una mayor velocidad de crecimiento, aumentando éste desde el día 1 de incubación para llegar a una fase estacionaria a partir del cuarto día. La cepa 149-CMU presentó la fase logarítmica media al octavo día y la TA-CMU también, aunque con una mayor producción de biomasa. La actividad específica de lacasa extracelular fue significativamente alta en la cepa TA-CMU con respecto a las otras dos cepas, presentando una actividad máxima de 325 U/mg de proteína en el día 8. Las cepas 29-CMU y 149-CMU presentaron un máximo de 25 U/mg y 40 U/mg de proteína los días 5 y 13, respectivamente.

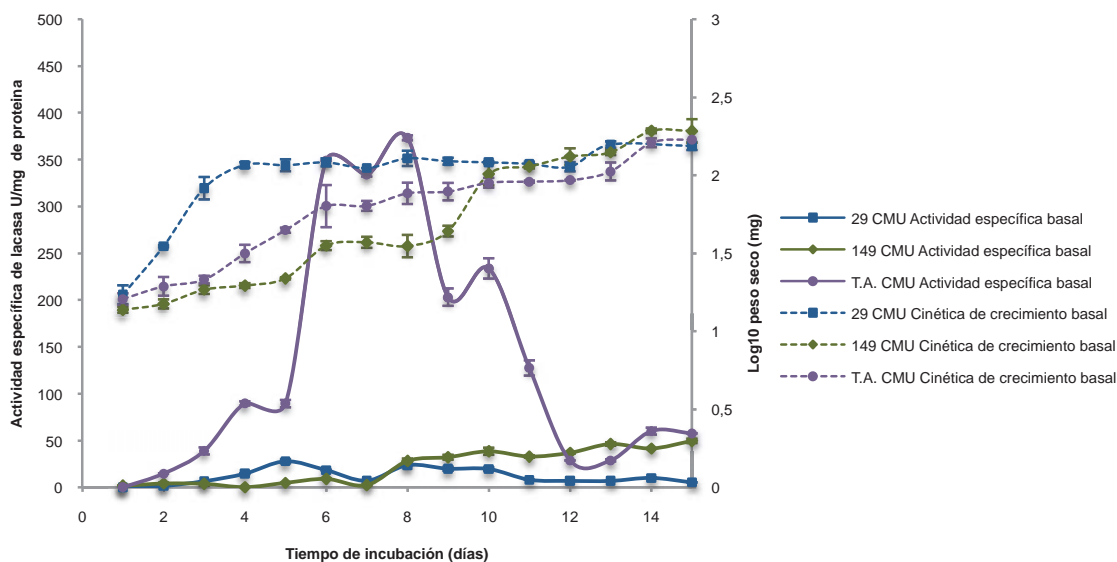


Figura 29. Actividad específica basal de lacasa extracelular y cinética de crecimiento de las cepas 29-CMU, 149-CMU y TA-CMU. Las cepas fueron crecidas en medio líquido PDB e incubadas a 28°C y 120rpm.

VII.3.2.2. Inducción con extracto de rastrojo

Aunque en estas condiciones de cultivo la cinética de crecimiento de las tres cepas mostró diferencias significativas en los primeros 8 días de crecimiento, a partir de este día las tres cepas desaceleraron su crecimiento y produjeron prácticamente la misma cantidad de biomasa en el día 15. En los primeros días, la cepa 29-CMU mostró una mayor producción de biomasa, seguida de la cepa TA-CMU y por último la cepa 149-CMU. La máxima actividad enzimática fue detectada en la cepa TA-CMU, la cual alcanzó un pico máximo de 460 U/mg de proteína el día 8, seguida de la cepa 149-CMU con 360 U/mg de proteína el día 9 y por último la 29-CMU con 5 U/mg de proteína el día 10 (Figura 30).

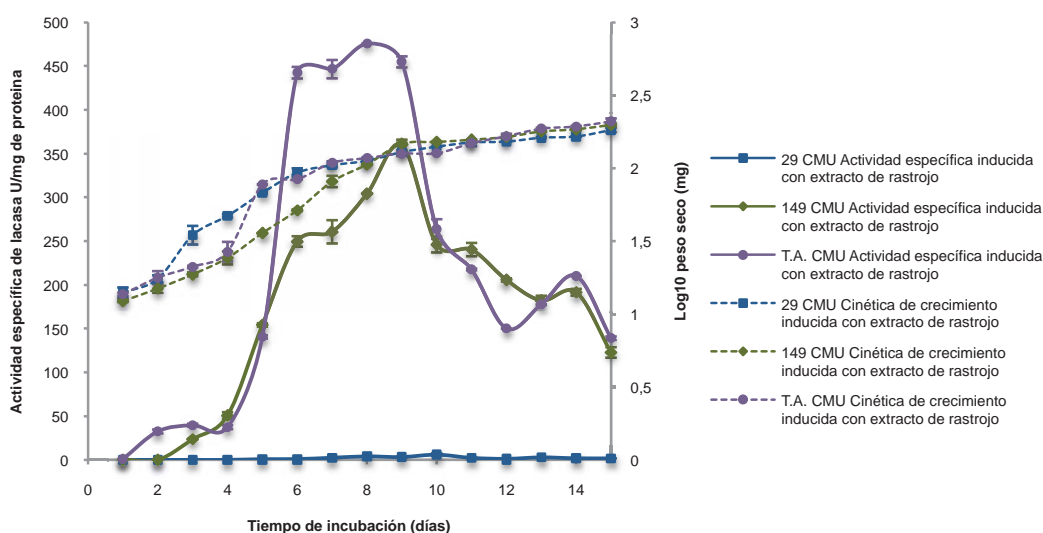


Figura 30. Actividad específica de lacasa extracelular inducida con extracto de rastrojo y cinéticas de crecimiento en las cepas 29-CMU, 149-CMU y TA-CMU. Las cepas fueron crecidas en medio líquido PDB adicionado con extracto de rastrojo al 10% (v/v) e incubadas a 28°C y 120 rpm.

VII.3.2.3. Inducción con rastrojo molido

En la figura 31 puede observarse que las cinéticas de crecimiento de las cepas 149-CMU y TA-CMU siguieron un patrón muy similar en los primeros días de incubación en medio PDB con rastrojo molido. En el caso de la cepa 149-CMU la producción de biomasa se incrementó a partir del día 9

alcanzando un máximo crecimiento con un valor \log_{10} de biomasa de 2.55, superior al 2.3 de la cepa TA-CMU. En el caso particular de la cepa 29-CMU el crecimiento del micelio se incrementó alcanzando valor \log_{10} de biomasa de 2.6 al quinto día de incubación, a partir del cual no se pudo seguir la cinética debido al crecimiento excesivo y la saturación de la masa del micelio. Con respecto a la actividad enzimática de lacasa extracelular la cepa 29-CMU no presentó actividad significativa en los 5 días que se midió. Por su parte, la cepa 149-CMU presentó un máximo de actividad de 225 U/mg de proteína el día 8 de incubación, con una posterior disminución hacia el día 15, en el cual llegó valores cercanos a cero. La cepa TA-CMU resultó ser la que presentó mayor actividad en cultivo en PDB con rastrojo molido, alcanzando un pico máximo de actividad de 450 U/mg de proteína el día 8, y disminuyendo de manera gradual hasta 100 U/mg al término de la cinética.

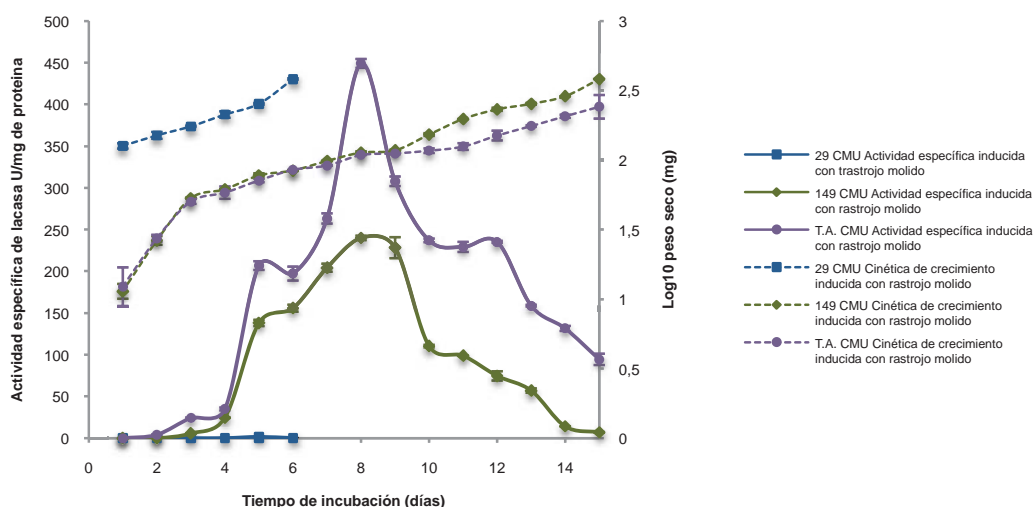


Figura 31. Actividad específica de lacasa extracelular inducida con rastrojo molido y cinética de crecimiento de las cepas 29-CMU, 149-CMU y TA-CMU. Las cepas fueron crecidas en medio líquido PDB adicionado con rastrojo molido al 2% (p/v) e incubadas a 28°C y 120 rpm.

En general, la actividad enzimática se incrementó con los inductores empleados, aumentando dicha actividad en las cepas 149-CMU y TA-CMU y obteniéndose valores máximos de 350 U/mg de proteína y 460 U/mg de proteína con extracto de rastrojo, así como 225 U/mg y 440 U/mg, respectivamente, con rastrojo molido. En el caso de la cepa 29-CMU pudo notarse que ninguno de los inductores implementados incrementó la actividad

enzimática sino que ésta se vio disminuida. Con respecto a los datos analizados con anterioridad pudo notarse que si bien la inducción con rastrojo molido fue considerable, los máximos incrementos de actividad se dieron con extracto de rastrojo.

VIII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se seleccionaron y caracterizaron cepas de hongos silvestres productoras de lacasas extracelulares. El descubrimiento y caracterización de cepas de hongos productores de lacasas extracelulares con diferentes afinidades por diversos sustratos y más estables a distintas condiciones de cultivo, es importante para la generación de distintas aplicaciones industriales, incluido el mejoramiento de la alimentación de animales de granja.

Uno de los primeros aspectos a destacar fue el hecho de que se lograron rescatar 13 cepas de estudio del cepario CMU en el que se encontraban conservadas mediante criopreservación durante un periodo de aproximadamente tres años. Esto implica que la criopresevación a largo plazo del micelio vegetativo de las cepas de estudio no afectó de manera negativa su capacidad de crecimiento *in vitro* ni la habilidad para producir enzimas extracelulares, particularmente lacasa, Aunque no se documentaron los parámetros de crecimiento y producción de lacasa extracelular de las cepas de estudio antes de guardarlas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las velocidades de crecimiento observadas y los niveles de actividad basal registrados muestran que estas cepas conservan capacidades fisiológicas con potencial biotecnológico. Previamente se ha reportado que la criopreservación de cepas de los géneros *Inonotus* y *Pholiota* con glicerol y dimetilsulfóxido (DMSO) no sufren una disminución significativa de su capacidad de crecimiento *in vitro* ni en la producción extracelular de lacasa y de manganeso peroxidasa (Stoychevet *al.*, 1998). No obstante, en dicho estudio las cepas se criopreservaron en nitrógeno líquido únicamente durante 48 h y solo para especies de dos géneros, mientras que en el presente trabajo se analizaron en medio sólido 13 cepas de doce géneros y tres cepas de dos géneros en medio líquido, las cuales se criopreservaron utilizando glicerol durante más de 36 meses. Aún más, en las cepas de estudio se encuentran representantes de Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota, algunas de las principales divisiones dentro de Fungi. Así, este trabajo muestra que la criopreservación a largo plazo no afecta de manera negativa las capacidades ligninolíticas de distintas especies de hongos

filamentosos. A futuro sería interesante estudiar la influencia de otros métodos más baratos de conservación de cepas, como la conservación en agua o en suelo, sobre la capacidad de producción de enzimas extracelulares, principalmente lacasas.

Entre las cepas que se analizaron en el presente trabajo estuvo *P. djamour* (149-CMU), la cual mostró una capacidad significativa para decolorar a los colorantes naranja de metilo, azul ácido, chicago azul cielo 6B, índigo carmín, remazol brillante azul R, azul directo 71 y fucsina ácida. Esta cepa también mostró capacidad para oxidar el guayacol. En la literatura se ha documentado la capacidad de distintas cepas de *P. ostreatus* y de *Pleurotus pulmonarius* (Rigas *et al.*, 2006) para decolorar el colorante Poly R-478, indicando que la especie aquí estudiada conserva dichas propiedades de degradación de colorantes fenólicos previamente reportada para el género.

El tratamiento de residuos de rastrojo con distintas cepas del género *Pleurotus* ha sido reportado con anterioridad (Cohen *et al.*, 2002). Así, se ha documentado el incremento de la digestibilidad *in vitro* de rastrojo de trigo tratado con *P. ostreatus* (Lindenfelser *et al.*, 1979; Zadrazil, 1985; Kamra y Zadrazil, 1986), así como un incremento en la degradación ruminal (Jalc *et al.*, 1996). Martínez *et al.* (1994) han observado una deliginificación selectiva de *P. eryngii* sobre el rastrojo de trigo y Bisaria *et al.* (1997) reportaron la capacidad de *P. sajor-caju* para disminuir en aproximadamente 45% el contenido de lignina de rastrojo de trigo y de maíz en ensayos de bioconversión en sustrato sólido, si bien no midieron la actividad extracelular de lacasa. Así, el presente trabajo muestra que *P. djamour* puede unirse al listado de cepas del género *Pleurotus* que son útiles para tratar rastrojo de maíz, para el que existen pocos estudios al respecto debido a que la actividad extracelular de lacasa está directamente relacionada con el tratamiento de rastrojo.

El ensayo de actividad de lacasa extracelular en medio líquido para esta cepa mostró una actividad basal máxima de 40 U/mg de proteína, la cual se mantuvo relativamente constante hasta el día 15 de incubación, mientras que tanto con rastrojo molido como con extracto de rastrojo se observó un solo máximo de actividad correspondiente a 350 U/mg de proteína y 225 U/mg de

proteína, respectivamente. En la comparación de nuestros resultados de actividad extracelular de lacasa con reportes previos para especies del género *Pleurotus* es importante tomar en consideración que dichas determinaciones se realizaron en diferentes medios de cultivo y en ensayos de fermentación en sustrato sólido. También, en la mayoría de los reportes se presentan datos de actividad total, es decir en U/ml de cultivo o en U/mg de peso seco, sin mostrar actividad específica. Estudiando diferentes cepas de *P. ostreatus* se ha reportado una actividad basal de $56.87 (\pm 11.6) \times 10^{-4}$ U/mg de peso seco para la cepa de referencia f6, la cual aumenta cerca de tres mil veces en aislados monospóricos y cruza en medio Kirk con concentraciones limitantes de nitrógeno (Eichlerová *et al.*, 2000). Cuando la cepa f6 se creció en rastrojo de trigo estéril, se observó una actividad de lacasa extracelular de $9.63 (\pm 1.55) \times 10^{-2}$ U/ml a 22 °C, la cual disminuyó conforme se incrementó la temperatura de incubación. Para la misma especie se han reportado valores más altos de actividad extracelular de lacasa, del orden de 485-906.3 U/ml (Periasamy y Palvannan, 2010) y 58.2 U/g (Toca-Herrera y Rodríguez-Couto, 2011). Estos resultados de la literatura indican que la actividad extracelular basal de *P. djamour* medida en este estudio y la inducción de ésta en presencia de rastrojo, es mayor a la de otras especies de *Pleurotus*.

En las especies del género *Pleurotus* estudiadas se ha encontrado la presencia de dos o más isoenzimas. Así, en distintas cepas de *P. ostreatus* se ha documentado la presencia de dos (G. Palmieri *et al.*, 2003; Giardina *et al.*, 2007) y cuatro isoenzimas (Mansur *et al.*, 2003), las cuales se expresan dependiendo de las condiciones de cultivo y presentan distintas afinidades por sustrato y condiciones de actividad óptima diferentes. A la fecha, se han identificado al menos tres genes de lacasa extracelular en *P. ostreatus* (Pezzella *et al.*, 2009). Para el caso de *P. sapidus* (Linke *et al.*, 2005) y *P. eryngii* (Muñoz *et al.*, 1997) se ha documentado la presencia de dos isoenzimas, mientras que para *P. pulmonaris* se ha reportado la producción de tres isoformas (Marques de Souza *et al.*, 2004) y para *P. sajor-caju* se han identificado cuatro genes que codifican para distintas isoenzimas (Soden y Dobson, 2001). Así, de acuerdo a los antecedentes dentro del género, es posible suponer que *P. djamour* tiene al menos dos isoenzimas de lacasa

extracelular. A futuro, sería interesante determinar el número de isoenzimas que se están expresando cuando se cultiva *P. djamour* en presencia de rastrojo, así como el número de genes que codifican para lacasas extracelulares en dicha especie.

La cepa que presentó mayor actividad enzimática específica basal e inducida fue *T. versicolor* (TA-CMU), obteniéndose un valor basal mayor a 370 U/mg de proteína hacia el día 8 de incubación. La inducción con rastrojo molido incrementó la actividad específica hasta 450 U/mg de proteína. En presencia de extracto de rastrojo mostró la cifra más alta de actividad en este trabajo, la cual fue de 460 U/mg de proteína. Nuevamente, al igual que en el caso de *Pleurotus*, las comparaciones del presente trabajo con la literatura deben de tomarse con reserva debido a las diferencias en las técnicas de cultivo, de inducción y de unidades en las que se reporta la actividad. Rodríguez-Couto y Toca-Herrera (2011) encontraron que este hongo presenta niveles de actividad específica de 63.3 U/g, por debajo de los reportados en el presente trabajo. Reportes previos han documentado la presencia de dos isoenzimas en *T. versicolor* (R. Bourbonnais *et al.*, 1995; Carvalho *et al.*, 1999; Lorenzo *et al.*, 2006), por lo que es posible que la cepa aquí analizada presente también dos isoenzimas, lo cual deberá evaluarse en estudios futuros de ésta cepa.

Los resultados obtenidos con la cepa de *P. paeonicola* son interesantes ya que existen pocos datos de actividad extracelular de lacasa en dicho género. Estudios hechos con *P. guepinii* muestran que ésta es capaz de decolorar *in vitro* colorantes con distintos tipos de estructuras (Nazareno y Hammer, 2006). Recientemente se ha reportado la capacidad de una cepa de *Pestalotiopsis* sp. para producir lacasa extracelular en medio definido, cuya actividad se incrementa cuando se añade Cu^{+2} al medio de cultivo, obteniendo un valor máximo de 32.7 (+/- 1.7) U/ml (Hao *et al.*, 2007). Adicionalmente, extractos crudos de la enzima producida pueden decolorar eficientemente al colorante azul directo rápido B2RL en condiciones ácidas. Dicha cepa fue aislada de suelo de bosque subtropical y en ensayos sin inducir mostró una actividad de lacasa extracelular de 0.56 (+/-0.09) U/ml (Hao *et al.*, 2006). En nuestra cepa de *P. paeonicola* la actividad basal de lacasa extracelular fue de 25 U/mg de proteína, por lo que parece ser tan buen productor o mejor que la

cepa del mismo género reportada en la literatura. Es importante hacer estudios adicionales para evaluar inductores óptimos de la actividad enzimática de lacasa extracelular en esta cepa.

IX. CONCLUSIONES

- i) Las cepas criopreservadas estudiadas conservan características fisiológicas útiles para aplicaciones biotecnológicas.
- ii) Los ensayos de decoloración/oxidación en medio sólido resultaron eficaces para la selección de cepas productoras de lacasa extracelular.
- iii) La cepa TA-CMU de *T. versicolor* presentó una actividad enzimática específica basal significativamente alta y mayor a la reportada en la literatura para otras cepas de esta especie.
- iv) Se documentó por primera vez la actividad de lacasa extracelular de la especie *P. djamour*, la cual mostró niveles de actividad iguales o superiores a los reportados en la literatura para otras especies del género.
- v) Tanto el rastrojo molido como el extracto de rastrojo fueron buenos inductores de la actividad de lacasa extracelular de las cepas de *P. djamour* (149-CMU) y *T. versicolor* (TA-CMU).

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves da Cunha MA, Barbosa AM, Giese EC and Dekker RF. 2003. The effect of carbohydrate carbon sources on the production of constitutive and inducible laccases by *Botryosphaeria* sp. *Journal of Basic Microbiology*. 43: 385-392.

Arora Daljit Singh and Rakesh Kumar Sharma. 2010. Ligninolytic Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 160: 1760-1788.

Arredondo-Santoyo M. 2009. Establecimiento de un cepario de hongos micromicetos silvestres del Estado de Michoacán. Tesis para obtener el grado Químico Farmacobiólogo. Facultad de Químico Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Akin DE, Sethuraman A, Morrison III WH, Martin SA and Eriksson KL. 1993. Microbial delignification with white rot fungi improves forage digestibility. *Applied and Environmental Microbiology*. 59: 4274-4282.

Baldrian P and Gabriel J. 2002. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiology Letters*. 206: 69-74.

Baldrian P, Valáskov V, Merhautová V, y Gabriel J. 2006. Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. *Research in Microbiology*. 156: 670-676.

Bisaria R., Madan M., and Vasudevan P. 1997. Utilization of agro-residues as animal feed through bioconversion. *Bioresource Technology*. 59 (1): 5-8.

Camarero S, Sarkar S, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ and. Martínez AT. 1999. Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *Journal of Applied Biochemistry*. 274: 10324-10330.

Carvalho Maria E. A. , M. C. Monteiro, and G. L. Sant'anna, Jr. 1999. Laccase from *Trametes versicolor*: Stability at Temperature and Alkaline Conditions and

Its Effect on Biobleaching of Hardwood Kraft Pulp. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 77-79: 723-733.

Collins PJ and Dobson ADW. 1997. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 3444-3450.

Cohen R., Persky L., and Hadar Y. 2002. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 58: 582-594.

Dashtban M, Heidi Schraft, Tarannum A. Syed, Wensheng Qin. 2010. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*.1: 36-50.

Dávila G y Vázquez DR. 2001. Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. *Mensaje Bioquímico* 30: 29-55.

Dekker RF, Vasconcelos AFD, Barbosa AM, Giese EC and Paccola- Meirelles I. 2001. A new role for veratryl alcohol: regulation of síntesis of lignocellulose-degrading enzymes in the ligninolytic ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. influence of carbon source. *Biotechnology Letters*. 23: 1987-1993.

Dekker RF, Barbosa AM, Giese EC, Godoy SD, Covizzi LG. 2007. Influence of nutrients on enhancing laccase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. *International Microbiology*. 10: 177-185.

Dorado J, Almendros G, Camarero S, Martínez AT, Vares T and Hatakka A. 1999. Transformation of wheat straw in the course of solid state fermentation by four ligninolytic basidiomycetes. *Enzyme and Microbial Biotechnology*. 25: 605-612.

Eichlerová Ivana , Ladislav Homolka, František Nerud, František Zadrzil, Petr Baldrian and Jirí Gabriel. 2000. Screening of *Pleurotus ostreatus* isolates for their ligninolytic properties during cultivation on natural substrates. *Biodegradation*. 11: 279-287.

Eggert C, Lafayette PR, Temp U, Eriksson KEL and Dean JFD. 1998. Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied Environmental Microbiology*. 64: 1766-1772.

Fernandez-Larrea J and Staht U. 1996. Isolation and characterization of a laccase gene from *Podospora anserina*. *Molecular and General Genetics*. 252: 539-551.

Giardina Paola, Flavia Autore, Vincenza Faraco, Giovanna Festa, Gianna Palmieri, Alessandra Piscitelli, and Giovanni Sannia. 2007. Structural characterization of heterodimeric laccases from *Pleurotus ostreatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 75: 1293-1300.

Gustavo Dávila y Rafael Vázquez-Duhalt. 2006. Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. *Mensaje Bioquímico*, Vol. XXX.

Gutiérrez A, Bocchini P, Galleti GC, and Martínez AT. 2006. Analysis of lignin-polysaccharide complex formed during grass lignin degradation by cultures of *Pleurotus* species. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 1928-1934.

Hao Jie-Jie, Xing-Jun Tian, Fu-Qiang Song, Xing-Bing He, Zhi-Jun Zhang and Peng Zhang. 2006. Involvement of Lignocellulolytic Enzymes in the Decomposition of Leaf Litter in a Subtropical Forest. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 53(3): 193-198.

Hao Jiejie , Fuqiang Song, Feng Huang, Changlin Yang, Zhijun Zhang, Yi Zheng, and Xingjun Tian. 2007. Production of laccase by a newly isolated deuteromycete fungus *Pestalotiopsis* sp. and its decolorization of azo dye. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 34 (3): 233-240.

Herpoël I, Moukha S, Lesage-Meessen L, Sigoillot J and Asther M. 2000. Selection of *Pycnoporus cinnabarinus* strains for laccase production. *FEMS Microbiology Letters*. 183: 301-6.

Hofrichter M, Vares T, Kalsi M, Galkin S, Scheibner K, Fritsche W and Hatakka A. 1999. Production of manganese peroxidase and organic acids and mineralization of ¹⁴C-labeled lignin (¹⁴C-DHP) during solid-state fermentation

of wheat straw with the white rot fungus *Nematoloma frowardii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 1864-1870.

Jalc D, Nerud F, Zitnan R, and Siroka P. 1996. The effect of white-rot basidiomycetes on chemical composition and in vitro digestibility of wheat straw. *Folia Microbiology*. 41: 73-75.

Kamra DN, and Zadrazil F. 1986. Influence of gaseous phase, light and substrate pretreatment on fruit-body formation, lignin degradation and in vitro digestibility of wheat straw fermented with *Pleurotus* spp. *Agricultural Wastes* 18: 1-17.

Karahanian E, Corsini G, Lobos S and Vicuña R. 1998. Structure and expresión of a laccase gene from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biochimica et Biophysica*. 1443: 65-74.

Keller FA, Hamilton JE and Nguyen QA. 2003. Microbial pretreatment of biomass: potential for reducing severity of thermochemical biomass pretreatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 108: 27-41.

Kiiskinen LL, Rättö M, Kruus K. 2004. Screening for novel laccase-producing microbes. *Journal of applied Microbiology*. 97: 640-646.

Kilaru S, Hoegger PJ and Kûes U. 2006. The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies. *Current Genetics*. 50: 45-60.

Koroljova-Skorobogat`ko OV, Stepanova EV, Gavrilova VP, Morozava OV, Lubimova NV, Dzchafarova AN, Jaropolov AI and Makower A. 1998. Purification and characterization of the constitutive form of laccase from the basidiomycetes *Coriolus hirsutus* and effect of inducers on laccase synthesis. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 28: 47-54.

Kremer S. and Anke H. 1997. Fungi in bioremediation. In T. Anke (ed.), *Fungal Biotechnology*. 275-295.

Leonowicz, A., Edgehill, R. U., Bollag, J. M. 1984. The effect of pH on the transformation of syringic and vanillic acids by the laccases of *Rhizoctonia*

practicola and *Trametes versicolor*. *Archives of Microbiology*. 137: 89-96.

Levin L, Forchiassin F, y Ramos AM. 2002. Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Mycologia*. 94: 377-383.

Levin L, Papinutti L, Forchassin F. 2004. Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. *Bioresource Technology* 94: 169-176.

Lindenfelser LA, Detroy RW, Ramstack JM, and Worden KA. 1979. Biological modification of the lignin and cellulose components of wheat straw by *Pleurotus ostreatus*. *Development Individual Microbiology*. 20: 541-551.

Linke D, Bouws H, Peters T, Nimtz M, Berger RG and Zorn H. 2005. Lacasses of *Pleurotus sapidus*: characterization and cloning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 9498- 505.

Lomasco A, Record E, Herpoël-Gimbert I, Delattre M, Robert JL, Georis J, Dauvrin T, Sigoillot JC and Asther M. 2003. Overproduction of laccase by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* using ethanol as inducer. *Journal of Applied Microbiology*. 94: 618-624.

Lorenzo Miriam, Moldes Diego, and Ma. Sanromán Angeles. 2006. Effect of heavy metals on the production of several laccase isoenzymes by *Trametes versicolor* and on their ability to decolorize dyes. *Chemosphere*. 63: 912-917.

Mansur Mariana , María E. Arias, José L. Copa-Patiño, María Flärdh, Aldo E. González. 2003. The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities. *Mycologia*. 95(6): 1013-1020.

Marques de Souza Cristina Giatti , Giovana Kirst Tychanowicz, Daniela Farani de Souza and Rosane Marina Peralta. 2004. Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. *Journal of Basic Microbiology*. 44: 129-136.

Martínez-Ángel T., Mariela Speranza, Francisco J. Ruiz-Dueñas, Patricia Ferreira, Susana Camarero, Francisco Guillén, María J. Martínez, Ana

- Gutiérrez, José C. del Río. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*. 8: 195-204.
- Martin-Moreno C., González BA and Blanco SMJ. 2004. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamiento de biorrecuperación. *Revista Iberoamericana de Micología*. 21: 103-120.
- Messner K, and Srebotnik E. 1994. Biopulping: An overview of developments in an environmentally safe paper-making technology. *FEMS Microbiology Reviews*. 13: 351-364.
- Muñoz C, Guillén F, Martínez AT and Martínez MJ. 1997. Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Current Microbiology*. 34: 1-5.
- Nagai M, Sato T, Watanabe H, Saito K, Kawata M, and Enei H. 2002. Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinus edodes*, and decolorization of chemically different dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60: 327-335.
- Nazareno MC and Hammer E. 2006. Decolorization of synthetic dyes by the Deuteromycete *Pestalotiopsis guepinii* CLPS no. 786 strain. *Journal Basic Microbiology*. 46: 28-33.
- Palmieri Gianna , Giovanna Cennamo, Vincenza Faraco, Angela Amoresanob, Giovanni Sannia, Paola Giardina. 2003. Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme and Microbial Technology*. 33: 220-230.
- Periasamy Rathinasamy, Thayumanavan Palvannan. 2010. Optimization of laccase production by *Pleurotus ostreatus* IMI 395545 using the Taguchi DOE methodology. *Journal Basic Microbiology*. 50 (6): 548-56.

Pezzella C, Autore F, Giardina P, Piscitelli A, Sannia G, and Faraco V. 2008. The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: isolation and heterologous expression of new family members. *Current Genetics*. 55: 45-57.

Pezzella Cinzia , Flavia Autore, Paola Giardina, Alessandra Piscitelli, Giovanni Sannia, Vincenza Faraco. 2009. The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: isolation and heterologous expression of new family members. *Current Genetics*. 55: 45-57.

Pointing SB. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology Biotechnology*. 57: 20-33.

Ralph JP and Catchside DEA. 2002. Biodegradation by white-rot fungi. In H. D. Osiewacz (ed.), *The Mycota*, Springer-Verlag, Germany. 10: 303-326.

R. Bourbonnais, M. G. Paice, I. D. Reid, P. Lanthier, and M. Yaguchi. 1995. Lignin Oxidation by Laccase Isozymes from *Trametes versicolor* and Role of the Mediator 2,29-Azinobis (3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate) in Kraft Lignin Depolymerization. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(5): 1876-1880.

Rezende MI, Barbosa AM, Vasconcelos AFD, Haddad R and Dekker RF. 2005. Growth and production of laccases by the ligninolytic fungi, *Pleurotus ostreatus* and *Botryosphaeria rhodina*, cultured on basal medium containing the herbicide, sceptor® (imazaquin). *Journal of Basic Microbiology*. 45: 460-469.

Rigas F., Dritsa V. 2006. Decolourisation of a polymeric dye by selected fungal strains in liquid cultures. *Enzyme and Microbial Technology*. 39: 120-124.

Riva S. 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology* 24: 219-226.

Rodríguez-Couto S and Toca-Herrera JL. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances*. 24: 500-513.

Sanchez C. 2009. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*. 27:185-194.

Shah V and Nerud F. 2002. Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. *Canadian Journal Microbiology*. 48: 857-870.

Stajic M, Persky L, Hadar Y, Friesem D, Duletic-Lausevic S, Wasser SP, Nevo E. 2006. Effect of copper and manganese ions on activities of laccase and peroxidases in three *Pleurotus* species grown on agricultural wastes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 128(1):87-96

Soden D. M. and Dobson A. D. W. 2001. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology*. 147: 1755-1763.

Shah, V., Nerud, F. 2002. Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. *Canadian Journal Microbiology*. 48: 857-870.

Temp U, Zierold U and Eggert C. 1999. Cloning and characterization of a second laccase gene from the lignin-degrading basiomycete *Pycnoporus cinnabarinus*. *Gene*. 236: 169-177.

Tetsch L, Bend J and Hölker U. 2006. Molecular and enzymatic characterization of extra and intracellular laccases from the acidophilic ascomycete *Hortaea acidophila*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 90: 183-194.

Thurston CF. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140: 19-26.

Toca-Herrera JL, Rodríguez-Couto, S. Osma JF, Moilanen U. 2011. Morphology and laccase production of white-rot fungi grown on wheat bran flakes under semi-solid-state fermentation conditions. *FEMS Microbiology Letters*. 318: 27–34.

Wilkins RJ. 2000. Forages and their role in animal systems. *In* Forage evaluation in ruminant nutrition. Edited by D. I. Givens, E. Owen, R. F. E. Axford and H. M. Omed. CAB International, Wallingford UK. pp. 1-14.

Wong DW. 2009. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 157: 174-209.

Yoshida, H. 1883. Chemistry of lacquer (Urushi). *Journal of the Chemical Society*. 43:472-486.

Zadrazil F. 1985. Screening of fungi for lignin decomposition and conversion of straw into feed. *Angewandte Botanik*. 59: 433-452.

Zhang Percival YH, Himmel ME and Mielenz JR. 2006. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*. 24: 452-481.