

### ISOFORMAS DE LACASAS DE *Pleurotus ostreatus* OBTENIDAS EN FERMENTACIÓN SUMERGIDA CON pH 4.5 Y 6.5

Díaz-Godínez R<sup>1</sup>, Bibbins-Martínez M<sup>2</sup>, Rojas-López M<sup>2</sup>, Sánchez C<sup>1</sup>, Díaz-Godínez G<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Km 10. 5 Aut. Tlaxcala-Tezmelucan, Ixtacuixtla Tlaxcala. México. Tel/Fax +52 2484815482, email: [diazgdo@hotmail.com](mailto:diazgdo@hotmail.com)

<sup>2</sup>Centro de Investigación de Biotecnología Aplicada, IPN. Tlaxcala, México.

Palabras clave: *Pleurotus*, *Lacasas*, *zimograma*

**Introducción.** Las enzimas lacasas ( $\rho$ -difeno: oxígeno oxido-reductasas E.C. 1.10.3.2) son glicoproteínas con peso molecular entre 60-80 Kda (1), su punto isoelectrico (pI) y su pH óptimo son ácidos. Las enzimas lacasas catalizan la oxidación, polimerización, depolimerización, metilación y/o dimetilación de compuestos fenólicos (2). *Pleurotus ostreatus* es un hongo de pudrición blanca. Se ha sugerido que el número y tipo de isoformas de lacasas dependen de las condiciones de desarrollo del hongo. En este trabajo se produjeron lacasas de *P. ostreatus* (ATCC 32783) por fermentación sumergida (FS) a dos pH's del medio de cultivo (4.5 y 6.5), y se identificaron las isoformas producidas por zimografía.

**Metodología.** Las fermentaciones se realizaron en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 50 ml de medio de cultivo (3). Cada matraz se inoculó con tres fragmentos de micelio de 4 mm de diámetro obtenidos de la periferia de una colonia desarrollada sobre agar extracto de malta por 7 días a 25 °C. Se incubaron a 25 °C por 23 días en agitación orbital de 120 rpm. Se muestreo cada 24 h. La actividad de lacasas se observó a través de zimogramas usando el método modificado de Laemmli (SDS-PAGE) (3). Los geles se incubaron a temperatura ambiente en solución de 2,6 Dimetoxifenol en buffer de acetatos pH 4.5 y por separado en buffer de fosfatos a pH 6.5 (3).

**Resultados y discusión.** En la Fig. 1 se muestra el perfil zimográfico de las enzimas producidas a pH de 6.5, se observó que existen dos isoformas que presentan actividad a los dos pH evaluados, pero existe una isoforma que solo presentó actividad a pH de 4.5.

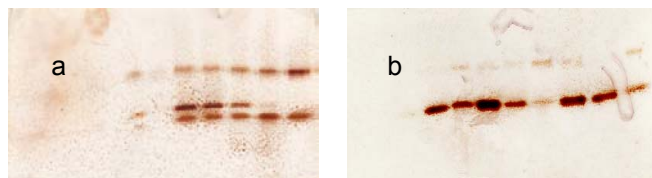


Fig. 1 Zimogramas de lacasas obtenidas por FS a pH de 6.5, incubadas a pH de 4.5 (a) y 6.5 (b).

En la Fig. 2 se puede observar que en la fermentación a pH de 4.5, se producen dos isoformas con actividad a pH de 4.5 y 6.5, sin evidencia de otra isoforma al cambiar el pH de actividad.

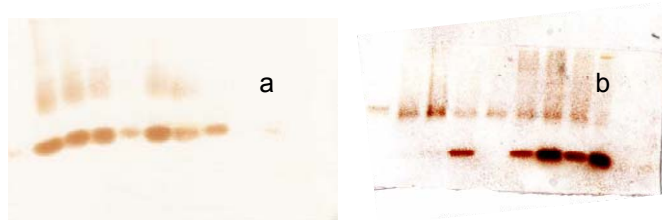


Fig. 2 Zimogramas de lacasas obtenidas por FS a pH de 4.5, incubadas a pH de 4.5 (a) y 6.5 (b).

**Conclusión.** Estos resultados sugieren que la producción de isoformas de lacasas está influenciada por el pH del medio de cultivo, y que algunas isoformas presentan actividad a distintos pHs. Se observan dos isoformas producidas en ambos pH del medio de cultivo, y una isoforma diferente producida a pH de 6.5 pero evaluada a 4.5. Lo anterior sugiere que dos isoformas son independientes del pH del medio de cultivo y que otra isoforma solo se producirá a pH de 6.5. Estos resultados contribuyen al conocimiento fisiológico y bioquímico de *P. ostreatus* y al manejo de las condiciones de producción de lacasas y de su actividad.

**Agradecimientos.** Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el Proyecto No. 47396, así como por la Universidad Autónoma de Tlaxcala y el CIBA-IPN.

#### Bibliografía.

1. Heinzkill M, Bech L, Halkier T, Schneider P y Anke T. 1998. Characterization of laccase and peroxidases from wood-rotting fungi (family *Coprinaceae*). *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1601-1606.
2. Giardina P, Palmieri G, Scaloni A, Fontanella B, Faraco V, Cennamo G y Sannia G. 1999. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Journal* 341: 655-663.
3. Tellez-Tellez M, Sanchez C, Loera O, Diaz-Godinez G. 2005. Differential patterns of constitutive intracellular laccases of the vegetative phase of *Pleurotus* species. *Biotechnology Letters*. 27(18):1391-4.