

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LA LACASA EN HIFAS JÓVENES Y MADURAS EN DOS CEPAS DEL HONGO COMESTIBLE DE LA ESPECIE *Pleurotus*

Javier I. López-Cruz, Octavio Loera y Gustavo Viniegra-González
Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa
Av. San Rafael Atlixco 186 Col. Vicentina. 09340 México D.F.
Tel. 58044714, Fax 58044712, e-mail: jilc@xanum.uam.mx

Palabras Clave: *Hifas jóvenes y maduras, lacasas, Pleurotus.*

Introducción. Las lacasas son enzimas cuproproteicas (Bencendiol:oxígeno oxidoreductasa EC 1.103.2), se encuentran en plantas, microorganismos y en hongos ligninolíticos. Oxidan grupos hidroxifenólicos y substratos no fenólicos en presencia de mediadores redox apropiados (ABTS, Hidroxibenzotriazol y Siringaldazina) en presencia de oxígeno (2 y 4). Se han extraído a partir de cultivos microbianos en fase líquida y sólida impulsando estudios sobre la degradación de lignina de los sustratos donde crecen los hongos: pajas, rastrojos y bagazos. El hongo comestible *Pleurotus*, produce isoenzimas de lacasa de origen citoplasmático o extracelular, y con ello obtiene una mayor cantidad de nutrientes por la degradación de fuente de carbono para la síntesis de biomasa y formación de pigmentos (1).

En este trabajo se determinó la actividad de las lacasas citoplasmáticas, en los estadíos de crecimiento hifas jóvenes y maduras del micelio de dos especies *Pleurotus* crecidas en espuma de poliuretano. También se determinaron sus parámetros cinéticos y una caracterización parcial.

Metodología. Se inocularon cepas de *Pleurotus pulmonarius* (Pp127) y *Pleurotus ostreatus* (Po7), en cajas Petri con espuma de poliuretano (PUF), impregnados con 20 mL de medio líquido extracto de malta (33.6 g/L), inductor de lacasa CuSO_4 (5mM) y ácido tánico (1mM). Se diferenciaron las hifas jóvenes y las maduras durante un periodo de 21 días de crecimiento, con azul de toluidina (0.1%) en H_3BO_3 (3). La biomasa producida se cuantificó para la obtención de la velocidad específica de crecimiento (μ). La actividad lacasa se determinó con Siringaldazina (0.05mM) y ABTS (0.5mM) como sustratos. Se purificó parcialmente a las lacasas obtenidas por precipitación con acetona al 85%. Se determinaron los parámetros K_m y V_{max} , estabilidad al pH y temperatura, peso molecular, zimografía-PAGE y punto isoelectrico durante el periodo de crecimiento.

Resultados. La μ observada fue de 0.013 y 0.011 h^{-1} para las cepas Po7 y Pp127, relacionando una μ alta con una mayor cantidad de hifas maduras, que se obtuvieron para Po7 (Figura 1). No hubo efecto del inductor de lacasas sobre el crecimiento, y sí sobre la actividad lacasa en hifas jóvenes y maduras, con respecto al tiempo, siendo mayor en los extractos provenientes de hifas maduras. La K_m para Po7 y

Pp127 fue de 0.011 y 0.009 mM, respectivamente, usando siringaldazina 0.05 mM en metanol como sustrato.

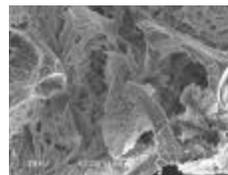


Fig 1. Microscopia electrónica de la Invasión micelial de la cepa Po7 sobre poliuretano

La V_{max} fue de 0.016 y 0.012 $\mu\text{mol}/\text{min}$ para las cepas Po7 y Pp127, respectivamente. Po7 tuvo una actividad lacasa mayor a pH 5 (0.1866 UI/mL), mientras que en la cepa Pp127 lo tuvo a pH 5.5 (0.2264 UI/mL). Po7 produce 3 tipos de enzimas, mientras que Pp127 solo una con respecto al tiempo y que fueron comprobadas por zimografía, con bandas diferentes tanto para hifas maduras como jóvenes. Ambas cepas concentraron su actividad en un rango de pH entre 4 y 7 como puntos isoelectricos. Los resultados muestran que a una temperatura de 45°C se alcanza la máxima actividad con 0.042 y 0.11 UI/mL para las cepas Po7 y Pp127, además de una estabilidad de la actividad hasta de 12.5 horas. La zimografía permitió la identificación de bandas termolábiles y termorresistentes.

Conclusiones. Los resultados confirman que la producción de lacasas que oxidan fenoles, cambia durante el proceso de crecimiento y dependen de la especie utilizada. Además este tipo de estudios permite la identificación de isoenzimas con propiedades interesantes como la termoestabilidad.

Bibliografía

1. Muñoz C. and Guillen F. (1997). Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: Characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn^{2+} oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2166-2174
2. Leonowicz A. and Grzywnowicz K. (1981). Quantitative estimation of laccases forms in some white rot fungi using syringaldazine as a substrate. *Enzyme Microb. Technol.* 2: 337-341.
3. Sánchez C. and Moore D. (1999). Conventional histological stains selectively stain fruit body initials of basidiomycetes. *Mycol. Res.* 103 (3): 315-318.
4. Palmieri G. Giardina P., Bianco C., Fontanella B and Sannia G. (2000). Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 920-924.