

# 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 sustratos 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  $\text{CuSO}_4$  (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  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (3). La biomasa producida se cuantificó para la obtención de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ). 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 isoelectrónico durante el periodo de crecimiento.

**Resultados.** La  $\mu$  observada fue de 0.013 y 0.011  $\text{h}^{-1}$  para las cepas Po7 y Pp127, relacionando una  $\mu$  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.

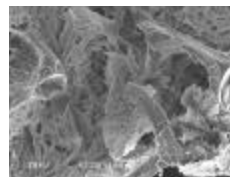


Fig 1. Microscopía electrónica de la invasión micelial de la cepa Po7 sobre poliuretano

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 isoelectrónicos. 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  $\text{Mn}^{2+}$  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.