

Caracterización de la lacasa obtenida por dos métodos de producción con *Pleurotus ostreatus*

Characterising laccase obtained by two production methods using *Pleurotus ostreatus*

*Nubia Esperanza Ramírez**, *María Carolina Vargas***, *Juan Carlos Ariza****,
*César Martínez ****

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue caracterizar y evaluar diferentes métodos de purificación y separación cromatográfica de un caldo rico en enzima lacasa, producida por una variedad del basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Se llevaron a cabo dos procesos de producción, a saber: a) FES (Fermentación en Estado Sólido); b) fermentación en sumergido. El proceso de FES se basó en la producción de un extracto de caldo crudo rico en enzima lacasa a partir del crecimiento micelial sobre salvado con vinaza en relación 1:1 w/v durante 20 días. Se obtuvo un caldo crudo con una actividad promedio de 20 U/ml. En el caso del proceso de fermentación en sumergido, se trabajó con el medio reportado por Hublick y Schinner (2000) con algunas modificaciones, y se obtuvo un crecimiento del hongo en forma de *pellets*, en un período de 15 días, con actividad promedio de 10 U/ml en el caldo crudo. Las isoenzimas aisladas en los procesos chromatográficos se caracterizaron de acuerdo a sus propiedades moleculares y cinéticas, se determinó su peso molecular por electroforesis de placa vertical (SDS-PAGE) y sus parámetros cinéticos, por ejemplo estabilidad, en un rango de temperatura y pH.

Palabras clave: lacasa, *Pleurotus ostreatus*, fermentación en estado sólido (FES), fermentación en sumergido, isoenzimas

ABSTRACT

This project was designed for characterising and evaluating different methods of chromatographic separation and purification regarding a laccase enzyme-rich broth produced by *Pleurotus ostreatus*, a variety of basidiomycetes. SSF (Solid State Fermentation) and Submerged Fermentation production processes were employed. The SSF process was based on producing a raw broth rich in laccase enzyme from mycelium grown on bran with 1:1 vinasse w/v for 20 days. A raw broth was obtained having an average 20 U/ml activity. The medium reported by Hublick and Schinner (2000) was used, with a few modifications, for the Submerged Fermentation process; the growth of pellet-shaped fungus was obtained within 15 days, having an average 10 U/ml activity in the raw broth. The isoenzymes isolated in the chromatographic processes were characterised according to their molecular and kinetic properties; their molecular weight was determined by SDS-PAGE vertical electrophoresis and their kinetic parameters (such as stability) expressed in a range of temperatures and pH.

Key words: laccase, *Pleurotus ostreatus*, Solid State Fermentation (SSF), Submerged Fermentation, isoenzymes

* M. Se. Instituto Colombiano del Petróleo, Ecopetrol. A.A 4185 Bucaramanga, e-mail: nramirez@ecopetrol.com.co

** M. Se. Instituto Colombiano del Petróleo, Ecopetrol. A.A 4185 Bucaramanga, e-mail: mcvargas@ecopetrol.com.co

*** Químicos Universidad Industrial de Santander.

Recibido: Mayo 7 de 2003. **Aceptado:** Agosto 5 de 2003.

INTRODUCCIÓN

La enzima lacasa se encuentra ampliamente distribuida en plantas y hongos degradadores de la lignina, lo que permite suponer que la lacasa cumple un papel importante en la madera y en la delignificación de la pulpa. Bajas concentraciones de varias lacasas se producen en la madera y en cultivos de hongos sumergidos, mientras que altas concentraciones son inducidas por la adición de compuestos aromáticos como la xilidina y el ácido ferúlico (Bourbonais and Paice, 1992). Gianfreda *et al.* (1999) reportan las lacasas (*p*-difenol:oxígeno oxidoreductasas) como glicoproteínas extracelulares que contienen cobre y un peso molecular en el rango de 60.000 y 80.000. Tienen la capacidad de reducir el oxígeno molecular a dos moléculas de agua y simultáneamente, trabajan en la oxidación de un electrón de muchos sustratos aromáticos (Thurston, 1994). El rango de sustratos oxidables es amplio, e incluye polifenoles, monofenoles metoxi sustituidos, aminas aromáticas y otros compuestos aromáticos fácilmente oxidables.

Generalmente las lacasas son más estables en pH alcalinos que en pH ácidos, lo cual se debe probablemente a la inhibición del grupo hidróxido sobre el proceso de auto-oxidación. Las lacasas también se pueden inactivar por la pérdida de los átomos de cobre o por condiciones de proteólisis o desnaturalización, entre otras. En condiciones idénticas, las lacasas termófilas generalmente son más termoestables que las lacasas mesófilas (Gianfreda *et al.*, 1999).

Las lacasas conservan su actividad en un rango de pH de 3 a 10 y en un rango de temperatura de 5 a 55 °C. La formación de las lacasas amarillas-marrones es el resultado del enlace de moléculas derivadas de la lignina a la proteína de la enzima. Esto sucede en cultivos de fermentación en estado sólido, y no presentan el espectro típico de las oxidases.

Las cinéticas de fermentación en estado sólido (FES) con *P. ostreatus* se han investigado básicamente para la caracterización en procesos de delignificación, producción de fertilizantes orgánicos y mejoramiento de concentrados de animales al incrementar la hidrólisis de polisacáridos. Hador *et al.* (1992) reportan estudios realizados sobre diferentes tipos de sustratos, entre ellos la paja con *P. ostreatus*, en donde se definió el ataque fúngico

sobre la lignina y los polisacáridos, y un incremento en la digestibilidad del sustrato y contenido de proteínas. Con la digestibilidad del sustrato se produce pérdida de peso y se relaciona con la lignina soluble, pero esta digestibilidad no aumenta después de los 30 a 40 días de tratamiento.

En 1997 Muñoz *et al.* caracterizaron las isoenzimas I y II de lacasa a partir de *P. eryngii*, y reportaron que éstas eran glicoproteínas monoméricas con 7 y 1% de carbohidratos y peso molecular de 65 y 61 KDa. La tasa de oxidación más alta del ABTS (Ácido 2,2'-azinobis(3-etylbenzotiazolin -6-sulfónico) con la lacasa I se obtuvo a 65 °C y pH 4. En el caso de la lacasa II ocurrió a 55 °C y pH 3. En este mismo estudio se reportó que las dos isoenzimas fueron estables a pH alto (8-12), manteniendo una actividad del 60 al 70% después de 24 horas. Ensayos con anticuerpos contra lacasa I reaccionaron con lacasa II, junto con lacasas de *P. ostreatus* y *P. pulmonaris*.

El presente trabajo se centra en la purificación de caldos crudos obtenidos a partir de la fermentación en estado sólido y fermentación en estado líquido con el hongo *P. ostreatus*. Se realizó además el estudio cinético de cada una de las isoenzimas obtenidas de cada proceso fermentativo.

METODOLOGÍA

Crecimiento del micelio y obtención del caldo crudo de enzima. El micelio de *Pleurotus ostreatus* (cepa de Chiapas, México) se mantuvo en placas de Agar Malta (Merck) a 4 °C. El crecimiento del hongo, en el caso de FES, se llevó a cabo en caldo Malta (250 ml en erlenmeyers de 1 L) e incubó a 20 °C a 120 rpm durante 8 días. Al cabo de este tiempo, el pellet producido fue el inoculo para el sustrato sólido, constituido por salvado, previamente humectado con vinaza estéril en relación 1:1. La inoculación mantuvo una relación de 1:10 w/v, y una vez homogeneizado se incubó de 20 a 25 días a 20 °C de forma estática. El extracto de caldo rico en enzima se recuperó agregando solución buffer fosfato pH 6 en relación 1:1 w/v, después se homogeneizó, tamizó y centrifugó a 8.000 rpm durante 20 min.

En el caso de la fermentación en sumergido, el cultivo se llevó a cabo en Medio de Hublick *et al.* (2000) modificado, e identificado como Lac-12, constituido por 30 g de glucosa; 15 g de triptona; 7.5 g Ext. de levadura, 30 mg de CuSO₄.5H₂O, y pH 5.6

con HCl 1M. Una vez homogeneizado, el micelio creció a 20 °C a 120 rpm durante 20 días. El caldo se recuperó después de centrifugado a 4500 rpm durante 15 min en centrífuga tipo IEC Centro MP4R, y se filtró por membrana de 0.45 µm y 0.2 µm. Luego se diafiltró en una membrana Pellicon (10 kDa) empleando el buffer acetato de sodio 50 mM pH 5.0, seguido de una concentración en una membrana Amicon PM 10 hasta obtener un volumen final de 10 ml.

Purificación de la enzima obtenida por fermentación en estado sólido (FES). El proceso de purificación empleado consta de una partición acuosa en dos fases utilizando polietilenglicol (PEG) al 15% y sulfato de amonio 10%. Una vez disueltos el polímero y la sal, se dejó incubar la solución a 4 °C durante 12 horas, al cabo de las cuales se centrifugó la solución a 8.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C para fraccionarla por completo.

Este extracto se diafiltró en una membrana Pellicon 10 kDa y se concentró en una membrana Amicon PM-10. El extracto se cargó sobre el gel Source 15Q (45 x 1.5 cm) equilibrado con buffer acetato de sodio 50 mM pH 5.0. La columna se lavó con 400 ml de buffer, con un flujo de 0.5 ml/min., y la enzima se eluyó del soporte aplicando un gradiente lineal de 0-0.5 M de NaCl en buffer acetato de sodio 50 mM pH 5.0 (500 ml). Las fracciones que contenían actividad fenol oxidasa se colectaron y concentraron en una membrana Amicon PM-10; posteriormente se pasaron por el gel Sefacril S-100 (73 x 2.5 cm) equilibrado con buffer acetato de sodio 50 mM pH 5.0. La muestra se eluyó isocráticamente aplicando el buffer de equilibrio a un flujo de 2 ml/min.

Purificación de la enzima obtenida por fermentación en estado sumergido. El extracto se diafiltró por membrana Pellicon 10 KDa con buffer acetato de sodio 50 mM pH 5 y concentró por Amicon PM10 para ser aplicada a una columna Source 15 Q (1.5 x 39 cm) equilibrada en el mismo buffer. La columna se lavó con 400 ml del buffer de equilibrio a un flujo de 0.5 ml/min y se aplicó un gradiente lineal de 0-0.5 M NaCl (500 ml). Las fracciones que contenían actividad fenoloxidasa se colectaron y concentraron en una membrana Amicon PM 10. Las isoenzimas aisladas se cargaron sobre el soporte de exclusión molecular, Sefacril S-100, equilibrada con buffer acetato de sodio 50 mM pH 5.0.

Ensayos enzimáticos y cinéticos. La actividad fenoloxidasa se realizó a 25 °C empleando ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)(ABTS 0.5mM) como sustrato, en buffer acetato de sodio 125 mM pH 4.5. La oxidación del ABTS se siguió por el incremento en la absorbancia a 420 nm ($\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La actividad enzimática se expresó como unidades internacionales en función del volumen (U/ml) (Bourbonnais *et al.*, 1995; Palmieri *et al.*, 1997).

La actividad fenoloxidasa en función del pH se midió empleando diferentes soluciones buffer ajustando su nivel de pH en un rango de 1-5.5. El efecto de la temperatura en la actividad enzimática y la estabilidad se midió respecto al pH óptimo de cada isoenzima, una vez predeterminado, en un rango de temperatura de 20-70 °C.

Determinación de la proteína. La concentración de proteína se determinó empleando el Bio-Rad Protein Assay con albúmina bovina como estándar.

Determinación de sales. Para el desalado de los extractos enzimáticos se empleó la cromatografía de permeación en gel y se midió la conductividad de las fracciones obtenidas con un equipo multiparámetro Modelo 1230 portátil que consta de un electrodo con una celda de conductividad Thermo Orion.

Electroforesis de Proteínas. Se aplicó Placa de electroforesis con gel de poliacrilamida (12%) en SDS 0.1% como describe Laemmli (1970). Para la determinación de peso molecular, el gel fue calibrado con MBP-β-galactosidas (175 kDa), MBP-paramiosina (83 kDa), glutámico dehidrogenas (62 kDa), aldolasa (47.5 kDa), triosafosfato isomerasa (32.5 kDa), (β-Lactoglobulina A (25), lisozima (16.5) y aprotinina (6.5 kDa). Las proteínas se visualizaron utilizando azul brillante de Coomasie.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción de lacasa

El micelio de *P. ostreatus* cultivado en el sistema de fermentación en estado sólido indicó una primera fase de colonización estimada en 12 días, a partir de la cual se observó un incremento en el contenido de proteínas y actividad lacasa, alcanzando un promedio de 20 U/ml (método de ABTS a 436 nm) a los 22 días, como se ilustra en la figura 1.

Estudios preliminares mostraron que la vinaza es el mejor inductor para la producción de enzima en comparación con otros residuos industriales evaluados, como licor cervecero, levadura hidrolizada y melaza (Vargas y

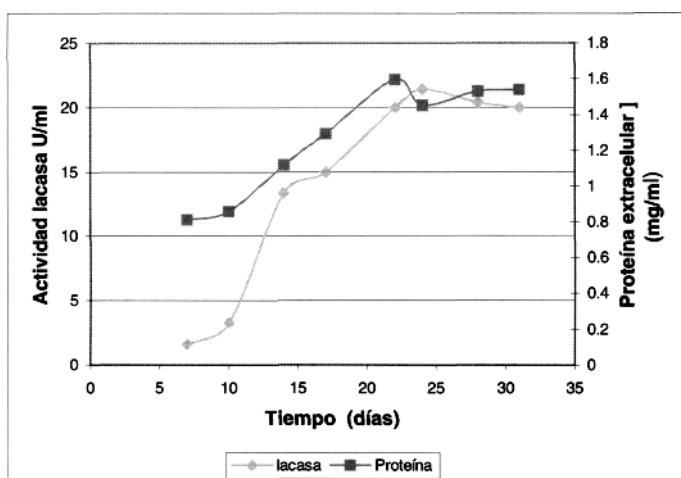


Figura 1. Cinética de producción de enzima lacasa en FES y monitoreo de proteína.

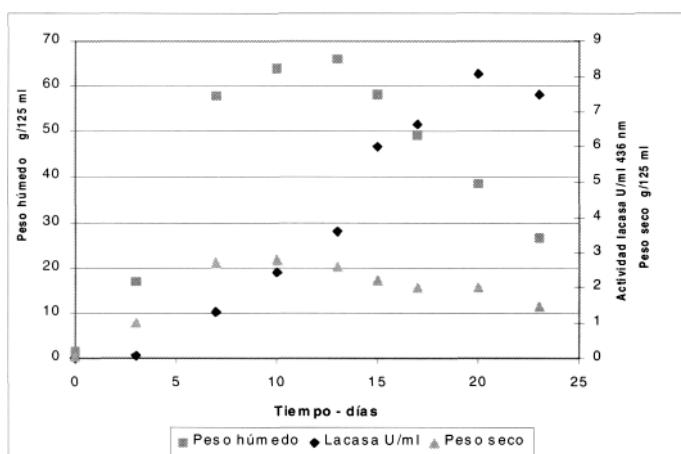
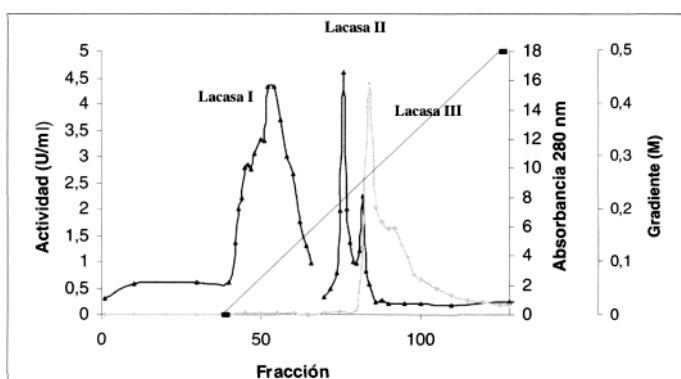


Figura 2. Cinética de producción de enzima lacasa en fermentación sumergida.



Ramírez, 2002). Esta respuesta se atribuye a la composición de metales y nutrientes de la vinaza, los de mayor relevancia son la lignina (0.14%), por ser activador para su degradación; Mn (76.16 ppm) se reporta como micronutriente del medio e induce la biodegradación de la lignina (Kerem y Hadar, 1995); el Cu (6.57 ppm) como inductor basal por ser el elemento constitutivo de la molécula de la lacasa (Collins, 1997).

El crecimiento y la producción de la enzima lacasa en estado sumergido con el medio Lac 12 indicó que la máxima velocidad de producción de la enzima está entre 10 y 15 días, con una actividad promedio máxima de 10U/ml (436 nm) y un peso seco máximo de biomasa de 2.8 g/125 ml (figura 2). El comportamiento de la cinética de producción de la lacasa, contra el peso de biomasa seca, indica un incremento sustancial en la concentración de la enzima en el punto estacionario del crecimiento micelial, y aumento en el colapso de los pellets en su estado húmedo, infiriéndose el metabolismo secundario, en el que ocurre la producción extracelular de la enzima. Por otra parte, con base en ensayos preliminares, se confirmó la acción del Cu como inductor en el medio, puesto que sin este elemento se observó el cultivo con suficiente biomasa, pero sin actividad lacasa (datos no mostrados).

Purificación extracto de FES

Siguiendo los pasos de purificación (tabla 1), la carga de enzima sobre el soporte Source 15Q indicó una elución definida de las isoenzimas, como se observa en la figura 3. Las fracciones correspondientes a las isoenzimas positivas para actividad fenoloxidasa fueron colectadas por separado. Las fracciones correspondientes al pico menor (lacasa I) eluyeron con el buffer

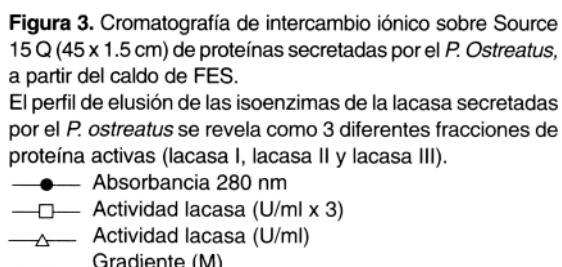


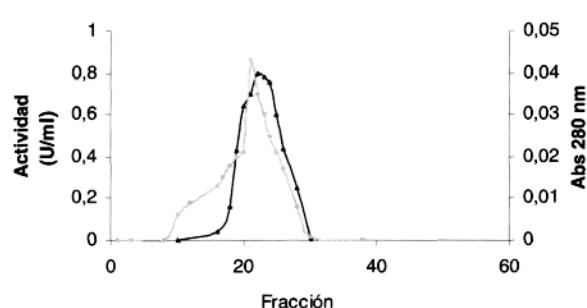
Figura 3. Cromatografía de intercambio iónico sobre Source 15Q (45 x 1.5 cm) de proteínas secretadas por el *P. Ostreatus*, a partir del caldo de FES.

El perfil de elución de las isoenzimas de la lacasa secretadas por el *P. ostreatus* se revela como 3 diferentes fracciones de proteína activas (lacasa I, lacasa II y lacasa III).

- Absorbancia 280 nm
- Actividad lacasa (U/ml x 3)
- △ Actividad lacasa (U/ml)
- Gradiente (M)

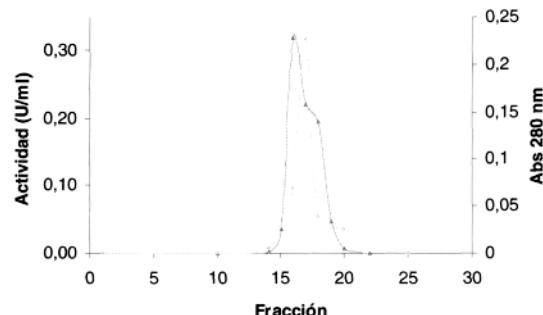
Tabla 1. Purificación de lacasa del medio de cultivo del *P. Ostreatus*.

Etapa	Vol (ml)	Actividad (U/ml)	Activ. (U)	Prot. Total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Purificación
PEG-Sal	254	2.1	533.4	45.72	11.7	100	1
Diafiltración	12.4	16.85	208.9	21.5	9.7	39.2	0.8
Source 15 Q							
Lacasa I	34	0.8	27.2	1.22	22.2	5.1	1.9
Lacasa II	13	2.44	31.72	1.0	31.7	5.9	2.7
Lacasa III	11	1.52	16.72	1.54	10.9	3.1	0.93
Sefacril S-100							
Lacasa I	60	0.45	26.7	0.66	17.6	5.0	1.51
Lacasa II	38.5	0.93	35.7	0.5	17.9	6.7	1.53
Lacasa III	49	0.47	23.2	1.568	36.3	4.3	3.11

**Figura 4.** Cromatografía de permeación en gel sobre Sefacril S-100 (73 x 2.5 cm) de lacasa I aislada del *P. ostreatus*.

El perfil de elución de la lacasa I aislada del medio de cultivo del *P. ostreatus* se revela como un pico simple.

—●— Absorbancia 280 nm
—△— Actividad lacasa (U/ml)

**Figura 5.** Cromatografía de permeación en gel sobre Sefacril S-100 (73 x 2.5 cm) de lacasa II aislada del *P. ostreatus*.

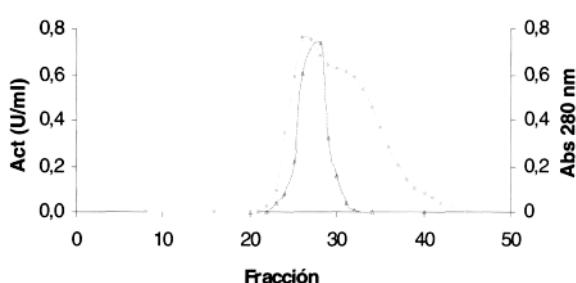
El perfil de elución de la lacasa II aislada del medio de cultivo del *P. ostreatus* se revela como un pico simple.

—●— Absorbancia 280 nm
—△— Actividad lacasa (U/ml)

de lavado; los picos correspondientes a la lacasa II y III eluyeron entre 0.2 a 0.25 M NaCl. Se eliminó la sal remanente de la cromatografía de intercambio iónico en el proceso de desorción, cargando cada una de éstas sobre el gel Sefacril S-100, cuyos resultados se ven en las figuras 4, 5 y 6.

La lacasa I eluye en un pico simple, cuyo perfil cromatográfico muestra que se elimina parte de material contaminante el cual absorbe a 280 nm y tiene baja actividad fenoloxidasa.

Las lacasas II y III eluyen igual que la lacasa I, como un pico simple en donde se elimina parte de material contaminado.

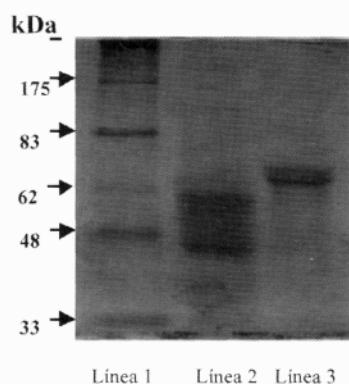
**Figura 6.** Cromatografía de permeación en gel sobre Sefacril S-100 (73 x 2.5 cm) de lacasa III aislada del *P. ostreatus*.

El perfil de elución de la lacasa III aislada del medio de cultivo del *P. ostreatus* se revela como un pico simple.

—●— Absorbancia 280 nm
—△— Actividad lacasa (U/ml)

Determinación de peso molecular de las isoenzimas extracto de FES

La fotografía 1 muestra que la lacasa I tiene un peso molecular aproximado de 52 kDa, y que la lacasa II no se encuentra completamente pura, debido a que se observa la presencia de otra proteína en el perfil electroforético de aproximadamente 46 y 30 kDa, pero teniendo en cuenta que los reportes bibliográficos indican que el peso molecular de las lacasas oscila entre 40 a 60 kDa, se podría descartar la banda de menor peso, aunque se debe incrementar al nivel de纯ificación de esta enzima para comprobar esta hipótesis.



Fotografía 1. Determinación del peso molecular de las isoenzimas de lacasa purificadas obtenidas por FES empleando la técnica SDS-PAGE. Línea 1: marcador de peso molecular; línea 2: lacasa II y línea 3: lacasa I.

Determinación del pH y temperatura óptima de las isoenzimas obtenidas a partir de FES

El efecto del pH en la velocidad de oxidación del ABTS (0.5 mM) por las isoenzimas de la lacasa fue estudiado con diversas soluciones buffer de concentración 100 mM (rango de pH 1.0-5.5). Las mayores velocidades fueron obtenidas a pH 3.0 (lacasa III) y pH 3.5 (lacasa II). La lacasa I muestra un pH óptimo que va de 2.5 a 3.5; la temperatura muestra que el valor óptimo se encuentra entre 40 y 45 °C. El perfil de pH y temperatura de las isoenzimas se muestra en las figuras 7 y 8.

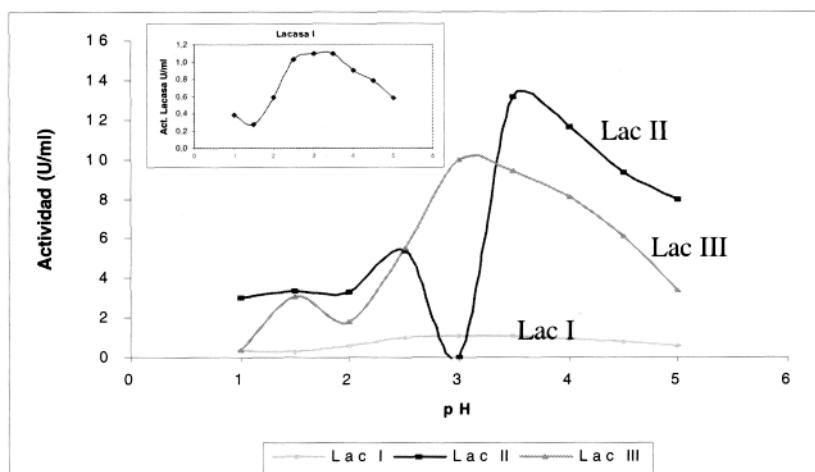


Figura 7. Perfil de pH de la lacasa I, II y III aislada del *P. ostreatus* obtenida mediante FES. El perfil se realizó a 25 °C.

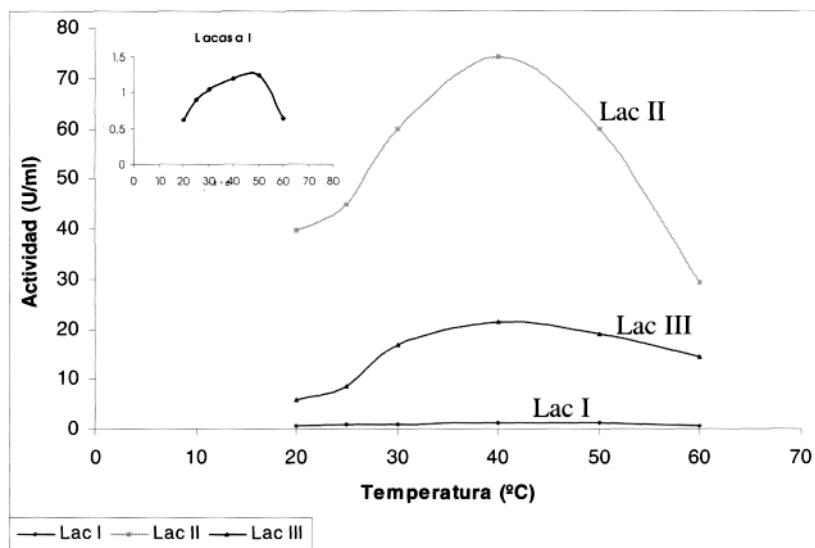


Figura 8. Perfil de temperatura óptima de las lacasas I, II, y III aisladas de *P. ostreatus* obtenidas de FES.

Purificación del extracto a partir de cultivo en sumergido

El procedimiento de purificación del caldo crudo se resume en la tabla 2.

Se pudo observar que ocurrió una pérdida de la proteína propia de las diversas etapas de purificación. El perfil de elución de las isoenzimas se observa en la figura 9, las cuales fueron llamadas lacasa I y lacasa II. El pico de mayor amplitud (lacasa II) de actividad fenoloxidasa eluyó a 0.3 M de NaCl; la frac-

Tabla 2. Purificación de lacasa del medio de cultivo de *P. ostreatus* obtenido de la fermentación sumergida.

Etapa	Vol (ml)	Actividad (U/ml)	Activ. (U)	Prot. Total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Purificación
Cultivo	273	17.3	4709.3	85.9	54.8	100	1
Diafiltración/ Concent.	60	13.3	795	21.3	37.3	17	0.7
[Amicon] 10 kDa	8.8	61.9	544.6	14.9	36.6	12	0.7
Source 15Q							
Lacasa I	18	1.9	33.4	2.5	13.4	1	0.2
Lacasa II	22	6.5	143.2	7.3	19.6	3	0.4
Sefacril S-100							
Lacasa I	20	1.0	20.3	1.0	20.8	0.4	0.4
Lacasa II	38	2.5	95.3	2.0	48.1	2	0.9

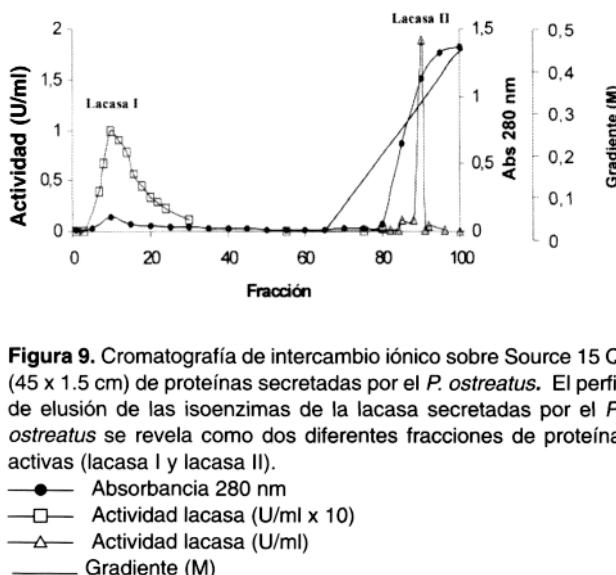


Figura 9. Cromatografía de intercambio iónico sobre Source 15 Q (45 x 1.5 cm) de proteínas secretadas por el *P. ostreatus*. El perfil de elusión de las isoenzimas de la lacasa secretadas por el *P. ostreatus* se revela como dos diferentes fracciones de proteína activas (lacasa I y lacasa II).

● Absorbancia 280 nm
 □ Actividad lacasa (U/ml x 10)
 △ Actividad lacasa (U/ml)
 — Gradiente (M)

ción correspondiente al pico de menor amplitud (lacasa I) eluyó con el buffer de lavado.

Las fracciones fueron colectadas y purificadas por cromatografía de permeación en gel (Sefacril S-100) en buffer acetato de sodio 50 mM pH 5.0 Las enzimas eluyeron como picos simples (figuras 10 y 11).

Se eliminó la sal remanente de la elusión de la lacasa I del gel de intercambio iónico y, a la vez, se eliminó material contaminante que no presentaba actividad fenoloxidasa, como lo muestra el perfil de elusión en las figuras 10 y 11.

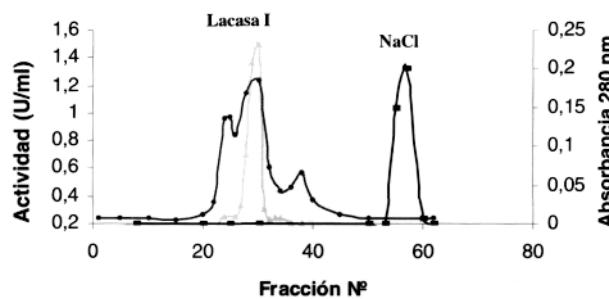


Figura 10. Cromatografía de permeación en gel sobre Sefacril S-100 (73 x 2.5 cm) de lacasa I aislada del *P. ostreatus*. El perfil de elusión de la lacasa I aislada del medio de cultivo del *P. ostreatus* se revela como un pico simple.

● Absorbancia 280 nm
 □ Actividad lacasa (U/ml)
 — Conductividad (mS)

La mayor actividad para la lacasa I se alcanzó a pH 2.5 y para la lacasa II a pH 1.5. Las temperaturas para la lacasa I y II fueron de 50 °C y 40 °C respectivamente.

La evaluación cinética comparativa de las Isoenzimas de la lacasa obtenidas por los dos procesos de fermentación se presentan en la Tabla 4.

Como se puede observar en la tabla 4, las isoenzimas obtenidas por fermentación en estado sumergido fueron más activas en la oxidación del ABTS que las isoenzimas aisladas del medio de

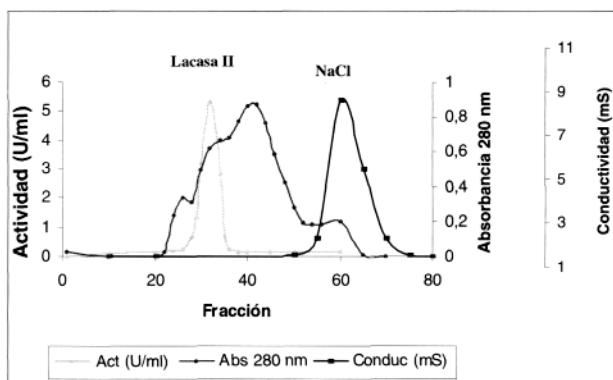


Figura 11. Cromatografía de permeación en gel sobre Sefacril S-100 (73 x 2.5 cm) de lacasa II aislada del *P. ostreatus*. El perfil de elusión de la lacasa I aislada del medio de cultivo del *P. ostreatus* se reveló como un pico simple.

—●— Absorbancia 280 nm
—△— Actividad lacasa (U/ml)
——— Conductividad (mS)

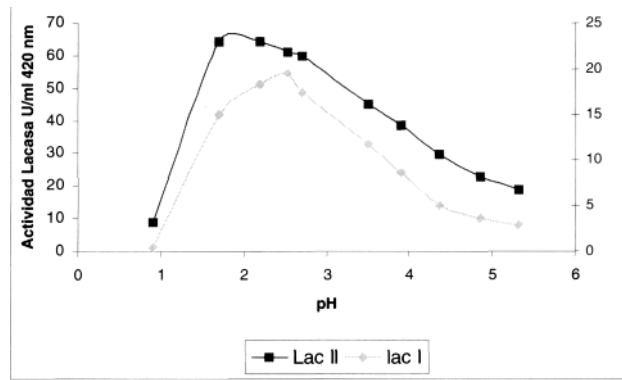


Figura 12. Determinación de pH y temperatura óptima de las isoenzimas obtenidas a partir del cultivo en sumergido.

Tabla 4. Cuadro comparativo de las constantes cinéticas de las isoenzimas de lacasa del *P. ostreatus* obtenidas por fermentación en estado sumergido y sólido.

Enzima	FES			Sumergido		
	Km (mM)	V.máx (U/ml)	V.máx./Km	Km (mM)	V.máx. (U/ml)	V.máx./Km
Lacasa I	0.17	0.015	0.088	0.77	24.51	31.8
Lacasa II	0.56	1.6	2.85	0.28	94.34	336.9
Lacasa III	1.32	0.42	0.32			

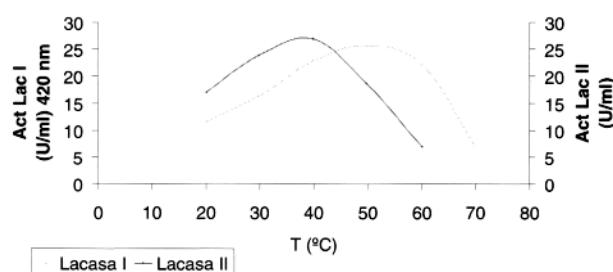


Figura 13. Actividad relativa de lacasas purificadas en función de la Temperatura

producción en estado sólido. También se observa que la eficiencia catalítica de las isoenzimas de lacasa producidas en estado sumergido son mucho mayor que la de las isoenzimas producidas en estado sólido, lo cual demuestra la alta especificidad para este sustrato.

CONCLUSIONES

A partir del extracto de FES se aislaron tres isoenzimas, las cuales presentaron un valor bajo de purificación por la complejidad misma del sustrato de producción, en el que evidenció pérdida de proteína durante los diversos procesos de purificación. Finalmente se obtuvo un aumento de 1.5 veces la actividad específica para las isoenzimas I y II, y de 3.1 veces para la isoenzima III luego de la cromato-grafía de permeación en gel.

A partir del extracto en sumergido se obtuvieron dos isoenzimas, con pérdida parcial de proteína propia de las etapas de purificación, dado que el balance de masa en términos de actividad específica presenta proporcionalidad entre las isoenzimas obtenidas al final del proceso y el extracto crudo inicial.

El pH óptimo de reacción indicó que las isoenzimas de sumergido se mantienen en valores más ácidos, 2.5 y 2.0 para las lacasas I y II, mientras que las de FES presentaron 2.5 - 3 y 3.5, respectivamente.

La temperatura óptima de reacción presentó los mismos valores para las isoenzimas I y II, aisladas tanto de FES como de sumergido: 50 °C y 40 °C, respectivamente.

En las constantes cinéticas, las isoenzimas obtenidas por estado sumergido fueron más activas en la oxidación del ABTS que las izoenzimas de FES. La eficiencia catalítica de las isoenzimas de sumergido es mayor que la de las de FES, lo cual demuestra la especificidad para el sustrato.

BIBLIOGRAFÍA

- Bourbonnais, R.; Paice, M. G. 1992. Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36: 823-7.
- Bourbonnais, R.; Paice, M. G.; Reid, I. D.; Lanthier, R.; Yaguchi. 1995. Lignin Oxidation by Laccase Isozymes from *Trametes versicolor* and Role of the Mediator 2,2'-Azinobis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate) in Kraft Lignin Depolymerization. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:1876-80.
- Collins, Patrick J.; Dobson, Alan D. W. 1997. Regulation of Laccase Gene Transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microb.* 63(9): 3444-3450.
- Gianfreda, Liliana; Xu, Feng; Bollag, Jean- Marc. 1999. Laccases. A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes. *Bioremediation Journal*, 3(1): 1-25.
- Hador, Y; Kerem, Z.; Gododecki, B.; Ardon, O. 1992. Utilization of Lignocellulosic Waste by the edible mushroom *Pleurotus* spp. *Biodegradation*, 3: 189-205.
- Hublick G; Schinner F. 2000. Characterization and inmobilization of the Laccase from *P. ostreatus* and its use for the continues elimination of phenolic pollutants. *Enzime and Microbial Technology*, 27: 330-3363.
- Johannes, C.; Majcherczyk, A. 2000. Laccase activity test and laccase inhibitors. *Biotechnology and Bioengineering*, 78: 193-199.
- Kerem, Zohar; Yitzhak, Hadar. 1993. Chemically defined solid-state fermentation of *Pleurotus ostreatus*. *Enzyme Microb. Technol*, 15: 785-790.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 277: 680-5.
- Muñoz, C.; Guillén, R; Martínez, A.T.; Martínez, M.J. 1997. Laccase Isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: Characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn⁺² oxidation. *Applied Environmental Microbiology*, 63(6): 2166-2174.
- Palmieri, G.; Giardina, P; Bianco, C.; Scaloni, A.; Capasso, A.; Sannia, G. 1997. Novel White laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (50): 31301-31307.
- Thurston, C. F. 1994. The structure and funtion of fungal laccases. *Microbiology*, 140: 19-226.
- Vargas, M. C; Ramírez, N.E. 2002. Phenol oxidation of petrol Refinery Wastewater catalyzed by Laccase. *CT&F- Ciencia Tecnología y Futuro*, 2(3): 23-30.