



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO DE LOS EFECTOS HIDRODINÁMICOS Y DE OXÍGENO DISUELTO SOBRE EL
CRECIMIENTO, LA MORFOLOGÍA Y LA PRODUCCIÓN DE LACASAS POR *Pleurotus ostreatus*
CP50 EN CULTIVO SUMERGIDO AGITADO MECÁNICAMENTE

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
IBQ. Karen Ibeth Fernández Alejandre

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Leobardo Serrano Carreón
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Clarita Olvera Carranza
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

CUERNAVACA, MOR. JUNIO, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Leobardo Serrano Carreón en el grupo del Dr. Enrique Galindo Fentanes. Durante la realización del mismo se contó con el apoyo económico del proyecto DGAPA IN201813 y de la beca de maestría de CONACyT (355536).

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Generalidades sobre las lacasas	5
2.1.1 Lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i>	7
2.1.1.1 Regulación de la expresión de los genes codificantes de las lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i>	8
2.2 Cultivo de hongos superiores	9
2.3 Morfología de los hongos filamentosos en cultivo sumergido	10
2.3.1 Efectos difusionales ligados a la morfología de <i>pellet</i>	11
2.3.2 Efecto de la morfología en la producción de proteínas	12
2.4 Efecto de la agitación en cultivos de hongos filamentosos	13
2.4.1 Efecto de la agitación sobre el crecimiento, la morfología y la productividad de hongos filamentosos	13
2.4.2 Problemática del efecto de la agitación: estrés hidrodinámico vs. transferencia de oxígeno	15
2.5 Efecto de los parámetros de cultivo sobre la producción de lacasas	17
2.6 Escalamiento de procesos de cultivo sumergido	18
2.7 Estrés oxidativo en fermentaciones con hongos filamentosos	20
2.7.1 Vías respiratorias alternas en respuesta a estrés oxidativo	20
2.7.2 Papel de las lacasas en el mecanismo de defensa de enzimas antioxidantes	21
2.8 Antecedentes en el grupo de investigación	22
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVOS	24
4.1 Objetivo general	24
4.2 Objetivos específicos	24

5. MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1 Materiales	25
5.1.1 Microorganismo	25
5.1.2 Cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i>	25
5.1.2.1 Precultivo	25
5.1.2.2 Medio de cultivo y condiciones de la fermentación	25
5.2 Fermentaciones	26
5.2.1 Características del biorreactor	26
5.2.2 Estimación de la EDCF	27
5.3 Métodos analíticos	28
5.3.1 Cuantificación de biomasa	28
5.3.2 Determinación de actividad lacasa	28
5.3.3 Determinación de actividad proteasa	29
5.3.4 Determinación del consumo de sustrato	29
5.3.5 Cálculo de la constante k_p asociada al crecimiento	29
5.3.6 Cálculo del coeficiente de producción de lacasas asociada al crecimiento	30
5.3.7 Electroforesis nativa	31
5.3.8 Caracterización morfológica de los <i>pellets</i>	32
5.3.8.1 Determinación del diámetro promedio	32
5.3.8.2 Determinación del diámetro crítico	32
5.3.8.3 Determinación de la densidad de los <i>pellets</i>	34
5.3.8.4 Cálculo del porcentaje de biomasa libre de limitación difusional de oxígeno	34
5.3.8.5 Determinación de la actividad metabólica de los <i>pellets</i>	35
5.3.9 Extracción de ARN total y síntesis de ADNc	35
5.3.10 Cuantificación de la expresión génica en tiempo real por qPCR	36
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	38
6.1 Diseño factorial 3^2 para el estudio del efecto de la EDCF y TOD sobre el crecimiento, la morfología y la producción de lacasas por <i>Pleurotus ostreatus</i> CP50	38
6.2 Estudio de la influencia de la EDCF y TOD sobre la transcripción génica y la producción de lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> CP50	40
7. RESULTADOS	41
7.1 Comportamiento de los parámetros de control	41
7.1.1 Comportamiento de la TOD	41

7.1.2 Comportamiento de la EDCF	41
7.2 Ajuste de los modelos a los datos experimentales y generalidades de las cinéticas	42
7.3 Análisis de varianza del diseño experimental 3 ²	44
7.3.1 Efectos de la EDCF y TOD sobre la constante k_p asociada al crecimiento en el diseño experimental 3 ²	45
7.3.2 Efectos de la EDCF y TOD sobre el coeficiente de producción de lacasas asociada al crecimiento (α) en el diseño experimental 3 ²	46
7.3.3 Efectos de la EDCF y TOD sobre el diámetro promedio de los <i>pellets</i> (D_{prom}) en el diseño experimental 3 ²	48
7.3.4 Efectos de la EDCF y TOD sobre la concentración máxima de biomasa ($X_{m\acute{a}x}$) y l actividad lacasa máxima ($Lac_{m\acute{a}x}$), en el diseño experimental 3 ²	49
7.4 Diámetro crítico de los <i>pellets</i>	49
7.5 Determinación de la actividad metabólica de los <i>pellets</i>	51
7.6 Perfil enzimático de las lacasas	53
7.7 Estudio de la influencia de la EDCF y TOD sobre la transcripción de <i>poxc</i> y <i>pox3</i> a través del diseño factorial 2 ²	54
7.8 Determinación de la actividad proteolítica en el diseño experimental 2 ²	58
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	60
9. CONCLUSIONES	62
10. PERSPECTIVAS	63
11. REFERENCIAS	64
ANEXO 1. Cultivos de <i>P. ostreatus</i> CP50 desarrollados a energía de disipación y concentración de oxígeno constante	74
ANEXO 2. Cálculos del análisis transcripcional	84

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
2.1	Ciclo catalítico de las lacasas. 5
2.2	Distribución de los elementos putativos de acción <i>cis</i> en las regiones promotoras de los genes de lacasa de <i>P. ostreatus</i> . 8
2.3	Perfiles de oxígeno disuelto desarrollados durante las fermentaciones con <i>Pleurotus ostreatus</i> CP50 a diferentes condiciones de AFR y EDCF inicial. 23
5.1	Diagrama del biorreactor y turbina Rushton utilizados en las fermentaciones. 26
5.2	Esquema de evaluación del coeficiente α del modelo de Luedeking-Piret. 31
5.3	Gel de agarosa al 1% con muestras de ARN total de cada condición, en los dos tiempos de muestreo (24 y 48 h). 36
5.4	A. Eficiencia de la amplificación de los transcritos mediante ajuste de mínimos cuadrados. B. Curva de calibración del método ΔCq . 37
7.1	Perfiles característicos de la TOD en las fermentaciones del diseño experimental 3^2 . 41
7.2	Perfiles característicos del torque de las fermentaciones del diseño experimental 3^2 . 42
7.3	Perfil cinético del cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i> CP50 (11 kW/m ³ s y TOD 15%). 43
7.4	Datos experimentales promedio de la constante k_p asociada al crecimiento de <i>P. ostreatus</i> CP50 en función de la EDCF y TOD en el diseño experimental 3^2 . 45
7.5	Datos experimentales promedio del coeficiente de producción de lacasas asociada al crecimiento (α) de <i>P. ostreatus</i> CP50 en función de la EDCF y TOD en el diseño experimental 3^2 . 47
7.6	Datos experimentales promedio del diámetro de los <i>pellets</i> (D_{prom}) de <i>P. ostreatus</i> CP50 en función de la EDCF y TOD en el diseño experimental 3^2 . 48
7.7	Imágenes de <i>pellets</i> de distintos tamaños, teñidos con FDA y observados en un microscopio confocal invertido. A) <1000 μ m; B) <1500 μ m; C) >2000 μ m. 52
7.8	Zimograma obtenido por electroforesis nativa al hacer reaccionar a las lacasas con el sustrato DMP (2,6-dimetoxifenol) en un cultivo llevado a 11 kW/m ³ s y TOD 15%. 53

7.9	Expresión relativa de los genes <i>pox3</i> y <i>poxc</i> en las cuatro condiciones del diseño experimental 2 ² a las 24 y 48 h de cultivo de <i>P. ostreatus</i> CP50.	55
7.10	Promedio de los niveles de expresión de <i>poxc</i> a las 48 h de cultivo de <i>P. ostreatus</i> CP50 en función de la EDCF y TOD en el diseño experimental 2 ² .	56
7.11	Comparativa de la expresión relativa de los genes <i>pox3</i> y <i>poxc</i> a través del tiempo (24 y 48 h) de los cultivos del diseño experimental 2 ² .	57
7.12	Comparativa de la expresión relativa entre los genes <i>pox3</i> y <i>poxc</i> de los cultivos del diseño experimental 2 ² a 24 y 48 h.	58
7.13	Perfiles de la actividad proteolítica de los cultivos del diseño experimental 2 ² , utilizando azoalbúmina como sustrato.	58
<p>Evolución del torque, velocidad de agitación (N), tensión de oxígeno disuelto (TOD), producción de CO₂ salida de O₂, concentración de biomasa, actividad lacasa, concentración de glucosa y diámetro promedio de <i>pellet</i> en los cultivos del diseño experimental 3².</p>		
A1	1 kW/m ³ s y TOD 8%	75
A2	1 kW/m ³ s y TOD 15%	76
A3	1 kW/m ³ s y TOD 22%	77
A4	11 kW/m ³ s y TOD 8%	78
A5	11 kW/m ³ s y TOD 15%	79
A6	11 kW/m ³ s y TOD 22%	80
A7	21 kW/m ³ s y TOD 8%	81
A8	21 kW/m ³ s y TOD 15%	82
A9	21 kW/m ³ s y TOD 22%	83

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
5.1 Composición de los geles de poliacrilamida para la electroforesis nativa.	31
5.2 Eficiencias de amplificación de los genes β - <i>tub</i> , <i>poxc</i> y <i>pox3</i> .	37
6.1 Factores y niveles utilizados en el diseño experimental 3 ² .	38
6.2 Arreglo experimental factorial 3 ² para el estudio del efecto de la EDCF y la TOD sobre la constante k_p asociada al crecimiento, el coeficiente de producción de lacasas asociada al crecimiento (α), la concentración máxima de biomasa ($X_{m\acute{a}x}$), la actividad lacasa máxima ($Lac_{m\acute{a}x}$) y el diámetro promedio de los <i>pellets</i> (D_{prom}) de <i>P. ostreatus</i> CP50 en fermentador de 10L.	39
6.3 Arreglo experimental factorial 2 ² para el estudio del efecto de la EDCF y la TOD sobre el nivel de expresión de <i>poxc</i> y <i>pox3</i> de <i>P. ostreatus</i> CP50 en fermentador de 10L.	40
7.1 Valores de los parámetros de respuesta calculados a partir de datos experimentales de los diseños factoriales 3 ² y 2 ² .	44
7.2 Análisis de varianza de la constante k_p asociada al crecimiento de <i>P. ostreatus</i> CP50 del diseño experimental 3 ² .	45
7.3 Análisis de varianza del coeficiente de producción de lacasas asociada al crecimiento (α) de <i>P. ostreatus</i> CP50 del diseño experimental 3 ² .	46
7.4 Análisis de varianza del diámetro promedio de los <i>pellets</i> de <i>P. ostreatus</i> CP50 a las 24 h de cultivo del diseño experimental 3 ² .	48
7.5 Velocidad específica de consumo de oxígeno (qO_2) para diferentes microorganismos.	50
7.6 Diámetros críticos calculados para las distintas tensiones de oxígeno disuelto evaluadas.	50
7.7 Porcentaje de biomasa que teóricamente no tiene problemas difusionales de oxígeno a las 24 h de cultivo, para cada una de las condiciones del diseño experimental 3 ² .	51
7.8 Análisis de varianza del nivel de expresión de <i>poxc</i> a las 48 h de cultivo de <i>P. ostreatus</i> CP50 en el diseño experimental 2 ² .	55

RESUMEN

Las lacasas (*p*-difenol: oxígeno-óxido reductasas E.C. 1.10.3.2) son enzimas que llevan a cabo la oxidación de una gran variedad de sustratos por lo que se han convertido en biomoléculas de gran interés en el campo de la biotecnología teniendo aplicaciones muy variadas en áreas como la biorremediación de aguas y suelos y en la elaboración de bebidas. Gran parte de la producción de lacasas se ha centrado en el cultivo de hongos filamentosos, entre los que figuran los géneros *Trametes*, *Pleurotus*, *Lentinula*, *Pycnoporus*, *Botryosphaeria* y *Phanerochaete* (Baldrian, 2006).

La forma de producción de lacasas más utilizada es el cultivo líquido de hongos basidiomicetos en reactores con agitación mecánica (STR), con ventajas como los cortos tiempos de cultivo y la capacidad de escalamiento; sin embargo, poco se sabe sobre el papel que desempeña la agitación en la producción de las lacasas ya que, por un lado, genera esfuerzos mecánicos que pueden ocasionar daños en la pared celular del hongo y, por otro lado, influye en la transferencia de oxígeno al medio. Generalmente se ha especulado que la agitación tiene un efecto negativo sobre la producción de lacasas debido al estrés hidrodinámico ejercido sobre el hongo, que frecuentemente crece formando *pellets*.

En el presente trabajo se estudiaron de manera independiente los efectos mecánicos de la agitación y de la tensión de oxígeno disuelto (TOD) en el crecimiento y la producción de lacasas del hongo *Pleurotus ostreatus* CP50 en reactor de 10 L agitado mecánicamente. Asimismo, se estudió el efecto de estos factores sobre la expresión de los genes *poxc* y *pox3* que codifican para las lacasas producidas por el hongo bajo las condiciones de operación.

Se realizó un diseño de experimentos factorial 3^2 donde se evaluó el efecto de la velocidad específica de disipación de energía (EDCF; 1, 11 y 21 kW/m³s) y TOD (8, 15 y 22%) sobre la velocidad de crecimiento, la producción específica de lacasas, la concentración máxima de biomasa, la actividad lacasa máxima, el tamaño de los *pellets* y la expresión de los genes *poxc* y *pox3* que codifican para lacasas y se expresan de forma constitutiva en el sistema utilizado.

El análisis de varianza demostró que el oxígeno es el principal factor, afectando tanto al crecimiento como a la producción de lacasas; mientras que la disipación de energía sólo afectó a la producción específica de lacasas y a la morfología de los *pellets*. El oxígeno tiene un efecto tipo campana sobre el crecimiento del hongo, tenido un punto óptimo a TOD de 15%, y ejerciendo efecto positivo entre 8 y 15% (TOD) y negativo entre 15 y 22%. El efecto negativo observado entre 15 y 22% de TOD podría justificarse como una defensa ante el estrés oxidativo ocasionado por las altas concentraciones de oxígeno. Por otro lado, el oxígeno tiene efecto negativo sobre la síntesis de lacasas afectando a nivel transcripcional la expresión del gen *poxc* que predomina en los cultivos de *P. ostreatus* CP50.

Por su parte, la EDCF tiene efecto positivo sobre la producción específica de lacasas y negativo sobre el tamaño de los *pellets*. Así, al incrementar el nivel de EDCF se obtienen *pellets* pequeños con menores limitaciones difusionales, mayor porcentaje de biomasa metabólicamente activa y mayor área superficial. Debido a que el efecto de la EDCF sobre la expresión de los genes que codifican a las lacasas no es significativo, es probable que el incremento en la producción específica de lacasas se deba a que existe una mayor proporción de biomasa activa y a que incrementa el área superficial de los *pellets*, región abundante en puntas hifales donde se sabe que se sintetizan los metabolitos de excreción.

Con los resultados presentados, se demuestra que el oxígeno, y no el estrés hidrodinámico, es el factor con mayor influencia en la producción de lacasas en el intervalo de estudio. Además, el efecto ocasionado por la disipación de energía sobre la producción específica de lacasas repercute físicamente, determinando el tamaño de los *pellets* y por tanto la región activa de síntesis de lacasas.

1. INTRODUCCIÓN

Las lacasas (*p*-difenol: oxígeno-óxido reductasas E.C. 1.10.3.2) son glicoproteínas pertenecientes al grupo de las polifenol oxidasas, también llamadas oxidasas azules de cobre debido a que contienen átomos de cobre en su sitio catalítico. Estas enzimas son producidas en la mayoría de los hongos de pudrición blanca, en otros hongos, algunas bacterias, insectos y plantas. Debido a la compleja estructura de la lignina, en la mayor parte de los hongos ligninolíticos se produce más de una isoenzima y esta cualidad confiere a las lacasas fúngicas la posibilidad de tener una gran variedad de sustratos e importantes papeles biológicos y biotecnológicos (Strong, 2011) que las lacasas de otro origen no poseen. Entre las principales aplicaciones se encuentran la delignificación de la madera, la biorremediación de aguas y suelos, la clarificación de bebidas y degradación de colorantes vertidos en efluentes, entre otras (Minussi *et al.*, 2002; Baldrian, 2006). En ese sentido, las lacasas del género *Pleurotus* son los componentes extracelulares más abundantes de los sistemas de degradación de lignina (Baldrian, 2006) y por ello hay especial interés en la producción de lacasas a partir de este género fúngico.

La producción de lacasas a partir de hongos ligninolíticos en cultivos sumergidos ha resultado ser el método más conveniente gracias a que la utilización de biorreactores en medio líquido facilita su separación, purificación y producción a gran escala, además de que acorta en gran medida los tiempos de cultivo. La producción de lacasas ha sido estudiada en distintos tipos de cultivo como: cultivos de estado sólido, inmovilizados y sumergidos (Fazenda *et al.*, 2008); sin embargo, la mayor parte de la producción de lacasas en la actualidad se realiza en cultivos sumergidos con agitación mecánica. Hasta el momento, la producción más alta reportada hasta ahora (300 U/ml) ha sido alcanzada en cultivos sumergidos inducidos con cobre en *Trametes pubescens* (Galhaup *et al.*, 2002).

Uno de los parámetros de proceso más importantes en los cultivos sumergidos de hongos filamentosos es la agitación. La agitación, además de llevar a cabo el mezclado del caldo de cultivo, determina la velocidad de transferencia de oxígeno y la disipación de energía por los impulsores genera esfuerzos de corte que pueden ocasionar daños en la pared celular del hongo o en la estructura de los *pellets* ocasionando su fragmentación (Rocha-Valadez *et al.*, 2005; Nienow, 1990). Estos efectos repercuten en el crecimiento del hongo y, por tanto, en su productividad y características morfológicas. Los cultivos de hongos filamentosos generalmente desarrollan una morfología tipo *pellet* por lo que la productividad de estos cultivos también puede verse afectada por problemas de limitaciones nutricionales o de oxígeno intra particular.

El efecto de la agitación sobre la producción de lacasas es generalmente evaluado al modificar la velocidad de agitación del reactor; sin embargo, se han reportado resultados que han llegado a causar controversia al respecto. Existen trabajos con diversos basidiomicetos donde se concluye que la agitación afecta negativamente la producción de lacasas (Hess *et al.*, 2002; Silvério *et al.*, 2013; Fenice

et al., 2003), otros donde no se encuentra efecto alguno (Tavares *et al.*, 2006; Babic y Pavko *et al.*, 2012) y algunos en donde se reporta que existen niveles óptimos de agitación que favorecen la producción de lacasas, encontrando que en niveles inferiores y superiores la producción de lacasas disminuye (Birhanli y Yesilada, 2010).

A pesar de los esfuerzos por entender el papel de la agitación en la producción de lacasas y debido a que no existen estudios adecuados que permitan evaluar de manera independiente los efectos hidrodinámicos de los de transferencia de oxígeno, de manera general se ha aceptado que las bajas producciones de lacasas se deben al estrés hidrodinámico efectuado por la agitación mecánica (Couto y Toca-Herrera, 2007; Hess *et al.*, 2002). Sin embargo, no se ha estudiado de manera independiente el efecto que tiene la agitación sobre la concentración de oxígeno disuelto en el medio como para atribuir el efecto de la agitación sólo al estrés hidrodinámico generado.

Debido a que existe una marcada interdependencia entre morfología-fisiología-productividad en los hongos filamentosos, diversos grupos han empleado la velocidad de disipación de energía (EDCF) como parámetro para relacionar la morfología y otros parámetros biológicos con las condiciones operacionales de un biorreactor. En nuestro grupo de investigación, se han estudiado los efectos de las condiciones hidrodinámicas en cultivos sumergidos de *Pleurotus ostreatus* CP50 a diferentes velocidades iniciales de disipación de energía (a frecuencias de agitación constantes) sin control de oxígeno disuelto (TOD) (Tinoco-Valencia *et al.*, 2014). Los resultados sugieren que la EDCF es el factor que tiene mayor influencia en la producción de las lacasas; no obstante, se requiere un estudio más riguroso para corroborar el efecto de la energía disipada donde la concentración de oxígeno no dependa de la velocidad de agitación.

En el presente trabajo se evaluó de manera independiente la EDCF y la concentración de oxígeno disuelto (TOD) sobre el crecimiento, la morfología, la transcripción de los genes *poxc* y *pox3*, y la producción de lacasas por *Pleurotus ostreatus* CP50.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades sobre las lacasas

Las lacasas (*p*-difenol: oxígeno-oxidoreductasas EC 1.10.3.2) pertenecientes al grupo de las oxidasas azules de cobre tienen cuatro átomos de cobre en su sitio catalítico y son glicoproteínas con peso molecular entre 50 y 130 kDa que catalizan la reducción de oxígeno a agua acompañada de la oxidación de un sustrato, utilizando una gran variedad de compuestos fenólicos como donadores de protones (Thurston, 1994).

El sitio catalítico de las lacasas está organizado en tres grupos de átomos de cobre caracterizados por diferentes propiedades espectroscópicas. El cobre T1 absorbe a una longitud de onda de 600 nm, mientras que el cobre T2 presenta absorción débil en la región visible, que constituye una región de resonancia paramagnética con los dos átomos de cobre T2. Los sustratos son oxidados por el cobre T1 y los electrones extraídos son transferidos a través del motivo His-Cys-His hacia el sitio T2/T3, donde el oxígeno es reducido a agua (Fig. 2.1). Como resultado de la reacción de cuatro moléculas fenólicas se producen cuatro radicales fenoxi que posteriormente sufren una reacción de polimerización (Messerschmidt, 1997).

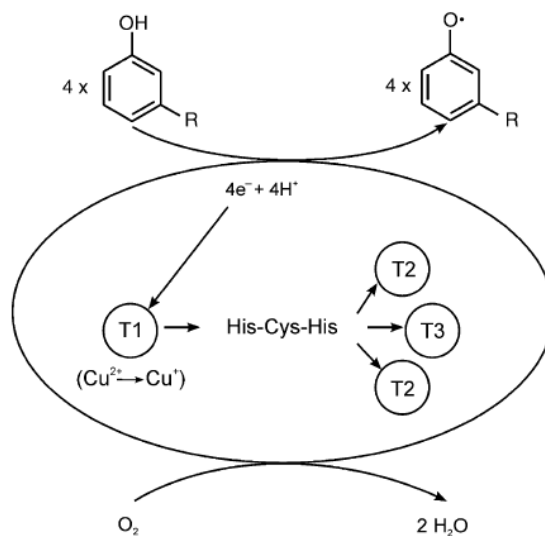


Fig. 2.1 Ciclo catalítico de las lacasas (Tomado de Baldrian, 2006).

Las lacasas típicamente están presentes en hongos de pudrición blanca y plantas, aunque también se encuentran en algunas bacterias e insectos, teniendo funciones muy diversas como la síntesis de lignina en las plantas, la esclerotización de las cutículas de la epidermis de algunos insectos, y en bacterias tienen papel en la morfogénesis y la resistencia a factores físicos en las esporas (Hatakka, 2001; Eggert

et al., 1996; Thurston, 1994; Alexandre y Zhulin, 2000). Las lacasas fúngicas son probablemente las que tienen un mayor número de funciones que incluyen la morfogénesis, patogénesis, síntesis de pigmentos, esporulación y degradación de lignina (Thurston, 1994; Gianfreda *et al.*, 1999).

Debido a la complejidad de la lignina y su estructura polimérica aleatoria de fenilpropanoatos, las enzimas encargadas de su descomposición deben tener especificidad por una amplia variedad de sustratos aromáticos (Janusz *et al.*, 2013). De ese modo, la versatilidad que propicia la baja especificidad de las lacasas fúngicas, hace que estas enzimas sean cada vez más interesantes para aplicaciones biotecnológicas variadas. Entre las principales aplicaciones figuran la delignificación del papel, la biorremediación de aguas y suelos, la clarificación de bebidas, la degradación de colorantes fenólicos vertidos en efluentes y la fabricación de sensores para la determinación de polifenoles (Minussi *et al.*, 2002; Baldrian, 2006; Gomes *et al.*, 2004).

La producción de lacasas por hongos basidiomicetos ligninolíticos, también denominados hongos de pudrición blanca, ha sido ampliamente estudiada debido a la capacidad de estos microorganismos para crecer en sustratos económicos, excretar las enzimas y a su gran capacidad de oxidación de compuestos xenobióticos. Por la facilidad con que se cultivan *in vitro* y con que las enzimas son purificadas, los géneros más estudiados en los últimos años han sido *Trametes*, *Pleurotus*, *Lentinula*, *Pycnoporus*, *Botryosphaeria* y *Phanerochaete* (Baldrian, 2006). En la mayoría de los hongos ligninolíticos se ha detectado la producción de más de una isoforma, constitutiva o inducible, en función de la composición del medio de cultivo y del uso de diversos inductores (Mayer y Staples, 2002). Al parecer la diversidad bioquímica de las isoenzimas de lacasas se debe a la existencia de múltiples genes codificantes para lacasas; sin embargo, la regulación de su expresión puede ser muy diversa entre especies fúngicas (Palmieri *et al.*, 2003).

A pesar de su gran capacidad como agentes oxidantes, la aplicación de lacasas a nivel comercial ha sido limitada debido a que estas enzimas son producidas en pequeñas cantidades de manera constitutiva, teniendo un costo elevado en el mercado (Minussi *et al.*, 2002; Galhaup *et al.*, 2002). Para mejorar la producción de lacasas, ha sido necesario implementar estrategias como: el uso de inductores y condiciones de limitación de sustratos, la adición de micropartículas insolubles e inertes, la producción heteróloga en levaduras y otros hongos filamentosos, además de la optimización del proceso a través de la manipulación de las variables de operación del biorreactor para maximizar la productividad y reducir costos. La producción de lacasas recombinantes representa una buena opción para incrementar la producción de estas enzimas y al respecto existe una gran cantidad de estudios en curso. Sin embargo, debido a que hasta ahora varias de las lacasas recombinantes han resultado poco estables con respecto a las lacasas de cepas fúngicas nativas, actualmente la mayor parte de la producción de lacasas a nivel industrial se centra en cultivos de basidiomicetos en medio líquido.

Con la finalidad de evaluar efectos e interacciones de los diferentes parámetros que regulan los sistemas bioquímicos se ha empleado el diseño experimental estadístico que puede ser aplicado en sistemas biológicos de manera útil en procesos de optimización (Tavares *et al.*, 2006; Tinoco-Valencia *et al.*, 2014). La estrategia del diseño de experimentos (DOE) resulta más eficiente que aquellos donde se varía un factor a la vez, al estudiar 2 o más factores, ya que es posible estudiar su efecto sobre una o más respuestas de manera simultánea y en un menor número de repeticiones (Wahid y Nadir, 2013).

2.1.1 Lacasas de *Pleurotus ostreatus*

Pleurotus es el género de hongos de pudrición blanca donde las lacasas constituyen la mayor parte de los componentes extracelulares de los sistemas de degradación de lignina (Baldrian *et al.*, 2006). Así pues, la producción de lacasas ha sido reportada anteriormente para varias especies del género *Pleurotus*: *P. pulmonaris* (De Souza *et al.*, 2004), *P. sajor-caju* (Soden y Dobson, 2001) y *P. eryngii* (Muñoz *et al.*, 1997; Ueda *et al.*, 2012).

Pleurotus ostreatus pertenece a una clase de hongos de pudrición blanca que produce lacasas y manganeso peroxidasas capaces de oxidar compuestos fenólicos, pero no lignina peroxidasas que pueden oxidar también compuestos no fenólicos (Hatakka, 1994). Se trata de un hongo basidiomiceto capaz de crecer y degradar una gran cantidad de desechos agrícolas y forestales (lignocelulósicos) atacando los diferentes polímeros de la madera debido a que puede secretar varias isoenzimas de lacasas. Esta variedad de isoenzimas de lacasa está relacionada con diferentes funciones como la síntesis y degradación de lignina, el desarrollo de cuerpos fructificantes, la producción de pigmentos y la detoxificación celular, entre otros (Lettera *et al.*, 2011).

A partir de la secuenciación del genoma de *P. ostreatus* PC 15 v2.0 (Joint Genome Institute, 2011) se ha indicado la presencia de al menos 12 genes de multicobre oxidasas. Se ha confirmado la secuencia de cuatro genes de lacasa: *pox1* (Giardina *et al.*, 1995), *poxc* (Giardina *et al.*, 1996), *poxa1b* (Giardina *et al.*, 1999) y *poxa3* que codifica para la subunidad grande tanto de POXA3a y POXA3b (Palmieri *et al.*, 2003). Recientemente se confirmó la secuencia de tres nuevos miembros de la familia de lacasas: *pox3*, *pox4* y *pox5* (Pezzella *et al.*, 2009) de los que no se conocen aún muchos detalles.

Algunas isoenzimas fenol oxidasas han sido purificadas y caracterizadas: POXA1b, POXA1w, POXA2, POXB1, POXB2, POXA3a, POXA3b y POXC (Giardina *et al.*, 1996, 1999; Palmieri *et al.*, 1997, 2000, 2003), donde POX significa fenol oxidasa. Otras isoenzimas que han sido identificadas son POX1 (Giardina *et al.*, 1995), POX3 y POX4 (Pezzella *et al.*, 2009). De acuerdo a Giardina (1999) la isoenzima predominante bajo todas las condiciones de cultivo evaluadas es POXC; además, la adición de sulfato de cobre al medio de cultivo provoca un incremento en la actividad total de lacasa, principalmente de la isoforma POXA1b (Palmieri *et al.*, 2003).

Cabe señalar que el promotor del gen *poxc*, que codifica para la isoenzima más abundante en todas las condiciones de cultivo, contiene la mayor cantidad de elementos de regulación, destacando 4 MRE (Elementos de Respuesta a Metales) y 3 N (Elementos de Respuesta a Nitrógeno).

Las variaciones en la ubicación y cantidad de elementos XRE (Elementos de Respuesta a Xenobióticos) y ARE (Elementos de Respuesta a Antioxidantes) pueden resultar en una amplia variedad de respuestas a los compuestos aromáticos dando lugar a una expresión diferencial de los múltiples genes que codifican para lacasas (Soden y Dobson, 2001; Xiao *et al.*, 2006).

Las secuencias consenso de unión al factor de transcripción NIT2 se relacionan con la regulación debida al nitrógeno. Al respecto, se sabe que la proteína NIT2 es requerida para la expresión de varios genes involucrados en el metabolismo de purinas, aminoácidos y en la asimilación de nitratos, lo cual sugiere una regulación de los genes de lacasa debido al tipo y cantidad de fuente de nitrógeno (Marzluf, 1997).

Los sitios putativos de unión a CreA sugieren un mecanismo de represión catabólica por carbono similar al que se lleva a cabo por CreA en *Aspergillus nidulans* (Strauss *et al.*, 1999). Se ha observado que altos niveles de glucosa inhiben la transcripción de lacasa en *T. pubescens* (Galhaup *et al.*, 2002) y en *T. sp* AH28-2 (Xiao *et al.*, 2006).

2.2 Cultivo de hongos superiores

El cultivo de hongos superiores ha cobrado importancia desde hace varias décadas a partir de la obtención de compuestos con actividades farmacológicas de interés como antibacteriales, antifúngicos, fitotóxicos, nematicidas, citostáticos y antivirales, entre otros (Fabian, *et al.*, 1998). Actualmente se emplean tres técnicas de cultivo a nivel industrial: cultivo en estado sólido, cultivo sumergido y cultivo inmovilizado.

El cultivo en estado sólido se caracteriza por el crecimiento de hongos filamentosos en un sustrato sólido sólo con el agua suficiente para permitir su crecimiento y metabolismo. Este tipo de cultivo fue utilizado por mucho tiempo con el empleo de residuos agroindustriales como sustratos, dando valor agregado a los mismos (Mitchell y Lonsane, 1992; Carlisle *et al.*, 2001) y procesos de biorremediación para la detoxificación de residuos agroindustriales. Algunos productos comerciales de basidiomicetos aún se obtienen por fermentaciones en sustrato sólido (quitosano, proteasas, esporas con propósitos de biocontrol, lovastatina, biomasa, entre otros); sin embargo, se trata de procesos que generalmente duran varias semanas, están limitados a hongos capaces de tolerar bajos niveles de actividad acuosa a_w , el control y el monitoreo de parámetros son muy limitados y la estandarización y escalamiento del proceso no son garantizables.

En los cultivos inmovilizados se aplican técnicas de inmovilización celular de atrapamiento para hongos con ciertas matrices. No obstante, la eficacia de este método depende de la capacidad de los microorganismos para fijarse a superficies sólidas por la secreción de polimucosacáridos (Moonmangmee *et al.*, 2002) por lo que puede no alcanzarse una adsorción eficiente.

Por otro lado, los cultivos sumergidos de las formas fúngicas vegetativas han resultado ser menos problemáticos (la transferencia de oxígeno y de calor es mucho mejor, los cultivos son más homogéneos, son menos propensos a sufrir contaminaciones y son susceptibles de ser escalados hasta cientos de miles de litros) haciéndolos más reproducibles, flexibles, fáciles de monitorear y de controlar a partir de parámetros operacionales clave.

La manera en que los hongos superiores obtienen sus nutrientes en la naturaleza puede tener un impacto en las tecnologías empleadas para hacerlos crecer y en el proceso de escalamiento para la producción de los metabolitos de interés. Las técnicas de cultivo sumergido suelen ser muy eficientes en la producción de metabolitos específicos debido a que proporcionan con mayor facilidad las condiciones más favorables para su biosíntesis y, aun cuando se trate de hongos filamentosos, el cultivo sumergido se ha convertido en método fermentativo preferido en la producción de proteínas a nivel industrial (Fazenda *et al.*, 2008).

La producción de lacasas a partir de hongos ligninolíticos en cultivos sumergidos ha resultado ser el método más conveniente gracias a que la utilización de biorreactores en medio líquido facilita su separación, purificación y producción a gran escala, además de que acorta en gran medida los tiempos de cultivo. A pesar de que la producción de lacasas ha sido estudiada en cultivos de estado sólido e inmovilizados, la mayor parte de la producción de lacasas en la actualidad se realiza en cultivos sumergidos con agitación mecánica (Fazenda *et al.*, 2008). Hasta el momento, la producción más alta reportada hasta ahora (300 U/ml) ha sido alcanzada en cultivos sumergidos inducidos con cobre en *Trametes pubescens* (Galhaup *et al.*, 2002).

2.3 Morfología de los hongos filamentosos en cultivo sumergido

En cultivo sumergido, la morfología de los hongos depende de las condiciones ambientales del reactor como la viabilidad de las esporas, la concentración del inóculo, la composición del medio, el pH, la fuerza iónica, la temperatura, la concentración de oxígeno disuelto y el estrés mecánico (Krull *et al.*, 2010; Deckwer *et al.*, 2006).

A nivel macroscópico, los hongos desarrollan dos tipos de morfología extrema en cultivo sumergido: aquella filamentosa o de micelio disperso y agregados de hifas compactos con forma semiesférica denominados *pellets* (Papagianni, 2004).

Particularmente, se ha sugerido que los *pellets* favorecen la producción de metabolitos asociados al crecimiento, mientras que el crecimiento filamentoso favorece la biosíntesis de metabolitos secundarios (Paul y Thomas, 1996). En este sentido, el crecimiento filamentoso ha sido reportado como favorable para la producción de diversos antibióticos (penicilina) y enzimas (pectinasa) de interés industrial (Makagiansar *et al.*, 1993; Papagianni, 2004). Sin embargo, la diferenciación y el estado fisiológico de las células que llevan a cabo la síntesis de tales metabolitos aún no ha sido bien comprendida.

Para fines prácticos en fermentadores, la morfología de tipo *pellet* parece ser la más conveniente pues, a diferencia del micelio disperso, tiene comportamiento de fluido Newtoniano y la viscosidad del medio de cultivo no se incrementa de manera significativa (Metz *et al.*, 1979). Por el contrario, la morfología filamentosa presenta el inconveniente de que, a medida que el hongo crece, la viscosidad del caldo aumenta adquiriendo un comportamiento pseudoplástico debido a las interacciones entre los filamentos suspendidos pudiendo resultar en una transferencia pobre de oxígeno (Riley *et al.*, 2000; Wittler *et al.*, 1986; Gabelle *et al.*, 2012).

En términos reológicos, la morfología de *pellet* resulta ser la más conveniente; sin embargo, a medida que el *pellet* aumenta de tamaño durante la fermentación, su viabilidad y productividad puede verse afectada por problemas de limitación de sustratos o de oxígeno en el interior de los mismos, pudiéndose obtener *pellets* huecos a causa de lisis celular (Zmak *et al.*, 2006; Cui *et al.*, 1997; Grimm *et al.*, 2005; Krull *et al.*, 2013).

2.3.1 Efectos difusionales ligados a la morfología de *pellet*

El crecimiento de los hongos en forma de *pellet* es análogo al crecimiento de colonias en sustratos sólidos, que con el tiempo sufren limitaciones difusionales (Pirt, 1966). Es muy probable que las limitaciones nutricionales o de oxígeno al interior de los *pellets* afecten negativamente al crecimiento y la productividad de tales hongos. A bajas concentraciones de oxígeno la disponibilidad del mismo queda restringida sólo a las células ubicadas en la capa externa del *pellet* que reciben suficiente oxígeno y nutrientes, con lo que solo la capa externa del *pellet* es activa (Prosser, 1995). De otro modo, aun cuando se mantengan altas tensiones de oxígeno disuelto en el medio, la concentración de oxígeno puede disminuir en el interior del *pellet* cuando los agregados miceliares son demasiado grandes y compactos (Cui *et al.*, 1998; Schügerl *et al.*, 1983; Krull *et al.*, 2010).

La transferencia de oxígeno en el interior de *pellets* miceliares ha sido objeto de estudio desde hace varias décadas; al respecto existen algunos trabajos donde se han empleado microelectrodos y sensores de aguja microaxiales (Wittler *et al.*, 1986) para medir los perfiles de presión de oxígeno dentro de *pellets* fijos.

Tramper y Van't Riet (1991) propusieron una ecuación para determinar el diámetro crítico (D_{crit}) definido como el diámetro de *pellet* cuando la concentración del sustrato en el centro del mismo llega a cero. Dicho de otra forma, D_{crit} (Ec. 1) es el diámetro máximo al cual no se presenta limitación de oxígeno hacia el interior del *pellet*. En *pellets* con tamaños mayores a D_{crit} el crecimiento sólo tendrá lugar en la capa externa del mismo. La ecuación empleada para calcular el D_{crit} es la siguiente:

$$D_{crit} = \sqrt{\frac{24 \times C_{O_2} \times D_{ef}}{R_{O_2}}} \quad \text{Ec. 1}$$

donde D_{crit} es el diámetro crítico de los agregados (m), C_{O_2} es la concentración de oxígeno disuelto en el seno del líquido (kgO_2/m^3), D_{ef} es la difusión efectiva del oxígeno en los agregados (m^2/s) y R_{O_2} es la velocidad de consumo de oxígeno por unidad de volumen ($\text{kgO}_2/\text{m}^3\text{s}$). R_{O_2} es igual al producto de la velocidad específica de consumo de oxígeno (q_{O_2}) y la densidad de los agregados (ρ). D_{ef} es el producto del coeficiente de difusión molecular (D_{O_2}) y la porosidad del *pellet* (P) (Ec. 2).

$$D_{ef} = D_{O_2} \times P \quad \text{Ec. 2}$$

Con la ecuación del diámetro crítico, es posible estimar el grado de la limitación en la difusión de oxígeno hacia el interior del *pellet* de acuerdo a sus características morfológicas (densidad, porosidad y diámetro) y de otros factores como la concentración de oxígeno disuelto y la velocidad de consumo de oxígeno.

2.3.2 Efecto de la morfología en la producción de proteínas

Existen trabajos en los que se ha propuesto que la morfología miceliar influye de manera importante en la producción de un metabolito dado (Zmak *et al.*, 2006; Paul y Thomas, 1996; Johansen *et al.*, 1998; Papagianni *et al.*, 2004). La energía disipada a través de los impulsores por efecto de la velocidad de agitación puede ocasionar algunos cambios en la estructura interna del *pellet* (i.e. viabilidad, compactación) (Krull *et al.*, 2010) y en las características de la morfología filamentosa (ramificaciones, número de puntas hifales activas y grado de dispersión) (Ahamed y Vermette, 2010). Tales efectos tendrán una fuerte influencia en la velocidad de crecimiento y productividad del microorganismo. En el caso de *pellets*, a altas velocidades de agitación, la compactación celular en el interior de los mismos favorece la aparición de una barrera de transporte, con lo que disminuye la disponibilidad de nutrientes en su interior pudiendo llegar a ocasionar lisis celular y la obtención de *pellets* huecos (Krull *et al.*, 2010).

Por su parte, en el trabajo de Treskatis *et al.* (1997) con *Penicillium chrysogenum*, se ha sugerido que el límite máximo para el diámetro de *pellet*, por debajo del cual se mantiene la viabilidad y la productividad de la cepa, es de 400 μm . Por un lado, se demostró que el tamaño y la forma de los agregados miceliares de una fermentación ejercen influencia en la actividad metabólica de los microorganismos; por otro lado, se confirmó que la morfología de los organismos puede ser modificada por influencias mecánicas o químicas dependientes de las condiciones del medio.

En un trabajo más reciente Zmak *et al.* (2006) estudiaron la influencia del tamaño de *pellet* sobre el crecimiento de *Phanerochaete chrysosporium* y la producción de lignina peroxidasa (LiP) utilizando *pellets* de distintos tamaños (2-18 mm). En este trabajo se observó que en los cultivos con los *pellets* más grandes la producción extracelular de la LiP comenzaba mucho después que en los cultivos con *pellets* más pequeños; a raíz de este y otros análisis, se dijo que el incremento en el tamaño de los *pellets* tiene efecto negativo sobre la productividad de *P. chrysosporium*. Dado que existe una alta correlación entre el área superficial total y la productividad del hongo, se determinó que el área superficial es el factor morfológico que determina la productividad de este hongo, dado que los *pellets* más pequeños tienen mayor área superficial que los *pellets* más grandes. El-Enshasy *et al.* (2006) hallaron la misma correlación entre el tamaño del *pellet* y la productividad con *Aspergillus niger* en la producción de glucosa-oxidasa.

2.4 Efecto de la agitación en cultivos de hongos filamentosos

La agitación en un cultivo sumergido debe cumplir con dos funciones principales: a) llevar a cabo la dispersión del aire para asegurar una adecuada transferencia de oxígeno al medio de cultivo; y b) un mezclado eficiente del caldo de cultivo con el fin de minimizar los gradientes de temperatura, pH y de concentración de nutrientes en el biorreactor. Por otro lado, la agitación contribuye al mantenimiento de gradientes de concentración entre el interior y el exterior de las células ya que, a través de velocidades de difusión mayores, se reduce la limitación nutricional de las células y se facilita la remoción de gases residuales y otros productos catabólicos del microambiente celular (Oh *et al.*, 2007). Por lo anterior, se considera que la agitación es uno de los parámetros de proceso más importantes en los cultivos de hongos filamentosos.

2.4.1 Efecto de la agitación sobre el crecimiento, la morfología y la productividad de hongos filamentosos

En fermentaciones de hongos, la agitación por medio de impulsores no sólo resulta en la dispersión de gases, el mezclado y la transferencia de masa y calor. La agitación también puede afectar de manera considerable al crecimiento y la morfología del hongo (Cui *et al.*, 1997) puesto que genera esfuerzos

de corte que pueden ocasionar daños en la pared celular además de la erosión y fragmentación de los *pellets* (Amanullah *et al.*, 2000; Rocha-Valadez *et al.*, 2005; Nienow, 1990). Lo anterior puede repercutir finalmente en la velocidad de crecimiento y la síntesis de metabolitos de interés (Papagianni *et al.*, 2004). En reactores agitados mecánicamente, las condiciones hidrodinámicas y los esfuerzos mecánicos estarán determinados por la velocidad de agitación y la geometría y número de los impulsores (Jüsten *et al.*, 1996; Rocha-Valadez *et al.*, 2005), influyendo notablemente sobre los bioprocesos miceliares.

Los esfuerzos de corte y/o deformación presentes durante los cultivos determinarán el efecto del estrés hidrodinámico sobre las células. Cualquier microorganismo colocado en un fluido cuyo movimiento genere gradientes de velocidad, experimentará esfuerzos de corte debido a las variaciones irregulares del flujo (Oldshue, 1983). El esfuerzo de corte (τ) se define como la fuerza por unidad de área aplicada en forma paralela de cada partícula biológica (Bennet y Myers, 1962), y es resultado de diferencias espaciales de *momentum* entre las corrientes y/o trayectorias presentes en un fluido en movimiento (Tramper y van't Riet, 1991). La magnitud de estos esfuerzos es directamente proporcional al gradiente de deformación (γ) cuando se trabaja con fluidos newtonianos. Sin embargo, para el caso de cultivos de hongos filamentosos en los que la viscosidad cambia con el tiempo de cultivo y con la velocidad de agitación, la relación entre esfuerzo de corte y la velocidad de deformación no es lineal y su comportamiento puede quedar definido por la Ley de Potencia:

$$\tau = K \left(\frac{dv}{dy} \right)^n = K \gamma^n = K \left(\frac{dv}{dy} \right)^{n-1} \left(\frac{dv}{dy} \right) = \mu_{ap} \gamma \quad \text{Ec. 3}$$

donde dv es la diferencia de velocidades entre las líneas de flujo del medio de cultivo superior e inferior, dy es la distancia entre las líneas de flujo, n es el índice de flujo y K es el índice de consistencia característicos de cada fluido, y el término $K (dv/dy)^{n-1}$ es la viscosidad aparente (μ_{ap}) [Pa*s] (Bennet y Myers, 1962).

Los esfuerzos de corte interaccionan con la superficie de los *pellets* pudiendo ocasionar diversos tipos de daños que van desde la erosión (desprendimiento de hifas de la superficie), hasta la completa ruptura de los mismos (Kelly *et al.*, 2004). Anteriormente se han descrito tres mecanismos de fragmentación de *pellets*: la interacción entre *pellets* y *eddies* (pequeños remolinos generados por las fuerzas hidrodinámicas en las zonas cercanas a los impulsores que ocasionan altas velocidades de deformación), impactos entre *pellets* e impulsores o baffles, y colisiones entre *pellets*. De lo anterior, se dice que la interacción con *eddies* es el mecanismo de fragmentación más importante dado que la densidad de los *pellets* es muy similar a la del medio y los *pellets* seguirán las líneas de corriente del flujo líquido (Johansen *et al.*, 1998).

Así pues, la disipación de energía suministrada a través de la agitación en un cultivo sumergido es un factor determinante de las características morfológicas de los hongos filamentosos; al respecto existen diversos estudios (Kelly *et al.*, 2004; Cui *et al.*, 1998; Rocha-Valadez *et al.*, 2005; Amanullah *et al.*, 2002; Mitard y Riba, 1986; Casas López *et al.*, 2005; El-Enshasy *et al.*, 2006; Rodríguez Porcel *et al.*, 2005) donde se ha concluido que el tamaño de los *pellets* disminuye, ya sea por fragmentación o desprendimiento de hifas, al incrementar la energía específica suministrada por efecto de esfuerzos cortantes.

En el 2006, Zmak *et al.* demostraron que existe una relación inversamente proporcional entre la velocidad de corte impuesta y el diámetro de los *pellets* generados con *Phanerochaete chrysosporium*. En dicho estudio se aplicaron diferentes velocidades de corte, al variar el diámetro de los tanques en cultivos en lote bajo las mismas condiciones de agitación, para generar *pellets* de distintos tamaños. El resultado del análisis fue una correlación lineal entre la velocidad de corte y el tamaño de los *pellets*; lo anterior indica, según el autor, que el tamaño de *pellet* depende sobre todo de las condiciones hidrodinámicas dentro del tanque.

Existe un trabajo con una cepa recombinante de *Aspergillus niger* (El-Enshasy *et al.*, 2006), donde se estudió el efecto de la agitación sobre el crecimiento y la producción de glucosa oxidasa utilizando diferentes velocidades de agitación. Lo que observaron fue un efecto negativo en el crecimiento del hongo pero positivo sobre la producción específica de la proteína de interés; lo anterior se debía a la obtención de *pellets* más pequeños con mayor porcentaje de biomasa activa, encontrando que las regiones de producción de la proteína se sitúan en la capa externa de los *pellets* y que la síntesis de proteínas tenía lugar sólo en el 25% de la biomasa del *pellet*. Gracias a estudios de este tipo es posible entender que no siempre lo que afecta negativamente al crecimiento va a repercutir del mismo modo en la producción de un metabolito dado; en este caso la agitación afecta negativamente al crecimiento del hongo pero favorece la producción específica de la enzima de interés.

2.4.2 Problemática del efecto de la agitación: estrés hidrodinámico vs. transferencia de oxígeno

La variedad de comportamientos presentados en hongos macroscópicos durante su cultivo (cambios en la morfología, velocidad de crecimiento, productividad y fisiología), en respuesta a las velocidades de agitación, resulta muy difícil de generalizar debido a la naturaleza tan diversa de los hongos. Aunados a esto se encuentran otros efectos del mezclado y transferencia de oxígeno, particularmente cuando los caldos adquieren un comportamiento pseudoplástico. El problema reside en que, al evaluar la influencia de la agitación en los cultivos sumergidos sobre dichos comportamientos como la velocidad de crecimiento o la productividad, no se estudian por separado los efectos de los esfuerzos de corte y los efectos de la concentración de oxígeno.

En 1998, Cui *et al.* plantearon la necesidad de distinguir el efecto de la tensión de oxígeno disuelto y el efecto de las fuerzas mecánicas para entender cómo ambos factores afectan la morfología de los hongos realizando estudios con el hongo *Aspergillus awamori*. Para llevar a cabo esos experimentos decidieron mantener constante la velocidad de disipación de energía y la concentración de esporas y ajustar diferentes tensiones de oxígeno disuelto iniciales por mezcla de gases (aire y oxígeno puro o nitrógeno); sin embargo, llegaron a la conclusión de que, para lograr un estudio más fino, era necesario controlar las tensiones de oxígeno disuelto en valores constantes durante toda la fermentación.

Existen pocos trabajos donde se ha tratado de abordar este problema. En 1996, Gibbs y Seviour llevaron a cabo un estudio para determinar si la influencia en la producción de exopolisacáridos en *Aureobasidium pullulans* estaba dada por los esfuerzos mecánicos sobre el micelio o por la concentración de oxígeno. Cuando incrementaban la velocidad de agitación de 250 a 1000 rpm notaban que la producción específica del exopolisacárido disminuía; mientras la mayoría de investigadores de la época atribuían este efecto al estrés mecánico dado por la velocidad de agitación, ellos propusieron que el oxígeno podía ser el factor más importante en la producción. Tras llevar a cabo cultivos con control de oxígeno disuelto por mezcla de gases a las distintas velocidades de agitación, comprobaron que efectivamente el oxígeno tenía un efecto negativo sobre la producción del exopolisacárido mientras que el estrés mecánico tenía un efecto menor.

Durante su trabajo, Rocha-Valadez *et al.* (2007a) utilizaron una estrategia muy similar a la planteada por Cui *et al.* (1998), al estudiar el efecto de las condiciones hidrodinámicas sobre la fisiología del cultivo miceliar de *Trichoderma harzianum* para la producción de 6-pentil- α -pirona (6PP). Para ello se implementó un sistema de fermentación que permitió estudiar los efectos hidrodinámicos de manera independiente del efecto del oxígeno disuelto. Lo anterior se consiguió controlando la tensión de oxígeno disuelto a valores mayores al 20% a través de la manipulación de la composición de los gases de entrada y el mantenimiento de un suministro de potencia constante durante los cultivos.

La velocidad específica de disipación de energía (EDCF) tuvo efectos tanto en la morfología como en el metabolismo, productividad, viabilidad y diferenciación celular del hongo. El aumento de la EDCF redujo el diámetro de los agregados miceliar debido a que se favoreció su fragmentación; además tuvo efecto negativo sobre la velocidad específica de crecimiento y positivo sobre la velocidad específica de producción de CO₂ a velocidades específicas de consumo de glucosa constantes. Con lo anterior, se sugirió que el estrés mecánico incrementó los requerimientos metabólicos del hongo para fines de mantenimiento, lo cual correlacionó con la pérdida de viabilidad y esporulación a niveles altos de EDCF. La productividad específica mostró una relación en forma de campana respecto a la EDCF, la explicación fue que a niveles bajos (entre 3 y 10 kW/m³s) se minimizaron las limitaciones nutricionales y a niveles altos (después de 20 kW/m³s) el estrés hidrodinámico impuesto afectó negativamente a la biosíntesis de 6PP.

2.5 Efecto de los parámetros de cultivo sobre la producción de lacasas

La producción eficiente de lacasas involucra la combinación de factores como: una cepa altamente productiva, un medio de cultivo adecuado y el uso de inductores; asimismo, es importante la selección del tipo de cultivo y de diseño del biorreactor.

Existen diversos reportes donde se habla de la influencia que ejercen la agitación y la aireación sobre la producción de lacasas por diferentes cepas de hongos en cultivo sumergido; no obstante, al evaluar el efecto de la agitación se ha llegado a conclusiones muy contrastantes que no permiten esclarecer el papel de este parámetro en la producción. Por un lado, hay quienes afirman que los altos esfuerzos de corte generados por la agitación son los responsables de la baja producción de lacasas (Hess *et al.*, 2002; Fenice *et al.*, 2003; Silvério *et al.*, 2012); por otro lado, se ha reportado que la producción de lacasas no se ve afectada por la agitación (Tavares *et al.*, 2006; Babic y Pavko, 2011) y, finalmente otros observaron que la producción de lacasas se ve afectada por la agitación siguiendo una relación tipo campana indicando una estimulación a baja agitación y una represión a alta agitación (Birhanli y Yesilada, 2010). A continuación se hablará de algunos de esos estudios.

Fenice *et al.* (2003) evaluaron el efecto de la agitación y de la aireación sobre la producción de lacasas en fermentaciones de estado líquido cultivando el hongo *Panus tigrinus* CBS 577.79. El estudio del efecto de la agitación se llevó a cabo en reactores de 2 L, utilizando 2 impulsores Rushton y variando sus velocidades desde 250 hasta 750 rpm a un flujo de aireación de 1 vvm; mientras que el efecto de la aireación se estudió variando el flujo de aireación de 0.5 a 1.5 vvm, manteniendo la velocidad del impulsor a 500 rpm. En este trabajo se observó que al aumentar la velocidad de agitación se habían alcanzado actividades enzimáticas menores y se sugirió que probablemente se había debido al incremento del esfuerzo de corte sufrido por el microorganismo sin tomar en cuenta los efectos en la transferencia de oxígeno. Por otro lado, en la evaluación del efecto de aireación se observó que el aumento en los flujos de aireación de 1 a 1.5 vvm afectaba negativamente la actividad de las lacasas.

En el 2006, Tavares *et al.* realizaron un diseño experimental donde aplicaron metodologías de superficie de respuesta para optimizar la producción de lacasas por *Trametes versicolor* en biorreactor. Los parámetros evaluados fueron la velocidad de agitación (100 y 180 rpm), el pH (3 y 5) y la concentración de glucosa (0 y 9 g/L). En este estudio, la velocidad de agitación no representó efecto alguno sobre la actividad máxima de lacasas mientras que el pH del medio resultó ser el factor más importante, seguido por la concentración de glucosa.

Durante un estudio en cultivos en lote de *Trametes versicolor* ATCC 200801, Birhanli y Yesilada (2010) describieron un efecto de tipo campana en la producción de lacasas por parte de la velocidad de agitación. Durante este estudio también se encontró que tanto el tiempo de retención del cultivo en lote repetido, la temperatura, el pH y la cantidad de *pellets*, fueron importantes para la producción de

lacasas. Las condiciones de agitación evaluadas fueron de 0 a 250 rpm; la mayor actividad lacasa fue obtenida a 150 rpm, mientras que esta producción disminuyó a velocidades de agitación más bajas (0, 50 y 100 rpm) y más altas (200 y 250 rpm). La disminución en la actividad de las lacasas por arriba de 150 rpm fue atribuida a los esfuerzos de corte sobre los *pellets* por las altas velocidades de agitación sin tomar en cuenta los perfiles de oxígeno disuelto generados en esas condiciones hidrodinámicas.

En general, a pesar de los efectos contradictorios reportados en la literatura, se ha aceptado que los esfuerzos de corte generados por los impulsores afectan negativamente la producción de lacasas por hongos superiores (Couto y Toca-Herrera, 2007). Sin embargo, como ya se había mencionado en los estudios arriba citados, no se logró disociar la influencia de la agitación de los efectos de la concentración de oxígeno disuelto, para lograr un mayor entendimiento de los efectos del estrés hidrodinámico sobre el crecimiento y la producción de lacasas.

2.6 Escalamiento de procesos de cultivo sumergido

Las características morfológicas de los *pellets* (área proyectada promedio, diámetro, longitud, circularidad y porosidad, entre otros) han sido correlacionadas con diversos parámetros de operación del biorreactor para su escalamiento. El parámetro más utilizado es la potencia volumétrica suministrada (P/V) (Charles, 1985). La potencia volumétrica supone una disipación homogénea y constante de la energía en todo el tanque e integra en un solo parámetro la velocidad de agitación, el volumen de trabajo, la geometría, el diámetro y número de impulsores, entre otros. Sin embargo, la relación obtenida entre morfología micelar y P/V sólo es válida en la escala de estudio (Jüsten *et al.*, 1996).

Dada la dificultad para establecer una relación entre la potencia volumétrica y la morfología micelar observada en diferentes escalas de trabajo, diferentes grupos han empleado la relación entre la energía disipada en el caldo y el tiempo de circulación (EDCF; “energy dissipation/circulation function” por sus siglas en inglés) para relacionar otros parámetros biológicos, además de la morfología micelar, con las condiciones operacionales de un biorreactor. Esta velocidad de disipación de energía (EDCF) se refiere a la energía que es entregada al caldo de cultivo en las zonas cercanas al barrido de los impulsores en un tiempo dado, es decir, la frecuencia con la que pasan las formas miceliales a través de las zonas de máxima disipación de energía que se encuentran en la zona del impulsor. La EDCF está dada por:

$$EDCF = \frac{P}{kD^3} \times \frac{1}{t_c} \quad \text{Ec. 4}$$

donde $P/(k \cdot D^3)$ es la energía específica de disipación en la zona de barrido del impulsor (kW/m^3), P es la potencia suministrada (kW), D es el diámetro del impulsor (m), k es una constante que depende de la geometría del impulsor [adimensional] y $1/t_c$ es la frecuencia de circulación del microorganismo por la zona del impulsor (s^{-1}), definida como:

$$\frac{1}{t_c} = \frac{Fl_g \times N \times D^3}{V_L} \quad \text{Ec. 5}$$

donde Fl_g es el número de flujo gaseado (adimensional), N es la velocidad de agitación (s^{-1}) y V_L es el volumen del líquido (m^3). La estrecha correlación observada entre el tamaño miceliar y la EDCF observada por Jüsten *et al.* (1996) sugiere que, efectivamente, la fragmentación de las hifas no sólo depende de la energía suministrada, sino también de la frecuencia a la que el micelio está expuesto a un alto nivel de estrés mecánico.

En cultivos de *P. chrysogenum*, Smith *et al.* (1990) demostraron que la velocidad de producción de penicilina está en función de la EDCF, independientemente de la escala de trabajo utilizada (10 y 100 L). Resultados similares fueron reportados por Makagiansar *et al.* (1993) en cultivos de *P. chrysogenum* donde la longitud promedio de las hifas y la productividad específica de penicilina fueron función de la EDCF al trabajar con biorreactores de 5, 100 y 1000 L.

Por su parte, Jüsten *et al.* (1998) observaron que, además del área proyectada promedio, la velocidad específica de crecimiento y la productividad específica de penicilina fueron función de la EDCF en cultivos de *P. chrysogenum* desarrollados a diferentes velocidades de agitación y con tres geometrías distintas de impulsores (paletas planas, turbinas Rushton y paletas inclinadas).

En nuestro grupo de investigación se ha estudiado el efecto de la EDCF sobre la morfología, el crecimiento y la producción de 6-pentil- α -pirona en cultivos de *Trichoderma harzianum*, bajo condiciones no limitantes de oxígeno disuelto. Este estudio se llevó a cabo en un biorreactor diseñado para controlar, de manera rigurosa e individual, la concentración de oxígeno disuelto y la energía suministrada, independientemente de los cambios reológicos y del consumo de oxígeno generado por el aumento gradual en la biomasa y de la morfología desarrollada durante los cultivos (Rocha-Valadez *et al.*, 2007a). Dichos estudios demostraron que es posible controlar, a través de la EDCF, la velocidad de crecimiento y la productividad del proceso (Rocha-Valadez *et al.*, 2005), así como la morfología de los agregados miceliar (Rocha Valadez *et al.*, 2007b).

El uso de la EDCF ha sido útil para establecer correlaciones entre la hidrodinámica y el crecimiento, la morfología y la productividad de cultivos de hongos inferiores. Sin embargo, no existen reportes a la fecha sobre el estudio independiente de los efectos hidrodinámicos y de oxígeno disuelto sobre la fisiología de hongos basidiomicetos cultivados en reactores agitados mecánicamente.

2.7 Estrés oxidativo en fermentaciones con hongos filamentosos

En procesos fermentativos aerobios se sabe que el oxígeno puede tener efectos tóxicos para el microorganismo a presiones parciales no muy por encima de la del aire (Onken *et al.*, 1989) provocando un estrés de tipo oxidativo. El estrés oxidativo se define como un estado donde existe un desbalance relativo dentro de las células entre la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y las defensas antioxidantes intracelulares por parte del microorganismo (Li *et al.*, 2009). Estas especies reactivas de oxígeno incluyen al radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y al radical hidroxilo (OH^{\bullet}) que pueden generarse durante el metabolismo celular normal o por las reacciones catalizadas por oxidasas que generan H_2O_2 . Entre los mecanismos de defensa enzimáticos contra el estrés oxidativo está la producción de enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), lacasas (LAC) y la glutatión peroxidasa (Sigler *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2012). Por otro lado, se sabe que en hongos el nivel de las ROS y la detoxificación de xenobióticos puede controlarse por el glutatión a través del balance GSH/GSSG, que es una relación entre el glutatión en su forma reducida y oxidada (Penninckx *et al.*, 2000; Ye *et al.*, 2000).

2.7.1 Vías respiratorias alternas en respuesta a estrés oxidativo

El desbalance que se da cuando los niveles de ROS exceden la capacidad antioxidante de las células tiene efectos negativos que se reflejan en el crecimiento del hongo, en la velocidad de consumo de sustrato, en el bajo contenido de proteínas y el bajo contenido de ATP. Una explicación acerca de estos efectos es el involucramiento de vías respiratorias alternas que disminuyen la producción de ROS a expensas de la generación de ATP debido a que no generan bombeo de protones (Li *et al.*, 2011).

Estas vías involucran enzimas alternativas como las NADH deshidrogenasas y una oxidasa alternativa (AOX) que actúan en la cadena respiratoria a nivel de citocromos. Se sabe que las NADH deshidrogenasas transfieren el electrón del NADH directamente a la ubiquinona, eliminando el bombeo de protones hacia el exterior de la matriz mitocondrial. Del mismo modo AOX transfiere electrones desde el ubiquinol hasta el aceptor final O_2 sin la translocación de protones hacia la matriz mitocondrial. En estos casos la energía no se conserva sino que se disipa en forma de calor (Moore *et al.*, 2002).

En trabajos previos se ha demostrado que bajo condiciones de estrés oxidativo, sobre todo en procesos con elevado oxígeno disuelto (TOD) llevados a cabo por el enriquecimiento del aire con oxígeno en cultivos sumergidos, la actividad de las NADH deshidrogenasas alternativas sufre un incremento (Bai *et al.*, 2003a). En un estudio realizado en *Aspergillus niger* con aire enriquecido por O_2 (Bai *et al.*, 2003b) se encontró la disminución en la generación del radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) con respecto a un control con aire, y se comprobó que esta disminución en $O_2^{\bullet-}$ se debió al incremento en la actividad

de una NADH deshidrogenasa alternativa. Esta propuesta ha sido apoyada por estudios en otros grupos de trabajo donde se ha sugerido que, bajo estrés oxidativo, los hongos filamentosos regulan el transporte de electrones para favorecer el flujo hacia la vía respiratoria alternativa, reduciendo la generación de ROS (Voulgaris *et al.*, 2012; Kafaffa *et al.*, 2001; Bai *et al.*, 2003b; Zhao *et al.*, 2009).

2.7.2 Papel de las lacasas en el mecanismo de defensa de enzimas antioxidantes

En años recientes se ha resaltado el importante papel de las lacasas en la defensa contra el estrés oxidativo en hongos, ya que se ha visto que el estrés oxidativo puede inducir la expresión de enzimas ligninolíticas en algunos basidiomicetos como *Phanerochaete chrysosporium* (Belinky *et al.*, 2003), *Trametes versicolor* y *Abortiporus biennis* (Jaszek *et al.*, 2006) y *Coriolus versicolor* (Zhao *et al.*, 2009).

Existe un trabajo realizado con *Trametes versicolor* (Jaszek *et al.*, 2006) donde se confirmó la participación de las lacasas en la respuesta adaptativa al estrés oxidativo. El estudio se llevó a cabo a través de la inducción de estrés oxidativo y se evaluó la producción de lacasas y otras enzimas involucradas en el mecanismo de defensa antioxidante como SOD y CAT. El estrés oxidativo fue inducido por medio de Paraquat (PQ), una sustancia que cataliza la sobreproducción de radicales aniónicos superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y en consecuencia de otras ROS generadas por las reacciones de Fenton (Goldstein *et al.*, 2002). Lo que se observó en los tratamientos con PQ fue un incremento significativo en la actividad LAC, SOD, CAT y la disminución de la forma reducida del glutatión (GSH) y de los aniones superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Además, se observó una disminución significativa en el peso seco del micelio, lo cual implicó un incremento en el rendimiento de la enzima LAC con base en biomasa. A partir de este trabajo se propuso un mecanismo en que la SOD, al catalizar la dismutación de $O_2^{\bullet-}$ a O_2 y H_2O_2 , estimula la actividad LAC al proporcionar oxígeno como aceptor de electrones en la reacción de oxidación y además estimula la actividad CAT al liberar peróxido de hidrógeno.

Sin embargo, a pesar de tener evidencias de la participación de las lacasas en el mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo, hasta hace algunos años se desconocía si las lacasas realmente tenían un papel en la disminución de especies reactivas de oxígeno. Fue a partir de un trabajo con *Picchia pastoris* (Yang *et al.*, 2012), donde se descubrió que, bajo estrés oxidativo causado por H_2O_2 , la estimulación en la expresión del gen de lacasa a su vez estimula la transcripción de otro gen (*PpYAPI*) involucrado en el sistema antioxidante basado en glutatión. Esto significa que la producción de lacasas repercute de manera importante en el mecanismo de disminución de ROS basado en glutatión.

2.8 Antecedentes en el grupo de investigación

La producción de lacasas por el hongo *P. ostreatus* CP50 ha sido objeto de estudio de nuestro grupo de investigación durante los últimos años. En el proyecto previo “Estudio de la producción y de la transcripción génica de lacasas de *Pleurotus ostreatus* como respuesta al uso de cobre y/o lignina y de las condiciones de proceso” (Yáñez, 2012) se demostró que *P. ostreatus* CP50 produce dos isoenzimas de forma constitutiva bajo las condiciones de cultivo evaluadas: POXC y POX3. Mientras que la actividad volumétrica lacasa y transcripción génica del gen *poxc* se incrementaron en cultivos adicionados con sulfato de cobre (utilizado como inductor), la transcripción de *pox3* no se vio afectada.

Por otra parte, existe un estudio reciente del efecto de las condiciones hidrodinámicas sobre el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* y la producción de lacasas en fermentadores de 10 L a diferentes velocidades de disipación de energía (EDCF) iniciales y flujos de aireación (AFR), sin control de la concentración de oxígeno disuelto (Tinoco *et al.*, 2014). De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, en un rango de EDCF inicial entre 0.94 kW/m³s (147 rpm) y 5.94 kW/m³s (233 rpm) y de flujo de aireación entre 0.1 y 0.5 vvm, tanto la EDCF como AFR tienen un efecto positivo sobre la velocidad específica de crecimiento (μ) y sobre la concentración máxima de biomasa (X_{\max}). Sin embargo, se observa un efecto negativo sobre la producción asociada al crecimiento (α) y sobre la actividad lacasa máxima (Lac_{\max}).

A altas velocidades de agitación y de aireación se favorece el crecimiento del hongo, y esto tiene sentido si se toma en cuenta que al incrementar ambos parámetros existe una mayor concentración de oxígeno disuelto y una mayor disponibilidad de nutrientes en el caldo de la fermentación; además, el estrés hidrodinámico generado bajo esas condiciones difícilmente afecta a la viabilidad de las células. No obstante, el efecto sobre la producción de lacasas fue el opuesto al observado sobre el crecimiento, y el análisis estadístico indicó que el factor con mayor efecto sobre α fue la EDCF. Resultaría delicado atribuir el efecto de la EDCF sólo al estrés hidrodinámico ya que en realidad en el trabajo citado no se separó el efecto que ejerce la agitación sobre la transferencia de oxígeno puesto que no se controló la tensión de oxígeno disuelto (TOD).

Además, al analizar los perfiles de TOD desarrollados durante cada condición evaluada (Fig. 2.3), puede apreciarse que en aquella condición en la que se favorece la producción de lacasas (baja EDCF y bajo AFR) la concentración de oxígeno disminuye a mayor velocidad que a las condiciones opuestas, de alta EDCF y alto AFR, donde la concentración de oxígeno disuelto disminuye a una velocidad muy lenta durante las primeras 36 h de cultivo. Es posible que la producción de lacasas dependa más de la concentración de oxígeno disuelto en el medio que del estrés hidrodinámico que repercute en un daño celular.

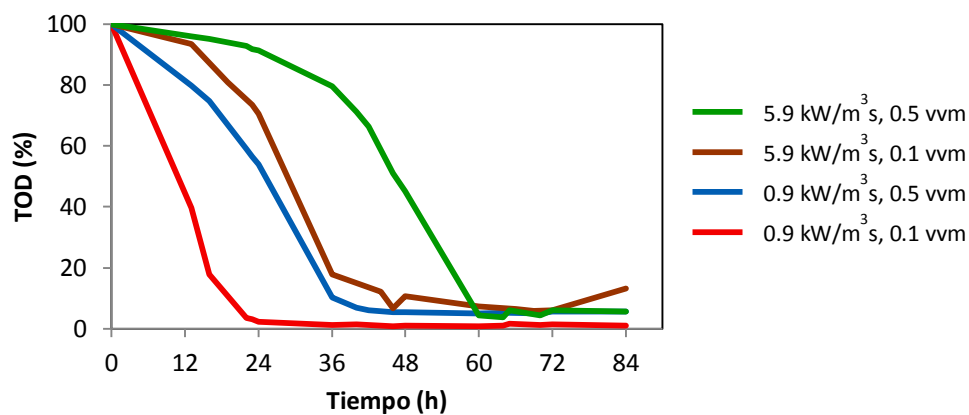


Fig. 2.3 Perfiles de oxígeno disuelto desarrollados durante las fermentaciones con *P. ostreatus* CP50 a diferentes condiciones de AFR y EDCF inicial (dato no publicado del trabajo de Tinoco *et al.*, 2014).

Para lograr un estudio más concluyente es necesario controlar de manera independiente la concentración de oxígeno disuelto y la EDCF, para poder evaluar sus efectos sobre la producción de las lacasas, independientemente de los cambios reológicos y del consumo de oxígeno generado por el aumento gradual de la biomasa y de la morfología filamentosa desarrollada.

3. HIPÓTESIS

En cultivos sumergidos agitados mecánicamente la concentración de oxígeno disuelto en el medio, y no el estrés hidrodinámico, es el factor con mayor influencia en la producción de lacasas por el hongo *Pleurotus ostreatus* CP50.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Estudiar de manera independiente el efecto del estrés hidrodinámico y de la concentración de oxígeno disuelto sobre el crecimiento, morfología, expresión génica y la producción de lacasas de *Pleurotus ostreatus* CP50 en fermentadores agitados mecánicamente.

4.2 Objetivos específicos

- Estudiar los efectos independientes de la energía específica de disipación (EDCF) y del oxígeno disuelto sobre el crecimiento, la morfología y la producción de lacasas en cultivos de *Pleurotus ostreatus* CP50.
- Estudiar el efecto de la energía específica de disipación (EDCF) y del oxígeno disuelto sobre la expresión de los genes *poxc* y *pox3*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Microorganismo

La cepa a utilizar, *Pleurotus ostreatus* CP50, fue proporcionada por el Dr. Daniel Martínez del Colegio de Posgraduados, Unidad Puebla y es preservada en caja de Petri en medio de agar y extracto de malta al 2%.

Para preservarla, se siembra aproximadamente 1 cm² del medio con la cepa a otra caja con medio fresco y se incuba durante 7 días a 29°C en la oscuridad.

5.1.2 Cultivo de *Pleurotus ostreatus*

5.1.2.1 Precultivo

El precultivo se realiza en matraces Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 100 mL de medio con extracto de malta al 2%, extracto de levadura al 1% y glucosa al 1%, a pH 6. Para preparar el precultivo, se corta 1 cm² de agar con el hongo crecido durante 7 días a 29°C por cada matraz a inocular y se homogeniza con 10 mL de medio estéril en un molino estéril a 30,000 rpm durante 12 s. De la suspensión de micelio obtenida, se inoculan 10 mL en cada uno de los matraces conteniendo 90 mL de medio para completar un volumen final de 100 mL. Posteriormente los matraces se incuban a 30°C y 150 rpm durante 4 días en una incubadora orbital.

5.1.2.2 Medio de cultivo y condiciones de la fermentación

El medio de cultivo está constituido por extracto de malta (20 g/L), extracto de levadura (10 g/L) y glucosa (10 g/L) y las condiciones de la fermentación fueron las siguientes: temperatura de 30°C, control a pH 6 por adición automática de H₃PO₄ (0.2 N) y un flujo de aireación de 0.5 vvm. Los componentes del medio de cultivo se disolvieron en agua destilada y se ajustó el pH a 6 con NaOH (2N). El medio preparado se vertió en el reactor y se esterilizó en autoclave a 121°C por 40 min. Finalmente el medio de cultivo se inoculó con 300 mL (correspondiente a tres matraces) del precultivo.

5.2 Fermentaciones

5.2.1 Características del biorreactor

Los cultivos se realizaron en un biorreactor de 14 L, modelo Microferm (New Brunswick Scientific) con las siguientes características: altura, 45 cm; diámetro interno, 21 cm y 4 mamparas de 2.1 cm de ancho. Se utilizó un arreglo de 3 turbinas Rushton, con una relación diámetro de impulsor/diámetro de jarra (D/T) DE 1/2. La separación entre impulsores fue de 1/3 del diámetro del tanque (T). El difusor consistió en un anillo con 14 orificios de aproximadamente 0.6 mm de diámetro.

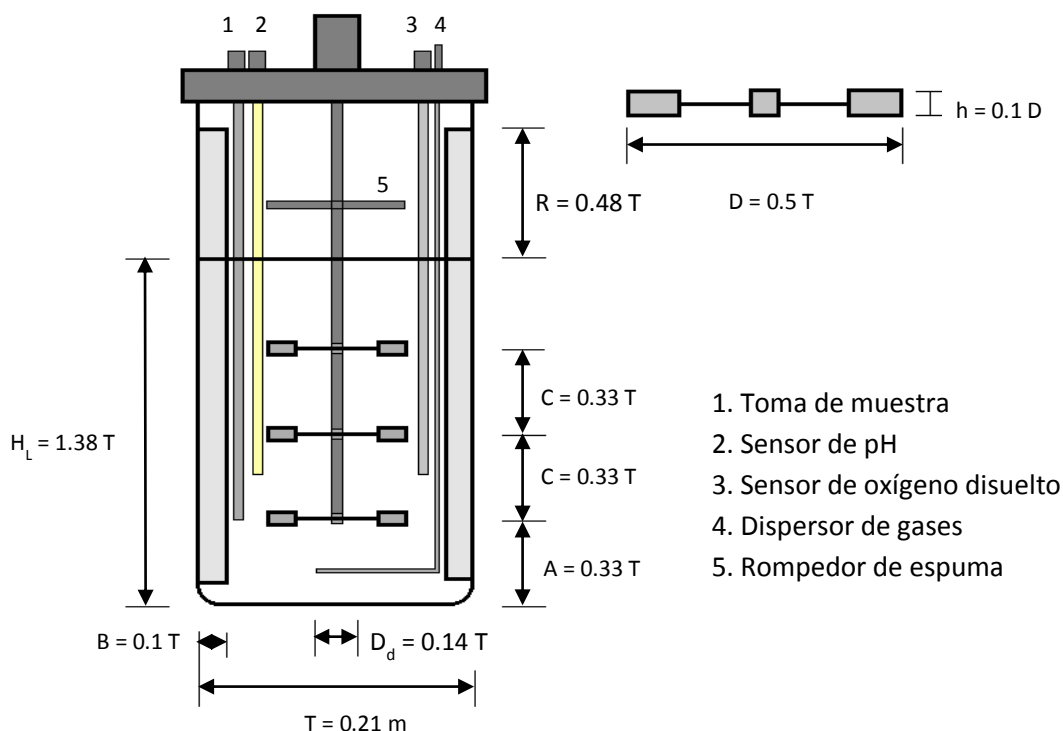


Fig. 5.1 Diagrama del biorreactor y turbina Rushton utilizados en las fermentaciones.

El oxígeno disuelto (TOD) y el pH se monitorearon mediante un electrodo polarográfico y uno de cristal, respectivamente (Ingold Electrodes Inc., USA) conectados a un amplificador de TOD y a un transmisor/controlador de pH (modelo 170 y 2300). La TOD se mantuvo controlada mediante un algoritmo convencional PID (proporcional-integral-derivativo) llevando a cabo una manipulación en la composición de los gases de entrada (modificando los flujos individuales de aire, oxígeno y nitrógeno mediante controladores de flujo másico: Brooks Instrument Div.) pero manteniendo un flujo total constante de 0.5 vvm. El control de la TOD permitió mantener una independencia con respecto a la velocidad de agitación y a la aireación; de este modo la concentración de oxígeno en el medio no estuvo influenciada por los cambios reológicos e hidrodinámicos suscitados en el cultivo. El control de pH se logró mediante la adición automática de H_3PO_4 (0.2 N) con una bomba peristáltica, utilizando

un sistema “On/Off” del mismo transmisor/controlador. Para el control de espuma se utilizó un sensor de nivel por conductividad, acoplado a un controlador New Brunswick (modelo 2300) que accionó el bombeo de una suspensión de antiespumante AF al 30% (Dow Corning).

La medición de torque en línea se llevó a cabo mediante un torquímetro de celda de carga Himmelstein (S. Himmelstein and Co., modelo 66032) montado sobre la flecha de agitación y la velocidad de giro de la flecha fue medida a través de un tacómetro. El consumo de potencia se calcula a partir de los valores de torque y velocidad de agitación (Ec. 6).

$$P = 2 \times \pi \times N \times (M - M_0) \quad \text{Ec. 6}$$

Donde P es la potencia entregada al caldo de cultivo (W), N es la velocidad de agitación (rps), M es la lectura de torque durante la fermentación (N·m) y M_0 es la lectura del torque debido a la fricción del sello mecánico y los rodamientos de la tapa del tanque (N·m), el cual se determinó drenando el medio de fermentación y operando el sistema al vacío, pero a las condiciones reales de operación durante 2 a 3 h. El sistema permitió mantener constante el suministro de potencia manipulando la velocidad de agitación con un motor acoplado a un tacómetro. Así pues, el sistema permite monitorear y controlar en línea la energía suministrada a un biorreactor piloto (14 L), independientemente de los cambios reológicos en el medio de fermentación.

Para medir la concentración de CO_2 y O_2 en el gas de salida, se utilizó un analizador de gases (Innova AirTech Instruments). Las señales amplificadas (TOD, pH, CO_2 y O_2), así como la obtenida por el torquímetro y el tacómetro, fueron adquiridas y almacenadas en una computadora provista con tarjetas de adquisición de datos (National Instruments, PC-AO-2DC). El software se diseñó utilizando un ambiente *Lab View* versión académica que permitió la adquisición, el almacenamiento, procesamiento y control de los parámetros mencionados.

5.2.2 Estimación de la EDCF

La estimación de la función de disipación/circulación de energía (EDCF, Ec. 4) se llevó a cabo como se ha reportado previamente (Rocha-Valadez *et al.*, 2005). La velocidad específica de disipación de energía en el volumen de barrido del impulsor (P/kD^3) se determinó con las mediciones de la potencia gaseada suministrada, el diámetro del impulsor y el factor geométrico k (relación altura del aspa/diámetro del impulsor, Ec. 7). El suministro de la potencia gaseada y no gaseada se determinó dividiendo la potencia total suministrada entre los tres impulsores; con estos datos se calcularon los números de potencia gaseada (P_{0G}) y no gaseada (P_0) (determinados a través de $P = P_0 \cdot \rho \cdot N^3 \cdot D^5$). Ambos números de potencia y el número de flujo no gaseado (Fl , Ec. 9) se utilizaron para determinar el número de flujo gaseado (Fl_G , Ec. 8). El tiempo de circulación gaseado (t_c , Ec. 5) se calculó usando el diámetro del impulsor, el número de flujo gaseado (Fl_G , Ec. 8), la velocidad de agitación (N) y el

volumen del líquido (V_L) en cada región del impulsor. V_L se determinó al dividir el volumen total de trabajo (10 L) entre el número de impulsores utilizados (3).

$$EDCF = (P/kD^3)(1/t_c) \quad \text{Ec. 4}$$

$$1/t_c = (Fl_g \times N \times D^3)/V_L \quad \text{Ec. 5}$$

$$k = (\pi/4)(W/D) \quad \text{Ec. 7}$$

$$Fl_G = Fl(P_{0G}/P_0) \quad \text{Ec. 8}$$

$$Fl = (0.91 \cdot P_0 \cdot (W/D)^{0.5}) \quad \text{Ec. 9}$$

La evaluación de EDCF se llevó a cabo a través del control de la potencia volumétrica disipada en la zona que rodea a los impulsores (P/kD^3) equivalente a la EDCF del inicio de la fermentación. Lo anterior se realizó controlando la potencia (P) a través del mantenimiento del torque (M) a un valor constante a través de la variación de la velocidad de agitación (N) de acuerdo a la ecuación (6). Tanto k como D son constantes conocidas.

5.3 Métodos analíticos

5.3.1 Cuantificación de biomasa

La evaluación del crecimiento miceliar se llevó a cabo a través de una técnica gravimétrica determinando la concentración de biomasa por peso seco, tomando muestras cada 12 horas. El micelio contenido en 50 mL de caldo de cultivo se filtró al vacío en papel Whatman No.1 previamente secado a peso constante (70°C, por 24 h) y tarado. Las muestras se lavaron con agua destilada y se secaron en el horno a 70°C hasta alcanzar un peso constante (24 h) y se pesaron. La concentración de la biomasa se calculó mediante la diferencia de pesos y se indica en g de biomasa por L de medio de cultivo (g/L).

5.3.2 Determinación de actividad lacasa

La actividad lacasa se determinó midiendo la oxidación del sustrato ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico) por espectrofotometría mediante el incremento de la absorbancia a 436 nm ($\epsilon_{436} = 29\,300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Tinoco *et al.*, 2011). Previo a la determinación, las muestras se centrifugaron a 12 000 rpm durante 5 min y se tomó el sobrenadante. La mezcla de la reacción consiste en una solución 1 mM de ABTS en amortiguador de acetatos (pH 3.6, 100 mM) y alícuotas (5 a 100 μL) del sobrenadante de la muestra a un volumen total de 1 mL. Una unidad de actividad lacasa se definió como la cantidad de enzima que oxidó 1 μmol de ABTS por minuto a 25°C bajo las condiciones de reacción. La actividad lacasa se determinó por triplicado cada 12 h.

5.3.3 Determinación de actividad proteasa

La actividad proteasa se determinó midiendo la hidrólisis del sustrato azoalbúmina (Sigma) por espectrofotometría mediante el incremento en la absorbancia a 440 nm (Faraco *et al.*, 2005). Tras centrifugar la muestra a 12,000 rpm durante 5 minutos, se tomaron 250 μL del sobrenadante y se incubaron a 37°C por 30 min con 400 μL de una solución patrón de azoalbúmina (15 mg/mL en amortiguador MOPS 50 mM, pH 7.0). La reacción se frenó al añadir 650 μL de ácido tricloroacético al 20% (w/v); el sustrato no digerido se precipitó y fue removido por centrifugación a 10,000 rpm por 15 min. Se tomaron 650 μL del sobrenadante y se le añadieron 350 μL de NaOH 10 M. Finalmente se leyó la absorbancia a 440 nm. El ensayo control se realizó con medio de cultivo estéril con la misma concentración utilizada para las fermentaciones y se utilizó como referencia. Una unidad de actividad enzimática se definió como los μg de azoalbúmina hidrolizados por minuto, tras haber realizado una curva de absorbancia de azoalbúmina a distintas concentraciones conocidas.

5.3.4 Determinación del consumo de sustrato

El consumo de sustrato se determinó a través de la concentración de glucosa en el caldo de cultivo cada 12 h por HPLC. Se utilizó una columna Aminex, a la cual se inyectaron 20 μL de muestra, utilizando H_2SO_4 5 mM como fase móvil con un flujo de 0.6 mL/min y una presión de 650 psi. La temperatura de la columna, así como la del detector se mantuvo a 40°C y se dio un tiempo de corrida de 12 min. El cálculo de la concentración de glucosa se hizo por medio de una curva patrón de glucosa a través de la relación de áreas en el cromatograma obtenido.

5.3.5 Cálculo de la constante k_p asociada al crecimiento

La velocidad de crecimiento se determinó de acuerdo al modelo de la raíz cúbica. Este modelo ha sido utilizado para describir las cinéticas de crecimiento de hongos filamentosos que se desarrollan en *pellets* dado que su crecimiento no es exponencial porque se limita al crecimiento en la cubierta exterior del mismo (Prosser y Tough, 1991; Nielsen, 1996; Emerson, 1950; Marshall y Alexander, 1960; Kelly *et al.*, 2006).

El modelo de la raíz cúbica es el siguiente:

$$m^{1/3} = k_p t + m_0^{1/3} \quad \text{Ec. 10}$$

$$k_p = \left(\frac{4}{3} \pi \rho n \right)^{1/3} \mu w \quad \text{Ec. 11}$$

donde m es la masa del *pellet* y m_0 es la masa del *pellet* al tiempo $t = 0$. El parámetro cinético k_p se relaciona directamente con la velocidad de crecimiento radial y está en función del grosor de la capa externa del *pellet* (w), de su densidad (ρ), de la velocidad específica de crecimiento de las células que se encuentran dentro del *pellet* (μ) y del número de *pellets* (n).

Así la velocidad de crecimiento radial de los *pellets* estará dada por:

$$\frac{dr}{dt} = \mu w \quad \text{Ec. 12}$$

que al integrarse queda de la siguiente manera:

$$r = \mu w t + r_0 \quad \text{Ec. 13}$$

donde r es el radio del *pellet*.

5.3.6 Cálculo del coeficiente de producción de lacasas asociada al crecimiento

Para la descripción de las cinéticas de formación de producto se utilizó el modelo de Luedeking-Piret:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad \text{Ec. 14}$$

Donde dP/dt es la velocidad de producción de lacasas ($U/(L \cdot h)$), α es el coeficiente de la producción asociada al crecimiento (U/g_x) y β es el coeficiente de la producción no asociada al crecimiento ($U/h \cdot g_x$)

Para la producción de lacasas la ecuación anterior se integra y se sustituye la ecuación de la raíz cúbica para dX/dt quedando una ecuación con dos condiciones iniciales (X_0 y P_0) y tres parámetros (k_p , α y β):

$$P(t) = P_0 + \alpha \left((x_0^{1/3} + k_p t)^3 - x_0 \right) + \beta (x_0^{1/3} + k_p t)^3 \quad \text{Ec. 15}$$

donde P_0 es la actividad volumétrica inicial de la lacasa (U/L), $P(t)$ es la actividad volumétrica lacasa al tiempo t (U/L) y x_0 (g/L) es la concentración de biomasa inicial. Dado que la producción de la enzima está totalmente asociada al crecimiento el parámetro β tiene un valor de cero.

Entonces el parámetro α , que en realidad es la producción específica de lacasas (U/g_x), se determinó con la pendiente de $P(t) - P_0$ vs. $\left((x_0^{1/3} + k_p t)^3 - x_0 \right)$ (Fig. 5.2)

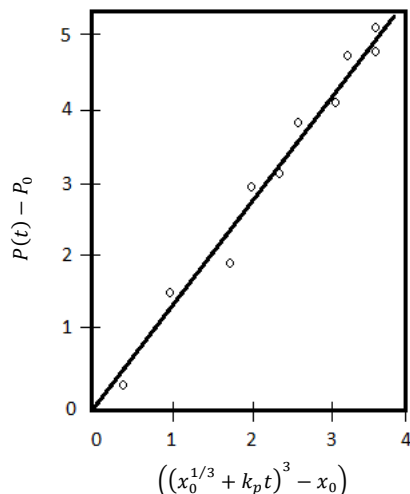


Fig. 5.2 Esquema de evaluación del coeficiente α del modelo de Luedeking-Piret $P(t) - P_0$ vs. $((x_0^{1/3} + k_p t)^3 - x_0)$

5.3.7 Electroforesis nativa

La electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones nativas se realizó mediante el método descrito por Laemmli (1970). Se utilizaron geles de acrilamida con un grosor de 0.75 mm y una concentración de 4 y 12% para el gel concentrador y separador, respectivamente. La composición de ambos geles se indica en la tabla 5.1.

	Gel separador (12%)	Gel concentrador (4%)
Agua destilada	3.7 mL	3.7 mL
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	2.5 mL	-
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	-	0.5 mL
Acrilamida 30%	3.7 mL	0.66 mL
Persulfato de amonio	50 μ L	25 μ L
TEMED	5 μ L	5 μ L
Volumen total	10.015 mL	4.908 mL

Tabla 5.1 Composición de los geles de poliacrilamida para la electroforesis nativa.

Para cargarse en los pozos, las muestras se prepararon con 10 μ L del sobrenadante obtenido, después de la centrifugación de la biomasa, del caldo de la fermentación y 5 μ L del amortiguador de carga, cargándose en cada pozo un total de 15 μ L. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara mini-protean Bio-Rad a un voltaje constante de 120 V, en amortiguador de Tris-Glicina pH 8.3 (25 mM Tris, 0.2 M Glicina). El amortiguador de carga tiene una composición de Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, glicerol 30%, azul de bromofenol 0.01% (w/v). El revelado del gel se realizó cubriéndolo con amortiguador de acetatos (pH 5, 100 mM) adicionando DMP (6 mM) para observar las bandas de actividad lacasa en los zimogramas.

5.3.8 Caracterización morfológica de los *pellets*

5.3.8.1 Determinación del diámetro promedio

Las características morfológicas de los *pellets* se evaluaron a través de un sistema de análisis de imágenes descrito previamente (Lucatero *et al.*, 2003). Esto permite generar información (parámetros morfológicos) de los agregados miceliarios a partir de imágenes procesadas digitalmente. El sistema consiste de una cámara CCD (Nikon KP-160) montada en un estereomicroscopio (Olympus SZ40). La cámara está conectada a una computadora y las imágenes se capturaron a través del programa Image Pro Plus v. 4.1 (Media Cybernetics, USA).

El parámetro morfológico a cuantificar fue el diámetro promedio de los *pellets* y se determinó a partir del diámetro de las longitudes de una serie de 180 trazos a través del centro de gravedad del *pellet*.

Se analizaron 200 objetos por muestra de cada 24 horas. En casi todos los casos se obtuvieron curvas de distribución normal al evaluar el diámetro promedio de los agregados. Los valores tomados en cuenta para el modelo fueron las medias de los diámetros de los agregados a las 24 horas de cultivo.

La preparación de la muestra se realizó tomando 3 mL de biomasa fresca diluida en una fracción 1:1 con una solución fijadora de formalina (13 mL de formaldehído (40 w/v), 5 mL de ácido acético glacial y 200 mL de etanol (50% w/v); Packer y Thomas, 1990). Para hacer el análisis morfológico, la muestra se diluyó en una proporción 1:4 con agua destilada para evitar que los *pellets* se sobrepusieran y se colocó sobre una cámara para imágenes (CoverWell™, Grace Bio-labs). Se utilizó azul de metileno para obtener una coloración oscura del micelio y mejorar su contraste en el campo brillante de iluminación.

Los datos del diámetro promedio de los *pellets* utilizados para evaluar el efecto de la EDCF y TOD sobre el crecimiento del hongo y la producción de lacasa, fueron aquellos de las muestras de 24 h para asegurar que el cultivo se encontrara en la fase de crecimiento acelerada.

5.3.8.2 Determinación del diámetro crítico

El diámetro crítico de los *pellets* se determinó a través de la ecuación propuesta por Tramper y Van't Riet (1991).

$$D_{crit} = \sqrt{\frac{24 \times C_{O_2} \times D_{ef}}{R_{O_2}}} \quad \text{Ec. 1}$$

donde D_{crit} es el diámetro crítico de los *pellets* (m), C_{O_2} es la concentración de oxígeno en el seno del líquido (kgO_2/m^3), D_{ef} es la difusión efectiva del oxígeno en los *pellets* (m^2/s) y R_{O_2} es la velocidad de consumo de oxígeno por unidad de volumen ($kgO_2/(m^3s)$).

La concentración de oxígeno se obtuvo de la lectura del electrodo de oxígeno disuelto, mientras que D_{ef} se estimó por:

$$D_{ef} = \rho_{O_2} \times P \quad \text{Ec. 2}$$

donde ρ_{O_2} es el coeficiente de difusión molecular del oxígeno en agua ($9 \times 10^{-6} m^2/h$; Doran, 1995) y P es la porosidad de los *pellets* medida a través del análisis de imágenes por fluorescencia con FDA.

El cálculo de R_{O_2} se hizo a través de la siguiente ecuación:

$$R_{O_2} = q_{O_2} \times \rho \quad \text{Ec. 16}$$

donde q_{O_2} es la velocidad específica de consumo de oxígeno ($kgO_2/(kg_xh)$) y ρ es la densidad de los agregados (kg_x/m^3). El valor de q_{O_2} se calculó por un método dinámico que consistió en llevar a cabo una fermentación partiendo de micelio disperso (homogenizado previamente) con la finalidad de garantizar la inexistencia de limitaciones difusionales en las células. Durante la fase de crecimiento acelerado de la fermentación, se detuvo el flujo de aire y se tomó el tiempo en el que se consumió el oxígeno disuelto en el medio hasta que llegara a un valor de cero. Se determinó la concentración de biomasa presente al momento de la medición y se calculó la velocidad de consumo de oxígeno como lo reportaron Torres *et al.* (2008). Los cálculos se describen a continuación:

Se parte del balance de oxígeno durante la transferencia desde una burbuja de aire hacia el medio de cultivo y el consumo por la célula:

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a (C^* - C_L) - q_{O_2} X \quad \text{Ec. 17}$$

donde

$K_L a$: coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (h^{-1})

C^* : solubilidad del oxígeno en el medio (g/L)

C_L : concentración de oxígeno disuelto en el medio (g/L)

q_{O_2} : velocidad específica de consumo de oxígeno ($mmolO_2/g_xh$)

X : concentración de células secas en el medio (g/L)

Sin embargo, tras dividir ambos lados de la ecuación por C^* y simplificarla al suspender la aireación, la ecuación 17 queda de la siguiente manera:

$$\frac{d(C_L/C^*)}{dt} = -\frac{q_{O_2}X}{C^*} \quad \text{Ec. 18}$$

Que tras integrarse queda:

$$\frac{C_L}{C^*} = \frac{C_b}{C^*} - \frac{q_{O_2}X}{C^*} \times t \quad \text{Ec. 19}$$

El valor de la velocidad específica de consumo de oxígeno se obtiene tras graficar C_L/C^* vs tiempo y multiplicando la pendiente obtenida por la solubilidad del oxígeno disuelto en el medio a 30°C (C^* , 8.05 mg/L) y la concentración de biomasa (X , g/L) al momento de hacer la medición.

5.3.8.3 Determinación de la densidad de los *pellets*

La densidad de los agregados se calculó con base en el peso seco y en el volumen ocupado por una determinada cantidad de biomasa húmeda. El procedimiento consistió en hacer pasar el caldo de cultivo a través de un tamiz con tamaño de malla de 74 μm asegurando que no pasara la biomasa y recuperar la biomasa húmeda retenida. Se midió el volumen que ocupaba la biomasa húmeda y se filtró a vacío en papel Whatman No. 1 para determinar el peso seco de la muestra. La determinación del peso seco se hizo llevando las muestras a peso constante en un horno a 80°C. El cálculo realizado para determinar la densidad de los *pellets* consistió en la división del peso seco entre el volumen ocupado por la biomasa húmeda.

5.3.8.4 Cálculo del porcentaje de biomasa libre de limitación difusional de oxígeno

El porcentaje de la biomasa que teóricamente no estaría limitada por oxígeno se calculó tomando como referencia el diámetro crítico estimado para los *pellets* de las distintas condiciones. El cálculo se realizó de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$V_{act} [\%] = \frac{V_{activo}}{V_{total}} \cdot 100 \quad \text{Ec. 20}$$

$$V_{activo} = V_{total} - V_{inactivo} \quad \text{Ec. 21}$$

$$V_{activo} = \left(\frac{4}{3} \pi \cdot \left(\frac{D_{prom}}{2} \right)^3 \right) - \left(\frac{4}{3} \pi \cdot \left(\frac{D_{prom} - D_{crit}}{2} \right)^3 \right) \quad \text{Ec. 22}$$

donde D_{prom} es el diámetro del *pellet* determinado por medio del análisis de imágenes.

5.3.8.5 Determinación de la actividad metabólica de los *pellets*

Para medir la actividad metabólica de los *pellets* se llevó a cabo una técnica de tinción con diacetato de fluoresceína (FDA) como indicador de actividad esterasa. Se utilizó una solución Stock de 1mg/mL de FDA en solución con acetona que se almacenó protegida de la luz a -20°C . Para la solución de trabajo se diluyeron 10 μL de la solución stock en 990 μL de agua destilada; esta solución se preparó justo antes de realizar la tinción (Hassan *et al.*, 2002). La preparación de las muestras se llevó a cabo separando los *pellets* en grupos de diferente tamaño utilizando diversos tamices y resuspendiendo los *pellets* en solución salina (NaCl 0.9% w/v). Una vez separados, los *pellets* mayores a 1000 μm se partieron por la mitad con ayuda de un bisturí para evitar problemas de difusión del FDA en los agregados.

Durante la tinción por cada 100 μL de muestra del caldo de cultivo, se añaden 300 μL de la solución de trabajo y se agita por inversión suave durante 3 minutos para permitir que el sustrato difunda a través de los *pellets*. Se colocaron aproximadamente 100 μL de la muestra teñida en un cubreobjetos (24 x 40 mm), procurando que los *pellets* cortados se posicionaran con la cara plana hacia el vidrio del cubreobjetos, y se observaron con luz UV en un microscopio Zeiss LSM510 Meta Confocal Invertido. Se obtuvieron las imágenes y se analizaron por medio del programa Image J Fiji. La cuantificación de fluorescencia se llevó a cabo por la diferencia de intensidades después de binarizar las imágenes tomando el tono blanco como un 100% de actividad metabólica.

5.3.9 Extracción de ARN total y síntesis de ADNc

Las muestras del caldo de cultivo (15 mL) se recibieron en tubos que contenían 0.5 mL de RNA later (Ambion). Posteriormente se centrifugó la muestra a 10, 000 rpm a 4°C durante 10 minutos para recuperar el micelio y desechar el sobrenadante. Para su almacenamiento, se añadió a las muestras RNA later en aproximadamente tres veces el volumen del *pellet* de micelio contenido en los tubos. El micelio se resuspendió por agitación manual y se almacenó a -70°C hasta su posterior tratamiento.

Previo a la extracción de ARN, las muestras se centrifugaron para eliminar el exceso de RNA later a 10, 000 rpm a 4°C durante 10 minutos y el micelio se congeló y maceró con nitrógeno líquido en un mortero para lograr la ruptura celular. Enseguida se realizó la extracción de ARN total utilizando 1 mL de TRIzol Reagent® (Invitrogen) por aproximadamente cada 50 μL de micelio pulverizado, agitando por inversión durante 5 minutos y siguiendo el protocolo de PureLink™ RNA Mini Kit (Ambion). La integridad se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en amortiguador MAE; el criterio para determinar la integridad y la pureza del ARN fue la presencia de dos bandas bien definidas correspondientes al ARN ribosomal, que no presentaran barrido entre ellas y en una proporción aproximada 2:1 (28s:18s) (Fig 5.3). La concentración de RNA se determinó espectrofotométricamente midiendo absorbancia a 260 y a 280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo

scientific Whaltam, MA). Posteriormente las muestras se sometieron a tratamiento con DNasa I usando el kit Turbo-DNase free (Ambion). La primera cadena de ADNc se realizó a partir de 5 μg de ARN total utilizando el oligo dT y RevertAid™ Minus H First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas Life Science) de acuerdo al protocolo del fabricante. El ADNc obtenido se utilizó como templado para la reacción de PCR cuantitativo en tiempo real.

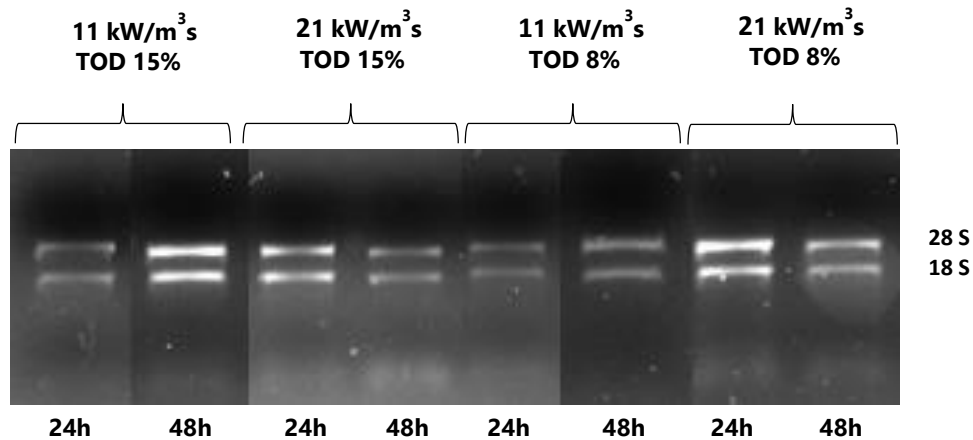


Fig. 5.3 Gel de agarosa al 1% con muestras de ARN total de cada condición, en los dos tiempos de muestreo (24 y 48 h). Se cargaron 2 μL de ARN total en cada pozo.

5.3.10 Cuantificación de la expresión génica en tiempo real por qPCR

Las reacciones de qPCR se realizaron en multicámaras de 96 pozos (MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems), en un termociclador ABI PRISM 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Las condiciones de los ciclos térmicos para todos los genes fueron de la siguiente manera: un paso inicial a 50°C por 2 min y a 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 s y 60°C por 1 min y finalmente un paso de disociación a 95°C por 15 s, a 60°C por 1 min, a 95°C por 15 s y a 60°C por 15 s.

Cada reacción consistió en 1 μL de mezcla equimolar (5 μM) de cada par de oligonucleótidos (sentido y antisentido), 50 ng de ADNc como templado y 6 μL de Maxima® SYBR Green/ROX Qpcr Master Mix 2X (Fermentas) en un volumen total de reacción de 10 μL . En todos los experimentos, por cada gen analizado se sometieron al mismo procedimiento controles negativos sin templado de ADNc (NTC) para excluir o detectar cualquier posible contaminación. La adquisición de datos se realizó mediante el programa SDS software (Applied Biosystems, Foster City, CA) y los valores para todos los genes aparecieron antes del ciclo 25. Todos los ensayos se hicieron por duplicado.

En el método reportado y validado previamente (Yáñez, 2012) se evaluó la eficiencia de la amplificación de los genes a estudiar, el rango dinámico de concentraciones de los transcritos y la

eficiencia del método de cuantificación. Durante la validación se obtuvieron valores muy cercanos al 100% en la eficiencia de la amplificación, un intervalo dinámico de 25 a 200 ng de ADNc y se aseguró que la eficiencia del gen problema y la del gen de referencia fueran aproximadamente iguales (Fig. 5.4).

Tabla 5.2 Eficiencias de amplificación de los genes β -*tub*, *poxc* y *pox3* (Tomado de Yáñez, 2012).

β - <i>tub</i>	<i>poxc</i>	<i>pox3</i>
m= -3.30	m= -3.26	m= -3.49
E = 100.09%	E = 102.6%	E = 93.8%

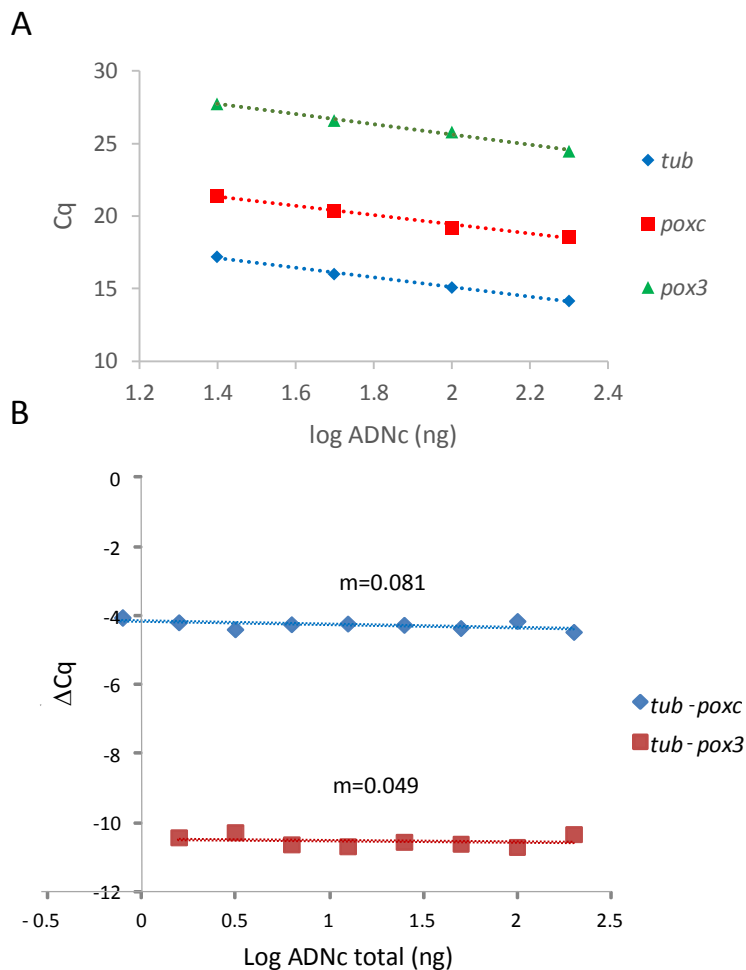


Fig. 5.4 A. Eficiencia de la amplificación de los transcritos mediante ajuste de mínimos cuadrados utilizando distintas concentraciones de cDNA y hallando un rango dinámico de 25 a 200 ng de cDNA para cada uno de los genes en el estudio: *tub* (◆), *poxc* (■) y *pox3* (▲). B. Curva de calibración del método Δ Cq para verificar que el rango dinámico de los genes problema y del gen de referencia fueran similares. Una pendiente menor a 0.1 fue el criterio para considerar válido el método de cuantificación; *tub-poxc* (◆) y *tub-pox3* (■) significan la resta del Cq del gen de referencia menos el Cq del gen problema en concentraciones de cDNA de 1 a 200 ng (Tomado de Yáñez, 2012).

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Debido a que el objetivo es estudiar el efecto de la agitación separando los efectos ocasionados por el estrés hidrodinámico de aquellos ocasionados por el incremento en la transferencia de oxígeno, para llevar a cabo los experimentos se utilizó el sistema de fermentación previamente descrito que permite controlar la EDCF y la TOD de manera independiente (Rocha-Valadez *et al.*, 2007a).

6.1. Diseño factorial 3^2 para el estudio del efecto de la EDCF y TOD sobre el crecimiento, la morfología y la producción de lacasas por *Pleurotus ostreatus* CP50

Se llevó a cabo un diseño experimental de 2 factores a 3 niveles (3^2) para analizar el efecto de la EDCF y la TOD sobre la constante asociada al crecimiento (k_p), el coeficiente de producción de lacasas asociada al crecimiento (α), la concentración de biomasa máxima ($X_{\text{máx}}$), la actividad lacasa máxima ($\text{Lac}_{\text{máx}}$) y el diámetro promedio de los *pellets* (D_{prom}) en un fermentador con volumen de trabajo de 10 L. En la tabla 6.1 se presentan los niveles de los factores incluidos en el diseño experimental.

Tabla 6.1 Factores y niveles utilizados en el diseño experimental 3^2 .

Factores	Niveles		
	-1	0	1
EDCF (Kw/m ³ s)	1	11	21
TOD (%)	8	15	22

Se eligieron 1, 11 y 21 kW/m³s de EDCF para tener distintos escenarios de estrés hidrodinámico esperando observar efectos en el crecimiento del hongo ya que entre 1 y 11 kW/m³s no se habían hallado efectos significativos en un estudio preliminar (datos no mostrados). Los valores de 8, 15 y 22% de TOD se eligieron considerando como máximo un nivel similar al de la proporción de oxígeno del aire y como mínimo uno que aún permitiera al hongo crecer y cuyo control no representara demasiadas variaciones.

El diseño experimental 3^2 consta de nueve combinaciones (Tabla 6.2). Todos los experimentos se hicieron por duplicado, a excepción del correspondiente a la condición central (11 kW/m³s, 15% TOD) que se realizó por cuadruplicado.

Tabla 6.2 Arreglo experimental factorial 3^2 para el estudio del efecto de la EDCF y la TOD sobre la constante k_p asociada al crecimiento, el coeficiente de producción de lacasas asociada al crecimiento (α), la concentración máxima de biomasa ($X_{\text{máx}}$), la actividad lacasa máxima ($\text{Lac}_{\text{máx}}$) y el diámetro promedio de los *pellets* (D_{prom}) de *P. ostreatus* CP50 en fermentador de 10 L.

Corrida	Condiciones	
	EDCF (Kw/m ³ s)	TOD (%)
1	1	8
2	1	15
3	1	22
4	11	8
5	11	15
6	11	22
7	21	8
8	21	15
9	21	22

Los efectos principales para cada uno de los factores evaluados fueron:

$$\beta_i = (y_i^+) - (y_i^-) \quad \text{Ec. 23}$$

Donde β_i es el efecto del i -ésimo factor sobre la respuesta, y_i^+ y y_i^- son las medias de las respuestas para los niveles mayor (+) y menor (-) del i -ésimo factor.

Las interacciones de los dos factores se calcularon por la siguiente ecuación polinomial de segundo grado:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad \text{Ec. 24}$$

que para los dos factores utilizados (EDCF y TOD) quedó de la siguiente manera:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \varepsilon \quad \text{Ec. 25}$$

donde Y es el valor promedio de la variable de respuesta; β_0 es el valor promedio de la respuesta, en ausencia del efecto de los factores X_1 y X_2 ; β_1 es el efecto lineal del factor 1 sobre la respuesta promedio; β_2 es el efecto lineal del factor 2 sobre la respuesta promedio; β_{11} es el efecto cuadrático del factor 1 sobre la respuesta promedio; β_{22} es el efecto cuadrático del factor 2 sobre la respuesta

promedio; β_{12} es el efecto de la interacción entre X_1 y X_2 ; y ε es el término de error relacionado con los efectos no explicados por el modelo.

El análisis estadístico (ANOVA) de los resultados y de correlación entre variables y factores se llevó a cabo con el software Design-Expert V.8 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA).

Además de la evaluación de las respuestas mencionadas se determinó el diámetro crítico de los *pellets* para cada condición y se utilizó un método fluorimétrico para la cuantificación de la actividad metabólica en *pellets* de distintos tamaños, utilizando FDA como indicador. De ese modo se pudo tener una aproximación de la magnitud de las limitaciones difusionales dependientes del tamaño y la concentración de oxígeno en el seno del líquido, así como de las regiones metabólicamente activas dentro del *pellet*.

6.2 Estudio de la influencia de la EDCF y TOD sobre la transcripción de los genes *poxc* y *pox3* de *Pleurotus ostreatus* CP50

Para este estudio se seleccionaron, con base en los resultados del diseño experimental 3^2 , cuatro de las condiciones analizadas para obtener un arreglo experimental factorial 2^2 usando como factores EDCF y TOD (Tabla 6.3). La respuesta a evaluar fue el nivel de transcripción de los genes *poxc* y *pox3* de *Pleurotus ostreatus* CP50 por el método RT-qPCR montado y validado por Yáñez (2012). Se analizaron muestras a dos tiempos de cultivo (24 y 48 h) para estudiar la variación de la expresión génica en la fase temprana y en la fase tardía del periodo de crecimiento acelerado del hongo.

Además de la evaluación de la expresión génica, se determinó la actividad proteolítica en los cultivos cada 12 h utilizando como sustrato azoalbúmina.

Tabla 6.3 Arreglo experimental factorial 2^2 para el estudio del efecto de la EDCF y la TOD sobre el nivel de expresión de *poxc* y *pox3* de *P. ostreatus* CP50 en fermentador de 10 L.

Corrida	Condiciones	
	EDCF (Kw/m ³ s)	TOD (%)
1	11	8
2	21	8
3	11	15
4	21	15

7. RESULTADOS

7.1 Comportamiento de los parámetros de control

7.1.1 Comportamiento de la TOD

Parte fundamental de este trabajo fue llevar a cabo un buen control de los factores con base en los que se realizó la serie de experimentos. En lo que respecta al control de la tensión de oxígeno disuelto, en la figura 7.1 se presentan los perfiles de TOD característicos de las fermentaciones a 8, 15 y 22% y los valores de las constantes del PID utilizados (Para ver los perfiles de todas las fermentaciones ver el Anexo 1). En los cultivos llevados a cabo a una TOD de 8% y 15% se tuvo un control bastante bueno durante todo el tiempo de las fermentaciones, mientras que en los cultivos a 22% de TOD, se presentaron variaciones en el control de forma generalizada a partir de las 60 h de cultivo. No obstante, la mayoría de los datos experimentales tomados en cuenta para el cálculo de k_p y α , están dentro de la región donde hubo buen control, dentro de las primeras 60 h de cultivo.

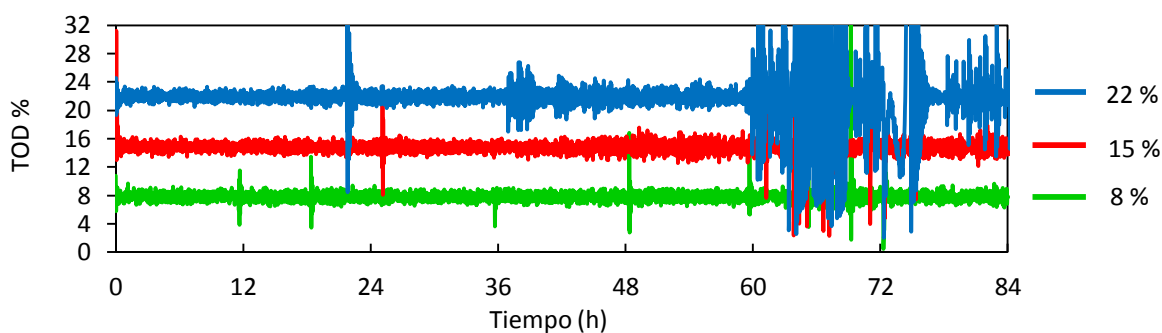


Fig. 7.1 Perfiles característicos de la TOD de las fermentaciones del diseño experimental 3². Los valores de PID utilizados a 8 y 15% de TOD para el control del flujo de nitrógeno fueron: K_p 390%, T_i 2% y T_d -2%. Para 22% de TOD los valores para nitrógeno fueron: K_p 435%, T_i 3% y T_d -3%; dado que fue necesario el suministro de oxígeno, los valores para el control del flujo de O_2 fueron: K_p 180%, T_i 1% y T_d 0%.

7.1.2 Comportamiento de la EDCF

El control de la EDCF se llevó a cabo a través del control del torque, con variaciones en la velocidad de agitación en el biorreactor. En la figura 7.2 se presentan los perfiles de torque característicos desarrollados durante las fermentaciones llevadas a cabo y los valores de las constantes del PID utilizados (Para ver los perfiles de todas las fermentaciones ver el Anexo 1).

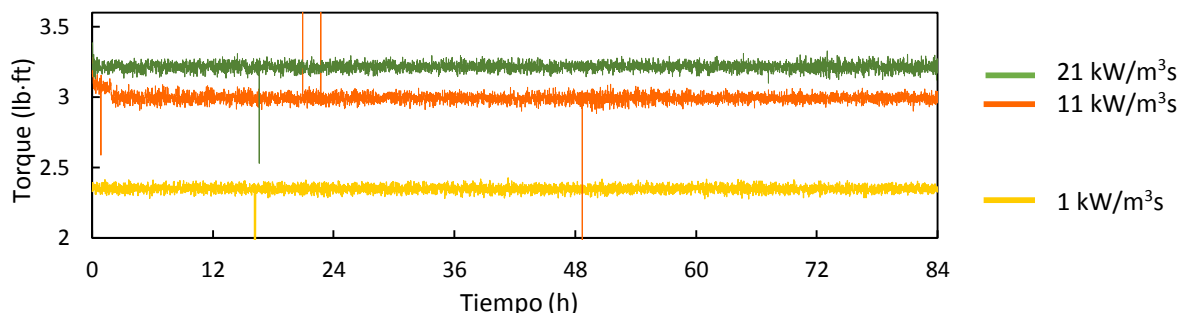


Fig. 7.2 Perfiles característicos del torque de las fermentaciones del diseño experimental 3². Los valores de las constantes PID para el control del torque en todas las condiciones evaluadas fueron K_p 10%, T_i 8% y T_d 2%.

En general se logró un buen control del torque en todas las condiciones experimentadas y durante todo el tiempo de fermentación monitoreado.

7.2 Ajuste de los modelos a los datos experimentales y generalidades de las cinéticas

Como se mencionó anteriormente, se utilizó el modelo de la raíz cúbica para describir el crecimiento de la biomasa, y a partir del mismo se determinó la constante asociada al crecimiento (k_p) de *Pleurotus ostreatus* CP50. Los datos simulados de la concentración de biomasa junto con los datos experimentales de actividad lacasa se modelaron mediante la ecuación de Luedeking-Piret para obtener un valor del coeficiente de producción de lacasas asociada al crecimiento (α).

De manera general, se obtuvo un buen ajuste de los datos experimentales con los valores simulados a partir de los modelos utilizados; en lo que respecta al modelo de la raíz cúbica, con coeficientes de correlación R^2 mayores a 0.98 hasta las 60 h y para el modelo de Luedeking-Piret, con R^2 mayores a 0.98 hasta las 36 h de cultivo. En la figura 7.3 se representa una de las condiciones evaluadas (10.94 $\text{kW/m}^3\text{s}$ y 15 % TOD) para mostrar el ajuste de los datos y los perfiles de consumo de la fuente de carbono.

Los cultivos se llevaron a cabo durante 84 horas y en ninguno de los casos se llegó a la fase de muerte celular pronunciada ni hubo agotamiento de la fuente de carbono (ver Anexo 1); no obstante, la fase estacionaria comenzó a partir de las 60 h con base en el modelo de la raíz cúbica. El hecho de que la fuente de carbono no se agote en los cultivos indica que la disminución en la velocidad de crecimiento del hongo se debe al agotamiento de algún otro nutriente como puede ser algún aminoácido o un cofactor esencial.

En todas las condiciones evaluadas la producción de lacasas estuvo asociada al crecimiento; sin embargo, sólo fue posible ajustar los datos experimentales de actividad al modelo de Luedeking-Piret hasta las 36 horas de cultivo, ya que después de este tiempo los valores de actividad simulados a través del modelo son mucho mayores que los obtenidos experimentalmente. Dicho de otro modo, la velocidad de producción de lacasas comenzó a disminuir a partir de las 36 horas de cultivo con respecto

a lo producido durante las primeras 24 horas. Ante tal disminución de la velocidad de producción de lacasas, se pensó en la posibilidad de que esto se debiera a la desnaturalización por proteasas generadas durante el cultivo o por una disminución en la síntesis de lacasas. Cabe mencionar que el coeficiente α se calculó para las primeras 36 h de los cultivos, donde aún no se presentaba la disminución en velocidad de producción de lacasas.

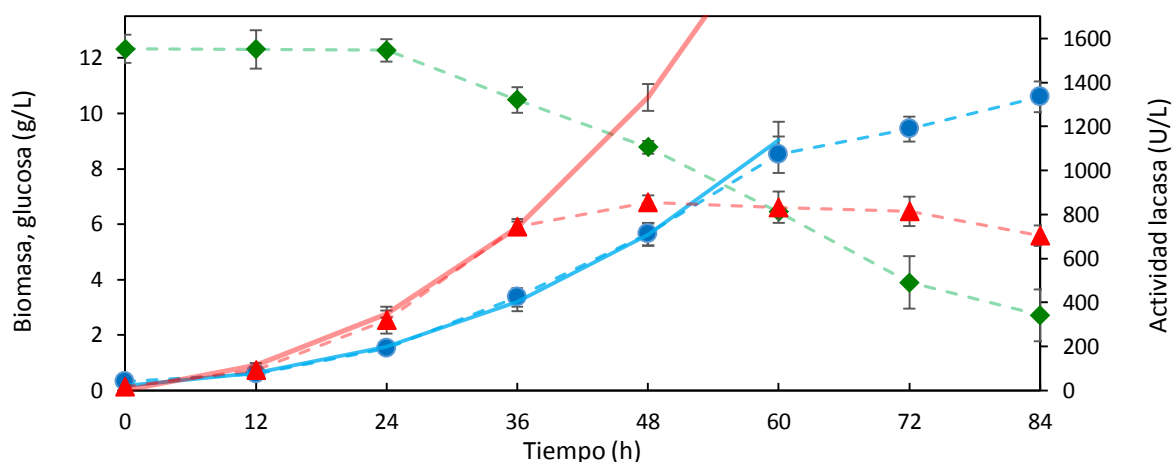


Fig. 7.3 Perfil cinético del cultivo de *Pleurotus ostreatus* CP50 (11 kW/m³s y TOD 15%). Concentración de biomasa (●); actividad volumétrica (▲); concentración de glucosa (◆). Las líneas continuas en los datos de biomasa y actividad volumétrica corresponden a los datos simulados tras el ajuste de los datos experimentales al modelo de la raíz cúbica y Luedeking-Piret, respectivamente; las líneas discontinuas representan a los datos experimentales.

Aunque la glucosa no se agote en los cultivos, es posible que esta no sea la fuente principal de carbono, ya que al observar la gráfica de consumo de glucosa es claro que ésta comienza a consumirse a partir de las primeras 24 horas. Esto significa que existe otro sustrato que el hongo está consumiendo como fuente de carbono al inicio de la fermentación y al parecer el hongo comienza a consumir la glucosa del medio cuando dicho sustrato se agota.

Existe un reporte de un trabajo realizado con *Pleurotus ostreatus* (Díaz, 2009) donde se ha visto que los rendimientos de biomasa con base en glucosa ($Y_{x/s}$) varían con el pH del cultivo. A pH alto (6.5-8.5) encontraron valores de $Y_{x/s}$ mayores al rendimiento teórico máximo con respecto a glucosa (0.5 g_x/g_s), mientras que a pH bajo (3.5 – 4.5) los rendimientos coinciden con el teórico máximo. El autor sugiere que, a pH elevado, el hongo no sólo utiliza carbohidratos como fuente de carbono, sino que puede ser que metabolice otras estructuras carbonadas provenientes de proteínas o lípidos presentes en el extracto de levadura que se utilizó.

En el presente trabajo el hongo puede estar consumiendo algún otro sustrato carbonado proveniente del extracto de levadura al inicio de la fermentación, como proteínas, cuyo calor de combustión es muy similar al de los carbohidratos y proveería de los aminoácidos necesarios para que el hongo comience a sintetizar sus propias proteínas, que le darán estructura en la primera etapa de crecimiento.

7.3 Análisis de varianza del diseño experimental 3²

El análisis de varianza (ANOVA) llevado a cabo a través del programa Design-Expert V8.0 del estudio de los factores EDCF y TOD sobre las respuestas k_p , α , $X_{m\acute{a}x}$, $Lac_{m\acute{a}x}$ y D_{prom} en el diseño experimental 3² se presenta a continuación. En la tabla 7.1 se resumen los valores de las respuestas introducidos en el análisis de varianza.

EDCF (kW/m ³ s)	TOD (%)	k_p ((g/L) ^{1/3} h ⁻¹)	α (U/g _s)	$X_{m\acute{a}x}$ (g/L)	$Lac_{m\acute{a}x}$ (U/L)	D_{prom} (μ m)
1	8	0.0224	277.77	11.38	872	1769
		0.0195	310.63	11	925	1775
1	15	0.0249	229.41	12.99	739	1815
		0.0215	213.87	12	756	1788
1	22	0.0206	199.19	9.99	695	1671
		0.02	181.43	9.5	764	1607
11	8	0.0272	282.42	11.2	1039	1268
		0.0193	323.48	10.4	775	1366
		0.0196	280.93		659	
		0.0187	318.97		727	
11	15	0.0269	227.74	11.72	861	852
		0.0259	250.16	13.75	890	1140
		0.0206	238.06	12.34	723	928
		0.0233	258.94		822	
		0.0239	276.25		827	
11	22	0.0223	237.84	11.24	748	1167
		0.0225	204.85	12	661	960
21	8	0.0191	369.69	9	994	1164
		0.0217	344.94	9	812	1101
		0.0198	335.24		799	
		0.0189	307.04		739	
21	15	0.0222	331.09	13.34	941	1329
		0.0199	267.43	9.11	741	911
		0.0226	271.28		727	
		0.0206	268.48		756	
21	22	0.0236	309.18	11.47	978	1034
		0.0224	235.43	14	780	1389

Tabla 7.1 Valores de los parámetros de respuesta calculados a partir de datos experimentales de los diseños factoriales 3² y 2², utilizados para determinar los efectos de la EDCF y TOD sobre: la constante k_p asociada al crecimiento, el coeficiente de producción de lacasas asociada al crecimiento (α), la concentración máxima de biomasa ($X_{m\acute{a}x}$), la actividad lacasa máxima ($Lac_{m\acute{a}x}$) y el diámetro promedio de los *pellets* (D_{prom}) de *P. ostreatus* CP50 cultivado en fermentador de 10 L. Los espacios vacíos corresponden a los cultivos del diseño experimental 2², a los cuales no se pudo determinar $X_{m\acute{a}x}$ como al resto de los cultivos, por tener una duración menor (60 h), y a cuyos *pellets* no se midió el diámetro promedio; el resto de los parámetros se calcularon dentro de las primeras 60 h para todos los cultivos.

7.3.1 Efectos de la EDCF y TOD sobre la constante k_p asociada al crecimiento en el diseño experimental 3²

Se obtuvo un modelo donde únicamente la TOD tiene efecto significativo sobre la constante asociada al crecimiento y donde la falta de ajuste debida a ruido no es significativa (Tabla 7.2).

Tabla 7.2 Análisis de varianza de la constante k_p asociada al crecimiento de *P. ostreatus* CP50 del diseño experimental 3².

Fuente	Suma de cuad.	Grados de lib.	Cuadrado medio	Valor de F	Prob > F
Modelo	4.7 x10 ⁻⁵	2	2.3 x10 ⁻⁵	7.2	0.004
TOD	1.5 x10 ⁻⁵	1	1.5 x10 ⁻⁵	4.58	0.043
TOD ²	2.6 x10 ⁻⁵	1	2.6 x10 ⁻⁵	7.98	0.01
Residuo	7.5 x10 ⁻⁵	23	3.2 x10 ⁻⁶		
Falta de ajuste	3 x10 ⁻⁵	6	5 x10 ⁻⁶	1.86	0.146
Error puro	4.5x10 ⁻⁵	17	2.7x10 ⁻⁶		
Cor Total	1.2 x10 ⁻⁴	25			

El modelo tiene un coeficiente de correlación $R^2 = 0.3851$ y la ecuación que le corresponde es la siguiente:

$$k_p = 0.023 + 0.001 \text{ TOD} - 0.0024 \text{ TOD}^2 \quad \text{Ec. 26}$$

Dado que el coeficiente de correlación del modelo es bajo, es claro que el modelo generado no sería útil en la predicción de respuestas ni por extrapolación ni por interpolación; sin embargo, el análisis estadístico permitió determinar los efectos significativos de los factores evaluados.

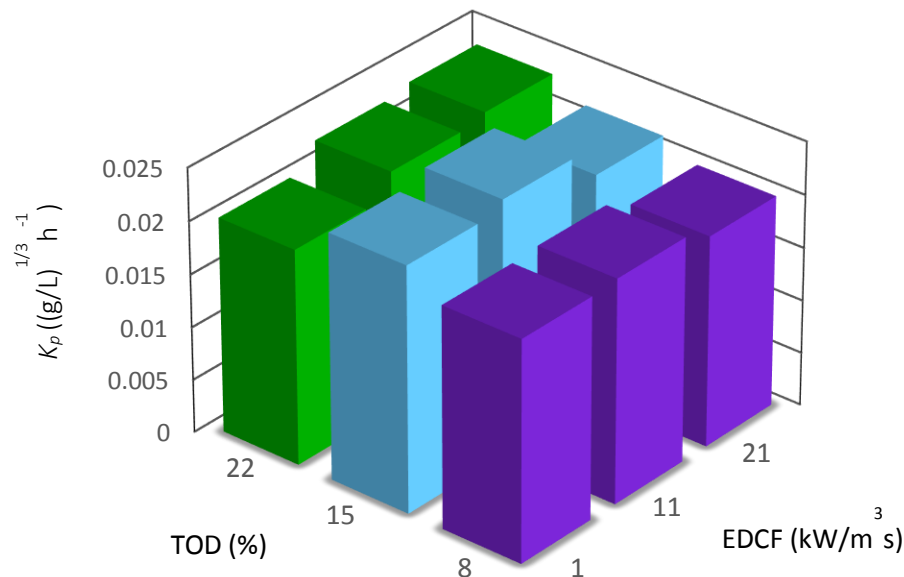


Fig. 7.4 Datos experimentales promedio de la constante k_p asociada al crecimiento de *P. ostreatus* CP50 en función de la EDCF y TOD en el diseño experimental 3².

Como se puede observar en la ecuación y el gráfico (Ec. 26, Fig. 7.4), la TOD tiene un efecto de tipo campana, es decir que existe una curvatura en el modelo tal que se observará un efecto negativo en el crecimiento en los niveles extremos de TOD. Se puede apreciar que conforme incrementa la TOD de 8 a 15% la constante asociada al crecimiento también incrementa; sin embargo, al sobrepasar este valor central, a 22%, se observa una disminución en k_p . Este efecto podría estar asociado a un mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo debido a las altas concentraciones de oxígeno disuelto predominantes en los cultivos. Lo anterior esto se ha observado poco en cultivos de hongos filamentosos debido a que la mayoría de las veces la TOD disminuye en las primeras horas del cultivo al operar sin control de oxígeno disuelto.

Bajo condiciones de estrés oxidativo, es posible la activación de una vía respiratoria alterna en el hongo que, para evitar la generación del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y otras especies reactivas de oxígeno (ROS), desvíe el flujo de protones y disminuya así la síntesis de ATP necesario para sus funciones vitales. La disminución en la generación de ATP podría verse reflejada en la disminución en la velocidad de crecimiento tal como se observa en el presente estudio.

Casos similares se han reportado en hongos filamentosos cuando se trabaja en condiciones de aire enriquecido con oxígeno (Voulgaris *et al.*, 2012; Bai *et al.*, 2003b; O'Donnell *et al.*, 2007) donde se ha identificado la activación de NADH deshidrogenasas y AOX alternativas.

7.3.2 Efectos de la EDCF y TOD sobre el coeficiente de producción de lacasas asociada al crecimiento (α) en el diseño experimental 3²

Se obtuvo un modelo significativo donde tanto la TOD como la EDCF tienen efecto significativo sobre el coeficiente de producción asociada al crecimiento y la falta de ajuste debida a ruido no es significativa (Tabla 7.3).

Tabla 7.3 Análisis de varianza del coeficiente de producción de lacasas asociada al crecimiento (α) de *P. ostreatus* CP50 del diseño experimental 3².

Fuente	Suma de cuad.	Grados de lib.	Cuadrado medio	Valor de F	Prob > F
Modelo	46414.9	2	23207.4	36.73	< 0.0001
EDCF	14386.9	1	14386.9	22.77	< 0.0001
TOD	27467	1	27467	43.47	< 0.0001
Residuo	14532.1	23	631.8		
Falta de ajuste	3044.7	6	507.4	0.75	0.6172
Error puro	11487.4	17	675.7		
Cor Total	60947	25			

De acuerdo con la ecuación del modelo para α (Ec. 27), la EDCF tiene un efecto positivo sobre α , mientras que la TOD tiene un efecto global negativo, siendo mayor el efecto que tiene la TOD.

El modelo tiene un coeficiente de correlación $R^2 = 0.878$ y la ecuación que le corresponde es la siguiente:

$$\alpha = 261.96 + 30.74 \text{ EDCF} - 43.52 \text{ TOD} \quad \text{Ec. 27}$$

A pesar de no repercutir de manera significativa en la velocidad de crecimiento del hongo, el incremento en la EDCF tiene un efecto positivo en la producción específica de lacasas. En este caso el incremento en α indica que el incremento de la EDCF favorece la producción de lacasas (ver figura 7.5).

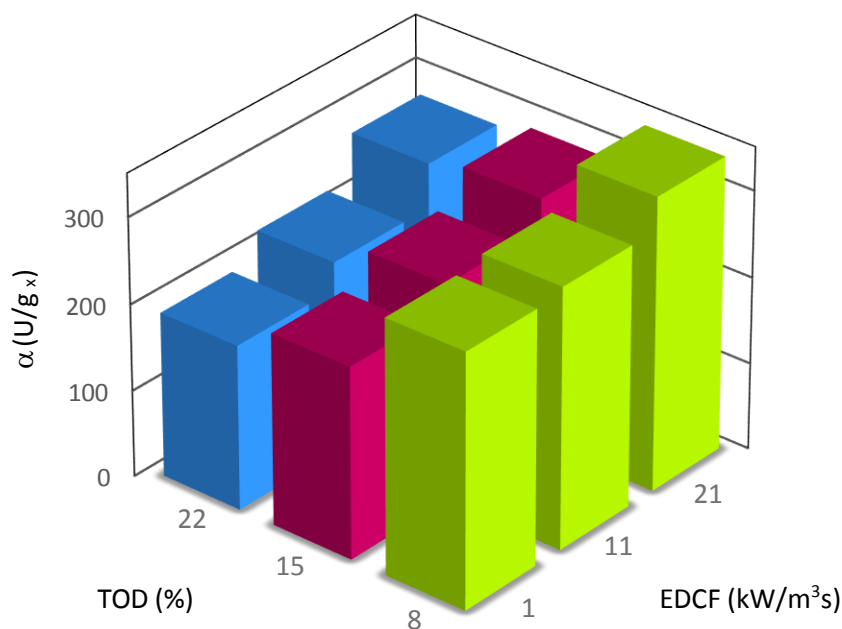


Fig. 7.5 Datos experimentales promedio del coeficiente de producción de lacasas asociada al crecimiento (α) de *P. ostreatus* CP50 en función de la EDCF y TOD en el diseño experimental 3².

Por otra parte, el efecto negativo ejercido por el oxígeno disuelto sobre la producción de lacasas (actividad volumétrica) no está claro aún; hasta el momento no existen reportes sobre el papel que ejerce el oxígeno en la expresión de los genes de las lacasas o sobre la estabilidad de la enzima.

La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en cantidades relativamente grandes está ligada al ciclo de vida normal de los hongos basidiomicetos (Jaszek *et al.*, 2014) y parte de la maquinaria de defensa involucra entre otras enzimas a las lacasas, que son inducibles por estrés oxidativo. Bajo la hipótesis de que a concentraciones elevadas de oxígeno se activa una segunda vía respiratoria alternativa que evita la formación de ROS, esta concentración disminuida de ROS podría estar provocando la baja expresión de las lacasas a altas TOD.

7.3.3 Efectos de la EDCF y TOD sobre el diámetro promedio de los *pellets* (D_{prom}) en el diseño experimental 3²

Durante el análisis de la morfología de los *pellets*, el único factor que tuvo efecto significativo sobre su tamaño (diámetro promedio) fue la EDCF (Tabla 7.4; fig. 7.6). El efecto de la EDCF es negativo ya que al incrementar la potencia disipada se obtienen *pellets* de menor tamaño, lo cual puede deberse a la erosión o a la fragmentación de los agregados miceliarios.

El modelo tiene un coeficiente de correlación $R^2 = 0.674$ y la ecuación que le corresponde es la siguiente:

$$D_{prom} = 1091 - 198.33 EDCF + 174.17 EDCF^2 \quad \text{Ec. 28}$$

Tabla 7.4. Análisis de varianza del diámetro promedio de los *pellets* de *P. ostreatus* CP50 a las 24 h de cultivo del diseño experimental 3².

Fuente	Suma de cuad.	Grados de lib.	Cuadrado medio	Valor de F	Prob > F
Modelo	6.2 x10 ⁵	2	3.1 x10 ⁵	17.62	< 0.0001
EDCF	4.7 x10 ⁵	1	4.7 x10 ⁵	26.93	< 0.0001
EDCF ²	1.4 x10 ⁵	1	1.4 x10 ⁵	8.31	0.0103
Residuo	3 x10 ⁵	17	17529.7		
Falta de ajuste	1.8 x10 ⁵	6	29422.9	2.66	0.5756
Error puro	1.2 x10 ⁵	11	11042.4		
Cor Total	9.2 x10 ⁶	19			

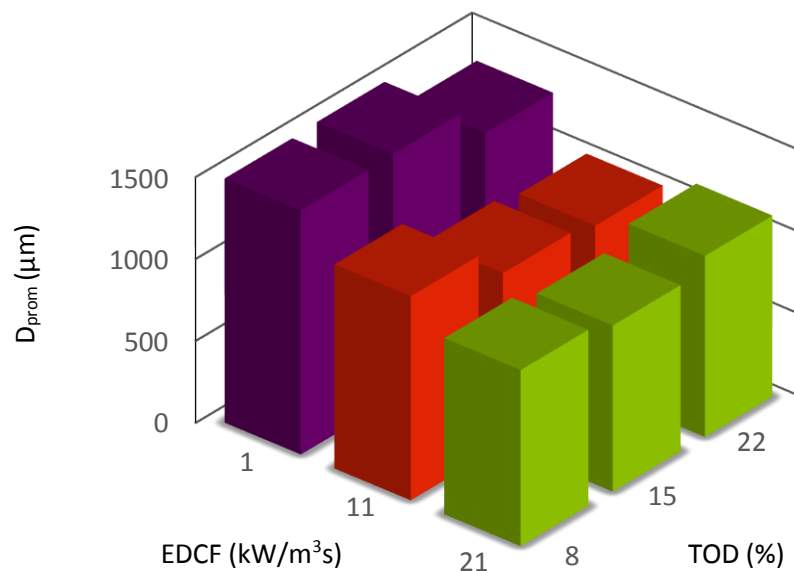


Fig. 7.6 Datos experimentales promedio del diámetro de los *pellets* (D_{prom}) de *P. ostreatus* CP50 en función de la EDCF y TOD del diseño experimental 3².

De este modo se deduce que, en el intervalo estudiado, el tamaño de los *pellets* sólo es función de la velocidad específica de disipación de energía (EDCF) puesto que la TOD no tuvo efecto significativo. Existen reportes muy similares en estudios en cultivo sumergido con diversos hongos filamentosos como *P. chrysogenum*, *A. awamori*, *T. reesei*, *T. harzianum* y *A. terreus* donde se ha observado este mismo fenómeno (Jüsten *et al.*, 1996; Cui *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2012; Rocha-Valadez *et al.*, 2005; Casas *et al.*, 2004).

En lo que respecta a este estudio, en realidad no hubo diferencias significativas entre los tamaños de los agregados evaluados a diferentes TOD y misma EDCF. El modelo obtenido (Ec. 28) y la figura 7.6 indican que a medida que aumenta la EDCF los *pellets* generados son más pequeños; sin embargo, pasando del valor medio de EDCF un incremento en este parámetro ya no modifica en gran medida el tamaño de los agregados.

7.3.4 Efectos de la EDCF y TOD sobre la concentración máxima de biomasa ($X_{m\acute{a}x}$) y la actividad lacasa máxima ($Lac_{m\acute{a}x}$), en el diseño experimental 3²

No se hallaron efectos significativos de la EDCF ni TOD sobre la concentración máxima de biomasa ni sobre la actividad lacasa máxima bajo las condiciones evaluadas.

Al final de los cultivos la concentración de biomasa fue muy variable debido probablemente a las dificultades en el control de la tensión de oxígeno disuelto en las últimas horas del cultivo, lo cual impidió observar efectos significativos.

En lo que respecta a la actividad lacasa máxima, esta no fue influenciada ni por la TOD ni por la EDCF, sino que estuvo determinada por la disminución en la velocidad de producción a partir de las 36 h de cultivo.

7.4 Diámetro crítico de los *pellets*

El cálculo del diámetro crítico de los *pellets* (Ec. 1) se hizo por medio de la ecuación establecida por Tramper y Van't Riet (1991) y utilizada por Cui *et al.* (1997).

La densidad de los *pellets* fue de 27.3 kg_x/m³ y la porosidad determinada por fluorescencia fue del 64%. La velocidad específica de consumo de oxígeno calculada a través del método dinámico fue de 0.79 mmolO₂/(g_x·h) cuyo valor se sitúa dentro del intervalo reportado para otros hongos y levaduras (ver tabla 7.5). Utilizando estos datos calculados y la constante de difusividad del oxígeno en el agua, así como la concentración de oxígeno disuelto en el medio, se estimó el diámetro crítico para cada tensión de oxígeno disuelto utilizada en los cultivos. Los resultados se presentan en la tabla 7.6.

Tabla. 7.5 Velocidad específica de consumo de oxígeno (qO_2) para diferentes microorganismos.

Especie	qO_2 (mmolO ₂ /g _x h)	Referencia
<i>Ganoderma lucidum</i>	0.33	Torres <i>et al.</i> , 2008
<i>Aspergillus terreus</i>	0.42	Casas López <i>et al.</i> , 2006
<i>Pleuotus ostreatus</i>	0.79	Este estudio
<i>Candida lipolytica</i>	0.81	Rane y Sims, 1994
<i>Thricoderma inhamatum</i>	0.86	Seo <i>et al.</i> , 2007
<i>Cephalosporium acremonium</i>	1.06	Araujo <i>et al.</i> , 1996
<i>Cordyceps sinensis</i> Cs-HK1	2	Paek <i>et al.</i> , 2014
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.56	Razmovski y Pucarevic, 2002
<i>Aspergillus niger</i>	3.43	Jorgensen <i>et al.</i> , 2009
<i>Aspergillus awamori</i>	6.25	Cui <i>et al.</i> , 1997

Tabla 7.6. Diámetros críticos calculados para las distintas tensiones de oxígeno disuelto evaluadas.

TOD (%)	D_{Crit} (μm)
8	358
15	490
22	593

Lo que indican estos estimados es que el diámetro crítico disminuye a medida que baja la tensión de oxígeno disuelto en el medio; por ejemplo, a una TOD de 8% el diámetro crítico será 1.65 veces más pequeño que a 22%. Dados los diámetros promedio característicos de las fermentaciones realizadas (mayores a 600 μm), se puede decir que la gran mayoría de los *pellets* presentan limitaciones difusionales desde el inicio de las fermentaciones donde el diámetro promedio es de 1200 μm.

Los valores del diámetro crítico calculados para los *pellets* de *P. ostreatus* son similares a los que se han determinado para otros hongos filamentosos. En lo que respecta a los *pellets* de *Aspergillus awamori* con porosidad de 0.8, TOD por arriba del 95% y densidad de 50 kg/m³, el diámetro crítico estimado fue de 370 μm (Cui *et al.*, 1997); para *Penicillium chrysogenum* el diámetro crítico determinado por mediciones con sensores microaxiales fue de 400 μm (Wittler *et al.*, 1986) y para *Aspergillus niger* entre 50 y 100 μm (Rinas *et al.*, 2005).

Con el diámetro crítico estimado para cada condición se realizó el cálculo para determinar el porcentaje de biomasa que teóricamente no tendría problemas difusionales a las 24 horas de cultivo (tiempo al que los cultivos aún se encuentran en fase de crecimiento acelerado). De acuerdo a los resultados

(Tabla 7.7), el cultivo más limitado (baja EDCF y baja TOD) tiene sólo un 57% de biomasa libre de limitación por oxígeno, mientras que en los cultivos con menores limitaciones (altas EDCF y alta TOD) se llega a un máximo del 89%. Lo anterior indica que todos los cultivos tienen limitaciones difusionales en menor o mayor medida en las condiciones evaluadas.

Dado que estos cálculos teóricos están basados únicamente en la disponibilidad de oxígeno al interior de los *pellets*, el porcentaje de biomasa activa en lo referente a la producción de proteínas de excreción podría ser todavía menor, puesto que se sabe que esta clase de proteínas se producen en los extremos hifales ubicados en la región periférica de los *pellets*. De esa forma, el porcentaje de biomasa activa, en cuanto a la excreción de lacasas, probablemente dependerá del área superficial del *pellet*, más que de la biomasa no limitada por oxígeno. Por ejemplo, en el caso de *Aspegillus niger*, El-Enshasy *et al.* (2006) demostraron que sólo un 25% de la biomasa total de los *pellets* (correspondiente a la capa externa del agregado) correspondía a la fracción productiva de glucosa-oxidasas, utilizando un método de identificación de regiones ricas en RNA por fluorescencia.

Tabla 7.7 Porcentaje de biomasa que teóricamente no tiene problemas difusionales de oxígeno a las 24 h de cultivo, para cada una de las condiciones del diseño experimental 3².

	EDCF (kW/m ³ s)								
	1			11			21		
TOD (%)	8	15	22	8	15	22	8	15	22
X _{act} (%)	57	68	84	65	82	89	71	83	89

7.5 Determinación de la actividad metabólica de los pellets

La viabilidad de los *pellets* en virtud de la actividad esterasa se determinó utilizando como sustrato al diacetato de fluoresceína (FDA) en muestras de un solo cultivo (1 kW/m³s y TOD 15%). Las muestras se separaron por tamaño y lo que se encontró fue que los agregados con diámetro aproximado de 1000 µm o menores, tenían una actividad metabólica cercana al 100% (Fig. 7.7A). En general se observó que en este grupo de *pellets* la porosidad era baja, y que las formas no eran completamente esféricas dado que podían tratarse de fragmentos de otros *pellets* más grandes.

En un segundo grupo se clasificó a los *pellets* con diámetros aproximados de 1500 µm y en un tercero se agrupó a los mayores a 2000 µm; la viabilidad promedio determinada para ambos grupos fue del 80% (Fig. 7.7B, C). En las imágenes de la fig. 7.7B y 7.7C se puede ver que el centro de los *pellets* no brilla con la misma intensidad que la periferia, lo que indica que las células que conforman el centro tienen una menor actividad metabólica.

A partir de estos datos podemos concluir que a medida que incrementa el tamaño de *pellet* existe un menor porcentaje de células activas dentro del mismo, debido probablemente a que las células del centro de los *pellets* estuvieron limitadas nutricionalmente durante el cultivo hasta perder su viabilidad.

Sin embargo, el hecho de que la actividad esterasa haya sido cuantificada *ex situ*, no implica que durante el cultivo se haya mantenido este mismo estado fisiológico, y esto puede deberse a las condiciones hidrodinámicas del cultivo y a las limitaciones nutricionales que presentan los *pellets* de gran tamaño cuando están completos.

Lo último se debe a que el tratamiento de las muestras, previo a su tinción, consistió en la ruptura de los *pellets* por la mitad, para permitir la difusión del sustrato FDA hacia las células del centro; sin embargo, durante el cultivo, se desconoce si se conserva esta misma actividad esterasa pues la limitación en la difusión de sustratos puede presentarse.

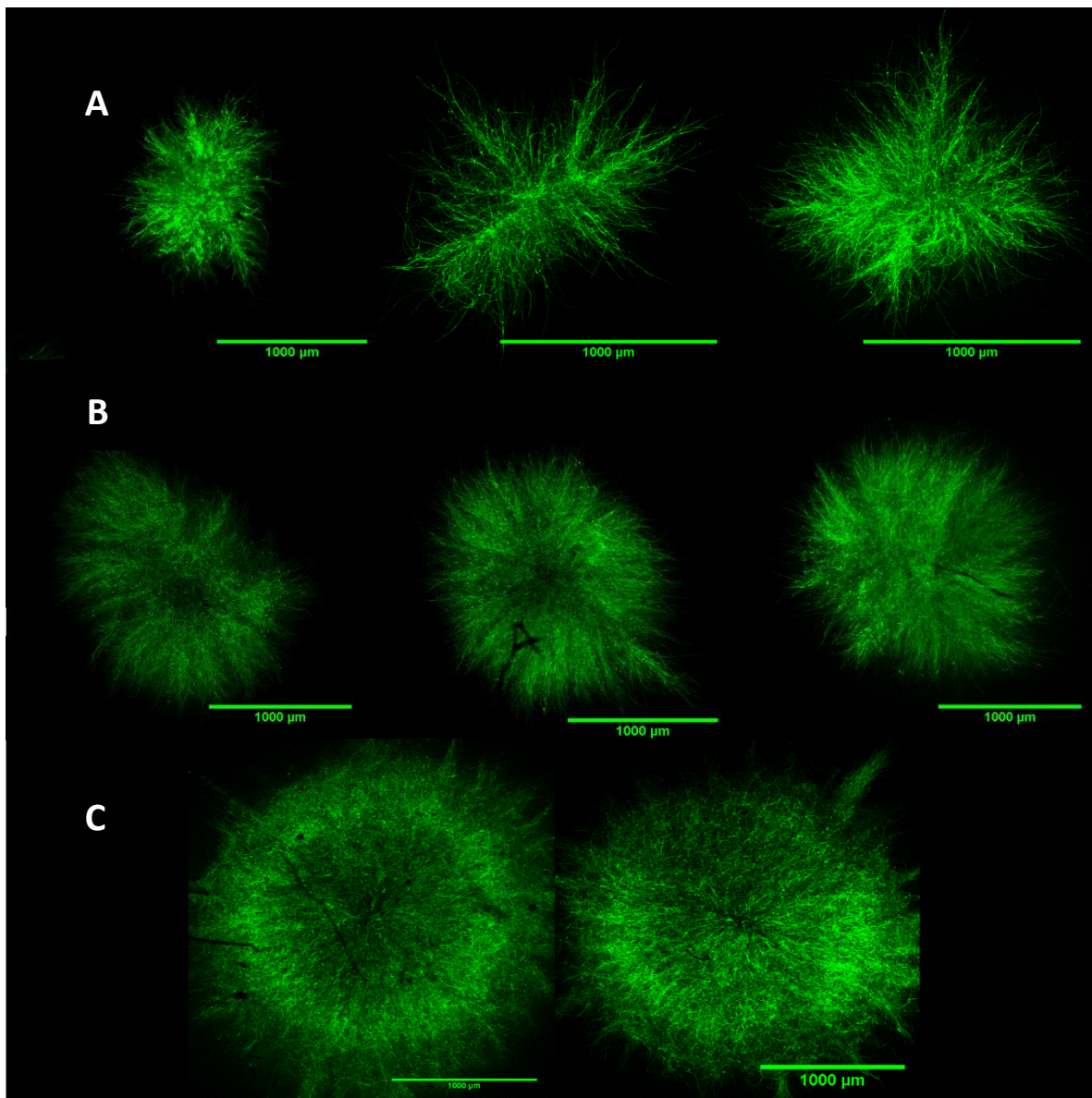


Fig. 7.7 Imágenes de *pellets* de distintos tamaños, teñidos con FDA y observados en un microscopio confocal invertido de un cultivo llevado a cabo a 1 kW/m^3 y TOD del 15%. A) $<1000 \mu\text{m}$; B) $<1500 \mu\text{m}$; C) $>2000 \mu\text{m}$.

7.6 Perfil enzimático de las lacasas

Con la finalidad de monitorear la producción de las isoformas de lacasas en las distintas condiciones evaluadas, se corrió un gel por electroforesis nativa para obtener los zimogramas correspondientes a cada una. En todos los zimogramas se observaron las dos bandas correspondientes a las isoformas POX3 y POXC; sin embargo, no se observaron diferencias en el tiempo de aparición ni en la intensidad de las bandas. En la fig. 7.8 se muestra uno de los geles obtenidos con las muestras, tomadas cada 12 h y estandarizadas por volumen, de una de las fermentaciones. El perfil típico es la aparición de la actividad de POXC a partir de las 12 horas y el descenso de la misma a partir de las 72 horas (por la disminución en la intensidad de las bandas). La actividad POX3 aparece a partir de las 24 horas y la intensidad de las bandas es mucho menor que la de POXC, lo cual indica que se produce muy poca de esta enzima o hay muy poca en su forma activa.

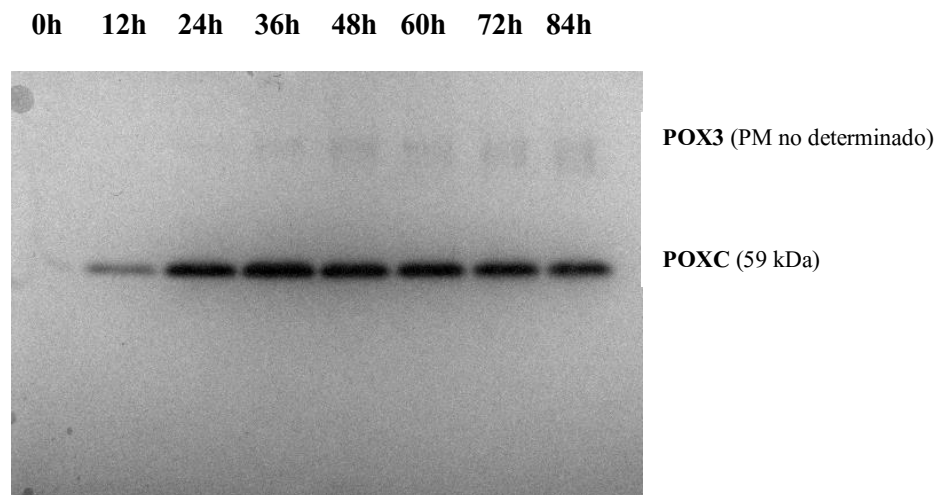


Fig. 7.8 Zimograma obtenido por electroforesis nativa al hacer reaccionar a las lacasas con el sustrato DMP (2,6-dimetoxifenol) en un cultivo llevado a 11 kW/m³s y TOD 15%.

7.7 Estudio de la influencia de la EDCF y TOD sobre la transcripción de *poxc* y *pox3* a través del diseño factorial 2²

Como se mencionó en la estrategia experimental, tras haber determinado que tanto la EDCF como la TOD tienen efecto significativo sobre la producción específica de lacasas, se seleccionaron 4 de las 9 condiciones establecidas en un principio para evaluar los niveles de transcripción de los genes *poxc* y *pox3*, obteniendo un diseño experimental 2² (Tabla 6.3).

Para la TOD se eligieron los valores 8 y 15% puesto que, al menos en lo que respecta a la actividad enzimática, este intervalo es suficiente para obtener diferencias significativas en el crecimiento del hongo y la actividad lacasa; además 8 y 15% son las dos condiciones probadas donde el control de oxígeno es más preciso. En cuanto a la EDCF se eligieron los valores que propiciaran mayor estrés hidrodinámico bajo el antecedente de que éste favorece la producción específica de lacasas. Así pues, el intervalo evaluado fue entre 11 y 21 kW/m³s.

Los perfiles de transcripción de los genes de lacasa *poxc* y *pox3* a 24 y 48h de cultivo se analizaron mediante qPCR comparando con un cultivo control del cual se esperaba tener los niveles de transcripción más bajos con base en la producción específica evaluada a través del coeficiente α (11 Kw/m³s y TOD 15%).

Con la finalidad de evaluar el efecto de la EDCF y TOD, en primer lugar se analizaron los niveles de expresión de las cuatro condiciones realizadas para cada tiempo de muestreo por separado y para cada gen (Fig. 7.9). Los resultados demuestran que la expresión de *pox3* no se afecta por ninguna de las condiciones evaluadas ni a las 24 ni a las 48 h de cultivo (Fig. 7.9A). Tras no haber diferencias significativas entre los niveles de transcripción cuantificados, no existe efecto ni de la EDCF ni de la TOD sobre la expresión de este gen.

En lo que respecta a la expresión del gen *poxc* (Fig. 7.9B) no se encontraron efectos significativos en las muestras de 24 h; sin embargo, a las 48 h el perfil es distinto, habiendo un claro efecto negativo por parte de la TOD pero nulo en el caso de la EDCF, lo cual se comprobó por el análisis ANOVA que se presenta a continuación.

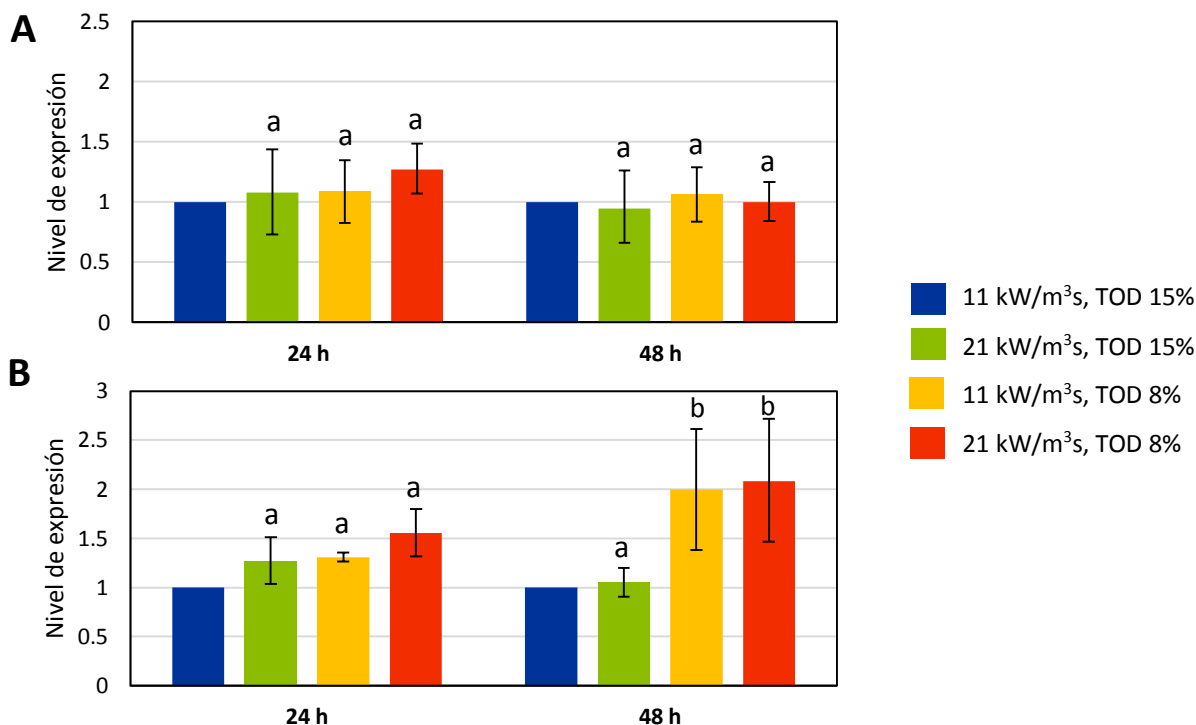


Fig. 7.9 Expresión relativa de los genes *pox3* (A) y *poxc* (B) en las cuatro condiciones del diseño experimental 2^2 a las 24 y 48 h de cultivo de *P. ostreatus* CP50. La expresión se presenta como el cociente normalizado al gen β -*tub* y al cultivo control del mismo tiempo (11 Kw/m³s, TOD 15%). Los datos representan la media y las barras de error de duplicados.

El análisis de varianza (Tabla 7.8) para las muestras de 48 h llevado a cabo a través del *software* Design-Expert V 8.0, indicó que únicamente la TOD tiene un efecto significativo lineal sobre el nivel de expresión de *poxc* y que la falta de ajuste debida al ruido no es significativa.

Tabla. 7.8. Análisis de varianza del nivel de expresión de *poxc* a las 48 h de cultivo de *P. ostreatus* CP50 en el diseño experimental 2^2 .

Fuente	Suma de cuad.	Grados de lib.	Cuadrado medio	Valor de F	Prob > F
Modelo	2.05	1	2.05	7.10	0.0373
B-TOD	2.05	1	2.05	7.10	0.0373
Residuo	1.74	6	0.29		
Falta de ajuste	0.010	2	5.094x10 ⁻³	0.012	0.9883
Error puro	1.73	4	0.43		
Corr Total	3.79	7			

La ecuación del modelo obtenido ($R^2 = 0.54$) es la siguiente:

$$poxc_{48h} = 1.53 - 0.51 TOD \quad \text{Ec. 29}$$

Tal como se aprecia en la ecuación 29 así como en el gráfico de superficie de respuesta (Fig. 7.10), la TOD tiene un efecto negativo sobre la expresión del gen *poxc*, mientras que la EDCF no tiene efecto alguno. Resulta interesante saber que tan sólo la TOD afecta a la expresión de uno de los genes evaluados, mientras que la EDCF a ninguno, a pesar de tener efecto positivo sobre la producción específica de las lacasas (U/g_x). Dicho efecto podría estar asociado a que a altas EDCF se favorece la obtención de *pellets* pequeños con mayor área superficial y menores limitaciones difusionales, por lo que el efecto positivo sobre α puede deberse al incremento en la porción de biomasa activa de los *pellets*.

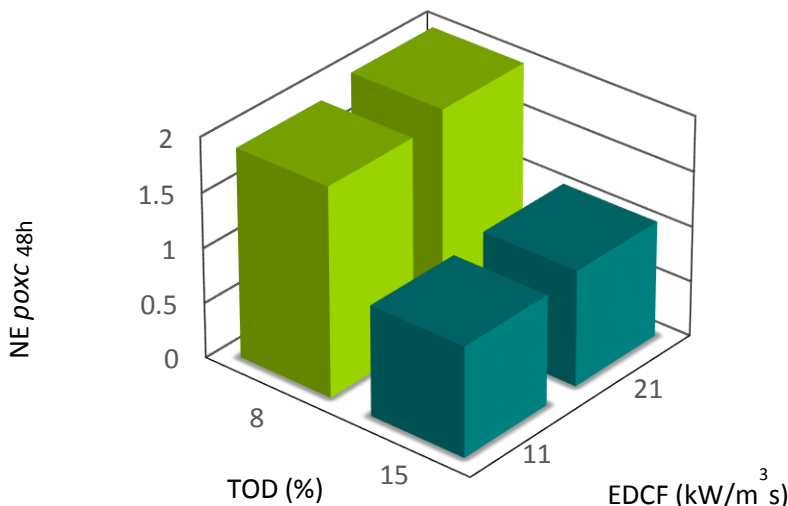


Fig. 7.10 Promedio de los niveles de expresión de *poxc* a las 48 h de cultivo de *P. ostreatus* CP50 en función de la EDCF y TOD en el diseño experimental 2^2 .

A fin de evaluar los niveles de expresión de ambos genes a través del tiempo se compararon los niveles relativos a 24 y 48 h para cada gen por separado, con respecto a un control (11 kW/m³s, TOD 15% a 24 h). Los niveles de expresión relativa de *pox3* (Fig. 7.11A) prácticamente no cambian entre 24 y 48 h en cada condición evaluada; por lo anterior puede decirse que el hongo mantiene una expresión invariable de *pox3* en todas las condiciones probadas al inicio y a la mitad de la fase acelerada de crecimiento.

Por otro lado, la expresión de *poxc* (Fig. 7.11B) experimenta una disminución cercana al 90% entre las 24 y 48 h de cultivo. Tal disminución en la expresión de *poxc* podría explicar la disminución de la producción específica de lacasas al pasar las 36 horas de cultivo.

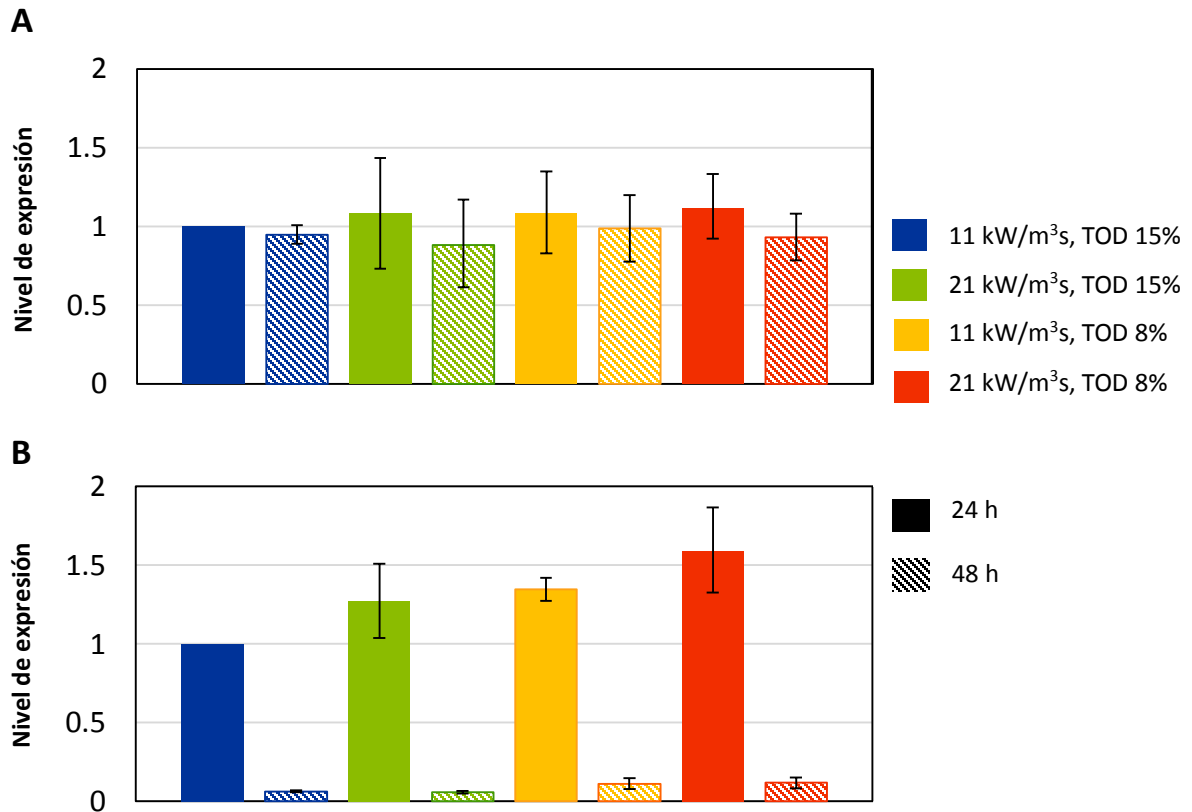


Fig. 7.11 Comparativa de la expresión relativa de los genes *pox3* (A) y *poxc* (B) a través del tiempo (24 y 48 h) de los cultivos del diseño experimental 2². La expresión se presenta como el cociente normalizado al gen β -*tub* y al cultivo control (11 Kw/m³s, TOD 15%) de 24 h. Los datos representan la media y las barras de error de duplicados.

Para conocer cuál isoforma fue la que tuvo una contribución mayoritaria en la actividad lacasa de los cultivos, se compararon los niveles de expresión entre *pox3* y *poxc* tomando como control la condición de 11 kW/m³s y TOD 15% (Fig. 7.12).

A las 24 h (Fig. 7.12A) de cultivo el nivel de expresión del gen *poxc* fue entre 100 y 180 veces mayor que el de *pox3*. A las 48 h (Fig. 7.12B) se observa la misma tendencia, sólo que la relación *poxc/pox3* está entre 6 y 16. Esta diferencia tan grande en relación a los tiempos de cultivo se debe a que a las 48 h la expresión de *poxc* es mucho menor que a las 24h.

Así pues, la isoforma predominante en los cultivos de *P. ostreatus* CP50 es la codificada por el gen *poxc* cuya expresión es la que finalmente resulta afectada negativamente por la concentración de oxígeno disuelto y disminuye hasta en un 90% de las 24 a las 48 h.

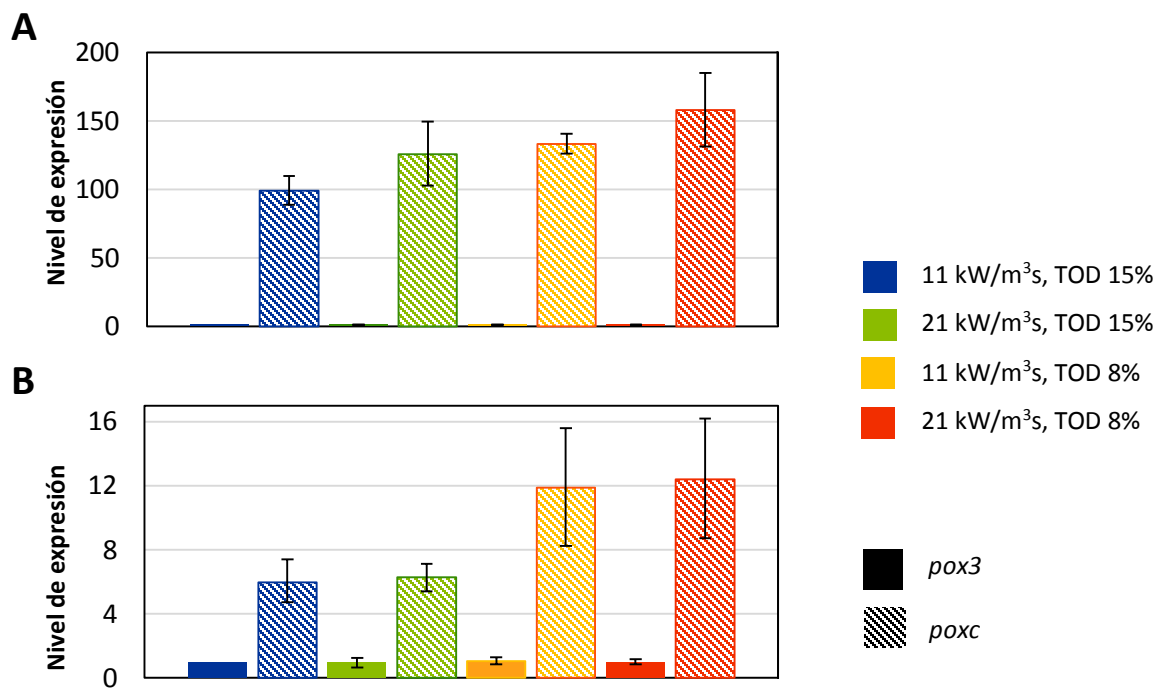


Fig. 7.12 Comparativa de la expresión relativa entre los genes *pox3* y *poxc* de los cultivos del diseño experimental 2² a 24 h (A) y 48 h (B). La expresión se presenta como el cociente normalizado al gen β -*tub* y al cultivo control (11 Kw/m³s, TOD 15%) de 24 h del gen *pox3*. Los datos representan la media y las barras de error de duplicados.

7.8 Determinación de la actividad proteolítica en el diseño experimental 2²

Con el objetivo de conocer si la causa de la disminución de la producción específica de lacasas durante los cultivos estaba relacionada con la actividad de proteasas, se hicieron determinaciones de actividad proteasa cada 12 h utilizando azoalbúmina como sustrato. En todas las fermentaciones se observó que la actividad proteasa comenzó a partir de las 36 h de cultivo, mismo tiempo en que la producción

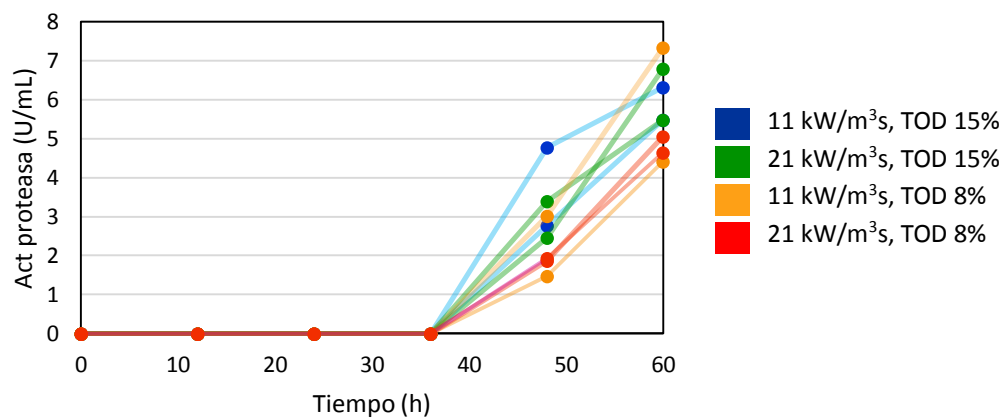


Fig. 7.13 Perfiles de la actividad proteolítica de los cultivos del diseño experimental 2², utilizando azoalbúmina como sustrato. Una unidad enzimática está definida como los μ g de sustrato hidrolizados por minuto.

específica de lacasas comenzaba a disminuir (ver Anexo 1). Sin embargo, la síntesis de enzimas proteolíticas no estuvo asociada a efectos de la EDCF ni de la TOD. Al parecer esta clase de enzimas se producen de manera invariable en todas las condiciones evaluadas (Fig. 7.13).

Faraco *et al.* (2005) caracterizaron a la proteasa extracelular más abundante de *P.ostreatus* en medio líquido (*PoS1*) que comenzó a presentar actividad desde el inicio de la fermentación y que fue identificada como una serin-proteasa perteneciente a la familia de las subtilisinas. De manera interesante, detectaron incrementos en la actividad de otras proteasas extracelulares después de un largo tiempo de cultivo (7 días) utilizando como sustrato azoalbúmina, y a través de una serie de experimentos demostraron que esas enzimas en realidad se secretaban durante las primeras horas como formas inactivas y posteriormente eran activadas en un proceso dirigido por *PoS1*. Con lo anterior, se sugirió que el papel de *PoS1* podría ser el de comenzar una cascada de reacciones proteolíticas promoviendo la activación de otras proteasas extracelulares.

La síntesis de proteasas ha sido reportada anteriormente en algunos trabajos con *P. ostreatus*; entre ellas se han identificado metaloproteasas (Shen *et al.*, 2007), serin-proteasas (Palmieri *et al.*, 2001) y otras no han sido identificadas aún (Palmieri *et al.*, 2000; Faraco *et al.*, 2005).

Se ha comentado que las proteasas extracelulares están involucradas en la regulación de la actividad ligninolítica de los basidiomicetos, ya que se ha demostrado que algunas serin-proteasas actúan degradando o activando a isoformas específicas de lacasas de *P. ostreatus* (Palmieri *et al.*, 2000, 2003) y otras degradando a las lignino peroxidasas (LiP) de *Phanerochaete chrysosporium* (Dosoretz *et al.*, 1990). A pesar de que no existen reportes sobre el efecto de las serin-proteasas o metaloproteasas de *P. ostreatus* sobre la actividad de las isoformas POXC y POX3, estas lacasas podrían estar siendo degradadas por las proteasas detectadas con azoalbúmina.

Aunque se desconozca el papel de las serin-proteasas, su ocurrencia en una amplia variedad de géneros sugiere que desempeñan un papel fisiológico crucial en los microorganismos que las producen (Faraco *et al.*, 2005). Existe la posibilidad de que la actividad proteolítica detectada en el presente estudio forme parte de una cascada de activación de proteasas y que se produzcan otras clases de proteasas no detectadas por el método utilizado.

Tras considerar los resultados obtenidos en el análisis de expresión de *poxc* y los de actividad proteasa, se sugiere que la disminución de la producción específica de lacasas, después de las 36 h de cultivo, se debe tanto a la disminución en su síntesis como a la degradación por proteasas. No obstante, sería conveniente saber qué otra clase de proteasas se producen y qué tan susceptibles son las lacasas a la degradación.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Con el presente trabajo se ha constatado la complejidad de los fenómenos que rigen el crecimiento y la producción de metabolitos de hongos filamentosos en cultivos sumergidos. En particular, poco se conoce la forma en que la producción de lacasas puede estar afectada por la hidrodinámica y la concentración de oxígeno durante el cultivo en biorreactores agitados mecánicamente.

Con los estudios realizados se probó que a pesar de que las lacasas sean metabolitos que se producen de forma asociada al crecimiento del hongo, las condiciones favorables para la producción de biomasa no son las mismas que para la producción de lacasas. Anteriormente no se contaba con estudios detallados que indagaran sobre el papel que tiene la agitación en la producción de lacasas, contando sólo con estudios clásicos de mejoramiento del proceso global. Sin embargo, este tipo de experimentos no permitían el entendimiento de los efectos asociados a la transferencia de oxígeno ni al estrés hidrodinámico sobre el crecimiento del hongo y la producción de lacasas de manera independiente.

A través de un diseño de experimentos factorial y del análisis ANOVA con una significancia $p \leq 0.05$, se evaluaron los efectos de la concentración de oxígeno (TOD) y de la disipación de energía (EDCF) sobre el crecimiento, la morfología y la producción de lacasas por *P. ostreatus* CP50 en cultivos sumergidos con agitación mecánica. Los resultados señalaron que tanto la EDCF como la TOD tienen efectos importantes en el proceso, siendo la TOD el factor con mayor efecto global al influenciar el crecimiento del hongo y la síntesis de lacasas a nivel transcripcional.

La TOD mostró tener un efecto de tipo campana sobre la velocidad de crecimiento del hongo; para valores de TOD entre 8 y 15% el efecto es positivo, mientras que entre 15 y 22% el efecto es negativo. El hongo podría estar activando una vía respiratoria alterna contra estrés oxidativo a nivel de la cadena de transporte de electrones utilizando alguna NADH deshidrogenasa u oxidasa no generadora de protones como se ha reportado en trabajos con *M. grisea*, *A. fumigatus* y *A. niger* (Yukioka *et al.*, 1998; Magnani *et al.*, 2007; Voulgaris *et al.*, 2012) y que también se ha relacionado en la disminución del ATP producido en condiciones de enriquecimiento del aire con oxígeno (Li *et al.*, 2008), con la disminución en la concentración de ROS (Karaffa *et al.*, 2001; Bai *et al.*, 2003b; Zhao *et al.*, 2009) y en el incremento en la actividad de enzimas relacionadas a la defensa contra estrés oxidativo (O'Donnell *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2009; Jaszek *et al.*, 2014).

Además, el oxígeno tiene un efecto negativo sobre el nivel de expresión de *poxc* y sobre la producción específica de lacasas, lo cual no había sido reportado antes y es un indicador de que la actividad lacasa resultante está asociada a la expresión de *poxc*. Con la finalidad de comprender el papel que desempeña el oxígeno en la transcripción génica del gen *poxc*, sería conveniente investigar las vías respiratorias involucradas en los cultivos a diferentes TOD y cuantificar metabolitos participantes en la respuesta a estrés oxidativo como $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 para buscar una relación con el nivel de expresión de *poxc*.

Por su parte, la EDCF tiene efecto positivo en la producción específica de lacasas y define el tamaño de los *pellets* formados teniendo efecto negativo. Sin embargo, tras considerar que la EDCF no afecta a la velocidad de crecimiento del hongo ni a la expresión de los genes que codifican lacasas, lo más probable es que el efecto de la EDCF se deba a los esfuerzos mecánicos que favorecen la formación de *pellets* pequeños y más compactos, y no a un mecanismo de respuesta transcripcional a estrés hidrodinámico. Al obtenerse *pellets* más pequeños, las limitaciones difusionales de oxígeno y nutrientes serán menores e incrementará el porcentaje de biomasa activa en la capa externa del *pellet*, así como su área superficial, en donde se ha comprobado que ocurre la producción de enzimas de secreción en otros hongos (Wösten *et al.*, 1991; Gordon *et al.*, 2000; Driouch *et al.*, 2012; Hamanaka *et al.*, 2001).

Conclusiones similares se obtuvieron en el trabajo de El-Enshasy *et al.* (2006) con *Aspergillus niger* al estudiar el efecto de la disipación de energía en la producción de glucosa-oxidasas recombinantes, donde se comprobó que el tamaño de los *pellets* es el responsable del rendimiento enzimático y que la producción de proteínas de secreción tiene lugar en la capa externa del *pellet* donde no existen limitaciones difusionales importantes.

También es importante resaltar que la disminución de la producción de lacasas observada en todos los cultivos a partir de las 36 h obedeció tanto a la disminución de la expresión del gen predominante *poxc* (con un nivel de expresión a las 48 h aproximadamente 100 veces menor que a las 24 h), así como a la actividad proteasa detectada en este mismo periodo.

Finalmente se cumplió el objetivo planteado y la hipótesis se acepta dado que la concentración de oxígeno disuelto (TOD) resultó ser el factor con mayor efecto sobre el crecimiento y la producción de lacasas por *P. ostreatus* CP50 en el intervalo de estudio.

9. CONCLUSIONES

- El oxígeno es el factor con mayor impacto sobre la velocidad de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* CP50, teniendo un efecto de tipo campana entre 8 y 22% de TOD y adicionalmente repercute negativamente en la producción de lacasas.
- El tamaño de los *pellets* es función de la energía disipada en el medio a través de la agitación y determina la producción específica de lacasas, la cual está probablemente ligada a la biomasa activa que no presenta limitaciones nutricionales.
- La isoforma predominante en el cultivo es la correspondiente a la codificada por el gen *poxc*, que se expresa alrededor de 100 veces más que el gen *pox3*.
- La producción específica de lacasas (U/g_x) disminuye al pasar las 36 h de cultivo debido a una disminución de la expresión del gen *poxc* y a la actividad de enzimas proteolíticas.

10. PERSPECTIVAS

- Averiguar la activación de alguna vía respiratoria alterna en concentraciones elevadas de oxígeno por medio de inhibidores como rotenona y amital, las cuales inhiben a las NADH deshidrogenasas convencionales pero no a las alternativas.
- Evaluar si a tensiones de oxígeno disuelto mayores a 15% existe una relación entre la síntesis de lacasas y la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS) con la finalidad de estudiar el papel del oxígeno en la síntesis de lacasas.
- Identificar la magnitud del efecto que ejercen las proteasas sobre la actividad de las lacasas durante el cultivo de *P. ostreatus* utilizando inhibidores de proteasas específicos y cuantificando proteína para detectar su degradación.
- Estudiar de manera detallada el efecto del tamaño del *pellet* y la concentración de oxígeno y nutrientes del medio sobre el porcentaje de biomasa activa en lo referente a la producción de lacasas por fluorescencia, utilizando indicadores de regiones ricas en ARNm como el anaranjado de acridina.

11. REFERENCIAS

- Ahamed, A. y Vermette, P. 2010. Effect of mechanical agitation on the production of cellulases by *Trichoderma reesei* RUT-C30 in a draft-tube airlift bioreactor. *Biochem Eng J* 49(3):379-387.
- Alexandre, G. y Zhulin, B. 2000. Laccases are widespread in bacteria. *Trends Biotechnol* 18(2):41-42.
- Amanullah, A., Jüsten, P., Davies, A., Paul, G.C., Nienow, A.W. y Thomas, C.R. 2000. Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. *Biochem Eng J* 5:109-114.
- Araujo, M.L., Oliveira, R.P., Giordano, R.C. y Hokka, C.O. 1996. Comparative studies on Cephalosporin C production process with free and immobilized cells of *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272. *Chem Eng Science*, 14th ISCRE. 51: 2835-2840.
- Babic, J. y Pavko, A. 2012. Enhanced enzyme production with the pelleted form of *D. squalens* in laboratory bioreactors using added natural lignin inducer. *J Ind Microbiol Biotechnol* 39:449-457.
- Bai, Z., Harvey, L.M. y McNeil, B. 2003a. Oxidative stress in submerged cultures of fungi. *Crit Rev Biotechnol* 23:267-302.
- Bai, Z., Harvey, L.M. y McNeil, B. 2003b. Physiological responses of chemostat cultures of *Aspergillus niger* (B1-D) to simulated and actual oxidative stress. *Biotechnol Bioeng* 82:691-701.
- Baldrian, P. 2006. Fungal laccases occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev*, 30: 215-242.
- Belinky, P.A., Flikshtein N., Lechenko, S., Gepstein, S. y Dosoretz, C.G. 2003. Reactive oxygen species and induction of lignin peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 69:6500-6506.
- Bennet, C.O. y Myers, J.E. 1962. Momentum, heat and mass transfer. McGraw Hill, Inc. pg 15-23.
- Birhanli, E. y Yesilada, O. 2010. Enhanced production of laccase in repeated-batch cultures of *Funalia trogii* and *Trametes versicolor*. *Biochem Eng J* 52:33-37.
- Carlisle, M. J., Watkinson, S. C. y Gooday, G. W. 2001. "The Fungi." Academic Press, London, UK.
- Casas López, J.L., Sánchez Pérez, J.A., Fernández Sevilla, J.M., Rodríguez Porcel, E.M. y Chisti, Y. 2005. Pellet morphology, culture rheology and lovastatin production in cultures of *Aspergillus terreus*. *J Biotechnol* 116: 61-77.
- Casas López, J.L., Rodríguez Porcel, E.M., Oller Alberola, I., Ballesteros Martín, M.M., Sánchez Pérez, J.A., Fernández Sevilla, J.M. y Chisti, Y. 2006. Simultaneous determination of oxygen consumption rate and volumetric oxygen transfer coefficient in pneumatically agitated bioreactors. *Ind Eng Chem Res* 45: 1167-1171.

- Charles, M. 1985. Fermentation design and scale-up. *Comprehensive Biotechnology*, Vol 2. Moo-Young M (Ed.), Pergamon Press, Oxford, UK: 120-150.
- Couto, S.R. y Toca-Herrera, J.L. 2007. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnol Adv* 25: 558-569.
- Cui, Y.Q., van der Lans, R.G. y Luyben, K.C. 1997. Effect of agitation intensities on fungal Morphology of Submerged Fermentation. *Biotech and Bioeng* 57: 715-726.
- Cui, Y.Q., van der Lans, R.G. y Luyben, K.C. 1998. Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. *Biotechnol Bioeng* 57: 409-419.
- De Souza, C.G., Tychanowics, G.K., De Souza, D.F. y Peralta, R.M. 2004. Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. *J Basic Microbiol* 44:129-136.
- Deckwer, W.D., Jahn, D., Hempel, D.C. y Zeng, A.P. 2006. System biology approach to bioprocess development. *Engineering in Life Sciences* 6(5): 455-469.
- Díaz, R. 2009. Efecto del pH inicial de desarrollo de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida sobre su actividad de lacasas. Tesis de maestría en Biotecnología aplicada, Instituto Politécnico Nacional, Tlaxcala, México.
- Doran, P.M. 1995. Bioprocess Engineering Principles. *Academic Press London UK*: 98-217.
- Dosoretz, C.G., Dass, S.B., Reddy, C.A. y Grethlein, H.E. 1990. Protease-mediated degradation of lignin peroxidase in liquid cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 56(11): 3429-3434.
- Driouch, H., Hänsch, r., Wucherpennig, T. Krull, R. y Wittmann, C. 2012. Improved enzyme production by bio-pellets of *Aspergillus niger*: targeted morphology engineering using titanate microparticles. *Biotechnol Bioeng* 109(2): 462-471.
- Eggert, C., Temp, U. y Eriksson, K.E. 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl Environ Microbiol* 62:1151-1158.
- El-Enshasy, H., Kleine, J. y Rinas, U. 2006. Agitation effects on morphology and protein productive fractions of filamentous and pelleted growth forms of recombinant *Aspergillus niger*. *Process Biochem* 41:2103-2112.
- Emerson, S. 1950. The growth phase in *Neurospora* corresponding to the logarithmic phase in unicellular organisms. *J Bacteriol* 60:221-223.
- Fabian, K., Lorenzen, K., Anke, T., Johansson, M. y Sterner, O. 1998. Five new bioactive sesquiterpenes from the fungus *Radulomyces confluens* Christ. *Z Naturforsch C* 53(11-12): 939-945.
- Faraco, V., Palmieri, G., Festa, G., Monti, M., Sannia, G. y Giardina, P. 2005. A new subfamily of fungal subtilases: structural and functional analysis of a *Pleurotus ostreatus* member. *Microbiology* 151: 457-466.

- Fazenda, M.L., Seviour, R., McNeil, B. y Harvey, L.M. 2008. Submerged culture fermentation of “higher fungi”: the macrofungi. *Adv Appl Microbiol* 63: 33-103.
- Fenice, M., Giovannozzi Sermanni, G., Federici, F. y D'Annibale, A. 2003. Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. *J Biotechnol* 100:77–85.
- Gabelle, J.C., Jourdier, E., Licht, R.B., Ben Chaabane, F., Henaut, I., Morchain, J. y Augier, F. 2012. Impact of rheology on the mass transfer coefficient during the growth phase of *Trichoderma reesei* in stirred bioreactors. *Chem Eng Sc* 75:408-417.
- Galhaup, C., Wagner, H., Hinterstoisser, B. y Haltrich, D. 2002. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enz Microb Technol* 30: 529–536.
- Gianfreda, L., Xu, F. y Bollag, J. 1999. Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Biorrem J* 3: 1-25.
- Giardina, P., Cannio, R., Martirani, L., Marzullo, L., Palmieri, G. y Sannia, G. 1995. Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* 61(6) :2408–2413.
- Giardina, P., Aurilia, V., Cannio, R., Marzullo, L., Amoresano, A., Siciliano, R., Pucci, P. y Sannia, G. 1996. The gene, protein and glycan structures of laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Eur J Biochem* 235(3):508-515.
- 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*. *Biochem J*, 341: 655-663.
- Gibbs, P.A., Seviour, R.J. 1996. Does the agitation rate and/or oxygen saturation influence exopolysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture? *Appl Microbiol Biotechnol* 46:503-510.
- Goldstein, S., Samuni, A., Arnovitch, Y., Godinger, D., Russo, A. y Mitchell, J.B. 2002. Kinetics of paraquat and copper reactions with nitroxides: the effects of nitroxides on the aerobic and anoxic toxicity of paraquat. *Chem Res Toxicol* 15:686-691.
- Gomes, S.A., Nogueira, J.M., y Rebelo, M.J. 2004. An amperometric biosensor for polyphenolic compounds in red wine. *Biosens Bioelectron* 20:1211-1216.
- Gordon, G.L., Archer, D.B., Jeenes, D.J., Doonan, J.H., Wells, B., Trinci, A.P.J. y Robson, G.D. 2000. A glucoamylase::GFP gene fusion to study protein secretion by individual hyphae of *Aspergillus niger*. *J Microbiol Methods* 42(1): 39-48.
- Grimm, H.L., Kelly, S., Krull, R. y Hempel, D.C. 2005. Morphology and productivity of filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 69:375-384.
- Hamanaka, T., Higashiyama, K., Fujikawa, S. y Park, E.Y. 2001. Mycelial pellet intrastucture and visualization of mycelia and intracellular lipid in a culture of *Mortierella alpina*. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:233-238.

- Hatakka, A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected White-rot fungi: production and role from in lignin degradation. *FEMS Microbiol Rev* 13:125-135
- Hatakka, A. 2001. Biodegradation of lignina. *Lignin, Humic Substances and Coal* (Hofrichter, M. & Steinbüchel, A. eds), pp. 129-179. Wiley-VCH, Weiheim, Germany.
- Hassan, M., Corkidi, G., Galindo, E., Flores, C. y Serrano-Carreón, L. 2002. Accurate and rapid viability assessment of *Trichoderma harzianum* using fluorescence-based digital image analysis. *Biotechnol Bioeng* 80(6):677-684.
- Hess, J., Leitner, C., Galhaup, C., Kulbe, K.D., Hinterstoisser, B., Steinwender, M. y Haltrich, D. 2002. Enhanced formation of extracellular laccase activity by the white-rot fungus *Trametes multicolor*. *Appl Biochem Biotech* 98–100:229–41.
- Janusz, G., Kucharzyk, K.H., Pawlik, A., Staszczak, M. y Paszczynski, A.J. 2013. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: gene expression and regulation. *Enz Microb Technol* 52: 1-12.
- Jaszek, M., Grzywnowicz, K., Malarczyk, E. y Leonowicz, A. 2006. Enhanced extracellular laccase activity as a part of the response system of white rot fungi: *Trametes versicolor* and *Abortiporus biennis* to paraquat-caused oxidative stress conditions. *Pest Biochem Physiol* 85:147-154.
- Jaszek, M., Kos, K., Matuszewska, A., Graz, M., Stefaniuk, D., Osinska-Jaroszuk, M., Predecka, M., Jóźwik, E. y Grzywnowicz, K. 2014. Effective stimulation of the biotechnological potential of the medicinal white rot fungus: *Phellinus pini* by menadione-mediated oxidative stress. *Appl Biochem Biotechnol* 174:644-656.
- Johansen, C.L., Coolen, L. y Hunik, J.H. 1998. Influence of morphology on product formation in *Aspergillus awamori* during submerged fermentations. *Biotechnol Prog* 14: 233-240.
- Jorgensen, T.R., Goosen, T., van der Hondel, C., Ram, A. y Iversen, J. 2009. Transcriptomic comparison of *Aspergillus niger* growing on two different sugars reveals coordinated regulation of the secretory pathway. *BMC Genomics* 10:44.
- Jüsten, P., Paul, G.C., Nienow, A.W. y Thomas, C.R. 1996. Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. *Biotechnol Bioeng* 52: 672-684.
- Jüsten, P., Paul, G., Nienow, A.W. y Thomas, C. 1998. Dependence of *Penicillium chrysogenum* growth, morphology, vacuolation, and productivity in fed-batch fermentations on impeller type and agitation intensity. *Biotechnol Bioeng* 59: 762-775.
- Karaffa, L., Váczy, K., Sándor, E., Biró, S., Szentirmai, A. y Pócsi, I. 2001. Cyanide-resistant alternative respiration is strictly correlated to intracellular peroxide levels in *Acremonium chrysogenum*. *Free Radic Res* 34:405-416.
- Kelly, S., Grimm, L.H., Hengstler, J., Schultheis, E., Krull, R. y Hempel, D.C. 2004. Agitation effects on submerged growth and product formation of *Aspergillus niger*. *Bioprocess Biosyst Eng* 26(5): 315-323.

- Kelly, S., Grimm, L.H., Bendig, C., Hempel, D.C. y Krull, R. 2006. Effects of fluid dynamic induced shear stress on fungal growth and morphology. *Process Biochem* 41:2113-2117.
- Krishna Prasad, K., Venkata Mohan, S. y Sarma, P.N. 2006. Immobilization of *Pleurotus ostreatus* 1804 of PUF cubes: mycelial growth pattern, effect on laccase yield and purification. *Indian J Biotechnol* 5: 84-88.
- Krull, R., Cordes, C., Horn, H., Kampen, I., Kwade, A., Neu, T.R. y Nörtemann, B. 2010. Morphology of filamentous fungi: linking cellular biology to process engineering using *Aspergillus niger*. *Adv biochem Eng Biotechnol* 121: 1-21.
- Krull, R., Wucherpennig, T., Eslahpazir, M.E., Walisko, R., Melzer, G., Hempel, D.C., Kampen, I., Kwade, A. y Wittmann, C. 2013. Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. *J Biotechnol* 163:112-123.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lettera, V., Del Vecchio, C., Piscitelli, A. y Sannia, G. 2011. Low impact strategies to improve ligninolytic enzyme production in filamentous fungi: the case of laccase in *Pleurotus ostreatus*. *C R Biol* 11: 781-788.
- Li, Q., Harvey, L.M. y McNeil, B. 2008. Oxygen enrichment effects on protein oxidation, proteolytic activity and the energy status of submerged batch cultures of *Aspergillus niger* B1-D. *Process Biochem* 43:238-243.
- Li, Q., Harvey, L.M. y McNeil, B. 2009. Oxidative stress in industrial fungi. *Crit Ver Biotechnol* 29:199-213.
- Li, Q., Bai, Z., O'Donnell, A., Harvey, L.M., Hoskisson, P.A. y McNeil, B. 2011. Oxidative stress in fungal fermentation processes: the roles of alternative respiration. *Biotechnol Lett* 33:457-67.
- Li, Y. y Trush, M.A. 1998. Diphenyleneiodonium, a NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production. *Biochem Biophys Res Commun* 253:295-299.
- Lucatero, S, Larralde-Corona, C.P., Corkidi, G. y Galindo, E. 2003. Oil and air dispersion in a simulated fermentation broth as a function of mycelial morphology. *Biotechnol Prog* 19: 285-292.
- Magnani, T., Soriani, F.M., Martins, V.P., Nascimento, A.M., Tudella, V.G., Curti, C. y Uyemura, S.A. 2007. Cloning and functional expression of the mitochondrial alternative oxidase of *Aspergillus fumigatus* and its induction by oxidative stress. *FEMS Microbiol Lett* 271:230-238.
- Makagiansar, H.Y., Ayazi-Shamlou, P., Thomas, C.R. y Lilly, M.D. 1993. The influence of mechanical forces on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Bioproc Eng* 9: 83-90.
- Marshall, K.C. y Alexander, M. 1960 Growth characteristics of fungi and actinomycetes. *J Bacteriol* 80: 412-416.
- Marzluf, G.A. 1997. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 17-&.

- Mayer, A.M. y Staples, R.C. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60: 551-565.
- Messerschmidt, A. 1997. *Multi-Copper Oxidases*. World Scientific, Singapore.
- Metz, B., Kossen, N.W.F. y van Suijdam, J.C. 1979. The rheology of mould suspensions. *Adv Biochem Eng* 11:104-156.
- Minussi, R.C., Pastore, G.M., Durán, N. 2002. Potencial applications of laccase in the food industry. *Trends. Food Sci Technol*, 13: 205-216.
- Mitard, A. y Riba, J.P. 1986. Rheological properties of *Aspergillus niger* pellet suspensions. *Applied Microbiol Biotechnol* 25:245-249.
- Mitchell, D.A. y B.K. Lonsane, 1992. Definition, characteristics and potential. In: solid substrate cultivation, Doelle, H.W., D.A. Mitchell and C.E. Rolz (Eds.). Elsevier Science Publishers Ltd., England, UK, pp: 1-16.
- Moldes, D., Lorenzo, M. y Sanromán, M.A. 2004. Different proportions of laccase isoenzymes produced by submerged cultures of *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic wastes. *Biotechnol Lett* 26: 327-330.
- Moonmangmee, S., Kawabata, K., Tanaka, S., Toyama, H., Adachi, O. y Matsushita, K.A. 2002. A novel polysaccharide involved in the pellicle formation of *Acetobacter aceti*. *J Biosci Bioeng* 93: 192-200.
- Moore, A.L., Albury, M.S., Crichton, P.G. y Affourtit, C. 2002. Function of the alternative oxidase: is it still a scavenger? *Trends Plant Sci* 7:478-81.
- Muñoz, C., Guillén, F. y Martínez, A. T. 1997. Induction and characterization of laccases in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Curr Microbiol* 34: 1-5.
- Nielsen, J., Johansen, C.L., Jacobsen, M., Krabben, P. y Villadsen, J. 1995. Pellet formation and fragmentation in submerged cultures of *Penicillium chrysogenum* and its relation to penicillin production. *Biotechnol Prog* 11(1): 93-98.
- Nienow, A.W. 1990. Agitators for mycelial fermentations. *TIBTECH* 8:224-233.
- O'Donnell, A., Bai, Y., Bai, Z., McNeil, B. y Harvey L.M. 2007. Introduction to bioreactors of shake-flask inocula leads to development of oxidative stress in *Aspergillus niger*. *Biotechnol Lett* 29:895-900.
- Oh, J. Y., Cho, E. J., Nam, S. H., Choi, J. W. y Yun, J. W. 2007. Production of polysaccharide-peptide complexes by submerged mycelial culture of an entomopathogenic fungus *Cordyceps sphecocephala*. *Process Biochem* 42: 352-362.
- Oldshue, J.Y. 1983. Fluid mixing technology. *Chemical Engineering*, Mac Graw-Hill Pub. Co. New York, NY.
- Onken, U. y Liefke, E. 1989. Effect of total and partial pressure (oxygen and carbon dioxide) on aerobic microbial processes. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 40:137-169.

- Packer, H.L. y Thomas, C.R. 1990. Morphological measurements of filamentous microorganisms by fully automatic image analysis. *Biotechnol Bioeng* 35:870-881.
- Paek, K.Y., Murthy, H.N. y Zhong, J.J. 2014. Production of biomass and bioactive compounds using bioreactor technology. *Springer* pp. 103.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Scaloni, A., Capasso, A. y Sannia, G. 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *J Biol Chem* 272: 31301–31307.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B. y Sannia, G. 2000. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol*, 66: 920-924.
- Palmieri, G., Cennamo, G., Faraco, V., Amoresano, A., Sannia, G. y Giardina, P. 2003. Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme Microb Technol*, 33: 220–230.
- Papagianni, M. 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol Adv*, 22: 189–259.
- Paul, G.C. y Thomas, C.R. 1996. A structured model for hyphal differentiation and penicillin production using *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol Bioeng* 51: 558-572.
- Penninckx, M. 2000. A short review on the role of glutathione in the response of yeast to nutritional, environmental and oxidative stresses. *Enzyme Microb Technol* 26:737-742.
- Pezzella, C., Autore, F., Giardina, P., Piscitelli, A., Sannia, G. y Faraco, V. 2009. The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: isolation and heterologous expression of new family members. *Curr Genet* 55:45–57.
- Pirt, S.J. 1966. A theory of the mode of growth of fungi in the form of pellets in submerged culture. *P R Soc Lond B Bio* 166: 369-373.
- Piscitelli, A., Giardina, P., Lettera, V., Pezzella, C., Sannia, G. y Faraco, V. 2011. Induction and transcriptional production of laccases in fungi. *Current Genomics* 12: 104-112.
- Prosser, J.I. y Tough, A.J. 1991. Growth mechanisms and growth kinetics of filamentous microorganisms. *Crit Rev Biotechnol* 10(4):253-274.
- Prosser, J.I. 1995. Kinetics of filamentous growth and branching. *The Growing Fungus* (edited by, N.A. Gow & G.M. Gadd), pp. 301-318, Chapman and Hall, London.
- Rane, K.D. y Sims, K.A. 1994. Oxygen uptake and citric acid production by *Candida lipolytica* Y1095. *Biotechnol Bioeng* 43: 131-137.
- Razmovski, R. y Pucarevic, M. 2002. Effect of brestan on *Saccharomyces cerevisiae* during continuous cultivation. *Folia Microbiol* 47(5): 507-510.

- Riley, G.L., Tucker, K.G., Paul, G.C. y Thomas, C.R. 2000. Effect of biomass concentration and mycelial morphology on fermentation broth rheology. *Biotechnol Bioeng* 68(2): 160-172.
- Rinas, U., El-Enshasy, H., Emmeler, M., Hille, A., Hempel, D.C. y Horn, H. 2005. Model-based prediction of substrate conversion and protein synthesis and excretion in recombinant *Aspergillus niger* biopellets. *Chem Eng Sci* 60:2729-2739.
- Rocha-Valadez, J.A., Hassan, M., Corkidi, G., Flores, C., Galindo, E. y Serrano-Carreón, L. 2005. 6-pentyl- α -pyrone production by *Trichoderma harzianum*: the influence of energy dissipation rate and its implications on fungal physiology. *Biotechnol & Bioeng*, 91: 54-61.
- Rocha-Valadez, J.A., Albiter, V., Caro, M.A., Serrano-Carreón, L. y Galindo, E. 2007a. A fermentation system designed to independently evaluate mixing and/or oxygen tension effects in microbial processes: development, application and performance. *Bioproc Biosyst Eng* 30: 115-122.
- Rocha-Valadez, J.A., Galindo, E. y Serrano-Carreón, L. 2007b. The influence of circulation frequency on fungal morphology: A case study considering Kolmogorov microscale in constant specific energy dissipation rate cultures of *Trichoderma harzianum*. *J Biotech* 130: 394-401.
- Rodríguez Porcel, E.M, Casas López, J.L., Sánchez Pérez, J.A., Fernández Sevilla, J.M. y Chisti, Y. 2005. Effects of pellet morphology on broth rheology in fermentations of *Aspergillus terreus*. *Biochem Eng J* 26:139-144.
- Schügerl, K., Wittler, R. y Lorenz, T. 1983. The use of molds in pellet form. *Trends Biotechnol* 1(4):120-123.
- Seo, J.H., Li, H., Kim, M.J. y Kim, S.J. 2007. Determination of agitation and aeration conditions for scale-up of cellulolytic enzymes production by *Trichoderma inhamatum* KSJ1. *Korean J Chem Eng* 24(5): 800-805.
- Shen, M.H., Kim, J.S., Sapkota, K., Park, S.E., Choi, B.S., Kim, S., Lee, H.H., Kim, C.S., Chun, H.S., Ryoo, C.I. y Kim, S.J. 2007. Purification, characterization, and cloning of fibrinolytic metalloprotease from *Pleurotus ostreatus* mycelia. *J Microbiol Biotechnol* 17(8): 1271-1283.
- Sigler, K., Chaloupka, J., Brozmanova, J., Stadler, N. y Hofer, M. 1999. Oxidative stress in microorganisms. I. Microbial vs. higher cells damage and defenses in relation to cell aging and death. *Folia Microbiol (Praha)* 44:587-624.
- Silvério, S.C., Moreira, S., Milagres, A.M.F., Macedo, E.A., Teixeira, J.A. y Mussatto, S.I. 2013. Laccase production by free and immobilized mycelia of *Peniophora cinérea* y *Trametes versicolor*: a comparative study. *Bioprocess Biosyst Eng* 36: 365-373.
- Smith, J.J., Lilly M.D. y Fox, R.I. 1990. The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol Bioeng* 35: 1011-1023.
- Soden, D.M. y Dobson, A.D. 2001. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology* 147: 1755-1763.

- Strauss, J., Horvath, H.K., Abdallah, B.M., Kinermann, J., Mach, R.L. y Kubicek, C.P. 1999. The function of CreA, the carbon catabolite repressor of *Aspergillus nidulans*, is regulated at the transcriptional and post-transcriptional level. *Mol Microbiol* 32:169-178.
- Strong, P.J. 2011. Improved laccase production by *Trametes pubescens* MB89 in distillery wastewaters. *Enzyme Res.* 2011: 379176
- Tavares, A.P., Coelho, M.A., Agapito, M.S., Coutinho, J.A., y Xavier, A.M. 2006. Optimization and modeling of laccase production by *Trametes versicolor* in a bioreactor using statistical experimental design. *App. Biochem Biotechnol* 134:233-48.
- Terashita, T., Oda, K., Kono, M. y Murao, S. 1985. Proteinases systems in *Flammulina velutipes* and *Pleurotus ostreatus*. *Trans Mycol Soc Jpn* 26: 397-409
- Thurston, C.F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology-Sgm* 140: 19-26.
- Tinoco, R., Acevedo, A., Galindo, E. y Serrano-Carreón, L. 2011. Increasing *Pleurotus ostreatus* laccase production by culture medium optimization and copper/lignin synergistic induction. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38: 531-540.
- Tinoco-Valencia, R., Gómez-Cruz, C., Galindo, E. y Serrano-Carreón, L. 2014. Toward an understanding of the effects of agitation and aeration on growth and laccases production by *Pleurotus ostreatus*. *J Biotechnol* 177:67-73.
- Torres, A.M., Quintero, J.C. y Atehortúa, L. 2008. Determinación de la velocidad específica de consumo de oxígeno en microorganismos incluyendo el tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno. *Rev Fac Ing Univ Antioquia* 43:33-41.
- Tramper, J. y van't Riet, K. 1991. Basic bioreactor design. *Marcel Dekker Inc*, New York: 136-180.
- Treskatis, S.K., Orgeldinger, V., Wolf, H. y Gilles, E.D. 1997. Morphological characterization of filamentous microorganisms in submerged cultures by on-line digital image analysis and pattern recognition. *Biotechnol Bioeng* 53(2): 191-201.
- Ueda, M., Shintani, K., Nakanishi-Anjyuin, A., Nakazawa, M., Kusuda, M., Nakatani, F., Kawaguchi, T., Tsujiyama, S., Kawanishi, M., Yagi, T. y Miyatake, K. 2012. A protein from *Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis* C.J. Mou with strong removal activity against the natural steroid hormone, estriol: purification, characterization, and identification as a laccase. *Enzyme Microb Technol* 51(6-7): 402-407.
- Voulgaris, I., O'Donnell, A., Harvey, L.M. y McNeil, B. 2012. Inactivating alternative NADH dehydrogenases: enhancing fungal bioprocesses by improving growth and biomass yield? *Sci Rep* 2,322; DOI:10.1038/SREP00322.
- Wahid, Z. y Nadir, N. 2013. Improvement of one factor at a time through design of experiments. *World Appl Sci J* 21 (Mathematical Applications in Engineering), 56-61.
- Wittler, R., Baumgartl, H., Lübbers, D.W., Schügerl, K. 1986. Investigations of oxygen transfer into *Penicillium chrysogenum* pellets by microprobe measurements. *Biotechnol Bioeng* 28: 1024-1036.

- Wösten, H.A., Moukha, S.M., Sietsma, J.H. y Wessels, J.G. 1991. Localization of growth and secretion of proteins in *Aspergillus niger*. *J Gen Microbiol* 137:2017-2023.
- Xiao, Y.Z., Hong, Y.Z., Li, J.F., Hang, J., Tong, P.G., Fang, W. y Zhou, C.Z. 2006. Cloning of novel laccase isozyme genes from *Trametes* sp AH28-2 and analyses of their differential expression. *Appl Microbiol Biotechnol* 71:493-501.
- Yang, Y., Fan, F., Zhuo, R., Ma, F., Gong, Y., Wan, X., Jiang, M. y Zhang, X. 2012. Expression of the laccase gene from a white rot fungus in *Picchia pastoris* can enhance the resistance of this yeast to H₂O₂-mediated oxidative stress by stimulating the glutathione-based antioxidative system. *Appl Environ Microbiol* 78(16):5845-54.
- Yáñez, C. 2012. Estudio del efecto de cobre y lignina en la producción y la transcripción de lacasas por *Pleurotus ostreatus* CP50. Tesis de maestría en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología-UNAM, Cuernavaca, México.
- Ye, B., Faltin, Z., Ben-Hayyim, G., Eshdat, Y., Gressel, J. 2000. Correlation of glutathione peroxidase to paraquat/oxidative stress resistance in *Conyza* determined by direct fluorometric assay. *Prestic Biochem Physiol* 66:182-194.
- Yu, L., Chao, Y., Wensel, P. y Chen, S. 2012. Hydrodynamic and kinetic study of cellulose production by *Trichoderma reesei* with pellet morphology. *Biotechnol and Bioeng* 109: 1755-1768.
- Yukioka, H., Inagaki, S., Tanaka, R., Katoh, K., Miki, N., Mizutani, A. y Masuko, M. 1998. Transcriptional activation of the alternative oxidase gene of the fungus *Magnaporthe grisea* by a respiratory-inhibiting fungicide and hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1442:161-169.
- Zhao, Y., Li, J., Chen, Y. y Hang, H. 2009. Response to oxidative stress of *Coriolus versicolor* induced by exogenous hydrogen peroxide and paraquat. *Annals of Microbiol* 59(2):221-227.
- Zmak, P.M., Podgornik, A., Podgornik, H., Koloini, T. 2006. Impact of pellet size on growth and lignin peroxidase activity of *Phanerochaete chrysosporium*. *World J Microbiol Biotechnol* 22:1243-1249.

ANEXO 1

Cultivos de *P. ostreatus* CP50 desarrollados en el diseño experimental 3²

En este anexo se muestran las cinéticas individuales de los cultivos que formaron parte del diseño experimental 3² donde los factores evaluados fueron la EDCF y la TOD. En total se realizaron 20 fermentaciones; los experimentos 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 y 9 se hicieron por duplicado, mientras que el cultivo 5 se llevó a cabo por cuadruplicado. En las figuras de este anexo (A.1.1-A.1.9) se presenta la evolución del torque (lb·ft), la velocidad de agitación (N, rpm), tensión de oxígeno disuelto (TOD, %), producción de CO₂ (mmol/min), salida de oxígeno (mmol/min), concentración de biomasa (g/L), actividad lacasa (U/mL), concentración de glucosa (g/L) y diámetro de *pellet* (μm). Las líneas trazadas en las gráficas de biomasa y actividad lacasa representan los datos obtenidos al simular k_p y α , respectivamente, en los modelos de crecimiento y de producción asociada al crecimiento. No se cuenta con los perfiles de CO₂ y O₂ de todos los cultivos debido a que en un principio no se analizó la composición de los gases a la salida del fermentador.

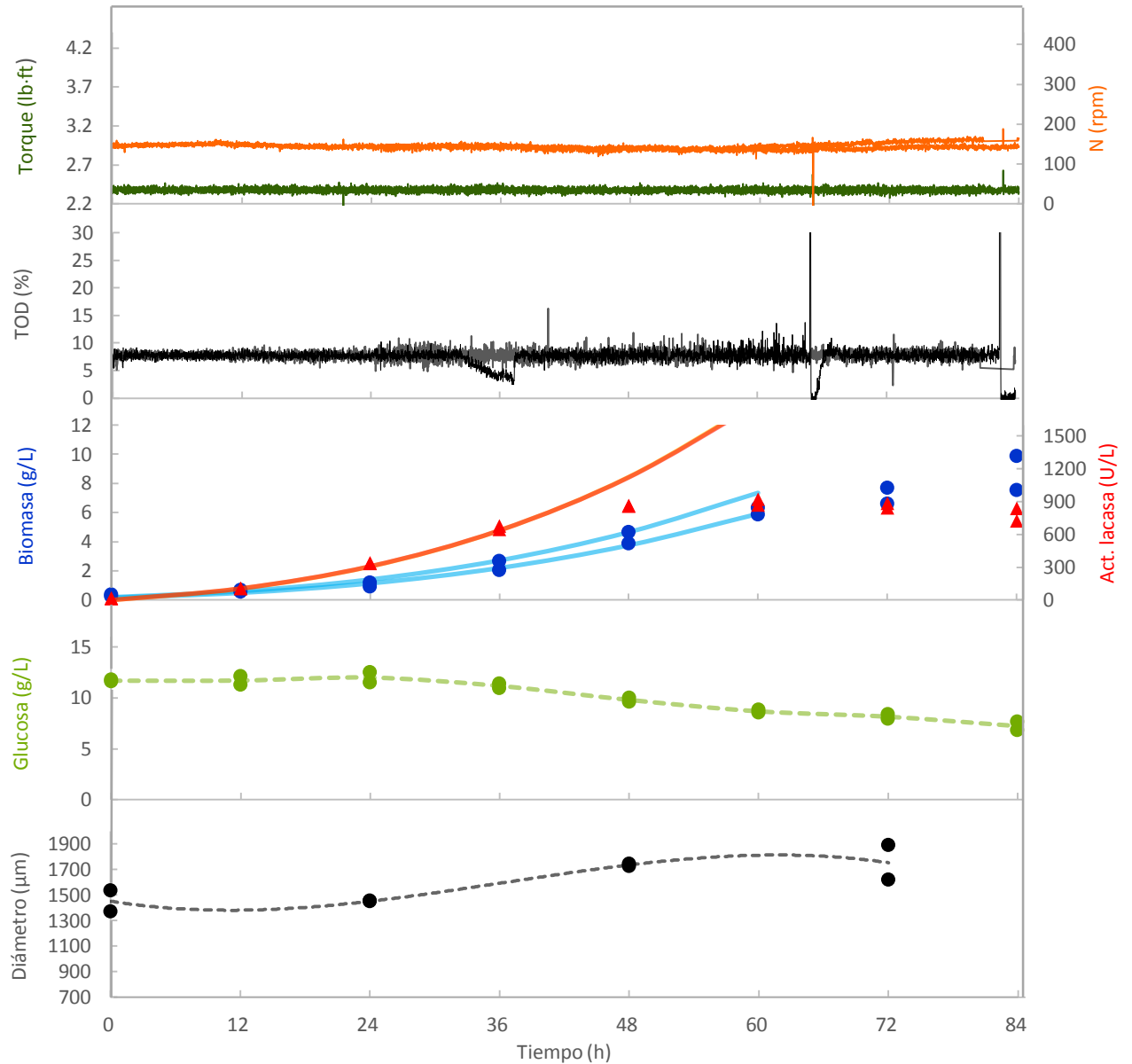


Fig. A1. Evolución del torque, velocidad de agitación (N), tensión de oxígeno disuelto (TOD), concentración de biomasa, actividad lacasa, concentración de glucosa y diámetro promedio de *pellet* en los cultivos de *P. ostreatus* CP50 desarrollados a 1 kW/m^3 y TOD 8% .

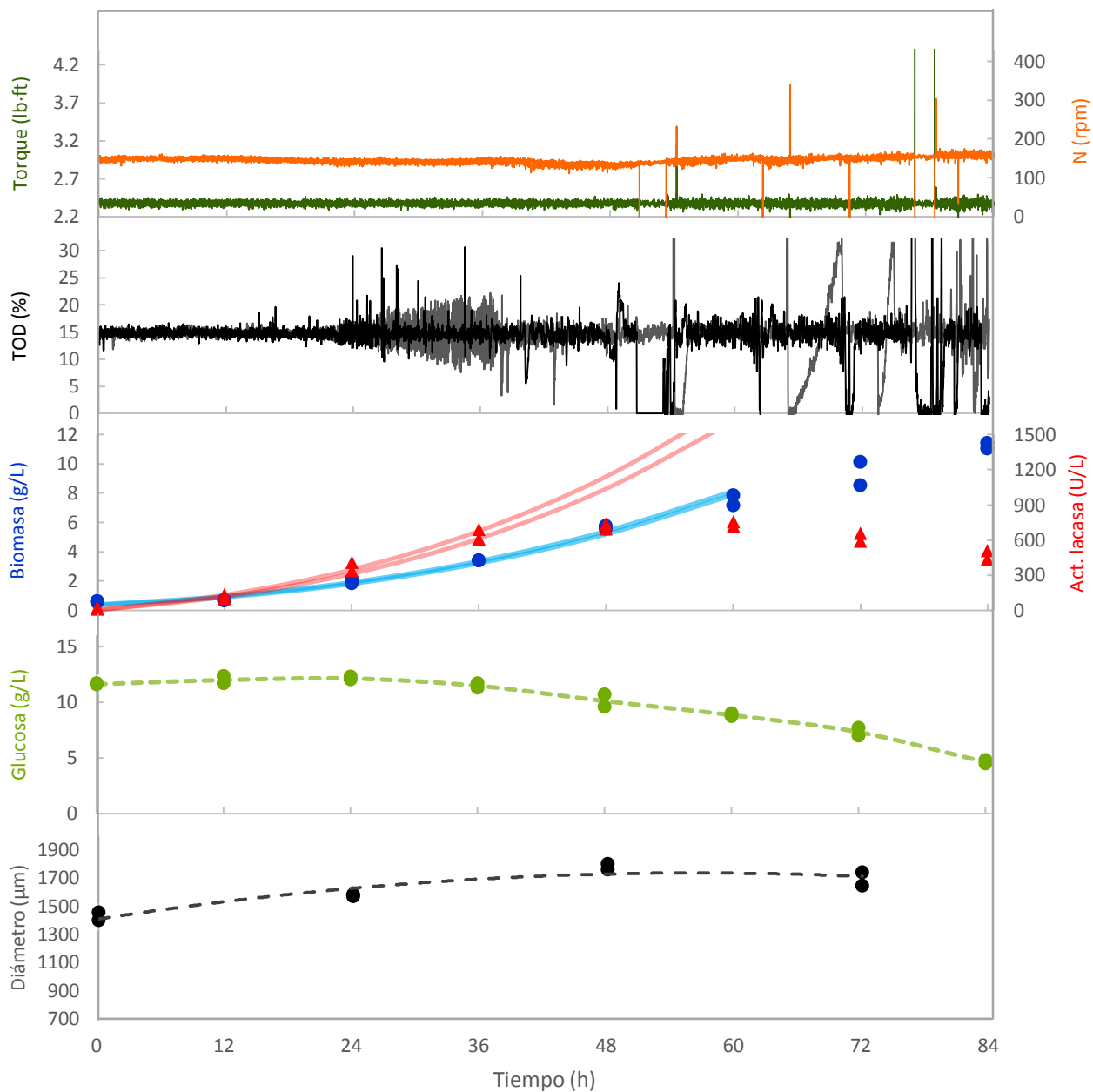


Fig. A2. Evolución del torque, velocidad de agitación (N), tensión de oxígeno disuelto (TOD), concentración de biomasa, actividad lacasa, concentración de glucosa y diámetro promedio de *pellet* en los cultivos de *P. ostreatus* CP50 desarrollados a $1 \text{ kW/m}^3\text{s}$ y TOD 15% .

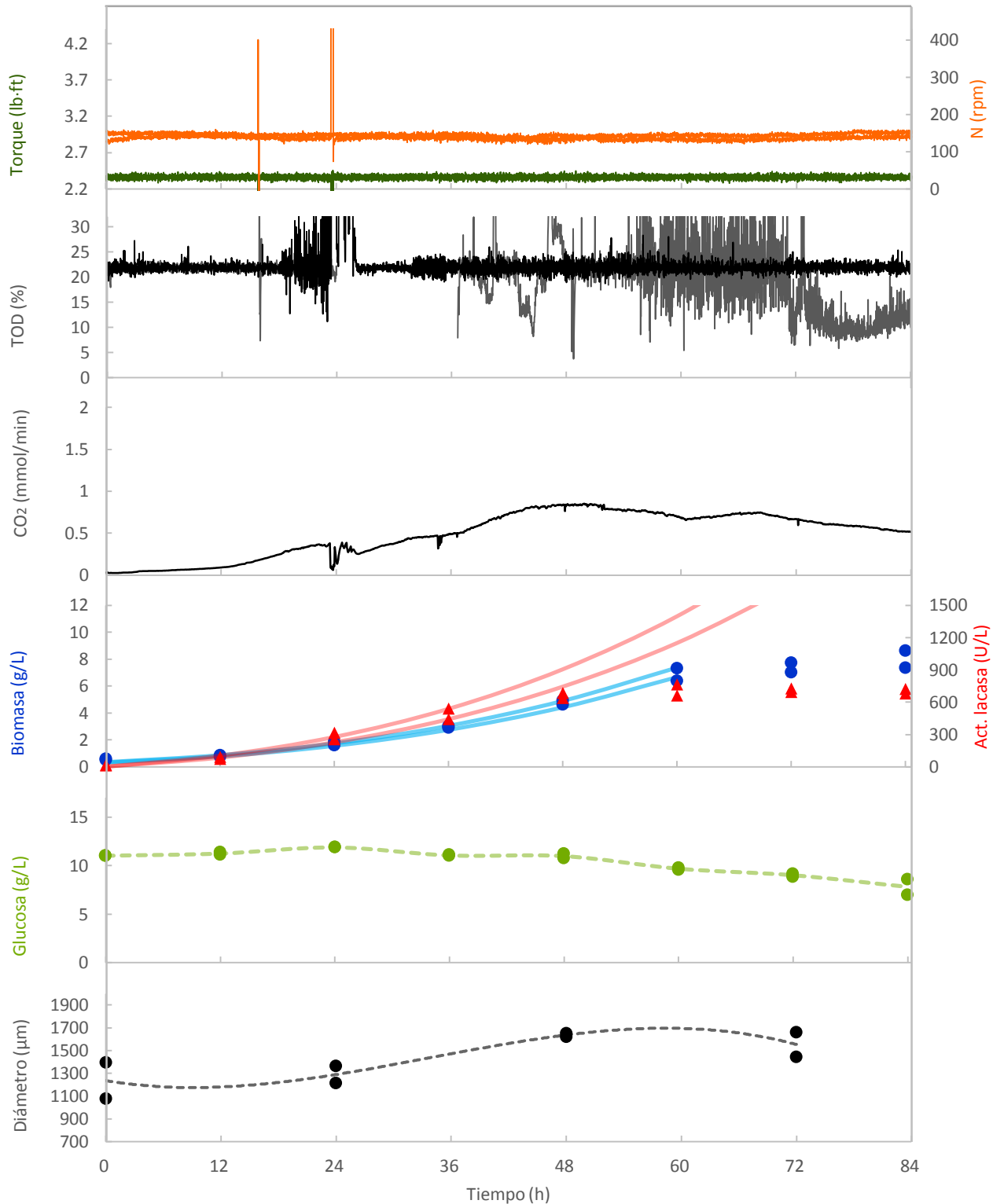


Fig. A3. Evolución del torque, velocidad de agitación (N), tensión de oxígeno disuelto (TOD), producción de CO₂, concentración de biomasa, actividad lacasa, concentración de glucosa y diámetro promedio de *pellet* en los cultivos de *P. ostreatus* CP50 desarrollados a 1 kW/m³s y TOD 22% .

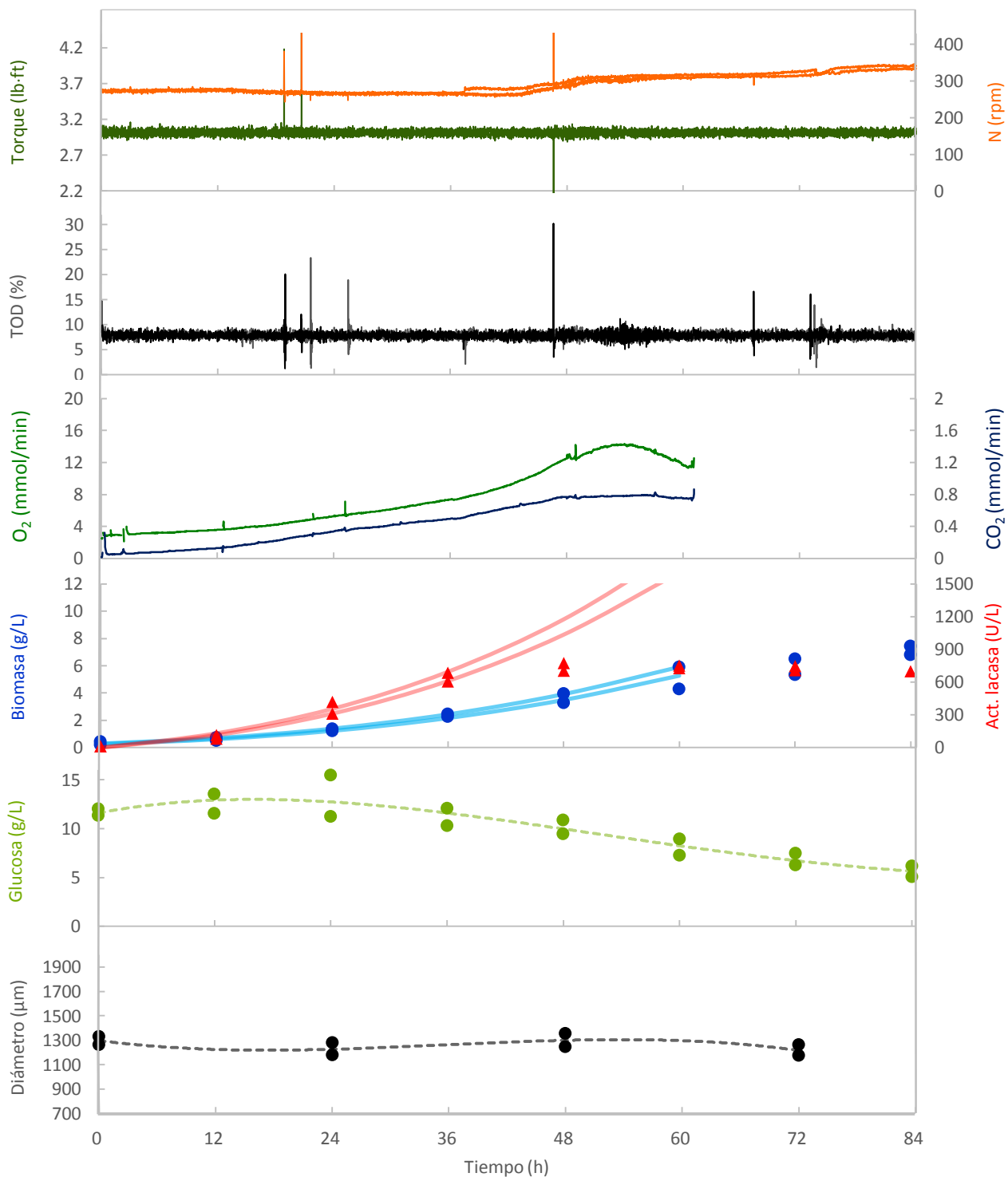


Fig. A4. Evolución del torque, velocidad de agitación (N), tensión de oxígeno disuelto (TOD), producción de CO₂, salida de O₂, concentración de biomasa, actividad lacasa, concentración de glucosa y diámetro promedio de *pellet* en los cultivos de *P. ostreatus* CP50 desarrollados a 11 kW/m³s y TOD 8% .

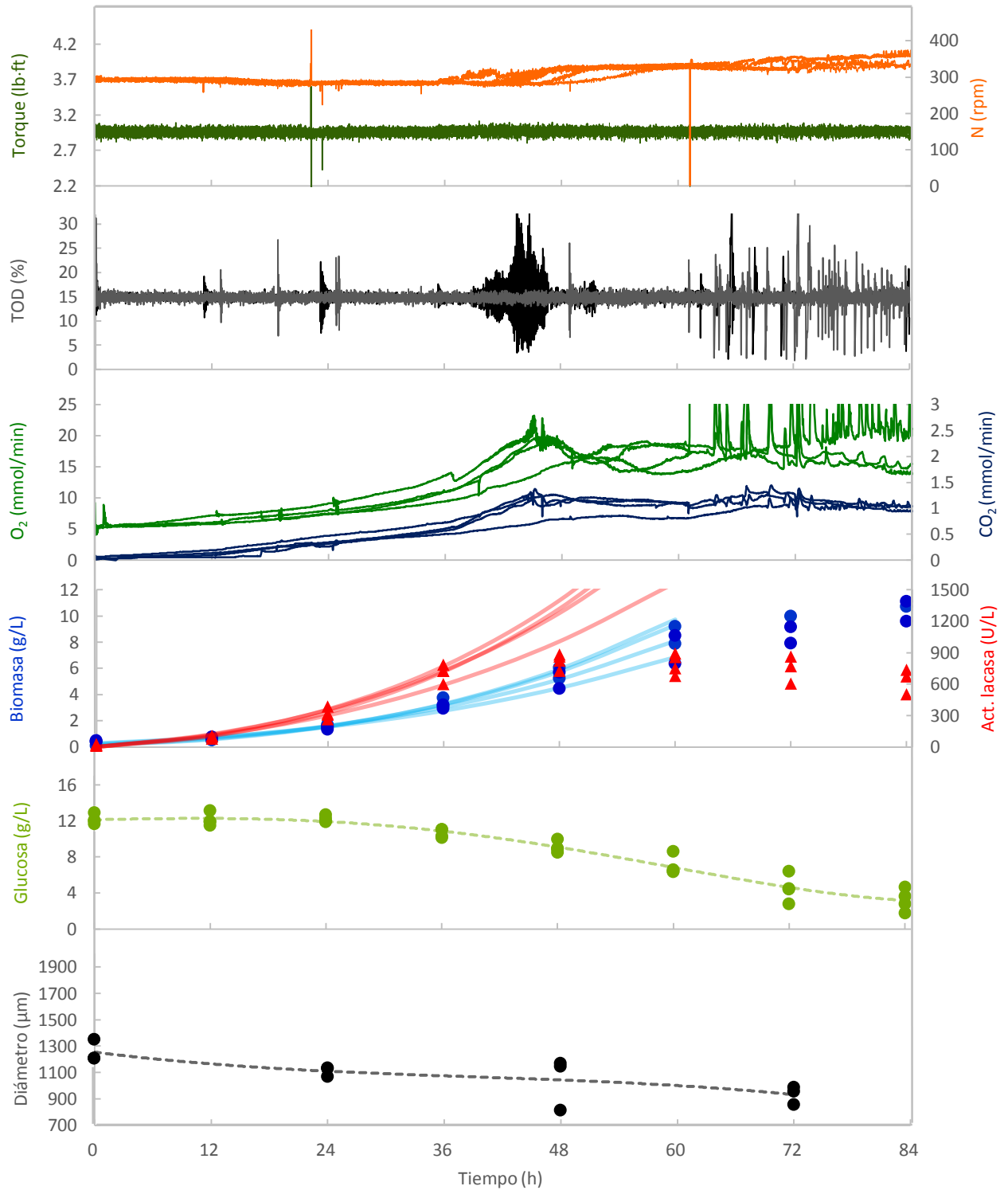


Fig. A5. Evolución del torque, velocidad de agitación (N), tensión de oxígeno disuelto (TOD), producción de CO₂, salida de O₂, concentración de biomasa, actividad lacasa, concentración de glucosa y diámetro promedio de *pellet* en los cultivos de *P. ostreatus* CP50 desarrollados a 11 kW/m³ y TOD 15% .

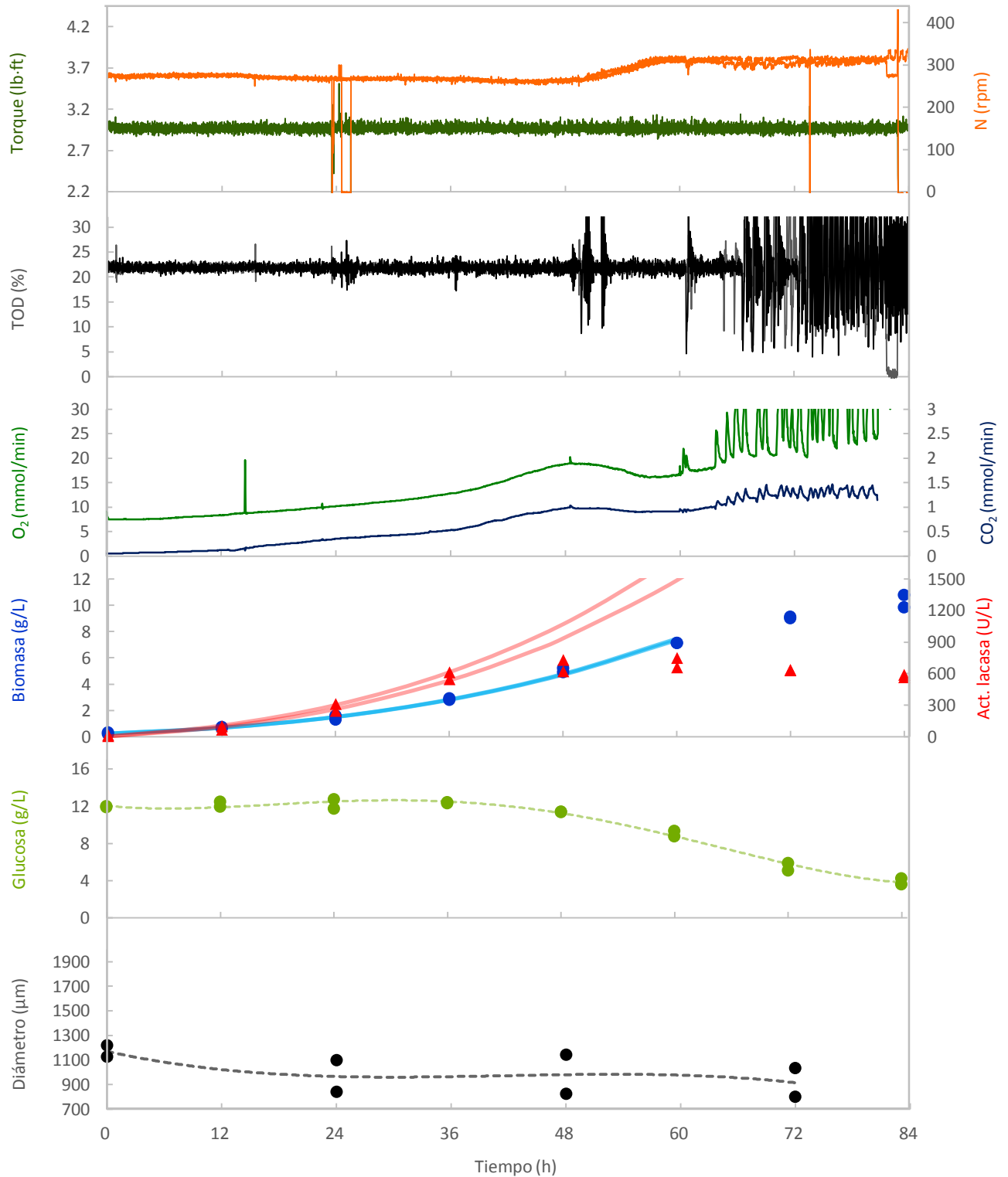


Fig. A6. Evolución del torque, velocidad de agitación (N), tensión de oxígeno disuelto (TOD), producción de CO₂, salida de O₂, concentración de biomasa, actividad lacasa, concentración de glucosa y diámetro promedio de *pellet* en los cultivos de *P. ostreatus* CP50 desarrollados a 11 kW/m³s y TOD 22% .

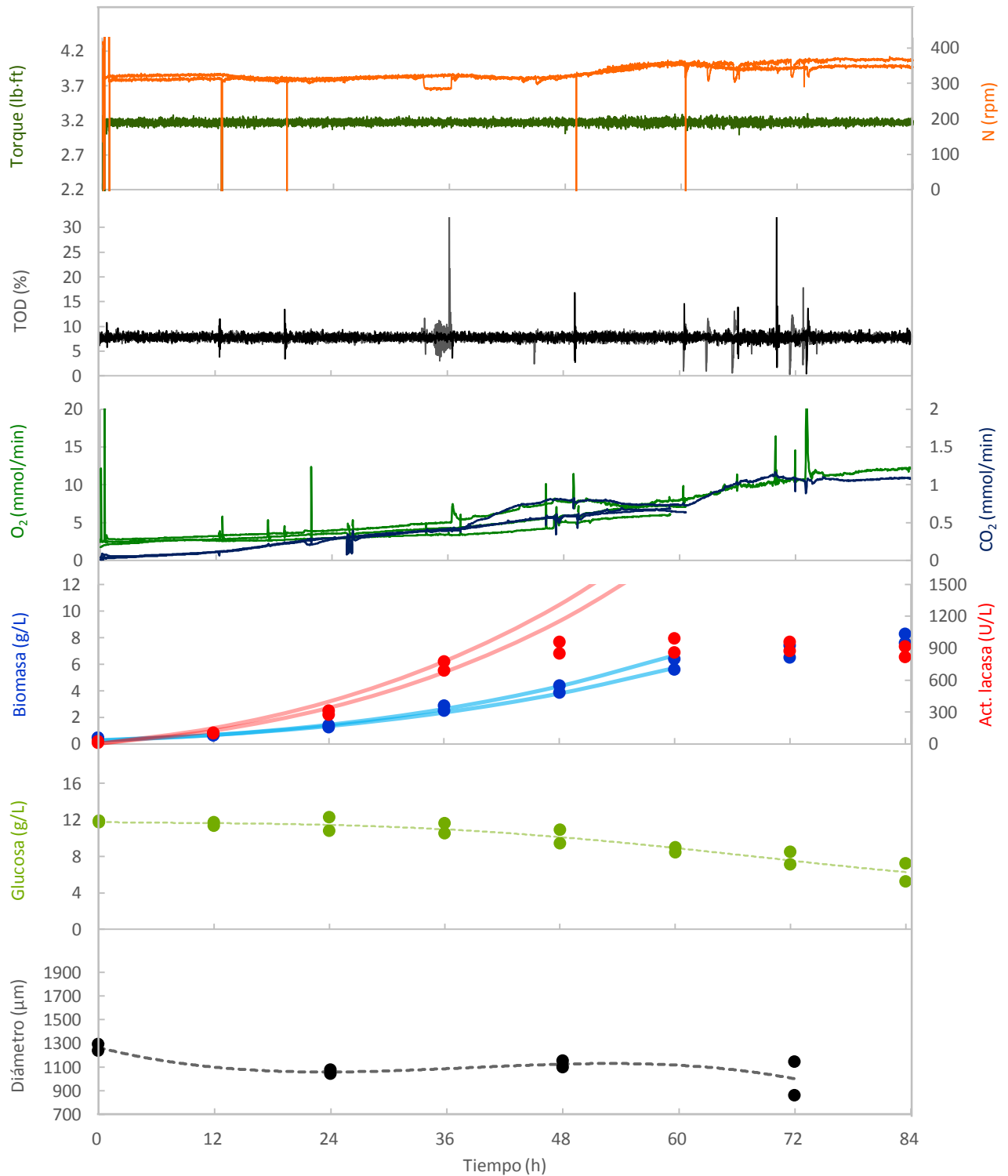


Fig. A7. Evolución del torque, velocidad de agitación (N), tensión de oxígeno disuelto (TOD), producción de CO₂, salida de O₂ concentración de biomasa, actividad lacasa, concentración de glucosa y diámetro promedio de *pellet* en los cultivos de *P. ostreatus* CP50 desarrollados a 21 kW/m³s y TOD 8%.

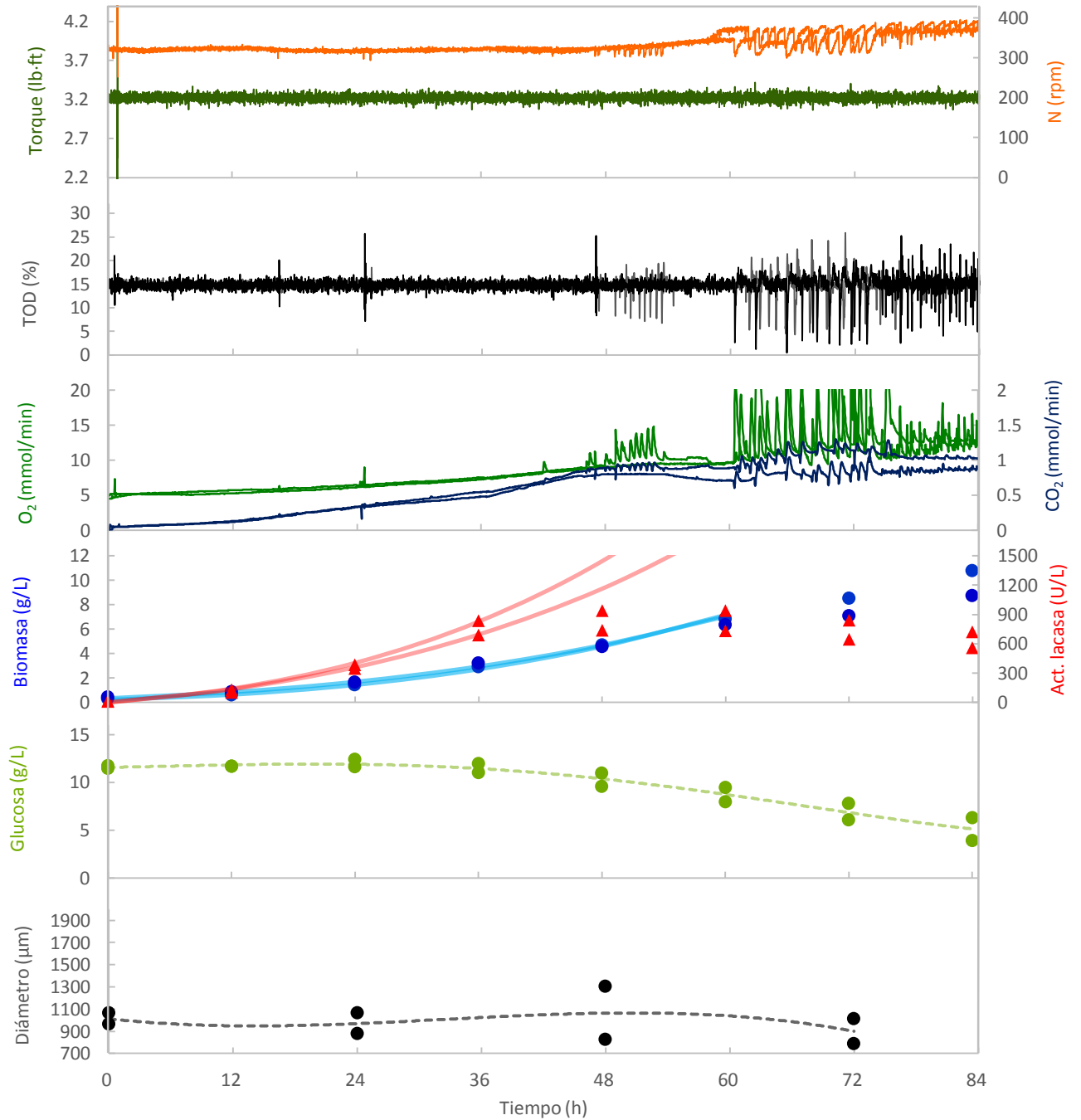


Fig. A8. Evolución del torque , velocidad de agitación (N), tensión de oxígeno disuelto (TOD), producción de CO₂ , salida de O₂, concentración de biomasa, actividad lacasa, concentración de glucosa y diámetro promedio de *pellet* en los cultivos de *P. ostreatus* CP50 desarrollados a 21 kW/m³s y TOD 15% .

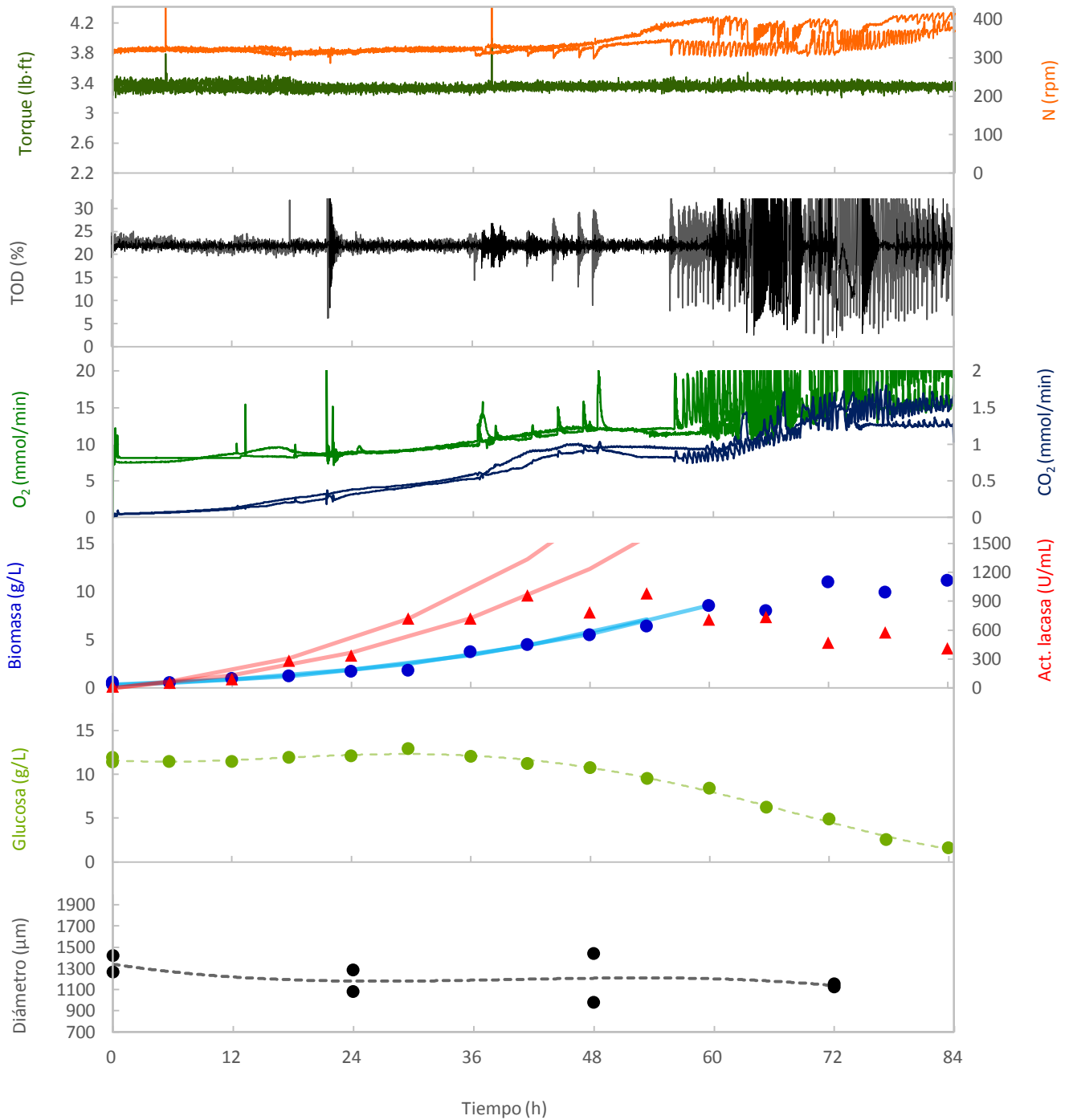


Fig. A9. Evolución del torque, velocidad de agitación (N), tensión de oxígeno disuelto (TOD), producción de CO₂, salida de O₂, concentración de biomasa, actividad lacasa, concentración de glucosa y diámetro promedio de *pellet* en los cultivos de *P. ostreatus* CP50 desarrollados a 21 kW/m³s y TOD 22% .

ANEXO 2

Cálculos del Análisis Transcripcional

El método doble delta es la manera más apropiada para analizar la cuantificación relativa de la expresión génica utilizando PCR a tiempo real. Una de las condiciones que se debe cumplir para aplicar éste método es que las eficiencias de amplificación del gen de estudio y el gen de referencia deben ser iguales. La eficiencia de amplificación (E) se calcula mediante un ajuste de mínimos cuadrados, usando la pendiente (S) en la siguiente ecuación:

$$E = 10^{-1/s} - 1$$

Si las eficiencias son aproximadamente iguales y muy cercanas a 1, la expresión del gen problema normalizada al gen de referencia y relativa al calibrador está dada por: $2^{-\Delta\Delta Ct}$. El valor $\Delta\Delta Ct$ muestra la diferencia entre ΔCt de la muestra en estudio y el ΔCt del calibrador (cultivo control):

$$\Delta\Delta Ct = \overbrace{(Cq_{\text{objetivo}} - Cq_{\text{referencia}})}^{\Delta Ct \text{ muestra problema}} - \overbrace{(Cq_{\text{objetivo}} - Cq_{\text{referencia}})}^{\Delta Ct \text{ muestra calibrador}}$$

Al tratarse de una cuantificación relativa de la expresión génica es importante considerar que una expresión génica de 1 supone que dicha expresión no cambia respecto de la situación que se tomó como calibrador (cultivo control). Si la expresión es mayor o menor de 1, implica que hay mayor o menor expresión que en el cultivo control, respectivamente. Los datos son presentados como las veces de cambio de la expresión del gen problema normalizado al gen de referencia y relativo a la muestra calibrador. Por lo tanto, al analizar los resultados hay que considerar que los datos de cambio de expresión son relativos al cultivo control en cada tiempo que se hizo en análisis.