



Intracellular isoforms of laccases produce by *Pleurotus ostreatus* grown in liquid fermentation at different initial pH of the culture medium

Isoformas intracelulares de lacasas producidas por *Pleurotus ostreatus* crecido en fermentación líquida a diferentes pH iniciales del medio de cultivo

Rubén Díaz, Gerardo Díaz-Godínez*

Laboratorio de Biotecnología, Centro de Investigación en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala, Ixtacuixtla, Tlaxcala, CP. 90120, México.

*Corresponding author

E-mail address: diazgdo@hotmail.com (G. Díaz-Godínez)

Article history:

Received: 27 November 2018 / Received in revised form: 1 January 2019 / Accepted: 6 January 2019 / Published online: 7 January 2019.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2019.4.1.38>

ABSTRACT

Pleurotus ostreatus was grown in liquid fermentation at different pH (3.5, 4.5, 6.5 and 8.5) of the culture medium for laccases production. The activity and isoforms number of intracellular laccases were determined at different pH (3.5, 4.5, 6.5 and 8.5) using 2,6-dimethoxyphenol as substrate. The maximum activity value (4800 U/gX) was observed in the culture at pH of 4.5 evaluated at the same pH. In all fermentations, laccase activity showed the maximal values at final of the culture. The lowest laccase activity (120 U/gX) was obtained in the culture at pH of 8.5 evaluated at pH 6.5. Different isoforms patterns of laccase were obtained depending on the pH of the culture medium. These results showed that pH is an important parameter for the activity and isoforms of intracellular laccases of *Pleurotus ostreatus*.

Keywords: Intracellular, Laccase activity, Laccase isoforms, *Pleurotus ostreatus*, Submerged fermentation.

RESUMEN

Pleurotus ostreatus se cultivó en fermentación líquida a diferentes pH (3.5, 4.5, 6.5 y 8.5) del medio de cultivo para la producción de lacasas. La actividad y el número de isoformas de las lacasas intracelulares se determinaron a diferentes pH (3.5, 4.5, 6.5 y 8.5) utilizando 2,6-dimetoxifenol como sustrato. El valor máximo de actividad (4800 U/gX) del cultivo se observó a un pH de 4.5 evaluado al mismo pH. En todas las fermentaciones, la actividad de lacasa mostró los valores máximos al final del cultivo. La menor actividad de lacasa (120 U/gX) se obtuvo en el cultivo a un pH de 8.5 evaluado a un pH de 6.5. Se obtuvieron diferentes patrones de isoformas de lacasa según el pH del medio de cultivo. Estos resultados mostraron que el pH es un parámetro importante para la actividad e isoformas de las lacasas intracelulares de *Pleurotus ostreatus*.

Palabras clave: Fermentación, Intracelular, Isoformas, lacasas, *Pleurotus ostreatus*.

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos eucariontes y algunos pueden desarrollarse sobre sustratos lignocelulósicos los cuáles se han clasificado en tres grupos dependiendo de los cambios químicos y estructurales que le ocasionan a la madera; hongos de pudrición blanda, oscura y blanca (Schwarze *et al.*, 2000). Entre los de pudrición blanca, se encuentran los del género *Pleurotus* que presentan un alto valor nutrimental, además tienen propiedades terapéuticas y potenciales aplicaciones biotecnológicas. Esto último debido a la capacidad que presentan para producir enzimas fenoloxidasas como las lacasas, manganeso peroxidasa, alcohol veratríl oxidasa y peroxidasa decolorante, aunque no produce lignina peroxidasa (Cuamatzi-Flores *et al.*, 2015; Díaz *et al.*, 2013; Palmieri *et al.*, 2005). Las lacasas son enzimas pertenecientes al grupo de las oxidasas de cobre azul, catalizan la oxidación de un sustrato fenólico mediante su acoplamiento a la reducción de O₂ al agua. Las lacasas fúngicas no tienen un sustrato específico, por lo que pueden transformar y algunas veces mineralizar por completo contaminantes ambientales, así como degradar compuestos no fenólicos en presencia de mediadores redox apropiados (Wilkolazka *et al.*, 2002). Debido a la acción catalítica de estas enzimas, se pueden usar para diversas aplicaciones biotecnológicas y ambientales como la decoloración de textiles, deslignificación, blanqueo de pulpa, desintoxicación de efluentes, biosensores y biorremediación (Hublik y Schinner, 2000). Se ha observado que las lacasas fúngicas tienen un papel importante en la degradación de lignina durante la invasión de los sustratos y se ha sugerido que están involucradas en los procesos de morfogénesis. Por otro lado, *Pleurotus ostreatus* es un hongo basidiomiceto que produce múltiples isoformas de lacasas, tanto intracelulares como extracelulares, y se ha sugerido que las condiciones de cultivo del hongo regulan la producción de estas enzimas, además pueden ser constitutivas e inducibles (Téllez-Téllez *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2013). Se ha reportado que la producción de las lacasas está influenciada por un gran número de factores ambientales tales como el pH,

temperatura, tipo de cultivo y composición del medio de cultivo (Téllez-Téllez *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2013). Los sistemas de producción de lacasas de hongos y bacterias más comúnmente utilizados, son los sistemas de fermentación en medio sólido (FS) y en fermentación en medio líquido (FL) (Palmieri *et al.*, 2003; Tlecuítl-Beristain *et al.*, 2008; Téllez-Téllez *et al.*, 2008). Asimismo, se ha reportado que en general, la FS produce mayor cantidad de metabolitos y enzimas (Viniestra-González *et al.*, 2003), sin embargo, hay reportes donde se indica que *P. ostreatus* presentó un comportamiento atípico, ya que en FL produjo mayor actividad de lacasa con respecto a la FS (Téllez-Téllez *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2011a; Díaz *et al.*, 2011b). Por otro lado, se han utilizado diferentes agentes inductores para la producción de lacasas, entre ellos se encuentran la adición al medio de cultivo de metales, diferentes fuentes de carbono y/o nitrógeno, sustratos específicos de las enzimas, entre otros (Palmieri *et al.*, 2000; D'Souza *et al.*, 1999). Dada la importancia biotecnológica y fisiológica que tienen las enzimas lacasas, en este estudio se reporta el patrón de isoformas intracelulares de lacasas de *Pleurotus ostreatus* crecido en FL a diferentes pH.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Microorganismo

Se utilizó la cepa de *Pleurotus ostreatus* 32783, de la American Type Culture Collection (Maryland, USA). La cepa se desarrolló en agar extracto de malta (AEM) a 25°C por 7 días y se mantuvo a una temperatura de 4°C hasta su utilización.

2.2. Condiciones de cultivo

Las FL se realizaron por triplicado en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de medio de cultivo ajustado por separado a diferentes valores de pH (3.5, 4.5, 6.5 y 8.5) utilizando HCl o NaOH 0.1 M, inoculados con 3 fragmentos de micelio de 4 mm de diámetro cortados de la periferia de una colonia desarrollada en AEM a 25 °C por 7 días, se incubaron a 25 °C en agitación orbital a 120 rpm. La composición del medio de cultivo en todos los casos fue (g/L): glucosa, 10; extracto de levadura, 5; K₂HPO₄, 0.4; ZnSO₄ · 7H₂O, 0.001; KH₂PO₄, 0.6; FeSO₄ · 7H₂O, 0.05; MnSO₄ · H₂O, 0.05; MgSO₄ · 7H₂O, 0.5; CuSO₄ · 5H₂O, 0.25; (Téllez-Téllez *et al.*, 2008). La toma de muestras se inició a las 72 o 96 h y posteriormente cada 24 h por 22 días.

2.3. Determinación de la actividad de lacasas intracelulares

Se obtuvo un extracto enzimático (EE) intracelular de la biomasa de *Pleurotus ostreatus* (2 mL/g de peso fresco) cada día se realizó un muestreo de todas las fermentaciones con la ayuda de un macerador de tejidos, para eliminar los sólidos, se realizó una centrifugación a 14000 xg. La actividad de lacasas se determinó usando 2,6-dimetoxifenol (DMP) como sustrato. La mezcla de reacción se preparó con 100 µL de EE, 900 µL de DMP (2mM) y fue incubada a 40 °C por 1 min en solución buffer 0.1 M por separado a diferente pH (citratos 3.5, acetatos 4.5, fosfatos 6.5 y tris 8.5). La absorbancia se midió a 468 nm en un

espectrofotómetro Jenway 6405 UV/Vis y una unidad de actividad (U) de lacasas se consideró como la cantidad de enzima que causó un incremento de una unidad de absorbancia por minuto bajo las condiciones de ensayo.

2.4. Zimogramas de lacasas intracelulares

El número de isoformas de lacasas se determinó por medio de zimografía en los EE obtenidos a las 336, 360, 384, 408, 432, 456, 488, 504 y 528 h. El análisis zimográfico se realizó utilizando la técnica de SDS-PAGE modificada (Téllez-Téllez *et al.*, 2008). El gel de corrida contuvo 100 g/L de acrilamida y 27 g/L de bis-acrilamida. El gel de empaquetamiento contuvo 40 g/L de acrilamida y 27 g/L de bis-acrilamida. Cada extracto enzimático (20 µL aproximadamente) fue mezclado con buffer de muestra sin agentes reductores de puentes disulfuro, todos los buffer's contenían SDS de acuerdo a la técnica de Laemmli (1970). Las muestras fueron colocadas en geles (0.75 mm de espesor) de un sistema de electroforesis Mini-Protean III (BioRad) y se aplicó una corriente eléctrica de 150 V por 1 a 1.25 h. Posteriormente los geles de electroforesis fueron lavados con agua desionizada con agitación orbital (20 a 30 rpm) durante 30 min, y el agua fue cambiada cada 10 minutos para remover el dodecil sulfato de sodio residual. Finalmente, los geles fueron incubados por separado en soluciones buffer a pH de 3.5, 4.5, 6.5 y 8.5. Las bandas con actividad de lacasas aparecieron en el gel por la oxidación del sustrato a partir de los 30 min aproximadamente. Se usó un marcador de peso molecular de 10-250 kDa (Precision Plus Protein™ Standars, BioRad) (Díaz *et al.*, 2011a; Díaz *et al.*, 2011b; Téllez-Téllez *et al.*, 2012b; Díaz *et al.*, 2013; Velázquez *et al.*, 2014; Álvarez-Cervantes *et al.*, 2016).

3. RESULTADOS

En todos los casos, aunque el pH del medio de cultivo se ajustó para cada fermentación a 3.5, 4.5, 6.5 y 8.5, después de las 400 h, el pH fue cercano a la neutralidad (datos no mostrados). La actividad de lacasas tuvo diferentes valores dependiendo del pH inicial del medio de cultivo y del pH de incubación de la reacción enzimática, lo que muestra que el pH de mayor actividad de lacasas no corresponde al pH al cual se produjeron. En la FL desarrollada a pH de 3.5, se obtuvieron valores máximos de actividad de 817, 701, 348 y 350 U/gX cuando la mezcla de reacción se incubó a pH de 3.5, 4.5, 6.5 y 8.5, respectivamente (Figura 1). En la Figura 2 se puede observar que los máximos valores de actividad de lacasas de los EE obtenidos de la FL a 4.5 fueron 4445, 4800, 2446 y 854 U/gX cuando la mezcla de reacción se incubó a 3.5, 4.5, 6.5 y 8.5, respectivamente. *Pleurotus ostreatus* desarrollado a pH inicial de 6.5 produjo hasta 620, 810, 1741 y 506 U/gX, cuando se determinó a pH de 3.5, 4.5, 6.5 y 8.5 respectivamente (Figura 3). La actividad de lacasas de *Pleurotus ostreatus* crecido a pH de 8.5 mostró la mayor actividad de 532, 291, 120 y 125 U/gX cuando se incubó la mezcla de reacción a pH 3.5, 4.5, 6.5 y 8.5, respectivamente (Figura 4).

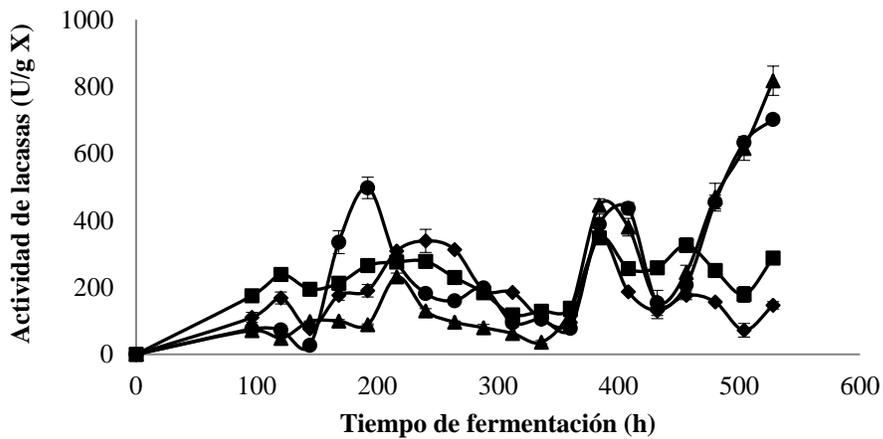


Fig. 1. Actividad intracelular de lacasas de *Pleurotus ostreatus* crecido en FL a pH inicial de 3.5, evaluada a pH de 3.5 (▲), 4.5 (●), 6.5 (◆) y 8.5 (■).

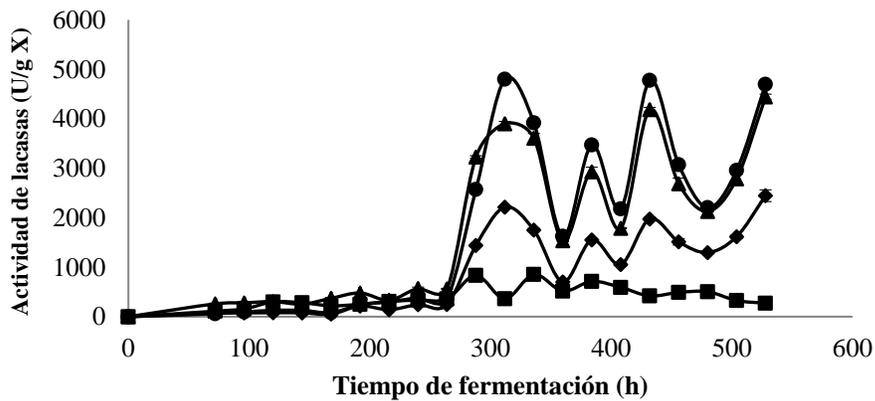


Fig. 2. Actividad intracelular de lacasas de *Pleurotus ostreatus* crecido en FL a pH inicial de 4.5, evaluada a pH de 3.5 (▲), 4.5 (●), 6.5 (◆) y 8.5 (■).

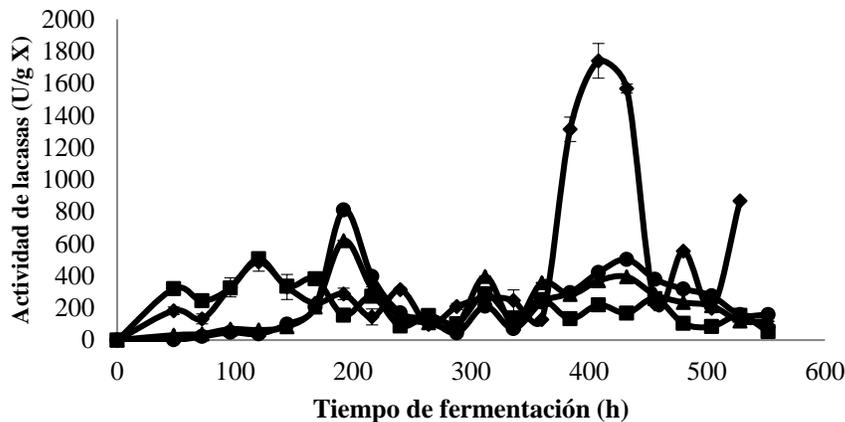


Fig. 3. Actividad intracelular de lacasas de *Pleurotus ostreatus* crecido en FL a pH inicial de 6.5, evaluada a pH de 3.5 (▲), 4.5 (●), 6.5 (◆) y 8.5 (■).

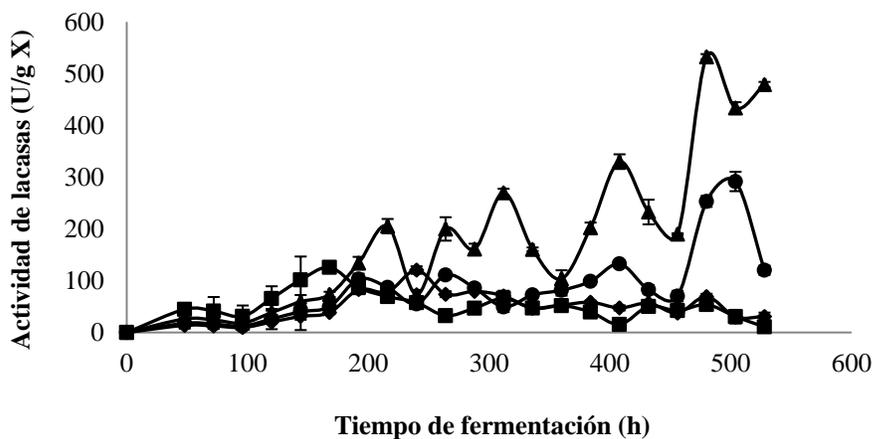


Fig. 4. Actividad intracelular de lacasas de *Pleurotus ostreatus* crecido en FL a pH inicial de 8.5, evaluada a pH de 3.5 (▲), 4.5 (●), 6.5 (◆) y 8.5 (■).

En las Figuras 5, 6, 7 y 8 se muestran los zimogramas de lacasas de *Pleurotus ostreatus* crecido en FL a pH de 3.5, 4.5, 6.5 y 8.5, respectivamente. Los geles de los EE obtenidos en las FL a pH de 3.5 y 4.5, incubados en los 4 pH's indicados, mostraron dos isoformas y con base en los marcadores de peso molecular, se puede sugerir que el patrón de isoformas es el mismo (con PM de 38 y 65 kDa); en los geles de los EE producidos a pH 6.5 se pudo observar que a pH de incubación de 3.5 y 4.5 se presentó el mismo patrón de isoformas que en los casos anteriores, sin embargo, a pH de incubación de 6.5 aunque se observaron dos isoformas, una con PM aproximado de 75 kDa y la otra de 47 kDa; a pH de incubación de 8.5 también se observaron dos isoformas, una de ellas es similar a la de mayor peso molecular presente en el gel anterior (75 kDa) y otra de 29 kDa; a pH del medio de cultivo de 8.5 se observaron hasta tres isoformas pero no en todos los tiempos de la fermentación;

en todas las muestras analizadas a pH de 3.5 y 4.5 se presentaron dos isoformas (una de PM aproximado de 75 kDa y la otra de 29 kDa), solo en algunos tiempos y de menor intensidad la isoforma de PM aproximado de 47 kDa; a pH de incubación de 6.5 y 8.5, prácticamente solo la banda más ligera se pudo observar (29 kDa). Los zimogramas de este estudio fueron de tipo cualitativo para ver el perfil de isoenzimas en cada fermentación, ya que los tiempos de incubación de los geles en el sustrato fue diferente en cada caso, por lo que no es posible considerarlos cuantitativos y no pueden relacionarse con las curvas de actividad.

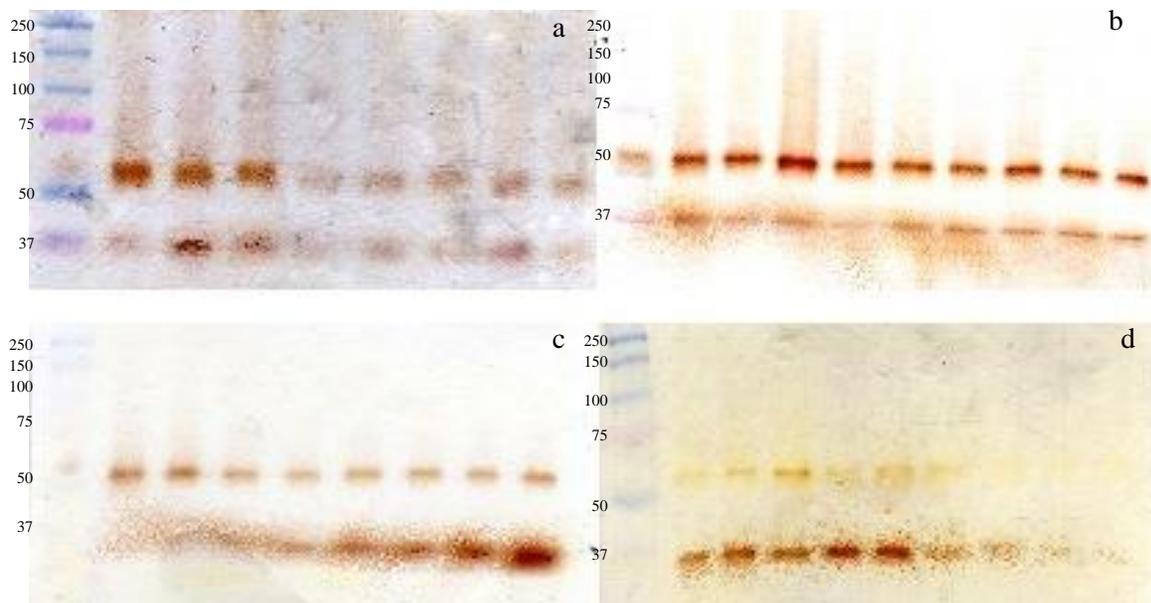


Fig. 5. Zimograma de lacasas intracelulares de *P. ostreatus* crecido a pH de 3.5. pH de la solución buffer en la que fueron incubados los geles; 3.5 (a), 4.5 (b), 6.5 (c) y 8.5 (d). Números a la izquierda de cada gel son PM en kDa de las proteínas del marcador.

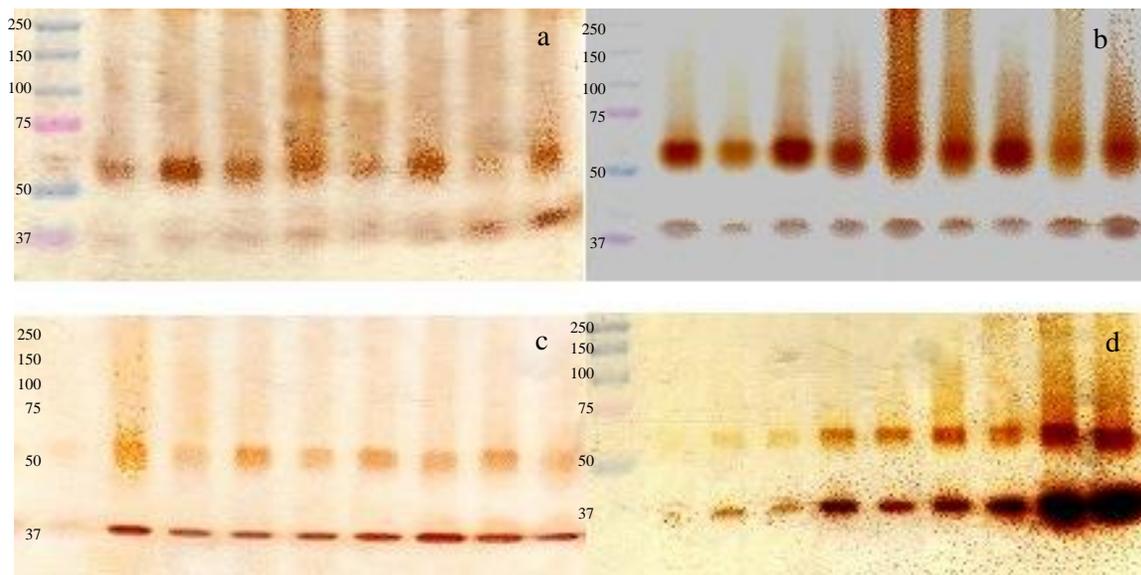


Fig. 6. Zimograma de lacasas intracelulares de *P. ostreatus* crecido a pH de 4.5. pH de la solución buffer en la que fueron incubados los geles; 3.5 (a), 4.5 (b), 6.5 (c) y 8.5 (d). Números a la izquierda de cada gel son PM en kDa de las proteínas del marcador.

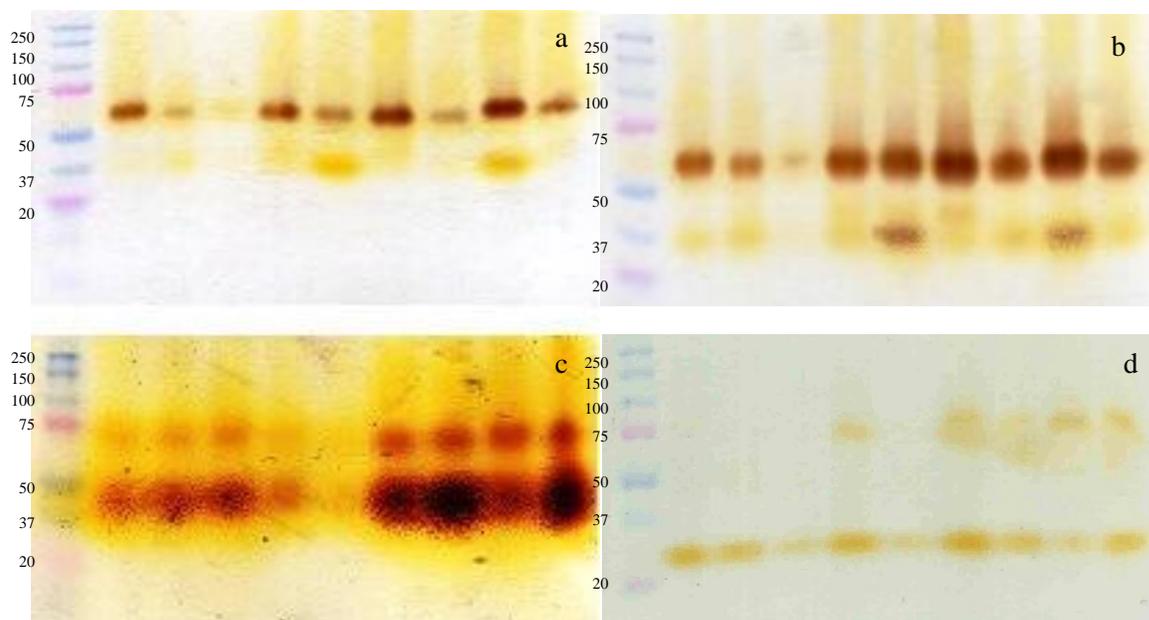


Fig. 7. Zimograma de lacasas intracelulares de *P. ostreatus* crecido a pH de 6.5. pH de la solución buffer en la que fueron incubados los geles; 3.5 (a), 4.5 (b), 6.5 (c) y 8.5 (d). Números a la izquierda de cada gel son PM en kDa de las proteínas del marcador.

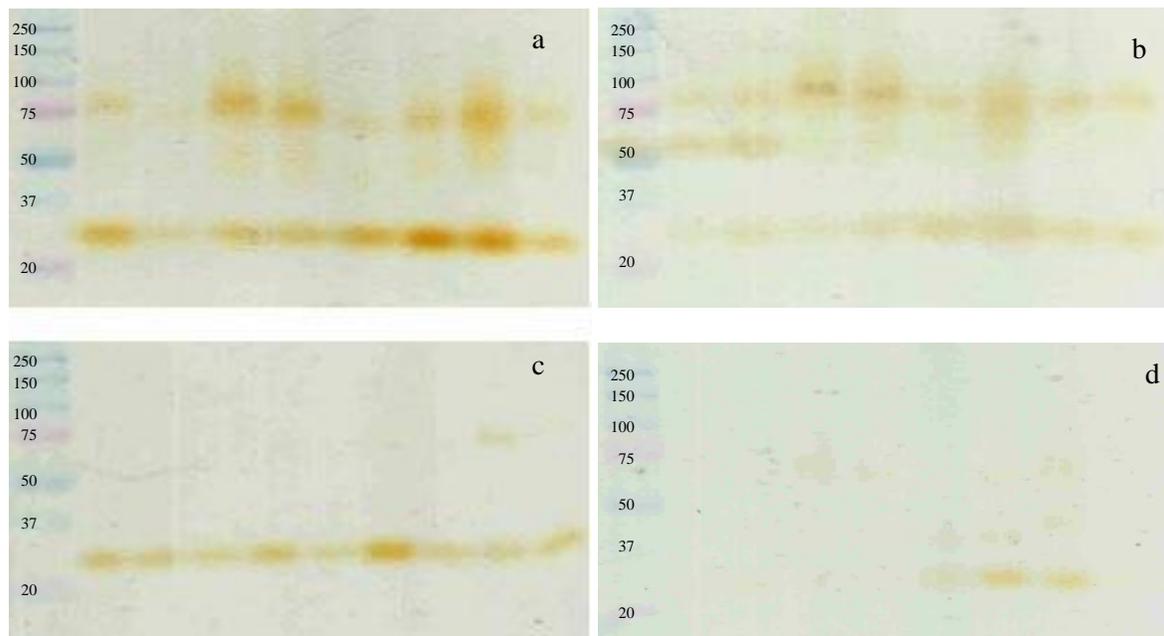


Fig. 8. Zimograma de lacasas intracelulares de *P. ostreatus* crecido a pH de 8.5. pH de la solución buffer en la que fueron incubados los geles; 3.5 (a), 4.5 (b), 6.5 (c) y 8.5 (d). Números a la izquierda de cada gel son PM en kDa de las proteínas del marcador.

4. DISCUSIONES

En los hongos, las enzimas ligninolíticas como las lacasas, manganeso peroxidasa, alcohol veratríl oxidasa y lignina peroxidasa, dada su principal función en la degradación de sustratos, han sido estudiadas principalmente las de carácter extracelular, sin embargo, las lacasas se han relacionado en procesos morfogénéticos, lo cual implica que también existen lacasas con función intracelular (Baldrian, 2006). En un estudio de lacasas extracelulares, *Pleurotus ostreatus* se creció a pH de 3.5 tanto en un medio de cultivo amortiguado como en uno sin amortiguar, después de 216 h, el pH del medio de cultivo no amortiguado se incrementó a 6.5, en ambos casos cuando el pH fue de 3.5, se observó una isoforma de lacasa y sólo cuando el pH se incrementó a 6.5 en el medio no amortiguado se produjo una isoforma más, lo cual sugiere que el hongo produce metabolitos que secreta para regular el pH exterior y también que la producción de lacasas está regulada por pH (Díaz *et al.*, 2011a), por otro lado se reportaron los elementos de respuesta en el promotor de un gen de lacasas (Po83) de *Pleurotus ostreatus* que incluye el elemento de respuesta a estrés que podría estar involucrado en la expresión de lacasas regulado por pH (Téllez-Téllez *et al.*, 2012a). Este es el primer estudio sobre el efecto del pH sobre la actividad y patrón de isoformas de lacasas intracelulares. En esta investigación se observó que el pH de desarrollo de *Pleurotus ostreatus* modifica la actividad de lacasas intracelulares, ya que los

valores más altos se obtuvieron a pH de 4.5, Aunque el pH óptimo de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* es de 6.5. Pocos estudios se han realizado para determinar la actividad de lacasas intracelulares de este organismo. Téllez-Téllez *et al.*, (2005) obtuvieron 12.7 veces menos actividad de lacasas intracelulares utilizando el mismo hongo y el mismo sustrato, pero sin adición de Cu como inductor al medio de cultivo y la mezcla de reacción fue incubada a pH de 6.0. Diaz *et al.*, (2013) reportaron el efecto del pH sobre la actividad y patrón de isoformas de lacasas extracelulares, cabe mencionar que todas las condiciones de ese experimento fueron idénticas a las de este estudio, también fue la misma cepa y sistema de cultivo. En ese estudio se reportaron cuatro isoformas de lacasas extracelulares con PM aproximados de 29, 38, 47 y 65 kDa, en esta investigación, con base en la posición de las bandas de actividad con respecto al marcador de PM, se puede sugerir que se observaron en las FL's desarrolladas a pH's de 3.5 y 4.5 las bandas correspondientes a las extracelulares con PM de 38 y 65 kDa; en la FL desarrollada a pH de 6.5, se observaron a pH de incubación de 3.5 y 4.5 las isoformas que corresponden a las extracelulares de 38 y 65 kDa, a pH de incubación de 6.5 se observó una isoforma correspondiente a la extracelular de 47 kDa y otra no observada en los EE extracelulares de 75 kDa, mientras a pH de incubación de 8.5 fueron las isoformas correspondientes a las de 29 y 75 kDa. A pH del medio de cultivo de 8.5 se observaron las isoformas correspondientes a las de 29 y 75 kDa cuando el gel se incubó a 3.5 y a pH de incubación de 4.5 se observaron las dos isoformas anteriores además de otra correspondiente a la extracelular de 47 kDa. A pH de incubación de 6.5 y 8.5 solo se observó la isoforma correspondiente a la extracelular de 29 kDa. Cabe mencionar que en este estudio, se utilizó un medio suplementado de Cu, el cual actúa además de cofactor como inductor de lacasas, en otro estudio sobre zimogramas de lacasas intracelulares de 10 cepas de hongos del género *Pleurotus* crecidos en placa en medio sin adición de inductores y a pH de 6.5 se observaron dos isoformas en los geles incubados a pH de 6.0 de la misma cepa utilizada en este estudio (Téllez-Téllez *et al.*, 2005). Armas-Tizapantzi *et al.* (2016) observaron los perfiles de lacasas intra y extracelulares *Pleurotus ostreatus* en medios de cultivo con y sin adición de Cu, observando tres isoformas intracelulares de PM aproximado de 34, 37 y 50 kDa que dadas las condiciones experimentales podría corresponder a las isoformas de 38 y 47 kDa de este estudio. Otros estudios sobre zimogramas de lacasas de *Pleurotus ostreatus* son de isoformas extracelulares. Téllez-Téllez *et al.* (2008) reportaron cuatro isoformas de lacasas extracelulares, sin embargo, los pesos moleculares no fueron reportados. Se han reportado PM de lacasas de *P. ostreatus* de 43.7 kDa (Tlecuitl-Beristain *et al.*, 2008), 67 kDa (Hublik & Schinner, 2000), 61 kDa (lacasa poxA1), 67 kDa (lacasa poxA2) (Palmieri *et al.*, 1997), 62 kDa (Lacc6) (Giardina *et al.*, 1999), poxA3a y poxA3b constituidas por una subunidad grande de 67 kDa y una subunidad chica de 18 o 16 kDa, respectivamente (Palmieri *et al.*, 2003), por lo que para saber si las isoformas observadas en este estudio corresponden a alguna de las previamente reportadas, se deben realizar más estudios como la purificación y secuenciación de cada una de ellas. Se considera que el pH del medio de cultivo *Pleurotus ostreatus* modifica la actividad y número de isoformas de lacasas intracelulares, las cuales

también tienen diferente pH de actividad, además en este estudio se observó una isoforma que se considera totalmente intracelular ya que no se reportó en la investigación donde se estudiaron las isoformas extracelulares producidas bajo las mismas condiciones de este estudio.

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio de biotecnología del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Álvarez-Cervantes J., Sánchez C., Díaz R. & Díaz-Godínez G. 2016. Characterization of production of laccases, cellulases and xylanases of *Pleurotus ostreatus* grown on solid-state fermentation using an inert support. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 15(2): 323-331.

Armas-Tizapantzi A., Cuatecontzi-Cuautle E., Fernández-Perrino F.J., Estrada-Torres A., & Montiel-González A.M. 2016. Temporal profiles of extra- and intracellular laccase isoenzymes from *Pleurotus ostreatus* produced in submerged and solid-state cultures. *African Journal of Biotechnology*. 15(22): 1069-1077.

Baldrian P. 2006. Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*. 30, 215-242.

Cuamatzi-Flores J.L., Nava-Galicia S.B., Díaz R., Garrido-Bazán V., Tlecuitl-Beristain S., & Bibbins-Martínez M.D. 2015. Activity determination of the DyP enzyme produced by *Pleurotus ostreatus* and evaluation of their oxidative capacity on several textile dyes. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias*. 6(13): 44-56.

Díaz R., Sánchez C., Bibbins-Martínez M.D. & Díaz-Godínez G. 2011a. Effect of medium pH on laccase zymogram patterns produced by *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. *African Journal of Microbiology Research*. 5(18): 2720-2723.

Díaz R., Alonso S., Sánchez C., Bibbins-Martínez M.D. & Díaz-Godínez G. 2011b. Characterization of the growth and laccase activity of strains of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. *Bioresources*. 6(1): 282-290.

Díaz R., Téllez-Téllez M., Sánchez C., Bibbins-Martínez M.D., Díaz-Godínez G. & Soriano-Santos J. 2013. Influence of initial pH of the growing medium on the activity,

production and genes expression profiles of laccase of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentations. *Electronic Journal of Biotechnology*. 16(4): 1-13.

D'Souza T.M., Merritt S.C. & Reddy A. 1999. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(12): 5307-5313.

Giardina P., Palmieri G., Scaloni A., Fontanella B., Faraco V., Cennamo G. & Sannia G. 1999. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Journal*. 341: 655-663.

Hublik G. & Schinner F. 2000. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. *Enzyme and Microbial Technology*. 27: 330-336.

Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-185.

Palmieri G., Giardina P., Bianco C., Scaloni A., Capasso A. & Sannia G. 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biological Chemistry*. 272: 31301-31307.

Palmieri G., Giardina P., Bianco C., Fontanella B. & Sannia G. 2000. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 920-924.

Palmieri G., Cennamo G., Faraco V., Amoresano A., Sannia G., & Giardina P. 2003. Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme and Microbial Technology*. 33: 220-230.

Palmieri G., Cennamo G., & Sannia G. 2005. Remazol brilliant blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. *Enzyme and Microbial Technology*. 36: 17-24.

Schwarze F., Engels J. & Mattheck C. 2000. Fundamental aspects. *En fungal strategies of wood decay in trees*. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 5-31.

Téllez-Téllez M., Sánchez C., Loera O. & Díaz-Godínez G. 2005. Differential patterns of constitutive intracellular laccases of the vegetative phase for *Pleurotus* species. *Biotechnology Letters*. 27: 1391-1394.

Téllez-Téllez M., Fernández F.J., Montiel-González A.M., Sánchez C. & Díaz-Godínez G. 2008. Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 81: 675-679.

Téllez-Téllez M., Diaz-Godinez G., Aguilar M., Sánchez C. & Fernández F. 2012. Description of a laccase gene from *Pleurotus ostreatus* expressed under submerged fermentation conditions. *BioResources*. 7(2): 2038-2050.

Téllez-Téllez M., Sánchez C., Díaz R., & Díaz-Godínez G. 2012. Zymogram patterns of extracellular laccases of *Pleurotus* species grown on non-inducer agar medium. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 11(3): 383-388.

Tlecuitl-Beristain S., Sánchez C., Loera O., Robson G.D. & Díaz-Godínez G. 2008. Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: production of a novel laccase isoform. *Mycological Research*. 112: 1080-1084.

Velázquez L., Téllez-Téllez M., Díaz R., Bibbins-Martínez M.D., Loera O., Sánchez C., Tlecuitl-Beristain S. & Díaz-Godínez G. 2014. Laccase isoenzymes of *Pleurotus ostreatus* grown at different pH in solid-state fermentation using polyurethane foam as support. *Annual Research & Review Biology*. 4(16): 2566-2578.

Viniegra-González G., Favela-Torres E., Aguilar N.C., Romero-Gómez S.J., Díaz-Godínez G., & Augur C. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*. 13(2-3): 157-167.

Wilkołazka A.J., Kochmanska-Rdest J., Malarczyk E., Wardas W. & Leonowicz A. 2002. Fungi and their ability to decolourize azo and anthraquinonic dyes. *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 566-572.