



## Applications of laccase enzymes of *Pleurotus ostreatus*

### Aplicaciones de las enzimas lacasas de *Pleurotus ostreatus*

Ana Karina Paredes-Juárez<sup>1</sup>, Elba Villegas-Villareal<sup>2</sup>, Rubén Díaz-Godínez<sup>3</sup>, Gerardo Díaz-Godínez<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Maestría en Biotecnología y Manejo de Recursos Naturales, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Ixtacuixtla, Tlaxcala México.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

<sup>3</sup>Laboratorio de Biotecnología, Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México. Email: \*[diazgdo@hotmail.com](mailto:diazgdo@hotmail.com)

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2017.2.1.135>

### ABSTRACT

Production of extracellular enzymes from filamentous fungi has been extensively developed through the use of submerged fermentation. However, the solid-state fermentation is a suitable alternative for the enzymes production given the physiological and morphological features of these fungi. In that sense, the use of agro-industrial wastes as substrates in the production of enzymes of industrial interest is a very good alternative because their composition, mainly of cellulose, hemicellulose and lignin which act as inducers for the synthesis of enzymes. Few microorganisms are capable of degrading lignocellulose, the most effective are the white-rot fungi which attack the components of the plant cell wall; in this group are find *Pleurotus ostreatus*.

Keywords: *Pleurotus ostreatus*, lacasses, solid-state fermentation

### RESUMEN

La producción de enzimas extracelulares de hongos filamentosos ha sido ampliamente desarrollada mediante el uso de fermentación sumergida. Sin embargo, la fermentación en estado sólido es una alternativa adecuada para la producción de enzimas dada las características fisiológicas y morfológicas de estos hongos. En este sentido, el uso de residuos agroindustriales como sustratos en la producción de enzimas de interés industrial es una muy buena alternativa debido a su composición, principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina que actúan como inductores para la síntesis de enzimas. Pocos microorganismos son capaces de degradar la lignocelulosa, los más eficaces son los hongos de la pudrición blanca que atacan los componentes de la pared celular de la planta; En este grupo se encuentra *Pleurotus ostreatus*.

Palabras clave: *Pleurotus ostreatus*, lacasas, fermentación en estado sólido.

## **1. INTRODUCCIÓN**

Las lacasas (E. C. 1.10.3.2) son enzimas oxidativas extracelulares distribuidas en plantas, bacterias, algunos insectos y principalmente en hongos. Varias especies de hongos basidiomicetos han sido estudiadas en los últimos años, particularmente los hongos de la podredumbre blanca que son organismos reconocidos como degradadores de lignina, gracias a su sistema extracelular de Lacasa, Lignina y Manganese Peroxidases (Martínez *et al.*, 2005). Gracias a esto, ha aumentado la prospección en busca de nuevas lacasas con diferentes propiedades a las ya reportadas, que se puedan aplicar a diferentes procesos de importancia económica y remediación. Los hongos ligninolíticos o de podredumbre blanca generan en la madera un aspecto blanquecino al remover la lignina, celulosa y hemicelulosa y producen mayor cantidad de enzimas ligninolíticas extracelulares que tienen una potente capacidad oxidante de la molécula de lignina (Mouso *et al.*, 2003; Quintero *et al.*, 2006). *Pleurotus ostreatus* es un hongo de pudrición blanca capaz de degradar y mineralizar a la lignina y lleva a cabo la oxidación de compuestos aromáticos (Chawachart *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2003; Dedeyan *et al.*, 2000). Son organismos de gran interés por la importancia económica que representan por su producción mundial como alimento y para la obtención de lacasas. Estos hongos producen diferentes isoformas de lacasas constitutivas, pero algunas pueden ser inducibles (Galhaup *et al.*, 2002)

Las principales aplicaciones biotecnológicas de las lacasas son en la industria textil (en la decoloración de tintes) y en la industria del papel (en el proceso de blanqueado). Sin embargo, su uso también se ha extendido a la industria alimentaria (para la estabilidad de jugos y vinos), farmacéutica, nanotecnología, biorremediaciόn de suelos (para degradar plásticos que contaminan al tener unidades de olefina y para la oxidación de contaminantes orgánicos y tóxicos), destoxicificación de aguas residuales (en la remociόn natural de xenobióticos aromáticos), manufactura de detergentes, y transformación de antibióticos y esteroides (Kunamneni *et al.*, 2006; Rodríguez & Toca, 2007; Desai & Nityanand, 2011). En general, las lacasas se describen como glicoproteínas muy activas en el rango ácido de pH y termotolerantes.

### **1.1. Generalidades de hongos del género *Pleurotus***

El género *Pleurotus*, es un grupo cosmopolita de hongos con alto valor nutricional, que incluye especies de hongos comestibles y medicinales que pertenecen al grupo de hongos de podredumbre blanca (Stajic *et al.*, 2006; Locci *et al.*, 2008). Son hongos saprófitos cuya capacidad de penetración de sus hifas, les permite degradar incluso materias estructuralmente complejas, como la madera o cutículas de insectos. Estos hongos producen enzimas que intervienen en la degradación de celulosa y lignina, obteniendo así su fuente de carbono y los nutrientes minerales necesarios para su crecimiento (Cisterna, 2003).

## 1.2. Taxonomía

En la tabla 1 se muestra la clasificación taxonomía de *P. ostreatus*.

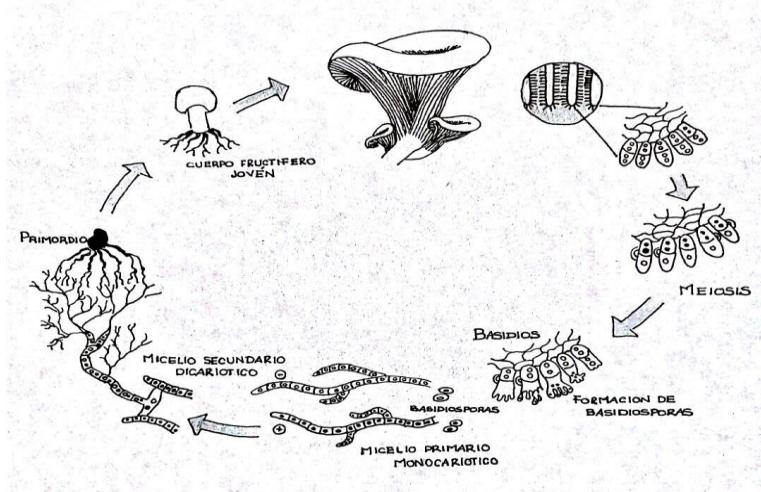
**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *P. ostreatus*.

<i>Reino</i>	<i>Fungi</i>
<i>Phylum</i>	<i>Basidiomycete</i>
<i>Clase</i>	<i>Agaricomycete</i>
<i>Familia</i>	<i>Pleurotaceae</i>
<i>Genero</i>	<i>Pleurotus</i>
<i>Especie</i>	<i>Ostreatus</i>

Fuente: Kirt *et al.*, 2001

## 1.3. Ciclo de vida de *Pleurotus*

Los hongos ligninolíticos u hongos de pudrición blanca se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza; pueden vivir en ambientes húmedos y secos; su temperatura óptima de crecimiento varía entre 20 y 30° C. Los hongos lignolíticos tienen una función importante en la naturaleza porque ayudan a la descomposición de la materia orgánica mediante la hidrolisis de sustratos por medio de su sistema enzimático, para posteriormente absorberlos por su pared celular (Archibald *et al.*, 1997). En el género *Pleurotus*, las basiodiosporas germinan cuando entran en contacto con un sustrato y se encuentran expuestas a una temperatura, pH y humedad adecuados para su crecimiento. Estas dan origen a un micelio primario, conocido como homocarión por tener un solo tipo de núcleo, generalmente haploide. La mayor parte del micelio homocarión no fructifica, pero es capaz de crecer vegetativamente. Para que el cuerpo fructífero se desarrolle, es necesario que dos micelios homocarióticos compatibles se fusionen y por disolución de la pared del punto de contacto, formen compartimentos hifales de citoplasma continuo, con dos tipos de núcleos provenientes de cada uno de los compartimentos que se fusionaron. A este tipo de micelio se le conoce como micelio secundario, en la mayoría de los casos este micelio presenta una estructura lateral conocida como conexión grapa o fíbula (Figura 1) (Sánchez & Royse, 2001).



**Fig. 1.** Ciclo de vida de *P. ostreatus*.

## 2. ENZIMAS LACASAS

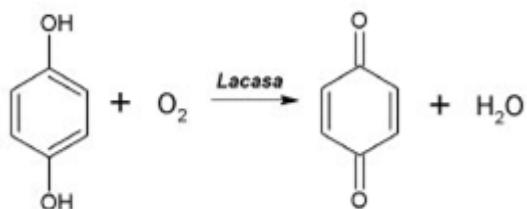
A la fecha está bien establecido que las típicas lacasas fúngicas son glicoproteínas, con tres centros de cobre, con pesos moleculares que van de 45 a 110 KDa dependiendo del hongo y del grado de glicosidación. Llevan a cabo la reducción de dos moléculas de oxígeno a una de agua, tienen pH óptimos ácidos y son termotolerantes.

La lacasa es una enzima oxidoreductasa (p-difenol-oxígeno-óxidorreductasa, EC 1.10.3.2). Se le considera dentro del grupo de las fenoloxidases ya que utiliza monofenoles como sustrato. Las isoformas de la lacasa poseen similar peso molecular y sustratos específicos similares, aunque presentan considerables diferencias en la secuencia de aminoácidos (Okamoto *et al.*, 2000). Son enzimas que están ampliamente distribuidas en la naturaleza; se ha reportado su presencia en animales, plantas y microorganismos (Lucas *et al.*, 2001).

Además, forman parte del sitio catalítico y son responsables de llevar a cabo la transferencia de electrones. El centro de cobre tipo I se caracteriza por una fuerte absorción en la zona de 600 nm y es el responsable del típico color azul de la lacasa. Está involucrado en la captura y transferencia de electrones (Reinhammar & Malmstrom, 1981). El centro de cobre tipo II solo exhibe su pico de absorción en la región visible, por lo que es invisible para el análisis por resonancia paramagnética de electrón. Es fácilmente removido en condiciones anaerobias y en presencia de un agente reductor. Además de estar implicado en la captura y transferencia de electrones, interviene en la unión del oxígeno al sitio activo. El cobre tipo III es un centro binario que absorbe alrededor de 330 nm. Al igual que el centro tipo II, participa en la unión del oxígeno. Este centro junto al centro tipo II forman un grupo trinuclear (T2/T3) incrustado entre los dominios 1 y 3, los cuales proveen sus aminoácidos para su estabilización (Thurston, 1994.; Piontek *et al.*, 2002).

## **2.1. Reacción química de lacasas**

En la figura 2 se muestra la reacción típica de una lacasa.



**Fig. 2.** Reacción típica de la enzima lacasa sobre compuestos fenólicos.

## **3. FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO COMO MÉTODO DE OBTENCIÓN DE LACASAS**

Se ha reportado que la fermentación en medio sólido (FMS) es una buena alternativa para la producción de diversas enzimas de hongos, obteniendo mejores resultados que en la fermentación en medio líquido (FML) (Díaz Godínez, 2001).

La producción de enzimas extracelulares a partir de hongos filamentosos ha sido desarrollada extensivamente a través del uso de FMS. Siendo una alternativa más adecuada para la producción de enzimas dadas las características fisiológicas y morfológicas de los hongos filamentosos (García, 2001). Es por ello que el uso integral y racional de los desechos agroindustriales como sustratos en la producción de enzimas de interés industrial se convierte en una alternativa extremadamente atractiva debido a la presencia en estos compuestos de grandes cantidades de celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina, los cuales sirven como inductores para la síntesis de enzimas hidrolíticas y fenoloxidases (García 2001.; Raimbault 1998.; Enari 1990.; Cannel & Moo-Young 1980). Sin embargo, son relativamente pocos los microorganismos capaces de degradar lignocelulosa. La lignina es un biopolímero aromático, estructuralmente amorfó, encontrado abundantemente en la pared de algunas células vegetales y extremadamente resistentes al ataque microbiano.

## **4. APLICACIONES INDUSTRIALES Y BIOTECNOLÓGICAS DE LAS ENZIMAS LACASAS**

Las aplicaciones prácticas de las lacasas, conducen a investigar nuevas fuentes de enzimas producidas por hongos (Mayer & Staples, 2002). Las lacasas ofrecen diversas ventajas que son de gran interés para su aplicación biotecnológica (Baldrian, 2006), pues oxidan tanto compuestos tóxicos como no tóxicos, son específicas, ecológicamente sostenibles y principalmente, son catalizadores competentes (Shraddha *et al.*, 2011).

#### **4.1. Industria del papel**

La preparación industrial del papel requiere la separación y degradación de lignina en pulpa (Rodríguez & Toca, 2007). Convencionalmente, este proceso se realiza usando oxidantes químicos a base de contaminantes clorados y oxígeno (Kunamneni *et al.*, 2006). Los procesos de deslignificación con oxígeno se han introducido industrialmente en los últimos años para sustituir los métodos convencionales con cloro, pero pre-tratamientos de la pulpa con enzimas ligninolíticas, podrían proporcionar estrategias más limpias de deslignificación (Rodríguez & Toca, 2007). Una razón importante para sustituir el blanqueo químico con cloro, por el bioblanqueo, es la eliminación de compuestos organoclorados del medio ambiente, dado que son altamente carcinogénicos (Rodríguez & Toca, 2007).

Las lacasas son utilizadas en la industria papelera para llevar a cabo el biopulpeo, que es un proceso fundamental para separar y eliminar la lignina de la celulosa (Deleé *et al.*, 1988).

#### **4.2 Industria textil**

Este tipo de industria ocupa las dos terceras partes del mercado total de colorantes, además de que consume grandes volúmenes de agua y sustancias químicas para el procesamiento húmedo de textiles (Desai & Nityanand, 2011; Rodríguez & Toca, 2007). Los reactivos químicos usados tienen diversa composición, que va de compuestos inorgánicos, a polímeros y productos orgánicos. Debido a su estructura química y origen sintético, los tintes son resistentes a la decoloración por exposición a la luz y al agua (Desai & Nityanand, 2011). El uso de lacasas en la industria textil ha crecido rápidamente; se han usado para blanquear textiles y algunas veces para sintetizar colorantes (Desai & Nityanand, 2011). En cuanto al blanqueo de textiles.

#### **4.3. Nanobiotecnología**

Dado que las lacasas son capaces de catalizar reacciones de transferencia de electrones sin la adición de cofactores, su uso también ha sido estudiado en biosensores, para detectar varios compuestos fenólicos u oxígeno. Por ello, biosensores para la detección de morfina y codeína, flavonoides vegetales y electroinmunoensayos, han sido desarrollados. La contribución de la nanotecnología es el desarrollo de más pequeños y más eficientes biosensores controlados por deposición y adsorción específica de biomoléculas en diferentes tipos de superficies, que van desde el orden de micras hasta nanómetros (Rodríguez & Toca, 2007).

#### **4.4. Biorremediación**

Uno de los mayores problemas ambientales que enfrenta el mundo hoy en día, es la contaminación del suelo, agua y aire, por compuestos químicos tóxicos (Desai & Nityanand, 2011). Con la rápida industrialización y el uso extensivo de pesticidas para mejorar la productividad agrícola, la contaminación ambiental se ha convertido en un serio problema. Ciertos compuestos peligrosos, como bifenilos policlorados, benceno, tolueno, etilbenceno, xileno, hidrocarburos aromáticos policíclicos, pentaclorofenol, 1,1, 1-tricloro-2,2-bis (4-clorofenil) etano y trinitrotolueno, son sustancias conocidas por su efecto carcinogénico y mutagénico y por su persistencia en el medio ambiente (Shraddha *et al.*,

2011). La capacidad de los hongos para transformar una amplia variedad de productos químicos peligrosos, ha causado gran interés en los investigadores para su uso en la biorremediación (Shraddha *et al.*, 2011).

En la biorremediación de suelos, las lacasas oxidan contaminantes orgánicos tóxicos que, en conjunto con otros xenobióticos, son la principal fuente de contaminación del suelo. Normalmente se aplican en forma de micelio crecido sobre viruta de madera, paja de trigo o de maíz, o de algún otro material lignocelulósico similar (Quintero *et al.*, 2006).

En aguas de irrigación, la presencia de compuestos aromáticos, representa un riesgo significante para la salud, por lo que el uso de lacasas inmovilizadas sobre soportes orgánicos, permite la remoción natural de los xenobióticos aromáticos de suspensiones acuosas (Minussi *et al.*, 2002).

#### **4.5. Cosméticos**

El ámbito de los cosméticos no ha sido indiferente a la aplicación de las lacasas ya que actualmente se conocen tintes capilares a base de estas enzimas que los hacen menos irritantes, pues las lacasas sustituyen el peróxido de hidrógeno como un agente oxidante en la formulación de los tintes. Recientemente, también se han desarrollado preparaciones cosméticas y dermatológicas que contienen proteínas para el aclarado de la piel (Rodríguez & Toca, 2007).

#### **4.6. Alimentos**

En la industria alimentaria, las lacasas se utilizan para la eliminación de compuestos fenólicos indeseables en la elaboración de jugos, en la estabilización del vino y la biorremediación de aguas residuales. Las lacasas no sólo mejoran la funcionalidad, sino también las propiedades sensoriales del producto en el que se aplican (Minussi *et al.*, 2002; Rodríguez & Toca, 2007.; Shraddha *et al.*, 2011).

En la industria de la cerveza, las lacasas no sólo proporcionan estabilidad, sino también alargan la vida útil de la misma. En esta bebida, la formación de turbidez es estimulada por las proantocianidinas presentes de forma natural, fenómeno que se conoce como “niebla fría”. A temperatura ambiente o superior, el calentamiento de la cerveza puede disolver el complejo, pero después de cierto tiempo, los anillos fenólicos son sustituidos por el grupo sulfhidrilo, y la turbidez entonces, se vuelve permanente, sin que se pueda redisolver (Shraddha *et al.*, 2011).

En la elaboración de jugos frutales estables, la enzima lacasa es utilizada comúnmente, ya que los compuestos fenólicos y sus productos de oxidación confieren color y sabor no característico al jugo. El cambio en el color y aroma del jugo, se atribuye a la polimerización y oxidación de compuestos fenólicos y polifenoles, debido a que existe una alta concentración de estos compuestos; esta reacción se denomina oscurecimiento enzimático (Rodríguez & Toca, 2007).

El tratamiento de los jugos con lacasas, es más efectivo en comparación con los métodos convencionales, ya que permite la eliminación de fenoles, así como de complejos sustrato-enzima, con la ayuda de una membrana de filtración, logrando la estabilidad del color, a pesar de que la turbidez esté presente (Minussi *et al.*, 2002). En el área de panificación, una amplia variedad de enzimas son usadas para mejorar la textura, volumen, sabor y frescura del pan. Cuando la lacasa se añade a la masa, la fuerza del gluten en la masa y en los productos de panadería, se mejora, pues el volumen del producto aumenta, se mejora la estructura de la miga y la suavidad de los productos horneados se lleva a cabo. Así mismo, debido a la adición de lacasa, la viscosidad disminuye y la resistencia y estabilidad aumentan, aun utilizando harinas de baja calidad (Minussi *et al.*, 2002; Rodríguez & Toca, 2007).

En la producción de vino, particularmente en la etapa de trituración y prensado de la uva, la alta concentración de compuestos fenólicos y polifenoles provenientes de los tallos, semillas y pieles de las bayas, desempeñan un papel importante, puesto que contribuyen al color y astringencia del vino. La oxidación de polifenoles ocurre tanto en mostos como en vinos, causando un aumento en el color y cambios en el sabor, lo que se denomina como “maderización”. Factores catalíticos, remoción de polifenoles, clarificación y altas dosis de dióxido de azufre, se utilizan para prevenir la maderización (Minussi *et al.*, 2002). Por lo tanto, el tratamiento con lacasa es factible, incrementa la capacidad de almacenamiento y reduce costos de procesamiento (Shraddha *et al.*, 2011).

## 5. CONCLUSIONES

Las enzimas lacasas debido a su alto potencial biotecnológico son ampliamente estudiadas, estas forman parte de un complejo enzimático capaz de degradar compuestos de difícil asimilación, es bien sabido que en todo el mundo se generan miles de toneladas de residuos agroindustriales, generando un gran impacto al ambiente; es aquí donde las enzimas juegan un papel imprescindible siendo capaces de remover estos residuos hasta su completa degradación. Las enzimas lacasas han sido producidas mediante diferentes procesos biotecnológicos en el que destacamos la fermentación sólida como un medio eficaz para su producción.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

## REFERENCIAS

- Cannel E. & Moo-Young M. 1980. Solid-state fermentation system. *Process Biochemistry*. 15, 2-7.
- Chawachart N., Khanongnuch C., Watanabe T. & Lumyong S. 2004. Rice bran as an efficient substrate for laccase production from thermotolerant basidiomycete *Coriolus versicolor* strain RC3. *Fungal Diversity*. 15: 23-32.

Cisterna C. 2003. Cultivo del champiñón ostra en chile. 1<sup>a</sup> Edición. Editorial Macote, Ltda. Chile. 118 p.

Dedeyan B., Klonowska A., Tagger S., Tron, T., Lacazio G., Gil G. & Le Petit J. 2000. Biochemical and characterization of a laccase from *Marasmius quercophilus*. Applied Environmental Microbiology. 66: 925-929.

Deleé W., O'Neil C., Haw Desai S. S. & Nityanand C. 2011. Microbial laccases and their applications: A review. Asian J Biotechnol. 3 (2): 98-124.

Díaz-Godínez G., Soriano J., Augur C. & Viniegra González G. 2001. Exopectinases Produced by *Aspergillus niger* in Solid-State and Submerged Fermentation: A Comparative Study. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 26: 271-275.

Enari M. 1990. In Microbial enzymes and Biotechnology (Ed. Fogarty W.). Applied Science Publishers, London. p. 183 -223.

Galhaup C., Goller S., Peterbauer C., Strauss J. & Haltrich D. 2002. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. Microbiology 148: 2159-2169.

Galhaup C., Goller S., Peterbauer C., Strauss J. & Haltrich D. 2002. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. Microbiology. 148: 2159-2169.

García A. 2001. Producción de Enzimas Lignolíticas por Basidiomycetes mediante la Técnica de Fermentación en Sustrato Sólido. Tesis de Maestría. Universidad Industrial de Santander, Escuela de Química, Bucaramanga.

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

Guillen F., Muñoz C., Gómez-Toribio V., Martínez T. & Martínez M. 2000. Oxygen activation during oxidation of methoxyhydroquinones by laccase from *Pleurotus eryngii*. Applied. Environmental. Microbiol. 66 (1):170-175.

Kes F. & Pinheiro H. 1988. Anaerobic treatment of textil effluents: A review. J Chemical Technological Biotechnol. 73: 323-335.

Kirk K T. & Fenn, P. 1982. Formation and action of ligninolitic system in basidiomycetes. British Mycological Society. Simposium 4. Cambridge University Press. pp. 67-70.

Kunamneni A., Plou F. J., Ballesteros A. & Alcalde M. 2006. Laccases and their applications: A patent review. Instituto de catálisis y petroleoquímica, CSIC. España. 50 p.

Locci E., Laconi S., Pompei R., Scano P., Lai A. & Marincola, C. 2008. Wheat bran biodegradation by *Pleurotus ostreatus*: A solid-state Carbon-13 NMR study. Bioresource Technol. 99 (10): 4279-4284.

Lucas L.R.; Robles Gómez A. M.; Gálvez Del Postigo Ruíz A.; García Gutiérrez T; Pérez Pulido R. & Álvarez de Cienfuegos López G. 2001. Biodegradación de la Celulosa y la Lignina. Universidad De Jaén. Pp. 148.

Martínez S. M., Pedrosa R. A., Rodríguez, V. R. & Rosas A. J. 2005. Efecto de la glucosa y nitrato de amonio sobre las enzimas ligninolíticas producidas por *Trametes versicolor* inmovilizado en espuma y la decoloración de un efluente papelero en un biorreactor de lecho fluidizado. Revista de Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. 10 (2): 27-26.

Mayer A. M. & Staples R. C. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. Phytochemistry 60:551-565

Mouso N., Papinutti L. & Forchiassin F. 2003. Efecto combinado del cobre y pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de lacasa y manganeso peroxidasa por *Stereum hirsutum* (Willd) Pers. Rev Iberoam Micol. 20: 176-178.

Okamoto K.; Yanagi S.O. & Sakai T. 2000. Purification and characterization of extracellular laccase from *Pleurotus ostreatus*. Mycoscience. 41: 7-13.

Quintero D. J. C., Feijoo, C. G. & Lema R. J. M. 2006. Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. VITAE. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. 13(2): 61-67.

Raimbault M. 1998. General and Microbiological Aspects of Solid Substrates Fermentation. Electronic Journal, of Biotechnology. Vol.1 (3): p. 1-17.

Rodríguez C. S. & Toca H. J. L. 2007. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. Biotechnology. Advances. 25: 558-569..

Rodríguez C. S. & Toca H. J. L. 2007. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. Biotechnoloy Advances. 24: 500-513.

Sánchez J.E. & Royse D. 2002. La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. Limusa, D. F. 290 pp

Shraddha R. S., Sehgal S., Kamthania M. & Kumar, A. 2011. Laccase: Microbial, sources, production, purification, and potential biotechnological applications. Enzyme Res. Artículo in press.

Songulashvili G., Elisashvili V., Wasser S. P., Nevo E. & Hadar, Y. 2007. Basidiomycetes laccase and manganese persoxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. Enzyme and Microbial Technology. 41: 57-61.

Stajic M., Persky L., Friesem D., Hadar Y., Wasser S. P., Nevo, E. & Vukojevic, J. 2006. Effect of different carbón and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. Enzyme and Microbial Technology. 38: 65-73