



Potential use of bioreactors for laccases production of basidiomycete fungi

Uso potencial de biorreactores para la producción de lacasas de hongos basidiomicetos

Luis Felipe Candia-Sanchez¹, Jorge Álvarez-Cervantes³, Rubén Díaz², Gerardo Díaz-Godínez^{2*}.

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

²Laboratorio de Biotecnología, Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México.

³Universidad Politécnica de Pachuca. Email: *diazgdo@hotmail.com

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2017.2.1.15>

ABSTRACT

The laccase enzymes are a group of blue multi-copper oxidases, which catalyze the oxidation of a wide range of substrates, such as polyphenols, aminophenols, and aromatic amines, whereby they are able to degrade lignin and highly recalcitrant environmental pollutants. These enzymes are produced by many fungi and are very useful in various biotechnological processes. The development of biotechnology has been possible mainly thanks to cell culture techniques including the large scale fermentation technology where bioreactors such as airlift or stirred tank to produce biomass and metabolites are very important. Such techniques have allowed the establishment of conditions for mushroom cultivation, for the synthesis of a variety of metabolites of interest. In recent years, they have made extraordinary efforts to produce laccases and approaches to improve functional expression or stability. Basidiomycetes fungi produce high levels of ligninolytic enzymes such as laccases.

Keywords: Airlift bioreactor, stirred tank bioreactor, laccases.

RESUMEN

Las enzimas lacasas son un grupo de enzimas azul cobre-oxidadas, las cuales catalizan la oxidación varios sustratos, como son polifenoles, aminofenoles, y aminas aromáticas, por lo cual son capaces de degradar la lignina así como muchos contaminantes ambientales altamente recalcitrantes. Estas enzimas son producidas por muchos hongos y son muy utilizadas en varios procesos biotecnológicos. El desarrollo de la biotecnología ha sido posible, gracias principalmente a técnicas de cultivo de células, incluyendo la tecnología de fermentación a gran escala, en la que son muy importantes biorreactores como el airlift o el tanque con agitación para producir biomasa y metabolitos. Tales técnicas han permitido el

establecimiento de condiciones para el cultivo de hongos, para la síntesis de una diversidad de metabolitos de interés. En los últimos años, han realizado esfuerzos extraordinarios para producir laccasas y enfoques para mejorar la expresión funcional o la estabilidad. Los hongos basidiomicetos producen altos niveles de enzimas ligninolíticas tales como laccasas.

Palabras clave: Palabras clave: Biorreactor airlift, Biorreactor tanque agitado, Lacasas, *Basidiomicetos*.

1. INTRODUCCIÓN

Alrededor de 70,000 especies de hongos han sido descritas, sin embargo, se estima que pueden existir alrededor de 1.5 millones de especies (Hawksworth *et al.*, 1995). Los hongos también son de gran importancia económica ya que tienen efectos tanto negativos como positivos en nosotros. Algunos son usados en la industria de la cerveza y la champaña, proveen numerosos medicamentos como la penicilina y otros antibióticos, hongos comestibles (trufas y colmenillas) Algunos también son estudiados como organismos modelo los cuales pueden ser usados para ganar conocimiento de procesos básicos tales como la genética, fisiología, bioquímica y biología molecular que pueden ser aplicables a muchos organismos (Taylor *et al.*, 1993). Al mismo tiempo, los hongos han contribuido en la pérdida de millones de dólares en daños en alimentos completamente 16 echados a perder, destrucción o degradación de materiales usados por el humano y enfermedades de plantas sanas así como también en el humano y en los animales (Mueller *et al.*, 2004). Los hongos no realizan la fotosíntesis pues son heterótrofos que viven a partir de la materia orgánica producida por otros organismos. Pueden reproducirse por esporas o por medio de la ramificación de estructuras tubulares y arborescentes llamadas hifas. Una hifa es una estructura cilíndrica que consta de una pared celular que recubre a una membrana en cuyo interior pueden existir uno o varios núcleos. Además, pueden tener septos que son paredes internas que cortan la continuidad del citoplasma dentro de la hifa y en algunos casos estos septos pueden presentar poros que permiten el paso del citoplasma, incluyendo a sus organelos, estableciendo así, la continuidad citoplásmica dentro de la hifa. Las hifas crecen por extensión apical o de las puntas y se multiplican por ramificación. En los extremos de estas células es donde se lleva a cabo la asimilación de nutrientes del medio y la excreción de las hidrolasas que son enzimas extracelulares necesarias para la degradación de una gran variedad de substratos complejos (Herrera & Ulloa 1990; Guzmán *et al.*, 1993, Alexopoulos *et al.*, 1996). Todos los hongos son heterótrofos, es decir, requieren materia orgánica preformada que utilizan como fuente de carbono y energía para la síntesis de estructuras celulares. La pared rígida (compuesta en mayor proporción por quitina y otros polisacáridos estructurales) con la que cuenta la mayoría de las especies fúngicas ligninocelulósicas, les impide fagocitar su alimento y por ello deben absorber nutrientes simples y solubles que obtienen mediante la degradación de biopolímeros tales como la celulosa, hemicelulosa y lignina, por acción de un complejo sistema de enzimas hidrolíticas que liberan al medio (Guzman *et al.*, 1993; Moore-Landecker, 1996). Al conjunto de hifas ramificadas de los hongos se le conoce como micelio, mismo que puede encontrarse en forma monocariótica (un solo núcleo) o dicariótica (dos núcleos). En el caso de los basidiomicetos, bajo condiciones fisiológicas ambientales específicas, el micelio dicariótico

comienza a formar estructuras reproductoras denominadas cuerpos fructíferos (también llamados carpóforos, esporóforos o basidiocarpos) y este proceso es acompañado por la transcripción de genes específicos que producen abundante ácido ribonucleico mensajero (ARNm) (Futoshi *et al.*, 2004). En el cuerpo fructífero de los hongos macroscópicos, el estípite o pie y el característico píleo o sombrero están conformados por micelio ramificado; en la parte inferior del píleo se encuentran las laminillas, mismas que constituyen el himenio, lugar donde se forman y se liberan las esporas una vez que el cuerpo fructífero ha madurado. Los basidiomicetas son los hongos más conocidos. Se caracterizan por formar basidios, células donde se producen externamente esporas sexuales (basidiosporas) tras la cariogamia y la meiosis. Algunos basidiomicetes tienen ciclos vitales muy complejos, especialmente algunos hongos patógenos como las royas (Uredinales, Basidiomiceto), que pueden tener dos hospedantes distintos y hasta cinco tipos diferentes de estructuras productoras de esporas.

2. CLASIFICACIÓN DE HONGOS BASIDIOMICETOS

Dentro de la clasificación de los hongos basidiomicetos podemos mencionar una gran variación pero lo más importantes esta que son hongos descomponedores puesto que son componente importante de diversos ecosistemas terrestres, la presencia y su roles son importantes pues que adquieren o dan nutrientes y una sucesión de plantas con la estabilización de suelos y otros procesos eco sistémicos son a menudo poco reconocidos (Boer *et al.*, 2005). Utilizamos los términos saprotrópico y saprófito para estos organismos, preferentemente saprofitos, ya que este último se refiere a hongos que se alimentan de materia muerta, aunque probablemente no existan verdaderos saprofitos (Kirk *et al.*, 2001). Los hongos saprotrofos incluyen miembros de la mayoría de los filos, pero los miembros del filio Basidiomycota (informalmente, basidiomicetos) tienen una esencial importancia en la naturaleza debido a que algunos de ellos, como por ejemplo, las especies *Lentinus hirtus*, *Schizophyllum commune*, *Trametes versicolor* y *Pleurotus spp* (Agrios, 2005) son los principales descomponedores de materiales recalcitrantes de la hojarasca mediante la producción de enzimas modificadoras de la lignina, como las de lignina peroxidasa, las manganoso peroxidasa y lacasas (Rayner & Buddy 1988). También se puede mencionar a *Puccinia graminis*, *Puccinia melanocephala*, *Hemileia vastatrix*, *Ustilago scitaminea* y *Tilletia tritici* los cuales son causantes de las royas y los carbones (Agrios, 2005) también algunos hongos (setas) forman ectomicorrizas con los pinos como *Amanita boletus* (Pérez-Moreno, 2012). También se puede mencionar algunos grupos de hongos comestibles los cuales son cultivados en casi todas las regiones del mundo y son los más comerciales por lo cual se conocen por su nombre comercial y su nombre científico como por ejemplo el *Agaricus bisporus* (champiñón), *Pleurotus spp.* (seta) y *Lentinula edodes* (shiitake) (Andrade & Mata 2012). Dentro de los basidiomicetos se han investigado en la medicina y sus metabolitos activos (Loyola, 2005). Estos estudió de los basidiomicetos se han realizado desde el Siglo I hasta la actualidad lo cual con trascurso de los años han referido que especias como *Ganoderma lucidum*, *Phellinus linteus* y *Formes fermentarius* se han encontrado compuestos con actividad antiviral, antitumoral, hematológica, antioxidante y antiinflamatoria (Smânia *et al.*, 2003; Aqueveque *et al.*, 2006) incluso pueden presentar actividad anticancerosa a través de la potenciación inmunológica, eficaz en la profilaxis y tratamiento del sida (Ick-Dong *et al.*, 2005). Paralelo a estos descubrimientos se han

reportado valiosos estudios referentes a la capacidad de los basidiomicetos de degradar eficientemente la lignina, polímero aromático, heterogéneo y complejo que protege las plantas de ataques de fitopatógenos. También pueden transformar a sustancias más simples contaminantes del medioambiente. La degradación de materiales lignocelulósicos es un proceso que involucra la acción sinérgica de un gran número de enzimas extracelulares (Aro *et al.*, 2005; Agrios, 2005; Quintero *et al.*, 2006; Ortiz, 2009), que se consideran en los microorganismos patógenos factores de virulencia, activados por señales ambientales y de comunicación célula-célula (Dong *et al.*, 2001). Por otra parte, algunos de ellos determinan la capacidad de ataque de los hongos mico parasíticos, proceso que involucra la hidrólisis de la pared celular de los fitopatógenos (Inglis & Kawchuk 2002). Los basidiomicetos en la biorremediación y su característica de degradación de materiales lignocelulósicos, se clasifican en hongos de la pudrición blanda, que degradan parcialmente la lignina para ganar acceso a la celulosa (Kirk & Farrell 1987), y hongos de la pudrición blanca, que la descomponen completamente (Tuomela *et al.*, 2000). En este proceso intervienen enzimas comúnmente conocidas como enzimas modificadoras de la lignina ya que van a secretar celulosa y hemicelulosa (Agrios, 2005), las cuales son producto del metabolismo secundario bajo un proceso estrictamente aerobio (Ortiz, 2009). De forma general la expresión de genes ligninolíticos se favorece a una baja concentración de los niveles de pH (Robles *et al.*, 2008 a), por la disminución de nutrientes como el nitrógeno, carbono o azufre y por la presencia o no de Mn. Es por eso que se considera como respuesta al estrés que se someten y ante carencias nutricionales (Ortiz, 2009). Debido a la baja especificidad de la actividad enzimática y a la fuerte capacidad oxidativa del sistema de degradación ligninolítica, los hongos de la pudrición blanca pueden degradar un amplio conjunto de compuestos similares a los que presenta la lignina, tales como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) (Collins & Dobson 1997), 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) (Wariishi & Gold 1992), dioxinas, 1,1,1-trichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl) ethane (DDT), cloroanilinas y colorantes (Field *et al.* 1992). Tal es el caso del hongo *Phanerochaete chrysosporium* capaz de degradar el DDT, contaminante persistente en el medioambiente, al igual que las especies *Pleurotus ostreatus*, *Phellinus weirii* y *Polyporus versicolor*, bajo condiciones ligninolíticas de crecimiento por más de treinta días de incubación. Durante la biodegradación del DDT se generan productos intermediarios, los cuales más tarde también son degradados (Robles *et al.*, 2008). El TNT resulta contaminante del agua, suelo y sedimentos. La modificación de este compuesto consiste en su transformación a DNT (dinitrotoluenos) por los hongos basidiomicetos como la especie *P. chrysosporium* es capaz de llevar el proceso hasta la producción de CO₂ y H₂ O. (Robles *et al.*, 2008). Actualmente se han realizado estudios de la biorremediación por las especies *Phanerochaete spp.*, *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus*. Este último es el de mejores resultados de degradación a explosivos en un período de poco más de doscientos días (Baldrian, 2008). Además, la especie *Pleurotus eryngii* es capaz de traspasar metales pesados o compuestos radioactivos al interior de sus basidiomas (Baeza *et al.*, 2006). Otros contaminantes, resultado de la actividad industrial, son los polibifenilos clorados (PBC) producidos por la cloración del grupo bifenilo. Los PCB logran al medioambiente, suelos y sedimentos como resultado de la utilización indebida en los procesos industriales como fluidos de transferencia, fluidos dieléctricos, solventes retardadores de la inflamación y diluentes orgánicos (Robles *et al.*, 2008). Las especies *P. chrysosporium*, *Corioloopsis polyzona*, *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor* son capaces de remover in vivo los PCB, solo que el mecanismo de acción exacto del proceso

donde actúan las enzimas ligninolíticas (Baudette *et al.*, 2000). En la Tabla 1 se describen algunos basidiomicetos y su importancia biotecnológica.

Tabla1. Hongos basidiomicetos y sus principales usos en la biotecnología.

Organismo	Importancia
<i>Lentinus histus</i>	
<i>Schizophyllum commune</i>	Degradadores de lignina y productores de enzima lacasas
<i>Trametes versicolor</i>	
<i>Pleurotus spp.</i>	
<i>Puccinia graminis</i>	
<i>Puccinia melanocephala</i>	
<i>Hemileia vastatrix</i>	Causantes de royas y carbones
<i>Ustilago scitaminea</i>	
<i>Tilletia tritici</i>	
<i>Amanita boletus</i>	Ectomicorriza (setas)
<i>Agaricus bisporus</i>	
<i>Pleurotus spp</i>	Principales hongos comerciales y comestibles
<i>Lentinula edodes</i>	
<i>Ganoderma lucidum</i>	
<i>Phellinus linteus</i>	Principales hongos en la producción de metabolitos activos en el uso medicinal
<i>Formes fermentarius</i>	
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	
<i>Pleurotus ostreatus</i>	
<i>Phellinus weirii</i>	
<i>Polyporus versicolor</i>	Degradadores de DDT, removedores de PCB
<i>Coriolopsis polizona</i>	
<i>Phanerochaete spp</i>	
<i>Trametes versicolor</i>	
<i>Pleurotus eryngii</i>	Capaz de transportar metales pesados a sus basidiomas

2.1. Fase de crecimiento y ciclo de vida

La reproducción sexual (Figura 1) juega un papel importante dentro de la biología donde estudios de muchos eucariotas promueven una innovación evolutiva de este linaje (Goodenough & Heitman 2014; Maia *et al.*, 2015). En este grupo se denomina basidiocarpo y se caracteriza por ser una célula terminal en forma de clavo en la que se produce cariogamia y meiosis, produciendo generalmente 4 esporas exógenas (basidiosporas). Todos los Basidiomicetos tienen micelios compuestos por hifas tabicadas, uni-, bi- o multinucleadas, con tabiques perforados por poros compuestos denominados dolíporos. Además, se caracterizan por presentar una intercalación de una fase dicariótica entre la plasmogamia y la cariogamia, paredes celulares compuestas por quitina y glucanos y ausencia de células flageladas (Lindorf *et al.*, 1991). En los casos de los hongos basidiomicetos tiene un ciclo o modelo sexual donde podemos describir que tienen dos

modelos sexuales donde el primero es el homotalismo y el segundo es heterotalismo. Para el primer caso el homotalismo de los hongos va a ser cuando son auto compatibles, haciendo una referencia a la unión sexual que se realiza entre dos elementos de un mismo micelio. Para segundo caso en el heterotalismo se necesitan dos micelios para así poder llevar a cabo su reproducción. A continuación se explica el ciclo de vida de un Basidiomiceto típico. A partir de basidiosporas haploides de distinta polaridad liberadas de un basidio maduro, en un medio adecuado, germinan y originan un micelio con células uninucleadas denominado micelio primario haploide o monocariótico (1). Estos micelios crecen y al encontrar otro compatible se ponen en contacto, que por plasmogamia (somatogamia) dan como resultado una célula con dos núcleos no fusionados, que seguirán dividiendo de manera conjugada para extender el micelio y formar el micelio secundario o dicariótico ($n+n$) (2). Este tipo de división conjugada que permite mantener la condición dicariótica se da mediante las fíbulas o asas anastomósicas, bucles o ganchos (ver explicación en el siguiente apartado). El micelio secundario se desarrolla y forma el cuerpo fructífero llamado basidiocarpo (micelio terciario) (3). Este cuerpo fructífero se encuentra constituido por un pie o estípite, un píleo y un himenio, el cual se encuentra formado por basidios (hifas estériles). Los basidios son estructuras reproductivas con dos núcleos (uno de cada micelio monocariótico de apareamiento) (4). Como resultado de la cariogamia se observa el único momento, muy breve, de un estadio diploide ($2n$) (5). Luego de que ocurre meiosis se obtiene como resultado la formación de cuatro núcleos. Cada uno de estos núcleos desarrolla una basidiospora (n), las que después de liberadas, el basidiocarpo se desintegra (6) (Curtis & Barnes 2004).

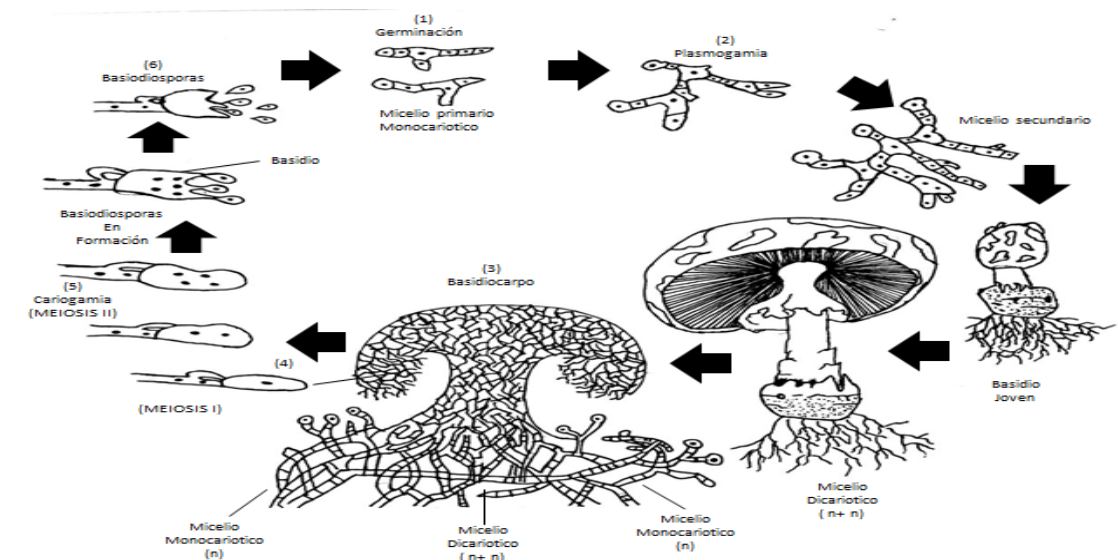


Fig. 1. Ciclo de vida de basidiomiceto.

2.2. Formación de fíbulas

Las fíbulas (Figura 2) son ramas cortas en forma de gancho que se producen en la célula terminal (1). En el gancho se ubica uno de los núcleos y el otro permanece en la célula terminal (2). Luego ambos núcleos se dividen simultáneamente (3), y se forman dos

tabiques, uno en el punto de origen de la fíbula y otro transversalmente debajo del arco formado por ella. Como resultado de esta tabicación se forma una nueva célula terminal con dos núcleos hijos de distinta polaridad, mientras que la célula subterminal porta un núcleo hijo interno y el otro contenido en la fíbula (4). Cuando la parte terminal de esta última se contacta con la pared de la célula subterminal, se disuelve y deja pasar el núcleo que contiene, quedando la célula subterminal con dos núcleos hijos distintos (5). Así, se originan dos células hijas cada una con un par de núcleos homólogos al par original (dicario) (Sánchez & Royse 2002).

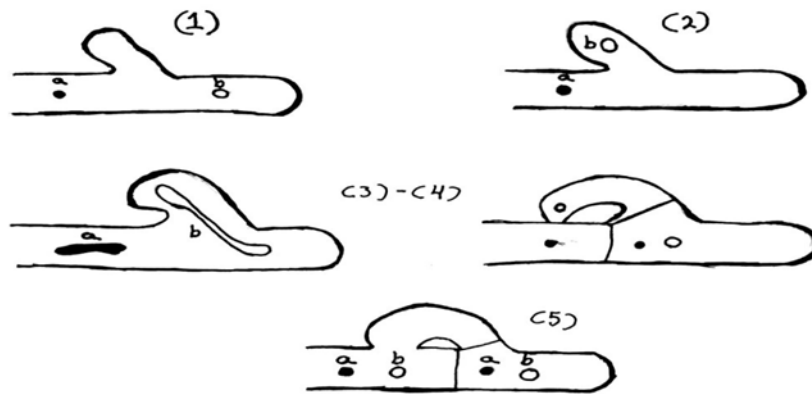


Fig. 2. Formación de fíbulas.

2.3. Desarrollo del cuerpo fructífero de un basidomicetos

Cuando las condiciones ambientales son las adecuadas, el micelio dicariótico produce una masa de hifas que se diferencian en una parte basal abultada, un pedúnculo semejante a un tallo (estúpide) y un sombrero o píleo que contiene septos o laminillas, o poros (Kobold *et al.*, 2000). Todas estas formas se encuentran en o por debajo del nivel del suelo y pueden estar rodeadas por una delgada cubierta de micelio que se llama velo universal. La seta se hace evidente cuando el pedúnculo se alarga y hace que píleo surja del suelo en la misma forma en la que se abre un paraguas. Las laminillas o poros se alinean en la superficie inferior del píleo; es ahí donde se forman las esporas (basidiosporas) en los basidios. Las esporas maduras se descargan y por el viento pueden ser arrastradas por varios metros, incluso kilómetros. Cuando esto ocurre, el píleo, el pedúnculo y el pie comienzan a degenerar. En algunas especies se transforman en un líquido semejante a la tinta, pero en la mayor parte de los casos se descomponen o secan (Jensen & Salisbury 1988).

3. IMPORTANCIA DE LAS ENZIMAS LACASAS

Lacasas son enzimas comunes en la naturaleza y se encuentran ampliamente en las plantas y hongos, así como en algunas bacterias e insectos (Minussi *et al.*, 2007). Las funciones fisiológicas de estos biocatalizadores, que pueden ser extracelulares o intracelulares, son

diferentes en los diversos organismos, pero todos ellos catalizan procesos de polimerización o despolimerización (Rivas, 2006). Como se mencionó anteriormente, la primera lacasa se reportó en 1883 de *Rhus vernicifera*, el árbol de laca japonesa del que se derivó la designación de lacasa, y la enzima se caracterizó como un metal que contenía oxidasa (Bertrand, 1985). Esto lo convierte en una de las primeras enzimas jamás descritas. Lacasas se han descubierto posteriormente de otras numerosas plantas (Ranocha *et al.*, 1999), pero la detección y purificación de lacasas vegetales son a menudo difíciles, porque los extractos de plantas crudas contienen un gran número de enzimas oxidativas con amplias especificidades de sustrato (Ranocha *et al.*, 1999), que es probablemente la razón por la información detallada sobre las propiedades bioquímicas de la lacasa vegetal son limitadas. Sin embargo, la lacasa de *Rhus vernicifera* es una excepción y ha sido ampliamente estudiado, especialmente en lo que respecta a sus propiedades espectroscópicas (Woolery *et al.* 1984). *R. vernicifera* lacasa también se ha utilizado ampliamente en las investigaciones del mecanismo de reacción general de lacasas (Battistuzzi *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2003). Lacasas vegetales se encuentran en el xilema, donde presumiblemente se oxidan monolignoles en las primeras etapas de la lignificación (Gavnholt & Larsen 2002), y también participar en los mecanismos radicales de la formación de polímeros de lignina (Hoopes & Dean 2004). Además, lacasas se ha demostrado que están involucrados en los primeros pasos de la curación en las hojas heridas (DeMarco & Roubelakis-Angelakis 1997). Sin embargo, la aparición de lacasas en las plantas superiores parece ser mucho más limitado que en los hongos (Mayer & Staples 2002; Moin & Omar 2013). Sólo unas pocas lacasas bacterianas han sido descritas hasta ahora. La primera lacasa bacteriana se detectó en la raíz de la planta asociada a la bacteria "*Azospirillum lipoferum*" (Givaudan *et al.*, 1993), donde se demostró que participan en la formación de melanina (Faure *et al.*, 1994). Se descubrió una lacasa atípica que contenía seis putativos sitios de unión a cobre de *Marinomonas mediterránea*, pero no se ha asignado actividad funcional a esta enzima (Sanchez-Amat *et al.*, 2001). *Bacillus subtilis* produce una lacasa de CotA termoestable que participa en la producción de pigmentos en el endosporas capa (Martins *et al.*, 2002). Lacasas también se han encontrado de *Streptomyces cyaneus* (Arias *et al.*, 2003) y *Streptomyces lavendulae* (Suzuki *et al.*, 2003). Aunque también hay otros informes sobre la actividad de la lacasa en las bacterias, no parece probable que las lacasas son enzimas comunes de ciertos grupos procariontes (Claus, 2003). Las proteínas bacterianas como la lacasa son proteínas intracelulares o peri plasmáticas (Dalfard *et al.*, 2006). A continuación se dan las lacasas que producen bacterias de diferentes fuentes ambientales con sus posibles funciones fisiológicas de la lacasa. *B. licheniformis* es una nueva bacteria melanogénica aislada del suelo, que protege la cepa de la luz UV y los oxidantes (Koschorreck *et al.*, 2008). Está implicado en la dimerización de los ácidos fenólicos (Naclerio *et al.*, 2010). *Bacillus endosporas* que producen lacasa se aislaron del suelo y la enzima implicada en la degradación del fenol (Kiiskinen *et al.*, 2002) La actividad de la lacasa se ha demostrado en muchas especies de hongos pertenecientes a ascomicetes y basidiomicetes, y la enzima ya ha sido purificada de muchas especies. Hay numerosos registros de la producción de lacasas por ascomicetos. Entre los grupos fisiológicos de hongos, las lacasas son típicas de los basidiomicetos podridos de madera, que causan la pudrición blanca y un grupo relacionado de hongos saprotrófitos que descomponen la basura, es decir, las especies que causan la degradación de la lignina. Casi todas las especies de hongos de pudrición blanca se informaron que producen lacasa en grados variables y la enzima ha sido purificada de muchas especies (Mander *et al.*, 2006). La mayoría de las lacasas caracterizadas hasta ahora

se han derivado de hongos de pudrición blanca que son eficientes degradadores de lignina. Muchos hongos contienen varios genes que codifican la lacasa, pero sus papeles biológicos en su mayoría no son bien conocidos. *Agaricus bisporus* (Marbach *et al.*, 1984), *Botrytis cinerea* (Schneider *et al.*, 1999), *Coprinus cinereus* (Niku-Paavola *et al.*, 1988), *Phlebia radiata* (Sannia *et al.*, 1986), *Pleurotus ostreatus* (Rogalski *et al.*, 1991) y *Trametes versicolor* (Dittmer *et al.*, 2004) son basidiomicetos que producen lacasas. Recientemente, las lacasas se han representado como enzimas de modificación de la lignina. En la Tabla 2 se muestran algunas lacasas purificadas y su peso molecular.

Tabla 2. Propiedades de lacasas fúngicas purificadas.

Organismos	Numero de isoenzimas	Peso molecular	Referencias
<i>Pleurotus ostreatus</i>	1	59	Sannia <i>et al.</i> 1986
<i>Podospira anserine</i>	3	70 80 390	Thurston 1994
<i>Trametes multicolor</i>	5	63	Leither <i>et al.</i> 2002
<i>Trichodema</i>	1	71	Assavanig <i>et al.</i> 1992
<i>Coriolus hirsutus</i>	1	55	Koroljova-Skorobogat'kp <i>et al.</i> 1998
<i>Trametes trogii</i>	2	70	Garzillo <i>et al.</i> , 1998
<i>Neurospora crassa</i>	1	65	Froehner & Eriksson 1976
<i>Trametes sanguínea M85-2</i>	1	62	Nishizawa <i>et al.</i> , 1995
<i>Chalara paradoxa CH 32</i>	1	67	Robles <i>et al.</i> , 2002
<i>Ganoderma lucidum</i>	3	65-68	Ko <i>et al.</i> , 2001
<i>Monocillium indicum</i>	1	72	Thakker <i>et al.</i> , 1992
<i>Chaetomium thermophilum</i>	1	77	Chefetz <i>et al.</i> , 1998
<i>Botrytis cinerae 61-34</i>	1	74	Slomczynski <i>et al.</i> 1995
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	2	68-71	Fukushima & Kirk 1995
<i>Coriolus Hirsutus</i>	1	73	Shin & Lee 2000
<i>Polyporus versicolor</i>	2	60-65	Mosbach 1963
<i>Pycnoporus Cina; nabarinus</i>	1	81	Eggert <i>et al.</i> , 1996

Modificado (Madhavi & Lele 2009).

4. BIORREACTORES

En lo general se puede hablar de un proceso de fermentación típico el cual es esencialmente un proceso que se lleva a cabo en un recipiente llamado fermentador o en general, biorreactor es un recipiente de vidrio o acero inoxidable, en el caso del uso farmacéutico, o de material menos noble, como acero al carbono, en el caso de aplicaciones menos

exigentes en pureza (Ruíz-Leza *et al.*, 2007), mediante el cual determinados sustratos que componen el medio de cultivo y son transformados por acción microbiana en metabolitos y biomasa (Borja-Padilla *et al.*, 1991). Por lo general, el biorreactor tiene una altura 2.5 a 4 veces superior a su diámetro, y en función de la aplicación, su volumen varía entre 1-10 000 L en el caso de un producto farmacéutico, a 1500000 L, y más en el caso de la producción de microorganismos (Noyola, 1994). El diseño de un fermentador, aparte de asegurar que la operación se desempeñe en forma aséptica, debe responder a tres requisitos principales: Mezcla adecuada, buena transferencia del oxígeno del aire al microorganismo y remoción del calor (Pérez *et al.*, 2008). El microorganismo va aumentando en su concentración en el transcurso del proceso al mismo tiempo que el medio se va modificando y se forman productos nuevos como consecuencia de las actividades catabólicas y anabólicas (Ruíz-Leza *et al.*, 2007). Este último imperativo explica que, a pesar de las bajas temperaturas a que operan los procesos biológicos con respecto a la catálisis química, es necesario considerar superficies importantes de intercambio térmico dentro del fermentador para mantener la temperatura de crecimiento. Esto explica también en parte el interés que presentan los microorganismos termófilos, capaces de trabajar a temperaturas más elevadas que otros microorganismos, lo cual reduce por una parte los problemas de remoción de calor durante la fermentación y, por otra parte, los riesgos de contaminación por los microorganismos mesófilos (Noireaux *et al.*, 2004). Los fenómenos de crecimiento y formación de producto, tienen lugar durante el desarrollo del proceso simultáneamente (Rodríguez-Couto, 2011).

4.1. Tipos de biorreactores

El tanque cilíndrico, con o sin agitación, es el reactor más utilizado en bioprocesos (Astudillo, 2010). Sin embargo, existe una gran cantidad de configuraciones de fermentadores en diferentes industrias de bioprocesos (Takayama & Akita 1994). Continuamente se desarrollan nuevos biorreactores para aplicaciones específicas y nuevas formas de biocatalizadores como tejidos animales y vegetales, así como células y enzimas inmovilizadas (Rokstad *et al.*, 2003). Gran parte del reto que representa el diseño de un reactor, para la gran parte de fermentaciones que necesitan oxígeno, recae en la provisión de una mezcla y aireación adecuadas (Nuutila *et al.*, 1994). Los reactores utilizados en cultivos anaerobios, sin inyección de aire ni agitación, son generalmente de construcción más simple (Bouallagui *et al.*, 2005).

4.1.2. Biorreactor tanque agitado

Estanques aireados agitados, son los más tradicionales y tuvieron un gran desarrollo durante los años 50 y se usan para la producción de antibióticos como la penicilina a escala industrial (Astudillo, 2010). El fermentador agitado consiste en un cilindro vertical que posee varios deflectores para prevenir la formación de un torbellino durante la agitación, en la Figura 3 se muestra un típico biorreactor agitado (Reuss, 1994). La mezcla y dispersión de las burbujas se alcanza mediante agitación mecánica, lo cual requiere una relativa gran cantidad de energía por unidad de volumen, donde el aire estéril penetra por la base del reservorio, a través de un distribuidor circular (Betts *et al.*, 2006). El eje vertical lleva una o varias hélices en función de la relación altura/diámetro. Las hélices se utilizan para reducir

la formación de vórtices. A pesar de que este modelo de fermentador no es el más económico de instalar ni de operar, en los fermentadores altos se instalan varios rodetes para mejorar la mezcla, existe una amplia variedad de formas y tamaños diferentes de rodetes que producen diferentes tipos de flujo dentro del recipiente (Astudillo, 2010). Generalmente, sólo el 70-80% del volumen de los reactores agitados se llena con líquido, lo que permite que exista un espacio en la parte superior para retirar las gotas que arrastra el gas de salida y para dar cabida a cualquier espuma que se forme (Ahamed & Vermette 2008). Si la formación de espuma es un problema, se puede instalar otro rodete denominado separador de espuma. Otra posibilidad consiste en añadir agentes antiespumantes dentro del caldo de cultivo, aunque éstos pueden reducir la transferencia de oxígeno, y tener afectaciones en la obtención de los metabolitos de interés o directamente al producto final, por lo que se suele preferir la opción de dispersión mecánica de la espuma (Marcos *et al.*, 2004). De lo que cabe resaltar aún sigue siendo uno de los más utilizados (Reuss, 1994). La razón de su éxito reside en su gran versatilidad para ser usado a cualquier escala de producción y para un gran número de procesos sin modificaciones del diseño. Por lo tanto, los costos relativamente elevados de inversión y operación se encuentran compensados por su flexibilidad (Rafiq *et al.*, 20013).

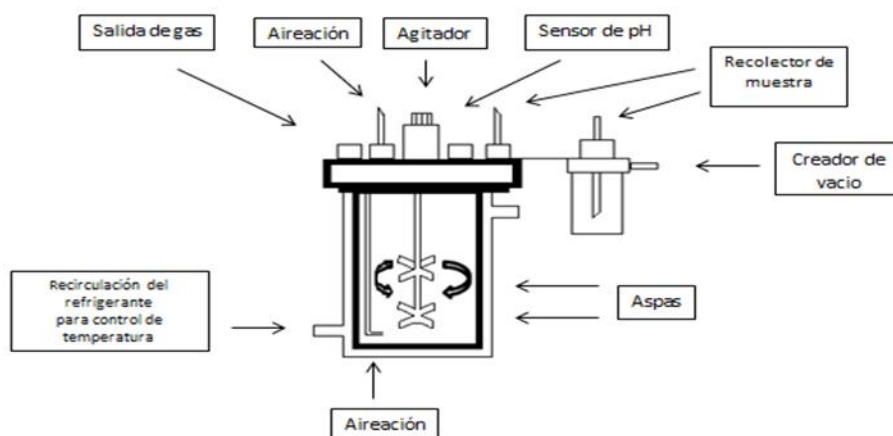


Fig. 3. Partes de un biorreactor de tanque agitado.

4.1.2. Biorreactor airlift

Los reactores de tiro de aire (Air-lift) (Figura 4), se trata de un reactor en forma de torre o columna, en el cual el aire es introducido en la base del tubo, y la ascensión de las burbujas de aire constituye el único tipo de agitación existente (Familletti, 1987). Se utilizan a menudo para cultivos de células animales y vegetales, y catalizadores inmovilizados porque los niveles de metabolitos son bastante inferiores que en los reactores agitados (Lee & Shuler 2000). El rasgo característico que da la diferencia de los de columna de burbujas es

que las corrientes de flujo de líquido están más definidas debido a la separación física de las corrientes ascendentes y descendentes, el gas es inyectado únicamente en una parte de la sección del reactor denominado (tubo de subida o recirculado) (Young *et al.*, 1991). El gas existente en el reactor y la disminución de densidad producen un movimiento ascendente del líquido en el tubo de subida. El gas se retira del líquido en la parte superior del reactor dejando el líquido más pesado libre de las burbujas y se recircula a través del reactor puente de aire (Jin-A *et al.*, 2009). El líquido circula en los reactores de tiro de aire como resultado de la diferencia de densidad entre el tubo de subida (Jin-A *et al.*, 2009). Los reactores de puente aire proporcionan generalmente mejores mezclas que los de columna de burbujas excepto cuando se opera a velocidades bajas de líquido (Kahar *et al.*, 2002). Se ha comprobado que tanto el contenido de gas en el tubo como las velocidades de transferencia de materia gas-líquido son similares en los reactores de columna de burbujas (Mirón *et al.*, 2002). Sin embargo, en los reactores de bucle externo, la casi completa retirada del gas aumenta la velocidad del líquido y disminuye el contenido de gas en el tubo, por lo que las velocidades de transferencia de materia, a igual velocidad, son menores que en los reactores de columna de burbujas (Mirón *et al.*, 2002). El rendimiento de los reactores de puente de aire está fuertemente influenciado por los detalles de construcción del recipiente (Freitas *et al.* 2000). Por ejemplo, en los reactores airlift de bucle interno, la variación de la distancia entre la parte inferior del tubo de tiro de chimenea y la base del reactor modifica la diferencia de presión en esta región y afecta a la velocidad del líquido y al contenido de gas existente en el tubo de tiro (Rao *et al.*, 1997). La profundidad a la que se coloca el tubo de tiro desde la parte superior del líquido afecta también a las características de la mezcla y a la transferencia de materia (Chao *et al.*, 1997). Estos fermentadores son utilizados en la producción de cerveza, vinagre y ácido cítrico (Brányik *et al.*, 2005).

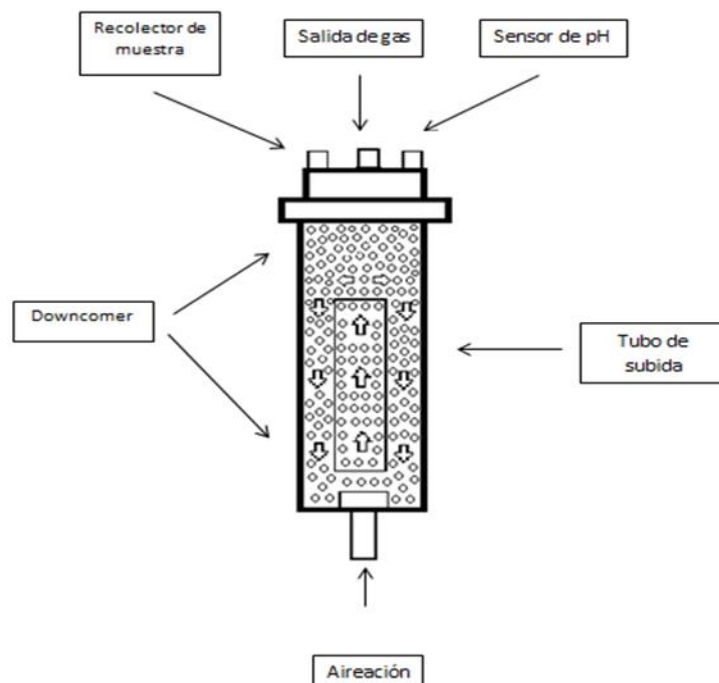


Fig. 4. Partes de un biorreactor airlift.

4.1.3. COLUMNA DE BURBUJAS

Las columnas de burbujas son de estructura muy sencilla. Como se muestra en la Figura 5 consiste generalmente en un recipiente cilíndrico con alturas superiores al doble del diámetro (Schügerl *et al.*, 1997). Aparte del difusor para la inyección del aire comprimido, los reactores de columna de burbujas no presentan estructuras internas (Schügerl *et al.*, 1997). En la producción de levadura es normal utilizar una relación altura-diámetro de 3:1, mientras que en otras aplicaciones pueden utilizarse torres con relaciones de 6:1 (Branco *et al.*, 2006). Algunas veces, en los reactores de columna muy altos se instalan placas horizontales perforadas para evitar la coalescencia de las burbujas y lograr una mejor redistribución del aire (Font *et al.*, 1997). Las ventajas de los reactores de columna de burbujas incluyen los bajos costos de capital, la ausencia de partes móviles y un adecuado rendimiento de la transferencia de materia y de la transmisión de calor (Lübbert, 2000) Al igual que en los reactores agitados, la formación de espuma puede ser un problema que necesite una dispersión mecánica o la adición de agentes antiespumantes al medio (Marcos *et al.*, 2004). Este tipo de fermentadores ha producido un interés creciente por la reducción en los costos de producción. Sin embargo, no se conocen bien aún los problemas en la síntesis de un producto que pueden derivar de las fluctuaciones ambientales a las que es sometido un microorganismo en este tipo de fermentadores por la falta de agitación. Por lo tanto, el desarrollo de la investigación en este sentido es indispensable. La circulación de

líquido arrastra a las burbujas y produce cierta retro mezcla del gas (Deckwer, 1992). La transferencia de materia gas-líquido en reactores depende fuertemente del diámetro de la burbuja y de la cantidad de gas existente en la columna (Deckwer, 1992). Sin embargo, como en los reactores de columna de burbujas es imposible predecir con exactitud los tamaños de las burbujas y las corrientes de circulación de líquido es difícil calcular con exactitud el coeficiente de transferencia de materia (Martínez-Salgado *et al.*, 2005).

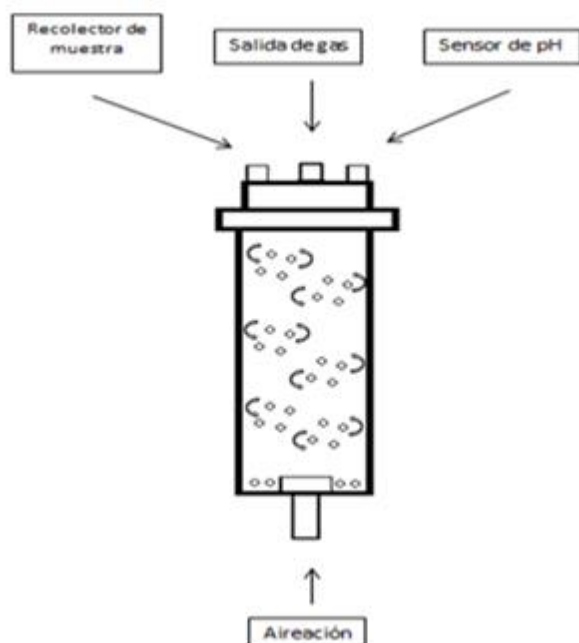


Fig. 5. Partes de un biorreactor de columna de burbuja.

4.2. PRODUCCIÓN DE LACASAS EN BIORREACTOR AIRLIFT

El estudio de las enzimas lacasas con hongos basidiomicetos se han reportado diversos resultados en cuanto con los resultados que se obtuvieron en el estudio del hongo *Trametes versicolor* a diferentes pH se obtuvieron diferentes resultados en los cuales el pH más óptimo fue de 3 en el cual se obtuvo 32.000 U/L, de enzima lacasas (Souza *et al.*, 2010). Otro estudio se evaluó la actividad enzimática que se obtuvo en el reactor airlift en amilasa con una actividad en ambos *Pleurotus pulmonarius* y *Pycnoporus cinnabarinus* alcanzaron aproximadamente 2500 U/L a 200 h de la fermentación (Díaz-Godínez *et al.*, 2016). En el estudio de la actividad de la lacasa del hongo *Trametes hirsuta* utilizando un biorreactor de columna de aire la lacasa donde su actividad máxima se obtuvo al día 24 con actividad hasta el máximo de 19 394 U/I (Rodríguez-Couto *et al.*, 2006). También en el estudio de la producción de lacasa por *Trametes versicolor* en un fermentador de puente aéreo se obtuvo el valor más alto en producción de lacasas donde las actividades se obtuvieron en presencia de 1 mM 2,5 Xilidina, alcanzando actividades de aproximadamente 1500 U/I (Rancano *et al.*, 2003).

5. CONCLUSIÓN

El proceso fermentativo consiste en crecer a un microorganismo en un medio de cultivo que contiene nutrientes, en un ambiente óptimo (fermentador), donde se establecen condiciones experimentales adecuadas (pH, temperatura, agitación, etc.) para obtener finalmente el producto deseado, ya sea biomasa o algún metabolito. En ese sentido, dentro de la biotecnología, los biorreactores han sido muy importantes en el estudio y producción de enzimas. El uso de biorreactores es una alternativa potencial para producir lacasas de hongos basidiomicetos.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Agrios G. N. 2005 *Plant Pathology*, Elsevier Academic Press, EE. UU. 922 pp.
- Ahamed A. & Vermette P. 2008. Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*. 42(1), 41-46.
- Alexopoulos C. J., Mims C. W. & Blackwell M. 1996. *Introductory mycology* In: 4th John Wiley and Sons.
- Andrade Gallegos R. H. & Mata G. S. 2012. La producción iberoamericana de hongos comestibles en el contexto internacional. 9-16.
- Aqueveque P., Becerra J., Palfner G., Silva M., Alarcon J., Anke T. & Sterner O. 2006. Antimicrobial activity of metabolites from mycelial cultures of Chilean basidiomycetes. *Journal of the Chilean Chemical Society*. 51(4), 1057-1060.
- Arias M. E., Arenas M., Rodríguez J., Soliveri J., Ball A. S. & Hernández M. 2003. Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(4), 1953-1958.
- Aro N., Pakula T. & Penttilä M. 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS. Microbiology reviews*. 29(4), 719-739.
- Astudillo I. C. P. 2010. Diseño integral de biorreactores continuos de tanque agitado aplicados a procesos de fermentación.
- Baldrian P. 2006. Fungal laccases occurrence and properties. *FEMS Microbiology reviews*. 30(2), 215-242.
- Battistuzzi G., Di-Rocco G., Leonardi A. & Sola M. 2003. ¹H NMR of native and azide-inhibited laccase from *Rhus vernicifera*. *Journal of inorganic biochemistry*. 96(4), 503-506.

Beaudette L. A., Ward O. P., Pickard M. A. & Fedorak P. M. 2000. Low surfactant concentration increases fungal mineralization of a *polychlorinated biphenyl* congener but has no effect on overall metabolism. *Letters in applied microbiology*. 30(2), 155-160.

Bertrand G. 1985. Sur la laccase et sur le pouvoir oxydant de cette diastase. *CR Acad. Sci. (Paris)*, 120, 266.

Betts J. I., Doig S. D. & Baganz F. 2006. Characterization and Application of a Miniature 10 mL Stirred-Tank Bioreactor, *Showing Scale-Down* Equivalence with a Conventional 7 L Reactor. *Biotechnology Progress*. 22(3), 681-688.

Borja-Padilla R., Martín Martín A. & Fiestas de Ursinos J. A. 1991. Influencia de la concentración de sustrato sobre la cinética del proceso de biometanización del *alpechín*, en biorreactores de lecho fluidizado con microorganismos inmovilizados. *Grasas y aceites*.

Bouallagui H., Touhami Y., Cheikh R. B. & Hamdi M. 2005. Bioreactor performance in anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes. *Process Biochemistry*. 40(3), 989-995.

Branco R. F., Santos J. C., Murakami L. Y., Mussatto S. I., Dragone, G. & Silva S. S. 2006. Influencia de la aireación y concentración de sistema inmovilizado en la producción de xilitol a partir de bagazo de caña de azúcar en biorreactor de columna de burbuja. In: *Memorias del XIII Congreso Interamericano de Ingeniería Química, Argentina*.

Brányik T., Vicente A. A., Dostálek P. & Teixeira J. A. 2005. Continuous beer fermentation using immobilized yeast cell bioreactor systems. *Biotechnology Progress*. 21(3), 653-663.

Chao Y., Ishida T., Sugano, Y. & Shoda M. 2000. Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* in a 50-l internal-loop airlift reactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 68(3), 345-352.

Claus H. 2003. Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives of Microbiology*. 179(3), 145-150.

Collins P. J. & Dobson A. 1997. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(9), 3444-3450.

Dalfard A. B., Khajeh K., Soudi M. R., Naderi-Manesh H., Ranjbar B. & Sajedi R. H. 2006. Isolation and biochemical characterization of laccase and tyrosinase activities in a novel melanogenic soil bacterium. *Enzyme and Microbial Technology*. 39(7), 1409-1416.4

De-Boer W., Folman L. B., Summerbell R. C. & Boddy L. 2005. Living in a fungal world impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology reviews*. 29(4), 795-811.

Marco A. & Roubelakis-Angelakis K. A. 1997. Laccase activity could contribute to cell-wall reconstitution in regenerating protoplasts. *Phytochemistry*. 46(3), 421-425.

Díaz-Godínez G., Téllez-Téllez M., Rodríguez A., Obregón-Barbosa V., de Lourdes Acosta-Urdapilleta, M. & Villegas E. (2016). Enzymatic, Antioxidant, Antimicrobial, and Insecticidal Activities of *Pleurotus pulmonarius* and *Pycnoporus cinnabarinus* Grown Separately in an Airlift Reactor. *BioResources*. 11(2), 4186-4200.

Dittmer U., He H., Messer R. J., Schimmer S., Olbrich A. R., Ohlen C. & Evans L. H. 2004. Functional impairment of CD8+ T cells by regulatory T cells during persistent retroviral infection. *Immunity*. 20(3), 293-303.

Dong Y. H., Wang L. H., Xu J. L., Zhang H. B., Zhang X. F. & Zhang L. H. 2001. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature*. 411(6839), 813-817.

Faraz Moin S. & Nor-Bin Omar M. 2014. Laccase enzymes: purification, structure to catalysis and tailoring. *Protein and peptide letters* 21(8), 707-713.

Faure D., Bouillant M. L. & Bally R. 1994. Isolation of *Azospirillum lipoferum* 4T Tn5 mutants affected in melanization and laccase activity. *Applied and environmental microbiology*. 60(9), 3413-3415.

Givaudan A., Effosse A., Faure D., Potier P., Bouillant M. L. & Bally R. 1993. Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: evidence for laccase activity in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiology Letters*. 108(2), 205-210.

Goodenough U. & Heitman J. 2014. Origins of eukaryotic sexual reproduction. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 6(3), a016154.

Hawksworth D. L. & Kalin-Arroyo M. T. 1995. Magnitude and distribution of biodiversity. *Global biodiversity assessment*. 107-199.

Herrera T. & Ulloa M. 1990. El reino de los Hongos. *Micología básica y aplicada*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Hoopes J. T. & Dean J. F. 2004. Ferroxidase activity in a laccase-like multicopper oxidase from *Liriodendron tulipifera*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42(1), 27-33.

Ick-Dong Y., Soo-Muk, C., Byeung-Wook P., Jae-Kuk Y., Nam-Doo H., Hwan-Mook K. & Chang-Woo L. 2005. Nuevo polisacárido inmunoestimulante procedente de la cepa de la especie *Phellinus*, y su uso. Patente 2241219.

Inglis G. D. & Kawchuk L. M. 2002. Comparative degradation of ascomycete, and basidiomycete cell walls by mycoparasitic and biocontrol fungi. *Canadian Journal of Microbiology* 48(1), 60-70.

Iwata F., Sumiya Y. & Sasaki A. 2004. Nanometer-scale metal plating using a scanning shear-force microscope with an electrolyte-filled micropipette probe. *Japanese journal of applied physics*. 43(7S), 4482.

Jensen E. A. & Salisbury F. B. 1988. In: 1th Botánica. México.

Johnson D. L., Thompson J. L., Brinkmann S. M., Schuller K. A. & Martin L. L. 2003. Electrochemical characterization of purified *Rhus vernicifera* laccase: voltammetric evidence for a sequential four-electron transfer. *Biochemistry*. 42(34), 10229-10237.

Kahar P., Kobayashi K., Iwata T., Hiraki J., Kojima M. & Okabe M. 2002. Production of ϵ -polylysine in an airlift bioreactor (ABR). *Journal of bioscience and bioengineering*. 93(3), 274-280.

Kiiskinen L. L., Kruus K., Bailey M., Ylösmäki E., Siika-aho M. & Saloheimo M. 2004. Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme. *Microbiology*. 150(9), 3065-3074.

Kobold A. M., Tulleken J. E., Zijlstra J. G., Sluiter W., Hermans J., Kallenberg C. G. M. & Tervaert J. C. 2000. Leukocyte activation in sepsis, correlations with disease state and mortality. *Intensive care medicine*. 26(7), 883-892.

Koschorreck K., Richter S. M., Ene A. B., Roduner E., Schmid R. D. & Urlacher V. B. 2008. Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 79(2), 217-224.

Lee C. W. & Shuler M. L. 2000. The effect of inoculum density and conditioned medium on the production of ajmalicine and catharanthine from immobilized *Catharanthus roseus* cells. *Biotechnology and bioengineering*. 67(1), 61-71.

Lindorf H., Parisca L. & Rodríguez P. 1991. Botánica. In: 2th Ediciones de la Biblioteca. UCV. Venezuela.

Loyola J. F. L. 2005. Química y síntesis de los principios activos aislados de hongos superiores: sus posibles aplicaciones farmacológicas. Tesis Doctoral. Universidad de La Laguna.

Madhavi V. & Lele S. S. 2009. Laccase: properties and applications. *BioResources*. 4(4), 1694-1717.

Mander G. J., Wang H., Bodie E., Wagner J., Vienken K., Vinuesa C. & Janssen G. G. 2006. Use of laccase as a novel, versatile reporter system in filamentous fungi. *Applied and environmental microbiology*. 72(7), 5020-5026.

Marbach I., Harel E. & Mayer A. M. 1984. Molecular properties of extracellular *Botrytis cinerea* laccase. *Phytochemistry*. 23(12), 2713-2717.

Marcos N. I., Guay M., Dochain D. & Zhang T. 2004. Adaptive extremum-seeking control of a continuous stirred tank bioreactor with Haldane's Kinetics. *Journal of Process Control*. 14(3), 317-328.

Martins L. O., Soares C. M., Pereira M. M., Teixeira M., Costa T., Jones G. H. & Henriques A. O. 2002. Molecular and Biochemical Characterization of a Highly Stable Bacterial Laccase That Occurs as a Structural Component of the *Bacillus subtilis* Endospore Coat. *Journal of Biological Chemistry*. 277(21), 18849-18859.

Mayer A. M. & Staples R. C. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*. 60(6), 551-565.

Minussi R. C., Pastore G. M. & Durán N. 2007. Laccase induction in fungi and laccase/NOH mediator systems applied in paper mill effluent. *Bioresource Technology*. 98(1), 158-164.

Mirón A. S., Garcia M. C. C., Camacho F. G., Grima E. M. & Chisti Y. 2002. Growth and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*. 31(7), 1015-1023.

Moore-Landecker J. 1996. *Zoosporic fungi. Fundamentals of the fungi. In: 4th Prentice Hall, Totowa, NJ, 33-81.*

Mueller T. G., Pusuluri N. B., Mathias K. K., Cornelius P. L., Barnhisel R. I. & Shearer S. A. 2004. Map quality for ordinary kriging and inverse distance weighted interpolation. *Soil Science Society of America Journal*. 68(6), 2042-2047.

Niku-Paavola M. L., Karhunen E., Salola P. & Raunio V. 1988. Ligninolytic enzymes of the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *Biochemical Journal*. 254(3), 877-884.

Noireaux V. & Libchaber A. 2004. A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. 101(51), 17669-17674.

Noyola A. 1994. Escalado de biorreactores anaeróbicos. In: Conferencia. Instituto de Ingeniería. UNAM. (p. 20).

Nuutila A. M., Toivonen L. & Kauppinen V. 1994. Bioreactor studies on hairy root cultures of *Catharanthus roseus*: comparison of three bioreactor types. *Biotechnology techniques*. 8(1), 61-66.

Ortiz M. L. 2009. Aproximaciones a la comprensión de la degradación de la lignina. *Orinoquia*. 13(2), 137-144.

Pérez N. M., Restrepo D. C., García J. D. & Giraldo D. R. 2008. Tuberización in vitro de papa (*Solanum tuberosum* L), variedad *Diacol Capiro*, en biorreactores de inmersión temporal y evaluación de su comportamiento en campo. *Ciencia*. 16(3).

Pérez-Moreno J. 2012. Los hongos comestibles ectomicorrícicos y su biotecnología. Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica: Investigación y desarrollo en un entorno multicultural. 19-28.

Quintero D., Juan C., Feijoo C., Lema R. & Juan M. 2006. Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. *Vitae Medellín*. 13(2), 61-67.

Rafiq Q. A., Brosnan K. M., Coopman K., Nienow A. W. & Hewitt C. J. 2013. Culture of human mesenchymal stem cells on microcarriers in a 5 l stirred-tank bioreactor. *Biotechnology letters*. 35(8), 1233-1245.

Rancano G., Lorenzo M., Molares N., Couto S. R. & Sanromán M. Á. 2003. Production of laccase by *Trametes versicolor* in an airlift fermentor. *Process Biochemistry*. 39(4), 467-473.

Ranocha P., McDougall G., Hawkins S., Sterjiades R., Borderies G., Stewart D. & Goffner, D. 1999. Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases—a divergent gene family—in poplar. *European Journal of Biochemistry*. 259(1-2), 485-495.

Rao T. R., Sonolikar R. L. & Saheb S. P. 1997. Influence of magnetic field on the performance of bubble columns and airlift bioreactor with submersed microorganisms. *Chemical engineering science*. 52(21), 4155-4160.

Rayners A. D. M. & Buddy L. 1988. Fungal communities in the decay of wood. *Advances. Microbiology. Ecol.* 10, 115-166.

Reuss M. 1994. Stirred tank bioreactors. In *Bioreactor System Design*. Marcel Dekker New York, USA.

Riva S. 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *TRENDS in Biotechnology*. 24(5), 219-226.

Robles-Hernández L., Gonzales-Franco A. C., Crawford D. L. & Chun W. W. 2008. Review of environmental organopollutants degradation by white-rot basidiomycete mushrooms. *Tecnociencia Chihuahua*. 2(1), 32-39.

Rodríguez-Couto S. 2011. Production of laccase and decolouration of the textile dye Remazol Brilliant Blue R in temporary immersion bioreactors. *Journal of hazardous materials*. 194, 297-302.

- Rodriguez-Couto S., Rodríguez A., Paterson R. R. M., Lima N. & Teixeira J. A. 2006. Laccase activity from the fungus *Trametes hirsuta* using an air-lift bioreactor. *Letters in applied microbiology*. 42(6), 612-616.
- Rogalski J. E. R. Z. Y., Lundell, T., Leonowicz A. N. D. R. Z. E. J. & Hatakka A. 1991. Production of laccase, lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase by various strains of *Trametes versicolor* depending on culture conditions.
- Rokstad A. M., Strand B., Rian K., Steinkjer B., Kulseng B., Skjak-Bræk G. & Espevik T. 2003. Evaluation of different types of alginate microcapsules as bioreactors for producing endostatin. *Cell transplantation*. 12(4), 351-364.
- Ruíz-Leza H. A., Rodríguez-Jasso R. M., Rodríguez-Herrera R., Contreras-Esquível J. C. & Aguilar C. N. 2007. Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido bio-reactors desing for solid state fermentation. *Revista mexicana de ingeniería química*. 6(1), 33-40.
- Sanchez-Amat P. Lucas-El'io E., Fernandez J. C. Garc'ia- Borr'on & F. Solano. 2001 Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *Biochimica et Biophysica*. 1547, no. 1, pp. 104-116.
- Sannia G., Giardina P., Luna M., Rossi M. & Buonocore V. 1986. Laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnology Letters*. 8(11), 797-800.
- Scherer M. & Fischer R. 1998. Purification and characterization of laccase II of *Aspergillus nidulans*. *Archives of microbiology*. 170(2), 78-84.
- Schneider N., Venzke S., Miller A. J., Pierce D. W., Barnett T. P., Deser C. & Latif M. 1999. Pacific thermocline bridge revisited. *Geophysical Research Letters*. 26(9), 1329-1332.
- Schügerl K., Lücke J. & Oels U. 1977. Bubble column bioreactors. *Advances in Biochemical Engineering*. 7(pp. 1-84). Springer Berlin Heidelberg.
- Smânia A., Marques C. J. S., Smânia E. F. A., Zanetti C. R., Carobrez S. G., Tramonte R. & Loguercio-Leite C. 2003. Toxicity and antiviral activity of cinnabarin obtained from *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *Phytotherapy Research*. 17(9), 1069-1072.
- Souza J. V., Silva É. S., Cavallazzi J. R. & Sobrinho A. D. 2010. Formulation of a liquid medium with wheat bran for the production of laccase by *Trametes versicolor* in an air-lift bioreactor. *Journal of Food Agriculture and Environment*. 8, 394-396.
- Suzuki T., Endo K., Ito M., Tsujibo H., Miyamoto K. & Inamori Y. 2003. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 67(10), 2167-2175.

Takayama S. & Akita M. 1994. The types of bioreactors used for shoots and embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 39(2), 147-156.

Taylor P.D., Fahrig L. Henein., K. & MerriamG. 1993. Connectivity is a vital element of landscape structure. *Oikos*. 68(3): 571-572.

Tuomela M., Vikman M., Hatakka A. & Itävaara M. 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology*. 72(2), 169-183.

Wariishi H., Valli K. & Gold M. H. 1992. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. *Journal of Biological Chemistry*. 267(33), 23688-23695.

Wood D. A. 1980. Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*. *Microbiology*. 117(2), 327-338.

Woolery G. L., Powers L., Peisach J. & Spiro T. G. 1984. X-ray absorption study of Rhus laccase: evidence for a copper-copper interaction, which disappears on type 2 copper removal. *Biochemistry*, 23(15), 3428-3434.

Young M. A., Carbonell R. G. & Ollis D. F. 1991. Airlift bioreactors: Analysis of local two-phase hydrodynamics. *AIChE journal*. 37(3), 403-428.