

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**



**“CARACTERIZACIÓN DE LACASAS PRODUCIDAS POR  
UN HONGO TERMOFÍLICO SILVESTRE AISLADO A  
PARTIR DE DESECHOS LIGNOCELULÓSICOS”**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
“MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA”  
P R E S E N T A:  
**I. B Q. E M I L I O M E D I N A R I V E R O**

**DIRECTOR: DR. GUSTAVO VINIEGRA GONZÁLEZ (UAM-I)**  
**ASESORES: DR. OCTAVIO LOERA CORRAL (UAM-I)**  
**DRA. SARA ELENA SOLÍS PEREIRA (ITM)**

MÉXICO, D.F.

Julio de 2003

## Resumen

Los hongos termofílicos en la actualidad son de gran importancia debido a que por lo general producen enzimas con propiedades interesantes como son la termoestabilidad y la resistencia a disolventes orgánicos. Estas enzimas tienen un gran potencial biotecnológico. Por ejemplo: en las industrias del papel para el bioblanqueo de la pulpa, que se lleva a cabo a altas temperaturas, y en la síntesis orgánica industrial que se lleva a cabo en sistemas de reacción no acuosos. Por tal motivo, en este trabajo se aisló una cepa de hongo termofílico ligninolítico (cepa EUM1) en el trópico mexicano. De esta cepa se obtuvieron lacasas a partir de un medio de cereal Bran Flakes al 3 % a 40°C. En este medio se obtuvieron 650 U/L de lacasas, que representó 35 veces más actividad cuando se comparó con el medio de extracto de malta al 2 %. Posteriormente, las lacasas del extracto se purificaron parcialmente con sulfato de amonio, intercambio aniónico (Q sepharosa), ultrafiltración y filtración en gel (10 a 200 KDa), para obtener un grado de purificación de 19.8 veces. El zimograma del extracto purificado reveló que se trataba de dos isoenzimas, con características moleculares muy parecidas, con un  $pI_{ap}$  de aproximadamente 4, peso molecular aparente de 77.37 KDa estimado por electroforesis con SDS. Las condiciones óptimas de actividad catalítica fueron pH 4 y temperatura de 60°C. Lo relevante de la caracterización fue que las dos isoenzimas fueron estables durante una hora en un amplio rango de pH entre 4-10 y a la temperatura de 50 y 60°C, conservando aproximadamente el 100 % de su actividad. Se determinaron las constantes cinéticas aparentes, debido a que esta preparación contenía ambas isoformas. De manera que su  $k_{catap}$  con ABTS como sustrato fue de 3402  $\text{min}^{-1}$ , 8 veces mayor comparada con la lacasa recombinante producida industrialmente por Novo Nordisk a partir de *Aspergillus oryzae*. Esta preparación conservó durante 5 minutos el 80 y 65 % de su actividad con 20 % de etanol y acetonitrilo, respectivamente. Y mantuvo el 52 y 30 % de actividad en etanol y acetonitrilo al 10 % durante una hora. Estos resultados abren la posibilidad de probar

las isoenzimas lacasas (lacasa 2) con sustratos de interés industrial solubles en medios semiacuosos y en procesos que se realicen a temperaturas elevadas.

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
Resumen.....	i
Contenido.....	iii
Lista de Tablas.....	v
Lista de figuras.....	vi
1. Introducción.....	1
2. Marco teórico.....	3
2.1. Lacasas.....	3
2.2. Estructura de lacasas.....	3
2.3. Mecanismo de reacción de lacasas.....	4
2.4. Sustratos de lacasas.....	4
2.5. Aplicaciones de lacasas en la industria.....	5
2.6. Microorganismos termofilicos y su importancia.....	6
2.7. Enzimas termoestables.....	8
2.8. Efecto de la temperatura sobre las velocidades de reacción.....	8
2.9. Biocatálisis en medios no acuosos.....	9
2.10. Purificación.....	9
2.11. Importancia de la caracterización cinética de las enzimas.....	13
2.12. Expresión de diferentes genes de lacasas.....	14
3. Antecedentes.....	15
4. Justificación, hipótesis y objetivos.....	17
4.1. Justificación.....	17
4.2. Hipótesis.....	17
4.3. Objetivo general.....	17
4.3.1. Objetivos particulares.....	18
5. Materiales y métodos.....	19
5.1. Aislamiento.....	19
5.2. Inóculo para el medio de producción de lacasas.....	19
5.3. Producción y obtención del extracto crudo de lacasas.....	20
5.4. Actividad de lacasa.....	20
5.5. Determinación de proteína por el método de Bradford.....	21
5.6. Precipitación con sulfato de amonio.....	21
5.7. Cromatografía de intercambio aniónico.....	22
5.8. Cromatografía de filtración en gel.....	23
5.8.1. Curva estándar de peso molecular en condiciones nativas.....	23
5.8.2. Determinación del peso molecular aparente de la lacasa 2.....	24
5.9. Isoelectroenfoque.....	25
5.10. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.....	25
5.10.1. Soluciones para preparar los geles.....	26
5.10.2. Preparación del gel y de las muestras.....	28
5.10.3. Condiciones de corrida.....	29
5.10.4. Revelado de las bandas de proteína en el gel.....	30
5.11. Zimogramas.....	31
5.12. Caracterización de la enzima lacasa 2.....	32
5.13. Efecto del pH sobre la actividad de lacasa.....	32

	<b>Página</b>
5.14. Estabilidad del pH.....	32
5.15. Efecto de la temperatura sobre la actividad de lacasa.....	33
5.16. Estabilidad a la temperatura.....	33
5.17. Efecto de disolventes sobre la actividad de lacasa.....	33
5.18. Estabilidad a los disolventes.....	34
5.19. Parámetros cinéticos.....	34
6. Resultados.....	36
6.1. Aislamiento y selección de macromicetos productores de lacasas.....	36
6.2. Producción de lacasas.....	37
6.3. Precipitación con sulfato de amonio.....	37
6.4. Cromatografía de intercambio aniónico.....	39
6.5. Cromatografía por filtración en gel.....	41
6.6. Isoelectroenfoque.....	42
6.7. Resumen de la purificación parcial de la lacasa 2 producida por el hongo silvestre EUM1.....	43
6.8. Determinación de pH óptimo y estabilidad de la actividad de lacasa al pH.....	44
6.9. Determinación de la temperatura óptima y estabilidad de la actividad de lacasa a la temperatura.....	46
6.10. Cálculo de la Energía de activación.....	47
6.11. Determinación de los parámetros cinéticos.....	49
6.12. Efecto de disolventes sobre la actividad de la lacasa.....	53
7. Discusión.....	56
8. Resumen de resultados.....	60
9. Conclusión.....	62
10. Referencias.....	63
Anexo 1.....	69
Anexo 2.....	70
Anexo 3.....	71

## Lista de Tablas

	<b>Página</b>
Tabla 1. Usos de lacasas en la industria.....	6
Tabla 2. Soluciones requeridas para preparar el gel de separación, con 12% de acrilamida.....	29
Tabla 3. Soluciones requeridas para preparar el gel de apilamiento, con 5% de acrilamida.....	29
Tabla 4. Etapas de purificación de la lacasa 2 producida por el hongo silvestre EUM1.....	44
Tabla 5. Comparación de constantes cinéticas de la lacasa producida por el hongo EUM1 contra la lacasa de Novo a 40°C.....	49
Tabla 6. Parámetros cinéticos aparentes de las lacasas parcialmente purificadas a diferentes temperaturas, con ABTS como sustrato.....	50
Tabla 7. Parámetros cinéticos aparentes de las lacasas parcialmente purificadas a diferentes temperaturas, con 2,6-DMP como sustrato.....	50
Tabla 8. Estabilidad a los disolventes de la lacasas parcialmente purificadas.....	54

<b>Lista de Figuras</b>	<b>Página</b>
Figura 1. Hongo termofílico silvestre MA2M2 aislado a partir de madera.....	16
Figura 2. Hongo EUM1 en medios de extracto de malta al 2 %. Incubado a 40°C durante 4 días. ....	36
Figura 3. Producción de lacasas por el hongo EUM1 en medio de bran flakes	38
Figura 4. Porcentajes de actividad de lacasa de los precipitados a diferentes concentraciones de saturación de sulfato de amonio.....	39
Figura 5. Perfil de separación de proteína y de las enzimas lacasa 1 y lacasa 2 producidas por el hongo EUM1, en cromatografía de intercambio aniónico, después de precipitar con sulfato de amonio.....	41
Figura 6. Perfil de separación de proteína y actividad de la enzima lacasa producida por el hongo EUM1.....	42
Figura 7. Zimograma de las lacasas parcialmente purificadas, con ABTS como sustrato. ....	43
Figura 8. Gel de proteína revelado con plata, de las etapas de purificación.....	44
Figura 9. Efecto del pH de las lacasas parcialmente purificadas producidas por el hongo silvestre EUM1.....	45
Figura 10. Efecto de la temperatura de las lacasas parcialmente purificadas producidas por el hongo silvestre EUM1.....	47
Figura 11. Gráfico de Arrhenius.....	48
Figura 12. Cinéticas de Michaelis-Menten con ABTS como sustrato.....	51
Figura 13. Cinética de Michaelis-Menten con 2,6-DMP como.....	52
Figura 14. Actividad de lacasas del hongo EUM1 con diferentes concentraciones de etanol y acetonitrilo.....	53
Figura. 15. Zimograma de actividad con ABTS como sustrato.....	55

## 1. Introducción

Las lacasas (E.C. 1.10.3.2, *p*-difenol: dioxígeno oxidoreductasa) son parte de un grupo de proteínas llamado enzimas multicobre, el cual incluye otras proteínas como la ácido ascórbico oxidasa y las ceruloplásmicas. La lacasa se encontró por primera vez en los exudados del árbol japonés *Rhus vernicifera* por Yoshida en 1883, y posteriormente fue caracterizada como una oxidasa que contiene metal (Mayer y Staples, 2002). Las lacasas son producidas principalmente por plantas y hongos (Mayer y Staples, 2002), aunque se han encontrado en la bacteria *Azospirillum lipoferum* (Giuvaudan *et al.* 1993), y en insectos. Sin embargo, en estudios que se le han hecho al mosquito *Anopheles* no se ha logrado identificar si se trata de una lacasa o de otra fenoloxidasa (Sidjanski *et al.* 1997).

Las lacasas catalizan la oxidación de compuestos fenólicos la cual es acompañada por la reducción de oxígeno para producir agua. Los grupos fenólicos son oxidados por la remoción de un electrón, generando un radical libre, el cual podría ser oxidado de nuevo o experimentar una polimerización. El rango de sustratos que pueden ser oxidados es amplio y varía entre una lacasa y otra. (Maheshwari *et al.* 2000).

Las enzimas: lacasa, manganeso peroxidasa, lignina peroxidasa y oxidasas que generan peróxido, componen el sistema enzimático que degrada la lignina (Heinzkill *et al.* 1998). Estas enzimas son producidas por hongos ligninolíticos y estos pueden distinguirse tres grupos bien diferenciados: hongos de pudrición blanda, pudrición oscura o café y pudrición blanca (Buswell y Odier, 1987). La lacasa oxida una gran variedad de sustratos (Thurston, 1994) sin necesidad de peróxido a diferencia de la manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa que requieren de peróxido para poder actuar.

En la actualidad, el estudio de la oxidación de compuestos aromáticos por tratamientos enzimáticos en medios no acuosos con lacasas ha ido en incremento, debido a que estos tratamientos serían una opción para la remoción de hidrocarburos aromáticos policíclicos en combustibles. Lo cual disminuiría los contaminantes en la atmósfera como por ejemplo el benzo[*a*]pireno que es altamente mutagénico y carcinogénico fósiles (Collins *et al.* 1996).

Otro tema de gran interés en la actualidad, son las enzimas producidas por hongos termofílicos, ya que, pueden ser estudiadas principalmente para explorar sus ventajas en bioprocesos industriales, y para comparar similitudes y diferencias en propiedades fisicoquímicas entre enzimas producidas por hongos mesofílicos y termofílicos. Para esto, es indispensable el desarrollo de protocolos de purificación de enzimas, y el estudio de sus propiedades generales, es decir su caracterización (Maheshwari *et al.* 2000). Por esta razón en este trabajo nos enfocamos a la purificación parcial y caracterización de dos lacasas producidas por un hongo termofílico aislado a partir de desechos de madera.

Cabe señalarse que, una parte importante de este estudio fue la búsqueda de hongos tropicales que pudieran descomponer residuos lignocelulósicos, que crecieran a temperaturas superiores de 45°C y excretasen enzimas que oxidasen compuestos fenólicos como el ácido gálico y el compuesto ABTS [2,2' - azinobis (3 – etilbenzotiazolina – ácido sulfónico)].

De esa manera se pretendió ejemplificar la importancia del aprovechamiento de la biodiversidad tropical en México, para la obtención de enzimas termoestables de posible uso industrial.

## 2. Marco teórico

### 2.1. Lacasas

La enzima lacasa fue obtenida por primera vez del árbol japonés *Rhus vernicifera* (Yoshida, 1883) y posteriormente fue encontrada en hongos; las lacasas más estudiadas son producidas por *Agaricus bisporus*, *Podospora anserina*, *Rhizoctonia praticola*, *Trametes* o *Polyporus versicolor*, *Pholiota aegerita*, *Pleurotus ostreatus*, *Coriolus hirsitus* y *Neurospora crassa* (Yaropolov *et al.* 1994). Las lacasas fúngicas pueden ser inducibles o constitutivas y también intracelulares o extracelulares (Sariaslani, 1989).

### 2.2. Estructura de lacasas

La lacasa es una glicoproteína que contiene, por lo general, entre dos y cuatro átomos de cobre aunque algunas contienen tres o seis átomos, como es el caso de lacasas producidas por *Rhus vernicifera* y *R. succedanca* que contienen cuatro y seis átomos de cobre respectivamente (Reihammar y Oda, 1979). Los átomos de cobre que contiene la lacasa son: Cu tipo 1 (T1), Cu tipo 2 (T2) y dos iones Cu tipo 3 (T3). En sus estados oxidados los cobres T1 y T2 exhiben señales específicas en espectros de resonancia paramagnética de electrones (EPR). Por el contrario, los dos iones cobre T3 no son paramagnéticos. El cobre T1 en su estado oxidado absorbe fuertemente la luz a 610 nm (Andreasson and Reinhammar., 1976)

El peso molecular de las lacasas extracelulares está entre 60 a 80 KDa del cual del 15 al 20% son carbohidratos (Thurston, 1994); que incluyen a la hexoseamina, glucosa, manosa, galactosa, fructosa y arabinosa (Yarolopov *et al.* 1994).

### 2.3. Mecanismo de reacción de lacasas

Solomon y col. (1996) realizaron una revisión sobre el mecanismo catalítico de la enzima lacasa y proponen que la velocidad de oxidación del sustrato depende del potencial reductor. Esto implica que la transferencia de electrones del sustrato al sitio T1 es la etapa que determina la velocidad en el número de recambio. Existen dos posibles mecanismos: A) El cobre T1 transfiere su electrón a el cobre T2 y el Cu T1 se reduce nuevamente; el Cu T1 y Cu T2 transfieren sus electrones a los Cu T3 ; el Cu T1 se vuelve a reducir y transfiere su electrón al Cu T2 , el Cu T1 se reduce nuevamente, dando finalmente como resultando la enzima en la forma totalmente reducida. B) El grupo trinuclear es reducido secuencialmente por etapas de la transferencia de electrones de el sitio T1.(el orden en que los tres cobres del sitio trinuclear son reducidos no se conoce aún).

### 2.4. Sustratos de lacasas

Las lacasas son muy inespecíficas, por tal razón tienen un amplio rango para oxidar sustratos entre una lacasa y otra (Thurston, 1994). Estas enzimas catalizan la oxidación de varios compuestos aromáticos entre los que se encuentran: mono, di y polifenoles; aminofenoles y diaminas, por la reducción de oxígeno molecular a agua (Giardina *et al.* 1995). También, tienen la capacidad de interactuar con un mediador (por ejemplo ABTS) para oxidar compuestos no fenólicos del modelo de la lignina, los cuales no son sustratos de las lacasas (Bourbonnais y Paice, 1990).

La lacasa es una polifenoloxidasa (*p*-difenol oxidasa, E.C.1.10.3.2). La reducción de oxígeno a agua por esta enzima esta acompañada por la oxidación típica de un sustrato fenólico. La reacción que lleva acabo la lacasa incluye la oxidación de un compuesto fenólico generando un radical libre; y este producto, siendo típicamente

inestable, puede experimentar una segunda oxidación por catálisis enzimática para formar quinonas, puede también, ocurrir una reacción no enzimática tal como una hidratación o desprotonación, o podría participar en una reacción de polimerización, dando un compuesto amorfo insoluble como la melanina (Thurston, 1994).

Las reacciones oxidativas que pueden llevar a cabo las lacasas para despolimerizar la lignina incluyen: rompimiento entre enlaces  $C_{\alpha}$ - $C_{\beta}$ , hidroxilación, rompimiento de estructuras aromáticas y desmetilación (Sariaslani, 1989).

## 2.5. Aplicaciones de lacasas en la industria

Las aplicaciones prácticas de las lacasas, conducen a investigar nuevas fuentes de enzimas producidas por hongos de la pudrición blanca de la madera, y el uso de mediadores, los cuales, promuevan o faciliten la acción de las enzimas (Mayer y Staples, 2002).

Las lacasas pueden ser 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. Así mismo, durante el bioblanqueo las lacasas eliminan los residuos de la lignina que causan el amarillamiento del papel (Deleé *et al.* 1988).

Una razón importante para sustituir el blanqueo químico por cloro, por el bioblanqueo, es la eliminación de compuestos organoclorinados del medio ambiente porque son altamente carcinogénicos.

Para mejorar la producción del combustible etanol, a partir de materias primas renovables, la lacasa del hongo de la pudrición blanca *Trametes versicolor*, fue expresada bajo el control del promotor PGK1 en *Saccharomyces cerevisiae*, para

incrementar la resistencia a inhibidores fenólicos, de la proteína heteróloga en hidrolizados lignocelulósicos (Larsson *et al.* 2001).

Por otra parte, la eliminación de color de efluentes generados por la industria textil es un problema de especial importancia en el tratamiento de aguas, debido a que contienen colorantes tipo azo que son carcinogénicos (Zheng *et al.* 1999; Rodríguez *et al.* 1999; Reyes *et al.* 1999); una alternativa para la eliminación de estos colorantes sería el uso de reactores de flujo continuo con lacasas inmovilizadas. En la tabla 1 se presentan otras aplicaciones de estas enzimas.

**Tabla 1.** Usos de lacasas en la industria

INDUSTRIA	USO	REFERENCIA
Textil	Tratamiento de efluentes	Deelé <i>et al.</i> 1988
Juguera	Remoción de compuestos fenólicos	Cliffe <i>et al.</i> 1990
Vinícola	Remoción de compuestos fenólicos	Brena y Bianchi, 1990
Papelera	Bioblanqueo	Call, 1994
Química	Biotransformación	Agemato <i>et al.</i> 1993

## 2.6. Microorganismos termofílicos y su importancia

Los microorganismos pueden ser clasificados de acuerdo a su temperatura óptima de crecimiento ( $T_{opt}$ ). La clasificación de los termofílicos no es muy precisa y esta depende de los diferentes grupos de microorganismos (Kristjansson, 1989); la temperatura de crecimiento de estos microorganismos se encuentra en el intervalo de 45 a 60°C (Pelczar *et al.* 1982).

Por más de 100 años se ha tenido la interrogante e intriga científica del origen de los microorganismos termofílicos. Se han propuesto dos hipótesis: i) los primeros

microorganismos se originaron en medios donde imperaban altas temperaturas, y a partir de estos subsecuentemente se derivaron otros microorganismos y ii) los primeros microorganismos no fueron termofílicos pero se fueron adaptando a condiciones de temperatura moderada, y los microorganismos termofílicos se originaron secundariamente a partir de los tipos psicofílicos y mesofílicos (Brock, 1985).

La aplicación de microorganismos termofílicos en procesos biotecnológicos tiene varias ventajas (Wiegel y Ljungdahl, 1984):

- Aumenta la velocidad de formación de producto por la elevada actividad metabólica.
- Disminuye la contaminación del cultivo.
- Se eliminan o disminuyen los sistemas de enfriamiento durante el cultivo.
- Para detener el cultivo no es necesario enfriar por debajo de 20°C.
- Incrementan las velocidades de difusión, ionización y solubilidad de químicos.
- Disminuye la densidad, la tensión superficial y la viscosidad del cultivo.
- Fácil recuperación de productos volátiles directamente desde el cultivo y durante el proceso de fermentación.
- Producción de proteínas termoestables.
- Baja producción de biomasa pero alta velocidad de conversión de sustrato a producto.

Si bien no todas las ventajas mencionadas anteriormente son necesarias para procesos a altas temperaturas el contar con alguna de ellas puede resultar beneficioso en los procesos que se llevan a cabo a escala industrial.

## 2.7. Enzimas termoestables

El descubrimiento de una variedad de nuevas y más activas enzimas permite extender el crecimiento del mercado de enzimas industriales (Zamost *et al.* 1991). La termoestabilidad es una propiedad buscada en estas nuevas enzimas debido a que presentan las siguientes ventajas en procesos industriales: se almacenan fácilmente; tienen un alto número de recambio, el cual es estable cuando se aplican altas temperaturas, (Wiegel y Ljungdahl, 1984); evitan la contaminación del sistema de reacción y resisten a agentes desnaturalizantes (Kristjansson, 1989).

## 2.8. Efecto de la temperatura sobre las velocidades de reacción

En general la velocidad de una reacción química o enzimática aumenta al aumentar la temperatura. Este efecto suele representarse en función de la variación de la constante de velocidad,  $k$ , con la temperatura, variación que a menudo sigue la ecuación de Arrhenius:

$$k = Ae^{-E_a/RT} \quad (1)$$

Una forma alternativa de esta ecuación se obtiene tomando logaritmos en ambos miembros:

$$\ln k = \ln A - E_a / RT \quad (2)$$

Esta ecuación implica que el logaritmo de la constante de velocidad sea una función lineal del inverso de la temperatura. Este tipo de representaciones suelen denominarse gráficos de Arrhenius.

Los dos parámetros que aparecen en la ecuación se suponen independientes de la temperatura. El parámetro  $A$  se denomina factor pre-exponencial o factor  $A$  y siempre tiene las mismas unidades que la constante de velocidad correspondiente.

El otro parámetro,  $E_a$ , denominado energía de activación o, más precisamente, energía de activación de Arrhenius, que es la energía que deben recibir las moléculas de los reactivos, para comenzar una reacción química, tiene las mismas dimensiones que  $RT$  y sus valores habituales están en el intervalo 50-200  $\text{kJ mol}^{-1}$  (Logan, 1996).

## **2.9. Biocatálisis en medios no acuosos**

Los medios no acuosos tiene muchas ventajas potenciales, incluyendo alta solubilidad de muchos sustratos orgánicos, reacciones hidrolíticas reversibles (síntesis) y modificación de la especificidad de la enzima, lo cual es el resultado de nuevas actividades enzimáticas (Schmid *et al.* 2001).

En la actualidad existen varias empresas especializadas en nuevos biocatalizadores industriales (activos en medios no acuosos), tales como Novozymes, Genencor, y más recientemente Diversa y Maxygen (Schmid *et al.* 2001).

Las reacciones catalizadas por enzimas en disolventes orgánicos muestran numerosas aplicaciones potenciales, algunas de ellas ya están comercializadas; por ejemplo Schering-Plough, produce miles de kilogramos de un agente antifúngico, en un esquema de síntesis donde una reacción estereoselectiva es la acetilación de un diol simétrico por una lipasa de levadura disuelta en acetonitrilo (Klibanov, 2001).

## **2.10. Purificación**

El estudio de una proteína en cualquier sistema, incluyendo los medios de reacción no acuosos requiere de la purificación de las enzimas. El desarrollo de

técnicas y métodos para la purificación de proteínas fue un pre-requisito esencial para muchos de los avances realizados en la biotecnología. La purificación de proteínas varía desde un simple paso de purificación por métodos de precipitación hasta un proceso de purificación validado de gran escala. Más de un paso de purificación es necesario para obtener la pureza deseada. La clave del éxito para una eficiente purificación de proteínas es seleccionar las técnicas más apropiadas, optimizar su resolución y combinar un camino lógico para maximizar el rendimiento y minimizar el número de pasos requeridos (Janson y Rydén<sup>1</sup>, 1998).

La mayoría de los esquemas de purificación incluyen alguna forma de cromatografía. Esta ha resultado una herramienta esencial en laboratorios donde la purificación de proteínas es necesaria. La disponibilidad de diferentes técnicas cromatográficas con diferentes selectividades proveen una poderosa combinación para la purificación de cualquier biomolécula requeridos (Janson y Rydén<sup>1</sup>, 1998).

A continuación se detallan algunas de las técnicas más usadas en la purificación de proteínas:

#### *Precipitación con sulfato de amonio*

Cuando altas concentraciones de sal están presentes, las proteínas tienden a agregarse, debido a que cambian su polaridad (cargas externas). A determinadas concentraciones de sal son insolubles y precipitan de la solución. Esta técnica es referida como “salting out”. Diferentes proteínas precipitan a diferentes concentraciones de sal, por tal motivo el “salting out” es a menudo usado durante la purificación de proteínas. Es importante recordar factores tales como: pH, temperatura y la pureza de la proteína, ya que juegan roles importantes para determinar el punto en que precipita una proteína en particular. El sulfato de amonio

es la sal más usada, debido a que combina muchas características útiles tales como: la efectividad para llevar a cabo el “salting out”, versatilidad de pH, alta solubilidad, baja la temperatura de la solución y tiene un precio bajo (Bollag y Edelstein, 1991). Este método fue empleado como primera etapa del proceso de purificación de la enzima lacasa producida por *Botrytis cinerea*, en donde primero se precipitaron del extracto crudo, proteínas contaminantes con el 40% de saturación de sulfato de amonio. Las cuales, se eliminaron por centrifugación y filtración, y posteriormente, se precipitó la enzima lacasa de interés con el 80% de saturación de sulfato de amonio (Pezet, 1998). Sin embargo en el extracto crudo de *Ceriporiopsis subvermispota*, la lacasa de interés precipitó con un solo fraccionamiento de sulfato de amonio al 90% de saturación (Fukushima y Kirk, 1995).

#### *Cromatografía por intercambio iónico*

Las resinas intercambiadoras iónicas consisten de una matriz con grupos básicos ó ácidos. Los intercambiadores iónicos básicos tienen grupos positivos y son llamados intercambiadores aniónicos, a diferencia de los ácidos que tienen grupos negativos y son llamados intercambiadores catiónicos. Los intercambiadores iónicos son usualmente clasificados como fuertes y débiles. El nombre se refiere a los valores de  $pK_a$  de sus grupos cargados (por analogía con fuerte y débil de bases o ácidos), pero esto no dice la fuerza con que se pegan las proteínas. A valores de pH lejanos del  $pK_a$ , la interacción podría ser igual de fuerte, tanto para un intercambiador fuerte o débil (Janson y Rydén<sup>2</sup>, 1998).

Una sal no amortiguadora, tal como NaCl, es usualmente adicionada al amortiguador para separar las proteínas del intercambiador iónico. Las propiedades de esta sal influyen en la separación, debido a que la proteína se intercambia con los

cationes ( $\text{Na}^+$ ) ó aniones ( $\text{Cl}^-$ ), dependiendo del intercambiador ya sea catiónico ó aniónico, como de la concentración de la sal.

La cromatografía de intercambio iónico es comúnmente usada como una etapa de purificación de lacasas. Por ejemplo: las lacasas que han sido parcialmente purificadas por intercambio aniónico son las producidas por: *Trichophyton rubrum* LKY-7 (Jung *et al.* 2002), *Botrytis cinerea* (Pezet, 1998), *Myceliophthora thermophila* (Berka *et al.* 1997), *Ceriporiopsis subvermispota* (Fukushima y Kirk, 1995), *Chaetomium thermophilum* (Chefetz *et al.* 1998), *Dichomitus squalens* (Périé *et al.* 1998), entre otras.

#### *Cromatografía por filtración en gel*

La separación de solutos por su peso molecular, también llamada filtración en gel cuando se usan soluciones acuosas y permeación en gel cuando usan solventes orgánicos (Fischer, 1980), fue dada a conocer alrededor de 1940 pero la primera separación por peso molecular de biomoléculas fue en 1955 por Lindqvist y Storgards. Esta técnica es ideal como paso final en un proceso de purificación cuando los volúmenes son reducidos, ya que el volumen de muestra influye significativamente en la velocidad y la resolución de la separación. Las muestras son separadas con un flujo isocrático y las características del amortiguador dependen del tipo de muestra (Hagel y Janson, 1992). La cromatografía de filtración en gel ha sido usada para purificar las lacasas producidas por: *Trichophyton rubrum* (Jung *et al.* 2002) y *Trametes villosa* (Yaver *et al.* 1996).

## **2.11. Importancia de la caracterización cinética de las enzimas**

La cinética es el estudio de la velocidad a la que tienen lugar las reacciones químicas. Uno de los objetivos principales de tal estudio es conseguir el conocimiento de un mecanismo de reacción. La velocidad de una reacción y la forma en que cambia esta velocidad en respuesta a diferentes condiciones están íntimamente ligadas a la ruta seguida por la reacción y es, por consiguiente, indicativa de su mecanismo de reacción. La cinética enzimática es un tema de enorme importancia en bioquímica según Voet y Voet (1990):

- Mediante estudios cinéticos se pueden determinar las afinidades de fijación de sustratos e inhibidores a una enzima, a su vez se puede establecer la máxima tasa catalítica de una enzima.
- Observando la forma en que varía la velocidad de una reacción enzimática con las condiciones de reacción y combinando esta información con la obtenida a partir de estudios químicos y estructurales de la enzima, se puede elucidar el mecanismo catalítico de la enzima.
- El estudio de la cinética de una reacción enzimática conduce a un conocimiento sobre el papel de la enzima en un proceso metabólico global.
- La determinación de las velocidades de reacciones catalizadas enzimáticamente se encuentran entre los procedimientos más utilizados en análisis bioquímico y clínico.

## 2.12. Expresión de diferentes genes de lacasas

Para aclarar los mecanismos catalíticos empleados por lacasas, es necesario la caracterización de las proteínas, lo que se facilita con la clonación del gen o los genes que codifican para esta enzima; permitiendo el entendimiento de la bioquímica y genética de este sistema. Originalmente se había pensado que numerosos isoenzimas de lacasas eran productos del mismo gen pero con variantes postraduccionales. Sin embargo, se han aislado y caracterizado varios genes de lacasa y copias de cADN (Mansur *et al.* 1998). En *Rhizoctonia solani* se obtuvieron cuatro secuencias diferentes de cADN que codifican para lacasa (Wahleithner *et al.* 1996) y cinco genes de lacasa en *Trametes villosa* (Yaver *et al.* 1996; Yaver y Golightly, 1996).

### 3. Antecedentes

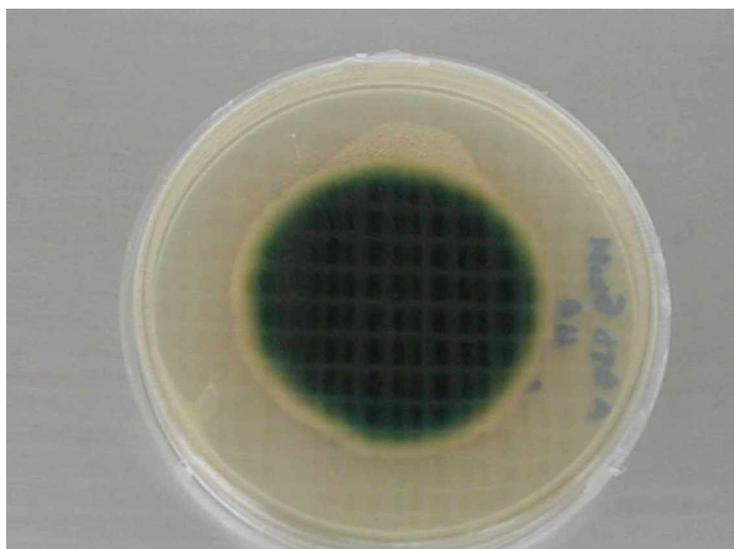
Ocho hongos deuteromicetos termofílicos productores de lacasas fueron aislados a partir de desechos lignocelulósicos, los cuales crecieron a 45°C. Uno de estos hongos nombrado MA2M2 presentó zonas de oxidación de ABTS por debajo de la colonia, esto indicó, que la lacasa producida está asociada al micelio. También en este hongo, la lacasa se produjo dependiendo de la edad de las hifas, por que la zona de oxidación no rebaso el diámetro de la colonia, es decir, no excreta la lacasa al medio (Figura 1A).

El hongo MA2M2, cuando fue observado microscópicamente, presento conidias características de *Penicillium* (Figura 1B) (Medina, 2000).

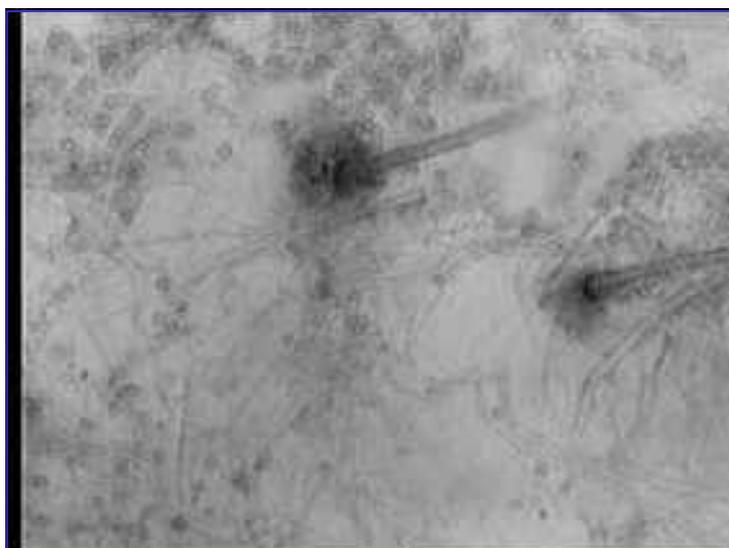
Entre los reportes para aislar lacasas termoestables a partir de hongos filamentosos, destacan los siguientes trabajos:

1) *Myceliophthora thermophila* fue descrito previamente como productor de celulasas y xilanasas termoestables, posteriormente fue identificada la actividad de lacasa termoestable (Berka *et al.* 1997). A raíz de esta nueva actividad enzimática, Novo Nordisk produce industrialmente la lacasa termoestable de *Myceliophthora thermophila* usando una cepa recombinante de *Aspergillus oryzae*, para la decoloración de la mezclilla (Berka *et al.* 1997).

2) *Chaetomium thermophilium* fue aislado a partir de residuos del composteo municipal durante un proceso de estado termofílico. *Chaetomium thermophilium*, es un hongo celulolítico, que presento actividad de lacasa cuando este fue crecido a 45°C en medio sólido y en medio líquido. La lacasa fue estable a la temperatura durante 1h a 70°C y mantuvo la mitad de su actividad durante 24 y 12h a 40 y 50°C respectivamente (Chefetz *et al.* 1998).



**A**



**B**

**Figura 1.** Hongo termofílico silvestre MA2M2 aislado a partir de madera. A) Actividad en placa con 5 mM ABTS, en el reverso de la colonia; B) Conidióforo observado en el objetivo 40x.

## **4. Justificación, hipótesis y objetivos**

### **4.1. Justificación**

Considerando la gran aplicación que puede tener la obtención de lacasas en la industria, es importante continuar con la búsqueda de nuevas lacasas que presenten propiedades con ventajas para su aplicación biotecnológica. En este sentido, la termoestabilidad es una propiedad importante en las enzimas usadas en la industria, debido a que éstas aumentan su actividad catalítica al haber un incremento en la temperatura, lo cual permite reducir la cantidad de enzima utilizada en el proceso (Kristjansson, 1989); por otra parte la resistencia a disolventes orgánicos, para la oxidación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y biotransformación de compuestos orgánicos en sistemas de reacción no acuosos, semiacuosos ó de dos fases. Por tal motivo resulta conveniente la purificación y caracterización de lacasas con estas propiedades.

### **4.2. Hipótesis**

Uno de los hongos termofílicos aislados en el trópico mexicano (Yucatán) a partir de madera, produce lacasas termoestables y resistentes a disolventes orgánicos (etanol y acetonitrilo).

### **4.3. Objetivo general**

Seleccionar un hongo termofílico silvestre que sea capaz de producir lacasas termoestables y resistentes a disolventes orgánicos; a partir de hongos termofílicos aislados de desechos lignocelulósicos, en Yucatán.

#### **4.3.1. Objetivos particulares**

- Seleccionar un hongo termofílico lignocelulósico a partir de 6 hongos basidiomicetos.
- Determinar los niveles de lacasas del hongo seleccionado en un medio.
- Purificar parcialmente las lacasas de interés producida por el hongo silvestre estudiado.
- Caracterizar las lacasas parcialmente purificadas.
  - Determinar el pH y la temperatura óptima.
  - Determinar la estabilidad al pH y a la temperatura.
  - Determinar los parámetros cinéticos aparentes.
  - Determinar el efecto y estabilidad en disolventes orgánicos.

## **5. Materiales y métodos**

### **5.1. Aislamiento**

Los cuerpos fructíferos se recolectaron de desechos de henequén y pedazos de madera, localizada en Mérida, Yucatán, guardados en frascos de vidrio estéril. Estos se llevaron al laboratorio y, en condiciones estériles, se cortó el cuerpo fructífero con un bisturí, para inocular 10 placas con 2 % de extracto de malta, 6 mg/ L de benlato, 20 U/mL de ampicilina y 2 % de agar. Posteriormente, se incubaron a 40°C durante 4 días. El medio sin ampicilina se esterilizó durante 15 minutos a 121°C y 15 psi, posteriormente se le adicionó la ampicilina, este antibiótico se esterilizó pasándolo a través de un filtro para jeringa (swinnex) estéril, el cual contenía una membrana de 0.22 µm.

A partir de 6 hongos basidiomicetos termofílicos productores de lacasas se seleccionó el hongo EUM1 (hallado en una puerta de madera), debido a que al sembrarlo en placas con 2 % de extracto de malta, 2 % de agar y 5 mM de ABTS [2,2' - azinobis (3 - etilbenzotiazolina - ácido sulfónico)], e incubarlo a 40°C, durante 2 días, presentó los halos más grandes de oxidación del ABTS, lo cual es fácilmente detectable por el color azul intenso que produce.

### **5.2. Inóculo para el medio de producción de lacasas**

El hongo EUM1 se propagó en placas con 2 % de extracto de malta y 2 % de agar, a 40°C durante 4 días; posteriormente con un bisturí, se levantó el micelio de dos cuadros de 1 x 1 cm aproximadamente, para inocular matraces de 250 mL con 50 mL de medio líquido de extracto de malta al 2 % para producción de biomasa, incubándose a 40°C y 150 rpm durante 4 días. Estos cultivos se homogenizaron con

un vórtex a velocidad máxima durante 2 minutos, para posteriormente inocular el medio de producción de lacasas. Los medios se esterilizaron durante 15 minutos a 121°C y 15 psi y se inocularon en condiciones estériles.

### **5.3. Producción y obtención del extracto crudo de lacasas**

A 24 matraces de 250 mL con 100 mL de medio de Bran Flakes de Kellog's al 3 %, en amortiguador de fosfatos pH 6, 60 mM (Pickard *et al.* 1999), se les adicionaron 2 mL de inóculo homogéneo, y posteriormente, se incubaron a 40°C y 150 rpm, durante 10 días. Los medios se esterilizaron durante 15 minutos a 121°C y 15 psi, y se inocularon en condiciones estériles.

Después de 10 días de producción de lacasas a partir del hongo EUM1 en este medio, los cultivos se centrifugaron a 3,840 *g* y 10°C, durante 30 minutos. Los sobrenadantes se decantaron y centrifugaron nuevamente a 15,300 *g* y 10°C, durante 30 minutos. Estos últimos sobrenadantes se congelaron a -10°C, durante 24 horas. Posteriormente, se descongelaron y se centrifugaron a 15,300 *g* a 5°C, durante 20 minutos. Los sobrenadantes se filtraron con un papel filtro tipo Whatman No. 1 y por último con una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ .

### **5.4. Actividad de lacasa**

El sistema de reacción de 1 mL para determinar la actividad de lacasa contenía: 100  $\mu\text{L}$  de amortiguador de acetatos 1 M pH 5, ó de citratos 0.5 M pH 4, además de 700  $\mu\text{L}$  de agua destilada, 100  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático y 100  $\mu\text{L}$  de sustrato ABTS 5 mM ó 2,6-DMP (2,6-dimetoxifenol) 5 mM. El coeficiente de extinción molar para el ABTS es de 36,000  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  y para el 2,6-DMP de 35,645  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Jung *et al.* 2002).

El sistema de reacción sin el sustrato se preincubó durante 1 minuto a 40 ó 60°C. Posteriormente, se le adicionó el sustrato y se midieron los incrementos de la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm para el ABTS y de 470 nm para el 2,6-dimetoxifenol cada 15 segundos durante 2 minutos a 40 ó 60°C. Una unidad de actividad (U) se definió como la cantidad de enzima que oxida 1  $\mu$ mol de sustrato por minuto bajo las condiciones de reacción. La determinación de la actividad de lacasa en todos los casos se hizo por duplicado.

### **5.5. Determinación de proteína por el método de Bradford (1976)**

La proteína se midió con 800  $\mu$ L de muestra, a la cual se le adicionaron 200  $\mu$ L de reactivo de Bradford (Bio-Rad). La solución se agitó y después de 5 minutos en reposo, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. Para saber la concentración de proteína en la muestra se construyó una curva estándar con 2, 4, 6, 8 y 10  $\mu$ g/mL de albúmina sérica bovina (Anexo 1). Las determinaciones de proteína se hicieron por duplicado.

### **5.6. Precipitación con sulfato de amonio**

En baño de hielo a 0°C se colocaron 4 vasos de precipitado de 50 mL con 25 mL de extracto crudo cada uno. A los cuales, con agitación suave, se les adicionó lentamente sulfato de amonio hasta llegar a 20, 40, 60 y 80 % de saturación, después de 12 horas de reposo en refrigeración a 4°C y con agitación suave, se centrifugaron a 15,300 *g* y 5°C, durante 20 minutos. Los sobrenadantes y los precipitados resuspendidos en 2 mL de amortiguador de acetatos 0.1 M, pH 5, se dializaron contra el mismo amortiguador de acetatos en membranas de diálisis de 12-14,000 Da por un período de 24 horas, con recambio del amortiguador cada 8 horas.

Para el proceso de purificación, 1 L de extracto crudo se precipitó con sulfato de amonio a 40 % de saturación. Se dejó reposar durante 20 horas, después se centrifugó y al sobrenadante se le adicionó sulfato de amonio hasta llegar a 80 % de saturación. Se dejó reposar durante 20 horas y se centrifugó de nuevo. El precipitado se resuspendió en 10 mL de amortiguador de acetatos y se dializó durante 24 horas, con recambio de amortiguador cada 8 horas.

A las muestras dializadas se les determinó la actividad de lacasa con ABTS y la concentración de proteína, como se describió previamente.

### **5.7. Cromatografía de intercambio aniónico**

Antes de inyectar la muestra a la columna, se equilibró corriendo dos volúmenes de columna (50 mL) de amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.3, con 0.5 M de NaCl y posteriormente dos volúmenes de columna de amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.3, a 5 mL/min. La muestra dializada (Sección 5.6.) de 10.2 mL (47.5 mg de proteína) se inyectó en una columna de 100 x 16 mm, de intercambio aniónico pre-empacada con Q sepharosa (Pharmacia, HiPrep 16/10 QFF), la cual se separó con un amortiguador Tris-HCl, pH 7.3, 50 mM y el mismo amortiguador con 0.5 M de NaCl, para hacer un gradiente de 0 a 100%, a 5 mL/min durante toda la corrida y temperatura ambiente. Se colectaron 90 fracciones de 5 mL.

A las fracciones colectadas se les determinó la actividad de lacasa con ABTS y la concentración de proteína como se describió previamente.

## **5.8. Cromatografía de filtración en gel**

La columna de 10 x 300-310 mm, pre-empacada con superdex 200 (Pharmacia, superdex 200 HR 10/30), el cual tiene un rango de separación entre 10,000 a 12,000 Da, se equilibró antes de hacer la primera inyección, con dos volúmenes de columna (48 mL), con un amortiguador de acetatos 50 mM, pH 5, el cual contenía 0.15 M de NaCl, a un flujo de 0.5 mL/min y temperatura ambiente. Posteriormente, entre cada inyección la columna se reequilibró con un volumen de columna (24 mL). Las muestras inyectadas en la columna fueron de 1 mL (0.12 mg de proteína), y se separaron con el mismo amortiguador de acetatos, bajo las mismas condiciones de flujo y temperatura.

La columna se montó en un sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) Bio-Rad modelo Biologic HR System workstation.

### **5.8.1. Curva estándar de peso molecular en condiciones nativas**

El procedimiento para determinar los pesos moleculares por cromatografía de filtración en gel, consistió en una modificación de los métodos de Whitaker (1963) y Andrews (1964), descritos en el boletín técnico, proporcionado por SIGMA dentro del kit.

El kit de marcadores de pesos moleculares de filtración en gel (SIGMA MW-GF-200), contenía: citocromo c (12,400 Da), anhidrasa carbónica bovina (29,000 Da), albúmina sérica bovina (66,000 Da), alcohol deshidrogenasa de levadura (150,000 Da),  $\beta$ -amilasa de papa (200,000 Da) y azul dextrán (2,000,000 Da).

El volumen vacío ( $V_0$ ) se determinó con el azul dextrán a una concentración de 2 mg/mL y los volúmenes de separación ( $V_e$ ) se determinaron con las proteínas citocromo c, anhidrasa carbónica bovina, albúmina sérica bovina, alcohol deshidrogenasa de levadura y  $\beta$ -amilasa de papa, a concentraciones de 2, 3, 10, 5 y 4 mg/mL, respectivamente. Todos los marcadores se disolvieron en amortiguador de elución con glicerol al 5%. Las condiciones de separación se describen arriba (Sección 5.8.).

La curva estándar se construyó graficando los pesos moleculares contra  $V_e/V_0$  (Anexo 2).

### **5.8.2. Determinación del peso molecular aparente de la lacasa 2**

Las fracciones de la 32 a la 41 colectadas de la columna de intercambio aniónico, que corresponden a la lacasa 2 (segundo pico) en el cromatograma de actividad, se juntaron para obtener un volumen de 50 mL, el cual se dializó contra un amortiguador de acetatos 50 mM, pH 5, utilizando una membrana de 10,000 Da; posteriormente se concentró 10 veces por ultrafiltración con una membrana de 10,000 Da. Con los 5 mL de muestra concentrada se hicieron 5 inyecciones de 1 mL (0.12 mg de proteína) a la columna superdex 200. Las condiciones de separación se describen en la sección 5.8. Se colectaron 30 fracciones de 1 mL en cada corrida. Pero, como se hicieron 5 inyecciones de la misma muestra y se colectaron en los mismos tubos las fracciones equivalentes, cada fracción tuvo un volumen final de 5 mL.

A las fracciones colectadas se les determinó la actividad de lacasa con ABTS y la concentración de proteína como se describió previamente.

El cromatograma de actividad permitió determinar el volumen de separación ( $V_e$ ) con lo que se pudo estimar en condiciones nativas, el peso molecular aparente de la lacasa 2 al interpolar en la curva estándar de pesos moleculares. El peso molecular estimado, fue aparente porque la preparación, denominada lacasa 2 estaba parcialmente pura.

### **5.9. Isoelectroenfoque**

Las fracciones de la 13 a la 19 correspondientes al pico de actividad en la cromatografía de filtración en gel, se juntaron (35 mL) y dializaron con membranas de 12–14,000 Da durante 12 horas con 3 cambios de agua destilada. Los 35 mL de muestra dializada se colocaron en una probeta de 100 mL, se les adicionó 2 mL de anfolitos con un rango de separación de pH de 3 a 10 y se llevaron a 60 mL con agua destilada. Esta solución, se inyectó en un Rotofor Cell Bio-Rad, previamente ensamblado y enfriado a 4°C. Se corrió a 15 W constantes durante 3 horas, hasta que los volts y amperes se hicieron constantes. Se colectaron 20 fracciones, a las cuales, se les determinó el pH y la actividad de lacasa con ABTS 0.5 mM, en amortiguador de acetatos pH 5, 0.1 M, a 40°C. Las fracciones que dieron mayor actividad de lacasa se juntaron y dializaron con membranas de 12,000-14,000 Da contra un amortiguador de acetatos 50 mM a pH 5, para hacer la caracterización enzimática de las actividades de lacasa.

### **5.10. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS**

El método usado para separar proteínas dependiendo de su peso molecular con geles de poliacrilamida, fue el descrito por Laemmli (1970). En todos los experimentos se utilizaron minigeles con 12% de acrilamida. En algunos casos, se probaron geles con 10% de acrilamida, los cuales se motaron y corrieron en una cámara mini-protean Bio-Rad. A cada pozo, se le adicionaron 12  $\mu$ L con diferentes

cantidades de proteína dependiendo de la muestra. Las bandas de proteína en los minigeles se revelaron con las soluciones del kit de tñido con plata (Pharmacia, 17-1150-01).

### **5.10.1. Soluciones para preparar los geles**

#### **Soluciones requeridas para preparar las soluciones de trabajo**

1) Amortiguador Tris-HCl 2 M pH 8.8

24 g Tris

50 mL de agua destilada

Ajustar el pH a 8.8 con un potenci3metro, adicionando HCl concentrado

Aforar a 100 mL con agua destilada

2) Amortiguador Tris-HCl 1 M pH 6.8

12.1 g Tris

50 mL de agua destilada

Ajustar el pH a 6.8 con un potenci3metro, adicionando HCl concentrado

Aforar a 100 mL con agua destilada

3) Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% (p/v)

Disolver 10 g de dodecil sulfato de sodio en agua destilada con agitaci3n y aforar a 100 mL

4) Glicerol al 50%(v/v)

Disolver 12.5 mL de glicerol en agua destilada y aforar a 25 mL

5) Azul de bromofenol al 1% (p/v)

Disolver 10 mg de azul de bromofenol en agua destilada con agitación y aforar a 10 mL. Filtrar para remover agregados del colorante.

**Soluciones de trabajo**

**1) Solución A** (solución de acrilamida/bis 30% T, 2.67% C)

29.5 g de acrilamida

0.8 g de N'N'-bis—metileno-acrilamida

Aforar a 100 mL con agua destilada. Guardar por meses en la oscuridad a 4°C.

**2) Solución B** (Amortiguador para el gel de separación 4x)

75 mL de amortiguador Tris-HCl 2 M pH 8.8 (1.5 M)

4 mL de dodecil sulfato de sodio al 10% (0.4%)

Aforar con agua destilada a 100 mL. Guardar por meses a 4°C.

**3) Solución C** (Amortiguador para el gel de apilamiento 4x)

50 mL de amortiguador Tris-HCl 1 M pH 6.8 (0.5 M)

4 mL de dodecil sulfato de sodio al 10% (0.4%)

Aforar con agua destilada a 100 mL. Guardar por meses a 4°C.

**4) Persulfato de amonio al 10%**

Disolver 0.5 g de persulfato de amonio en 5 mL de agua destilada.

**5) Amortiguador de corrida**

3 g de Tris (25 mM)

14.4 g de glicina (192 mM)

1g de dodecil sulfato de sodio (0.1%)

800 mL de agua destilada

Ajustar el pH a 8.3 con un potenciómetro y aforar a 1 L con agua destilada.

#### **6) Amortiguador de la muestra 5x**

0.6 mL de amortiguador Tris-HCl 1 M pH 6.8 (60 mM)

5 mL de glicerol al 50% (25%)

2 mL de dodecil sulfato de sodio al 10% (2%)

0.5 mL de 2-mercaptoetanol (14.4 mM)

1 mL de azul de bromofenol al 1% (0.1%)

0.9 mL de agua destilada

Guardar 3 semanas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **5.10.2. Preparación del gel y de las muestras**

Antes de mezclar las soluciones para elaborar el gel, se ensambla el dispositivo de moldeado del gel. Primero se adiciona el gel de separación (Tabla 2), hasta 1.5 cm, aproximadamente, antes de llenar el molde. Después de que gelifique en 40 minutos, aproximadamente, se le adiciona el gel de apilamiento (Tabla 3), hasta llenar el molde y se coloca el peine.

En tubos eppendorf se combinan 20  $\mu\text{L}$  de muestra con 5  $\mu\text{L}$  de amortiguador de la muestra 5x, se colocan en un baño a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos y se cargan los pozos con 12  $\mu\text{L}$ . En el primer pozo se cargaron 3  $\mu\text{L}$  de estándares de peso molecular Bio-Rad (cat. 161-0305); las proteínas que contenía fueron: lisozima (21,400 Da), inhibidor tripsina de soya (28,800 Da), anhidrasa carbónica (35,500 Da), ovalbúmina (50,300 Da), albúmina sérica bovina (93,000 Da) y fosforilasa B (113,000

Da). Para estimar el peso molecular aparente en condiciones desnaturizantes, se construyó una curva estándar de pesos moleculares (Anexo 3)

**Tabla 2.** Soluciones requeridas para preparar el gel de separación, con 12% de acrilamida.

<b>Solución de trabajo</b>	<b>12%</b>
Solución A (acrilamida)	4 mL
Solución B (Tris-HCl pH 8.8)	2.5 mL
Agua destilada	3.5 mL
Persulfato de amonio al 10%	50 $\mu$ L
TEMED	5 $\mu$ L
Volumen total	10 mL

**Tabla 3.** Soluciones requeridas para preparar el gel de apilamiento, con 5% de acrilamida.

<b>Solución de trabajo</b>	<b>4%</b>
Solución A (acrilamida)	0.67 mL
Solución C (Tris-HCl pH 6.8)	1 mL
Agua destilada	2.3 mL
Persulfato de amonio al 10%	30 $\mu$ L
TEMED	5 $\mu$ L
Volumen total	4 mL

### 5.10.3. Condiciones de corrida

Los geles de 0.75 mm de grosor se corrieron a un voltaje constante de 180 volts, en un amortiguador Tris-glicina pH 8.3, a temperatura ambiente, durante 55 minutos.

#### **5.10.4. Revelado de las bandas de proteína en el gel**

Las bandas de proteína en el gel de poliacrilamida, se revelaron con un kit de teñido con plata (Farmacia, 17-1150-01), el cual se basa en la metodología de Heukeshoven y Dernick (1985).

Después de haber desmontado el gel se colocó en un recipiente de vidrio, en donde se le adicionaron las siguientes soluciones, preparadas al momento en que fueron utilizadas:

##### **1) Solución de fijación (30 min) :**

100 mL de etanol

25 mL de ácido acético glacial

Aforar a 250 mL con agua destilada.

##### **2) Solución de sensibilidad (30min) :**

75 mL de etanol

1.25 mL de glutaraldehído (25 % p/v)\*

10 mL de tiosulfato de sodio (5 % p/v)

17 g de acetato de sodio

Aforar a 250 mL con agua destilada.

**3) Remover la solución de sensibilidad.** Lavar el gel con agua destilada, con 3 cambios, cada 5 minutos.

##### **4) Solución de plata (20 min) :**

25 mL de nitrato de plata (2.5 % p/v)

0.1 mL de formaldehído (37 % p/v)\*

Aforar a 250 mL con agua destilada.

**5) Remover la solución de plata.** Lavar el gel con agua destilada, con 2 cambios, cada minuto.

**6) Solución de desarrollo (2 a 5 min) :**

6.25 g de carbonato de sodio

0.05 mL de formaldehído (37 % p/v)\*

Aforar a 250 mL con agua destilada. Agitar vigorosamente para disolver el carbonato de sodio.

**7) Remover la solución de desarrollo.**

**8) Solución para detener el desarrollo de las bandas (10 min) :**

3.65 g de EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

Aforar a 250 mL con agua destilada.

**9) Remover la solución para el desarrollo de las bandas.** Lavar el gel con agua destilada, con 3 cambios, cada 5 minutos.

**10) Solución para conservar el gel (20 min) :**

25 mL de glicerol (87 % p/v)

Aforar a 250 mL con agua destilada.

**11) Conservar el gel cubriéndolo con papel celofán.** Dejar secar durante 5 horas en una cámara de aire caliente.

### **5.11. Zimogramas**

Los geles que fueron revelados con actividad enzimática, se prepararon y corrieron como se describe arriba (Sección 5.10.2. y 5.10.3.), pero en este caso la

muestra no se calentó a 100°C y el amortiguador de la muestra no contenía 2-mercaptoetanol, ni SDS.

Después de que se corrió y desmontó el gel, se lavó con agua destilada durante 15 minutos con 3 cambios de agua. Posteriormente, se le adicionaron 15 mL de una solución de ABTS 0.5 mM, en amortiguador de acetatos 0.1M, pH 5. Las bandas de color verde (del ABTS oxidado, por la enzima lacasa), se observaron aproximadamente en un tiempo de 5 a 10 minutos, a temperatura ambiente.

### **5.12. Caracterización de la enzima lacasa 2**

Los análisis de caracterización enzimática se hicieron con el extracto nombrado lacasa 2 obtenido del isoelectroenfoque (Rotofor). Para hacer las determinaciones de actividad de lacasa, bajo diferentes condiciones (las cuales se describen más adelante), la lacasa 2 se diluyó 1,000 veces, para obtener en el sistema de reacción una concentración de 27.74 ng de protenía/mL.

### **5.13. Efecto del pH sobre la actividad de lacasa**

La actividad de lacasa se determinó a 40°C con ABTS 0.5 mM a diferentes valores de pH. Se utilizaron 3 amortiguadores: de citratos a pH 3, 4, 5 y 6; de fosfatos a pH 6, 7 y 8; de Tris a pH 8, 9 y 10. Todos los amortiguadores tenían una concentración de 50 mM en el sistema de reacción.

### **5.14. Estabilidad del pH**

A 10 tubos de ensayo se les adicionó 10 µL de la lacasa 2, los cuales se diluyeron

10 veces con 90  $\mu\text{L}$  de amortiguador 50 mM a diferentes valores de pH, mencionados arriba (Sección 5.13), incubándose a temperatura ambiente durante 1 hora. Al tiempo cero y después de 1 hora, se tomaron alícuotas de 50  $\mu\text{L}$  del extracto incubado a cada pH, para diluirlas 10 veces con 450  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  del extracto diluido 100 veces en agua destilada para determinar la actividad de lacasa con ABTS 0.5 mM, en un amortiguador de citratos pH 4, 50 mM, a 60°C (temperatura óptima).

#### **5.15. Efecto de la temperatura sobre la actividad de lacasa**

La actividad de lacasa se determinó con ABTS 0.5 mM, en un amortiguador de citratos pH 4, 50 mM a 40, 50, 60, 70 y 80°C. El sistema de reacción sin el sustrato se preincubó durante 1 minuto a las diferentes temperaturas mencionadas.

#### **5.16. Estabilidad a la temperatura**

El extracto de lacasa 2 se diluyó 100 veces con agua destilada, se incubó a 50, 60, 70 y 80°C durante 1 hora, y cada 10 minutos se tomaron alícuotas de 100  $\mu\text{L}$ , para determinar la actividad de lacasa con ABTS 0.5 mM, en un amortiguador de citratos pH 4, 50 mM, a 60°C (temperatura óptima).

#### **5.17. Efecto de disolventes sobre la actividad de lacasa**

En este experimento se modificó la cantidad de 700  $\mu\text{L}$  de agua destilada del sistema de reacción, para adicionarle 50, 100, 150, 200, 300, 350 y 400  $\mu\text{L}$  de

disolvente (alcohol y acetonitrilo) y determinar la actividad de lacasa con ABTS 0.5 mM, en un amortiguador de citratos pH 4, a 60°C .

#### **5.18. Estabilidad a los disolventes**

En 6 viales de vidrio de 1 mL con 10 µL de extracto de lacasa 2, se les adicionó 10, 20 y 30 µL de disolvente (alcohol y acetonitrilo), y se llevaron a un volumen de 100 µL con agua destilada, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Al tiempo cero y después de 1 hora, alícuotas de 50 µL de la enzima incubada se diluyeron 10 veces con agua destilada, y se les determinó la actividad de lacasa con ABTS 0.5 mM, en amortiguador de citratos pH 4, a 60°C.

#### **5.19. Parámetros cinéticos**

La lacasa 2 parcialmente purificada se diluyó 10 veces (2774 ng/mL) para determinarle actividad enzimática con ABTS y 2,6-dimetoxifenol, en amortiguador de citratos, pH 4, a 20, 40 y 60°C (temperatura óptima), y diferentes concentraciones de sustrato. Las concentraciones de sustrato (ABTS y 2,6-dimetoxifenol) fueron de 0.01, 0.03, 0.06, 0.08, 0.1, 0.3, 0.6, 1 y 2 mM.

El ajuste de los datos al modelo de Michaelis-Menten con y sin inhibición por sustrato, para determinar los parámetros cinéticos aparentes, se realizó mediante la minimización de la suma de errores cuadrados, por el método multidimensional de Newton Rapson, presente en la rutina solver del programa Excel.

El modelo de Michaelis-Menten, es:

$$v_0 = \frac{V_{\text{máx}} S}{K_M + S} \quad (3)$$

El modelo de inhibición por sustrato, es:

$$v_0 = \frac{V_{\text{máx}} S}{K_M + S + S^2/k_i} \quad (4)$$

donde:

$v_0$  = velocidad inicial

$V_{\text{máx}}$  = Velocidad máxima

$S$  = Concentración de sustrato

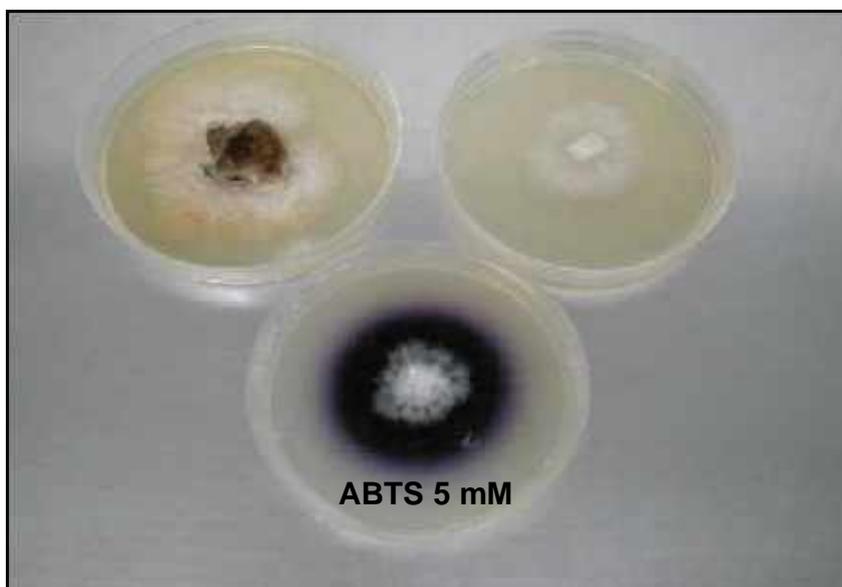
$K_M$  = Constante de Michaelis-Menten (Afinidad que tiene la enzima por el sustrato)

$K_i$  = Constante de inhibición

## 6. Resultados

### 6.1. Aislamiento y selección de macromicetos productores de lacasas

Se colectaron cuerpos fructíferos crecidos sobre madera y fibra de henequén en estado de descomposición a temperaturas cercanas a los 40°C. Para aislar los hongos se usaron medios de extracto de malta con 6 ppm de benlato que inhibió el crecimiento de los hongos deuteromicetos como es el caso de los *Aspergillus* y *Penicillium* y 20 U/mL de ampicilina para evitar el crecimiento de las bacterias. Se aislaron y purificaron 5 hongos a partir de las muestras de madera y 1 de la fibra de henequén, los cuales crecieron a 40°C y produjeron actividad ligninolítica en placas. La cual, fue identificada por los halos de oxidación de ABTS 5 mM. A partir de estos 6 hongos se seleccionó un hongo de la madera, nombrado EUM1 (Figura 2), debido a que presentó un mayor halo de oxidación de ABTS después de 48 horas de crecimiento en placa con respecto a los demás. En la figura 2 se observa el cuerpo fructífero aislado (arriba a la izquierda), el micelio propagado (arriba a la derecha) y el halo de oxidación del sustrato de lacasa ABTS (abajo).



**Figura 2.** Hongo EUM1 en medios de extracto de malta al 2 %. Incubado a 40°C durante 4 días.

## **6.2. Producción de lacasas**

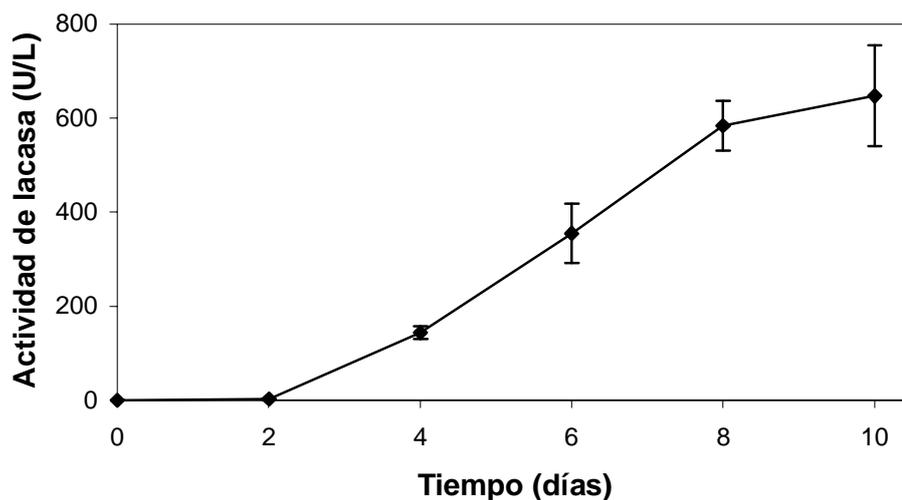
La producción de lacasas por el hongo EUM1 se realizó en un medio complejo de Bran Flakes, con base en la referencia de Pickard y col. (1999), quienes evaluaron la producción de enzimas ligninolíticas con diferentes hongos de la pudrición blanca en medios con glucosa, extracto de malta y extracto de levadura, y medios formulados con base en salvado de trigo (Bran Flakes) o avena. En estos experimentos se observó que la producción de lacasas en el medio compuesto por bran flakes fue aproximadamente 25 veces mayor con respecto al medio control (glucosa al 1%, extracto de malta al 0.35% y extracto de levadura al 0.25%).

En el caso del hongo EUM1 la producción de lacasas a los 10 días de cultivo fue de 680 U/L (Figura 3), 35 veces más en comparación con la producción en un medio control de extracto de malta. Este aumento de la actividad de lacasa podría ser debido a que el Bran Flakes es rico en fibra, la cual está constituida por lignina. La producción de lacasas en este medio presentó variaciones probablemente debido al lote del cereal comercial Bran Flakes de Kellogg's y al inóculo que no fue homogéneo. Sin embargo, en todos los casos la producción de lacasas fue considerablemente mayor con Bran Flakes, con respecto al control extracto de malta al 2%. Es de notarse que la curva de actividad (Figura 3) se asemeja a una curva de crecimiento logístico. Aunque no fue posible medir la biomasa por la naturaleza semisólida y biodegradable del sustrato.

## **6.3. Precipitación con sulfato de amonio**

Antes del fraccionamiento con sulfato de amonio se congeló el extracto crudo, con el fin de eliminar por filtración polisacáridos insolubles que precipitan al descongelar el extracto crudo. De esta manera se evitaron interferencias con la precipitación con sulfato de amonio, ya que en experimentos anteriores se observó que al no hacer

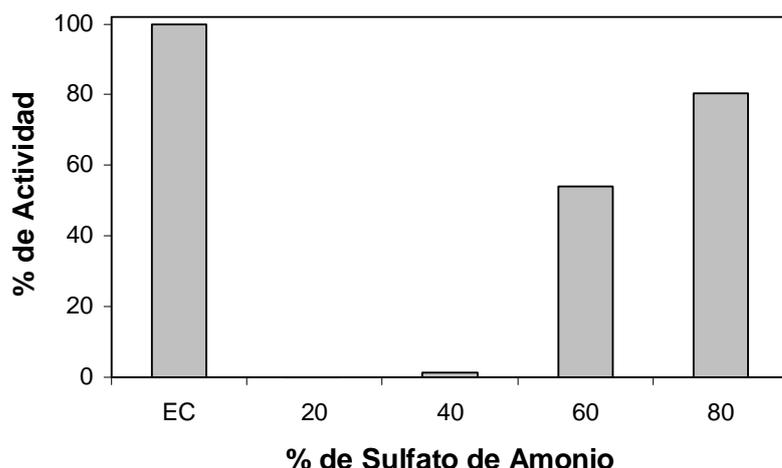
este paso se obtenían rendimientos de alrededor del 50 %, lo cual representó un porcentaje muy bajo para ser la primera etapa de purificación.



**Figura 3.** Producción de lacasas por el hongo EUM1 en medio de Bran Flakes al 3 % a pH 6, 40°C y 150 rpm.

Los resultados obtenidos en la precipitación con sulfato de amonio, mostraron el mayor rendimiento de actividad de lacasa al utilizar un 80 % de saturación con respecto al extracto crudo, el cual fue de 80 % (figura 4). Este rendimiento fue 26.5 % mayor comparado con los resultados de la precipitación con sulfato de amonio del extracto crudo de *Rigidosporus lignosus* bajo las mismas condiciones (Cambria *et al.* 2000). Cuando se evaluaron concentraciones de saturación de sulfato de amonio de 20, 40 y 60 % se determinó que precipitaron proteínas con aproximadamente un 0.15, 5 y 65 % de la actividad total de lacasa en el extracto crudo respectivamente (figura 4). Por lo tanto, para el primer paso de purificación del extracto crudo, con sulfato de amonio se realizó inicialmente una precipitación con 40 % de saturación, en donde se eliminó el precipitado que contenía proteínas contaminantes y alrededor del 5% de actividad de lacasa total y posteriormente, al sobrenadante se le adicionó

sulfato de amonio para llevarlo al 80 % de saturación. En este segundo fraccionamiento se obtuvo un rendimiento de 93.35 % (Tabla 4) en el precipitado resuspendido en amortiguador de acetatos 0.1 M, pH 5, y dializado contra el mismo amortiguador, en donde se obtuvo un volumen final de 10 mL.



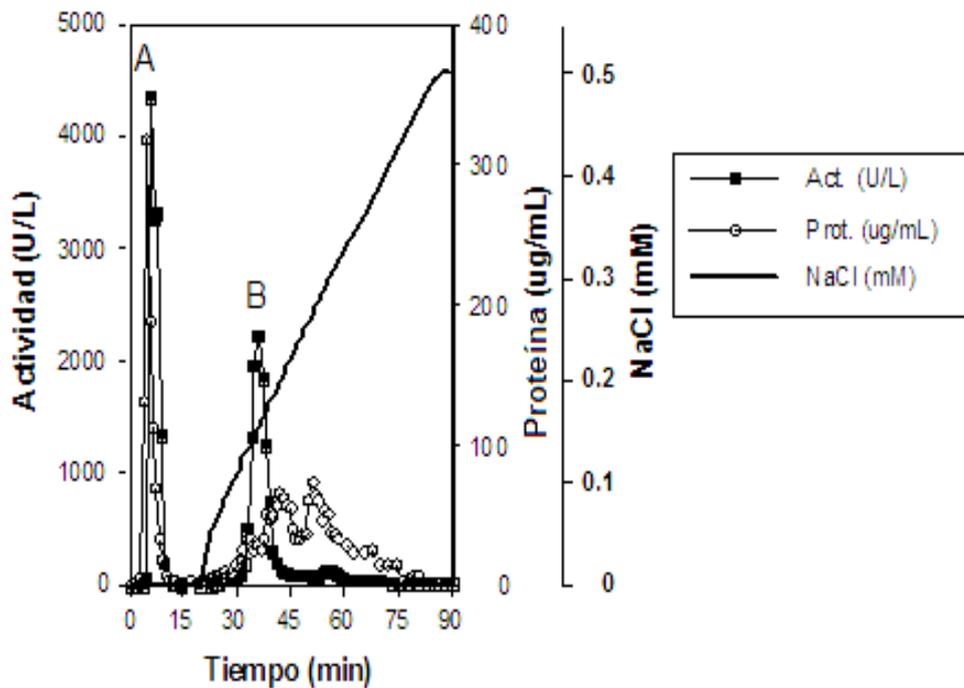
**Figura 4.** Porcentajes de actividad de lacasa de los precipitados a diferentes concentraciones de saturación de sulfato de amonio, obtenidos a partir del extracto crudo (EC).

#### 6.4. Cromatografía de intercambio aniónico

El precipitado del extracto crudo con el 80 % de saturación de sulfato de amonio resuspendido y dializado en amortiguador de acetatos (sección anterior), se inyectó en la columna de intercambio aniónico, en donde se lograron dos separaciones que presentaron actividad de lacasa. Estas fueron nombradas lacasa 1 y lacasa 2, por el orden en que salieron de la columna de intercambio aniónico. La lacasa 1 tuvo una actividad de 4,500 U/L (14.11 U/mg) y un tiempo de retención de 8 minutos, en el que aun no había comenzado el gradiente de cloruro de sodio. Esto indicó que la enzima

no fue afín al soporte Q, con amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.3. Por otro lado la lacasa 2 con una actividad de 2,200 U/L (82.53 U/mg), fue separada con 0.15 M de cloruro de sodio, en un tiempo de retención de 36 minutos (Figura 5).

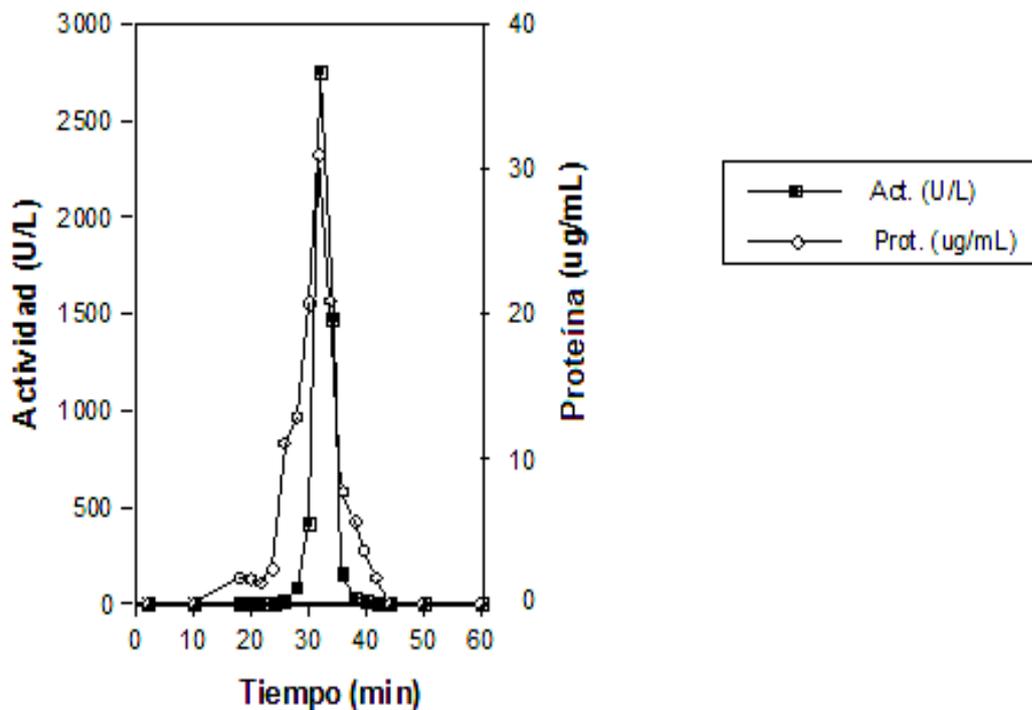
Las proteínas se separan mediante el intercambio aniónico dependiendo de sus cargas negativas que las rodean (fuerza iónica). Las cuales, aumentan al alejarse de su pI, por lo tanto la lacasa 1 salió primero de la columna porque tiene menos cargas externas que la lacasa 2, es decir el pI de la lacasa 2 estuvo más lejos del pH del amortiguador de separación (Tris-HCl pH 7.3). Este resultado, se confirmó con un isoelectroenfoque preliminar, en donde se obtuvieron los pI de las lacasas 1 y 2, los cuales fueron de 6 y 4 respectivamente. En este paso de purificación se eliminaron proteínas contaminantes, que no tuvieron actividad de lacasa (Figura 5). Las fracciones colectadas correspondientes a los picos de las lacasas 1 y 2, se recolectaron, y se determinó, en cada uno, la actividad en presencia de disolventes al 20%, la lacasa 1 no tuvo actividad, mientras que la lacasa 2 conservó el 81 % de su actividad con etanol y el 65 % con acetonitrilo, con base a esta propiedad de resistencia a disolventes, se seleccionó a la lacasa 2 para continuar el proceso de purificación y caracterización. Esta propiedad representa una ventaja para aplicaciones futuras en biotransformación de compuestos aromáticos y en la eliminación de hidrocarburos aromáticos policíclicos.



**Figura 5.** Perfil de separación de proteína y de las enzimas lacasa 1 (A) y lacasa 2 (B) producidas por el hongo EUM1, en cromatografía de intercambio aniónico. Las fases móviles fueron: amortiguador Tris-HCl, pH 7.3, 50 mM y el mismo amortiguador con 0.5 M de NaCl, para hacer un gradiente de 0 a 100 %, a un flujo de 5 mL/min.

### 6.5. Cromatografía por filtración en gel

En este nuevo paso de purificación de la lacasa 2, se obtuvo un pico de 2,800 U/L (75.67 U/mg) de actividad a los 16 mL de separación. En este mismo volumen salió el pico de proteína (37  $\mu\text{g/mL}$ ), el cual no fue igual de definido que la actividad, lo que indica que aun pueden haber proteínas contaminantes (Figura 6). Sin embargo con el volumen de separación de 16 mL, se estimó el peso molecular aparente de la lacasa nativa, el cual fue de aproximadamente 62 KDa (Anexo 2), y se encuentra dentro del rango de peso molecular de las lacasas extracelulares, que están entre 60 a 80 KDa (Thurston, 1994).



**Figura 6.** Perfil de separación de proteína y actividad de la enzima lacasa producida por el hongo EUM1. Las fase móvil fue: amortiguador de acetatos 50 mM, pH 5, con 0.15 M de NaCl, a un flujo de 0.5 mL/min.

### 6.6. Isoelectroenfoque

La lacasa 2 fue analizada en un isoelectroenfoque para determinar su punto isoeléctrico que fue de 4. Posteriormente, se llevó a cabo una electroforesis de proteínas nativas en donde se realizaron zimogramas utilizando ABTS como sustrato. Los resultados mostraron la aparición de 2 bandas de oxidación del ABTS que corresponden a isoformas que no pudieron ser separadas durante el isoelectroenfoque. Esto pudo ser debido a que se usaron amfolitos con un amplio rango de pH (3 a 10) y los pI de las isoenzimas son parecidos; como es el caso de las lacasas producidas por *Rigidoporus lignosus* (Cambria et al. 2000) y de *Pleurotus*

*eryngii* (Muñoz *et al.* 1997) que ambos tienen dos isoformas con pI de 3.2 y 3.25 y de 4.2 y 4.1, respectivamente.



**Figura 7.** Zimograma de las lacasas parcialmente purificadas, con ABTS como sustrato.

#### **6.7. Resumen de la purificación parcial de la lacasa 2 producida por el hongo silvestre EUM1**

Se identificaron dos bandas con actividad de lacasa, lacasa 1 y lacasa 2. Después de 4 etapas de purificación a partir de 1 L de extracto crudo, se obtuvo un volumen final de 35 mL con el 14.1 % de rendimiento y un factor de purificación de 21.1 veces (Tabla 4). Posteriormente se determinó con un isoelectroenfoque que la lacasa 2 presenta a su vez dos isoformas y que a diferencia de la lacasa 1 estas son resistentes a disolventes orgánicos. Se estimó el peso molecular aparente de las isoenzimas lacasas (lacasa 2) desnaturalizadas (Anexo 3) el cual fue aproximadamente de 77.37 KDa, (Figura 8).

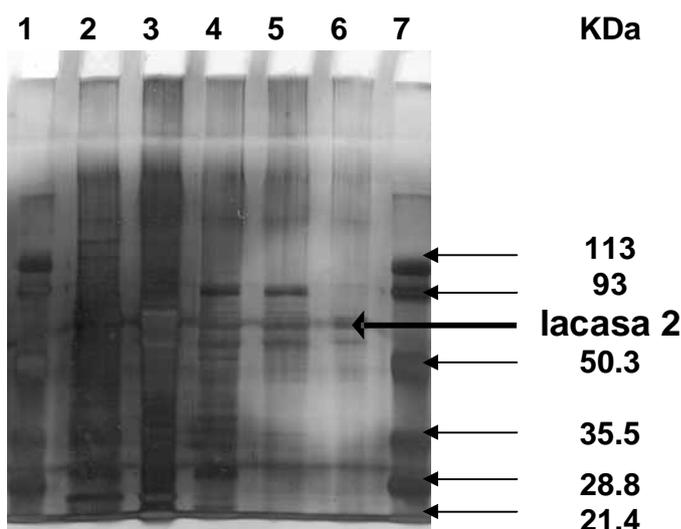
A partir de las fracciones colectadas en isoelectroenfoque (Rotofor Cell) se realizó la caracterización de las isoenzimas lacasas parcialmente purificadas (lacasa 2).

**Tabla 4.** Etapas de purificación de la lacasa 2 producida por el hongo silvestre EUM1

Etapa de purificación	Proteína		Actividad	Actividad	Y (%)	X
	Volumen (mL)	Total (mg)	Total (U)	Específica (U/mg)		
Extracto crudo	1000.0	86.2	197.7	2.2	100.0	1.0
Precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10.2	47.5	184.5	3.8	93.3	1.7
Intercambio iónico	50.0	1.3	49.1	37.7	24.8	17.1
Ultrafiltración	4.9	0.6	31.4	52.3	15.9	23.7
Filtración en gel	35.0	0.6	28.0	46.6	14.1	21.1

Y= rendimiento

X= factor de purificación

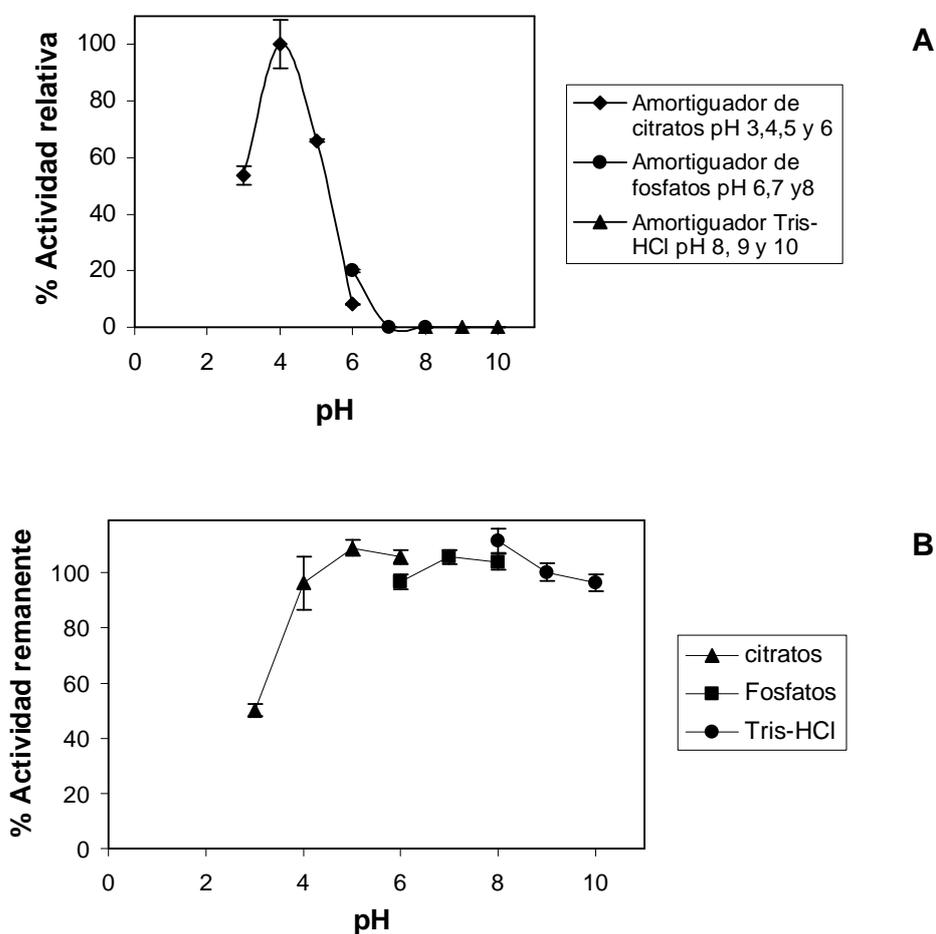


**Figura 8.** Gel de proteína revelado con plata, de las etapas de purificación. 1 y 7) Marcador de peso molecular, 2) Extracto crudo, 3) Precipitación con sulfato de amonio, 4) Intercambio aniónico, 5) Filtración en gel y 6) Isoelectroenfoque.

### 6.8. Determinación de pH óptimo y estabilidad al pH de la enzima lacasa 2

Las lacasas parcialmente purificadas tuvieron un pH óptimo de 4 (Figura 9A), el cual se encuentra dentro del rango de valores óptimos (3 a 5) que se presentan en

lacasas producidas por hongos basidiomicetos (Bollag y Leonowicz, 1984). A pH de 3 y 5 conservaron el 55 y 65 % de su actividad. Sin embargo, fueron estables durante 1 hora en un amplio rango de pH entre 4 y 10, conservando aproximadamente el 100 % de su actividad (Figura 9B). Esto representa una ventaja en comparación con otras lacasas como por ejemplo la producida por *Chaetomium thermophilium* que es completamente estable a pH 6, mientras que a pH 5, 8, 9 y 10 conserva aproximadamente el 60 % de su actividad (Chefetz *et al.* 1998) ó el como el caso de *Phanerochaete flavido-alba* que solo es estable a pH 5, y a pH 3 y 4 disminuye un 50 % de su actividad (Pérez *et al.* 1996).

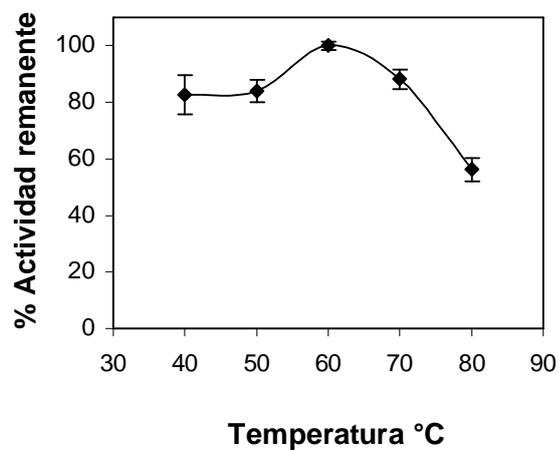


**Figura 9.** Efecto del pH en las lacasas parcialmente purificadas producidas por el hongo silvestre EUM1. pH óptimo (A) y estabilidad al pH (B). La actividad de lacasa se determinó con 0.5 mM de ABTS.

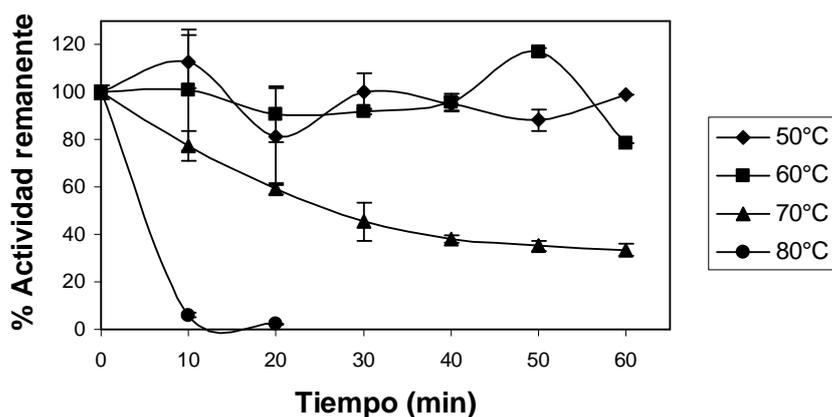
## 6.9. Determinación de la temperatura óptima y estabilidad de la actividad de lacasa a la temperatura

Las lacasas producidas por el hongo termofílico EUM1 tuvieron una temperatura óptima de 60°C (Figura 10A) al igual que el hongo termofílico *Chaetomium thermophilium* (Chefetz *et al.* 1998). En la figura 10 se observa que a 40, 50 y 70°C conservaron el 80 % de su actividad (Figura 10A). Aunque la lacasa producida por *Pleurotus eryngii* (Muñoz *et al.* 1997) tiene una temperatura óptima 5°C mayor que el hongo EUM1, tiene la desventaja de que sólo es estable a 45°C durante 10 minutos y a 50°C disminuye un 50 % su actividad después de 30 minutos. Las lacasas del hongo EUM1 son estables a 50 y 60°C durante 1 hora; a 70°C conservaron el 35 % de la actividad remanente después de una hora y a 80°C sólo se detectó el 1 % en la actividad después de 10 minutos (Figura 10B). Esta propiedad de termoestabilidad, representó una ventaja en el proceso de purificación, ya que se realizó a temperatura ambiente, y no hubo necesidad de mantener las lacasas en refrigeración, como es el caso de la mayoría de las enzimas producidas por hongos que se han purificado. Con respecto a la lacasa de *Chaetomium thermophilium*, es estable a 50 y 60°C durante 1 hora (Chefetz *et al.* 1998) y la lacasa de *Myceliophthora thermophila* es estable a 60°C en el mismo tiempo (Berka *et al.* 1997).

Debido a que las isoenzimas lacasas (lacasa 2) producidas por el hongo EUM1 son termoestables, se podrían usar en procesos industriales que se realicen a temperaturas elevadas, como es el caso del biopulpeo del papel y el desteñido de la mezclilla en la industria textil, el cual se lleva a cabo a temperaturas mayores de 60°C.



A



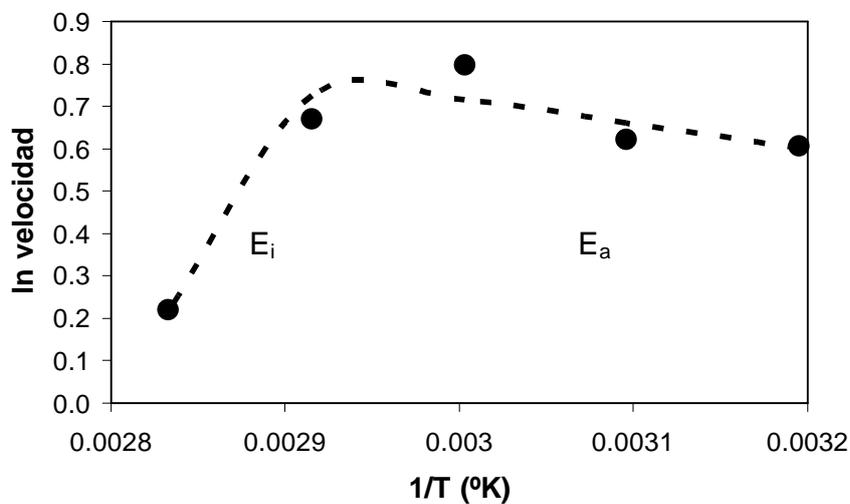
B

**Figura 10.** Efecto de la temperatura de las lacasas parcialmente purificadas producidas por el hongo silvestre EUM1. Temperatura óptima (A) y estabilidad a la temperatura (B). La actividad de lacasa se determinó con 0.5 mM de ABTS, en amortiguador de citratos pH 4, 50 mM.

### 6.10. Cálculo de la Energía de activación

La energía de activación ( $E_a$ ), indica la cantidad de calorías necesarias para incrementar la actividad catalítica de un mol de enzima, por tal motivo esta se calculó construyendo un gráfico Arrhenius (figura 11). Ver ecuación 2 en la sección 2.8.

La energía de activación de las enzimas lacasa 2 fue de -1,200 cal/mol, menor que la lacasa de Novo Nordisk la cual fue de -14,581 cal/mol (López, 2003), por lo tanto esta última es más activa al ir incrementando la temperatura. La energía de inactivación para la lacasa 2 fue de 65,401 cal/mol (Tabla 5).



**Figura 11.** Gráfico de Arrhenius. La pendiente  $E_a$  es la energía de activación y la  $E_i$  la energía de inactivación. Los datos experimentales se ajustaron al modelo de Arrhenius con el programa de solver.

La constante  $k_c^*$  (constante para calcular la  $k_{cat}$  a una temperatura dada) de la lacasa de Novo, fue 10 ordenes de magnitud mayor, que la de la lacasa 2 producida por el hongo EUM 1. Sin embargo la  $k_{cat}$  de la lacasa 2 fue de  $4239 \text{ min}^{-1}$ , 6 veces mayor comparada con la de Novo que fue de  $713 \text{ min}^{-1}$  (Villaseñor, 2003), por lo tanto este resultado, representó una ventaja para la enzima lacasa 2, ya que a  $40^\circ\text{C}$  pudo transformar mayor cantidad de moles sustrato (ABTS) a producto. Aunque su energía de activación ( $E_a$ ), su constante para calcular la  $k_i$  a una temperatura dada ( $k_i^*$ ) y su energía de inactivación ( $E_i$ ) no sean favorables para las lacasas producidas

por el hongo EUM 1 (lacasa 2). Otra ventaja relevante de la lacasa 2, fue que tuvo un  $K_M$  de 0.0125 mM, 16 veces más afín al ABTS que la lacasa de Novo (Tabla 5). Estos resultados demostraron, que las lacasas producidas por el hongo EUM 1, tienen propiedades interesantes, las cuales, podrían ser viables aplicadas en la industria.

La  $k_c^*$  y la  $k_i^*$ , son constantes arbitrarias utilizadas en el modelo de Arrhenius para calcular la energía de activación e inactivación a diferentes temperaturas.

**Tabla 5.** Comparación de constantes cinéticas de la lacasa producida por el hongo EUM1 contra la lacasa de Novo a 40°C.

Lacasa	$k_c^*$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$E_a$ (cal/mol)	$k_i^*$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$E_i$ (cal/mol)	$K_M$ (mM)
<b>Novo</b>	$1.17 \times 10^{13}$	-14 581	$39.28 \times 10^3$	34 143	0.2
<b>EUM 1</b>	$8.20 \times 10^3$	-1 200	$447.34 \times 10^3$	65 401	0.0125

$k_c^*$ = constante para calcular la  $k_{cat}$  a una temperatura dada

$E_c$ = Energía de activación

$k_i^*$ = constate para calcular la  $k_i$  a una temperatura dada

$E_i$ = Energía de inactivación

$K_M$ = Afinidad que tiene la enzima por el sustrato

### 6.11. Determinación de los parámetros cinéticos

A las lacasas parcialmente purificadas se les determinó actividad con diferentes concentraciones de ABTS y 2,6-DMP como sustratos. Las velocidades iniciales al ser graficadas se ajustaron al modelo de Michaelis – Menten con ambos sustratos (ABTS y 2,6-DMP) y en algunas ocasiones se presentó inhibición por sustrato (Figuras 12 y 13).

Los parámetros cinéticos aparentes de la lacasa 2 dependieron del sustrato y de la temperatura (Tablas 5 y 6). El valor de la  $K_{M_{ap}}$  con ABTS incrementó al incrementar la temperatura, en cambio con 2,6-DMP disminuyó al incrementar la

temperatura; es decir mientras con ABTS la lacasa disminuyó su afinidad al incrementar la temperatura, con 2,6 DMP sucedió lo contrario, con respecto a la  $V_{max}$   $ap$ , como la  $k_{cat}$   $ap$  con ABTS aumenta al incrementar la temperatura, pero con 2,6-DMP sucedió lo contrario, el  $k_i$   $ap$  a 40 y 60°C con 2,6-DMP no fue determinado debido a que en estos dos casos no presentó inhibición (Tablas 5 y 6).

**Tabla 6.** Parámetros cinéticos aparentes de las lacasas parcialmente purificadas a diferentes temperaturas, con ABTS como sustrato.

<b>Parámetros cinéticos aparentes</b>				
<b>Temperatura °C</b>	<b><math>K_M</math> (mM)</b>	<b><math>V_{max}</math> (U/L)</b>	<b><math>k_{cat}</math> (<math>min^{-1}</math>)</b>	<b><math>K_I</math> (mM)</b>
<b>20</b>	0.010	1.22	3402	6.33
<b>40</b>	0.0125	1.52	4239	12.64
<b>60</b>	0.015	1.82	5076	18.95

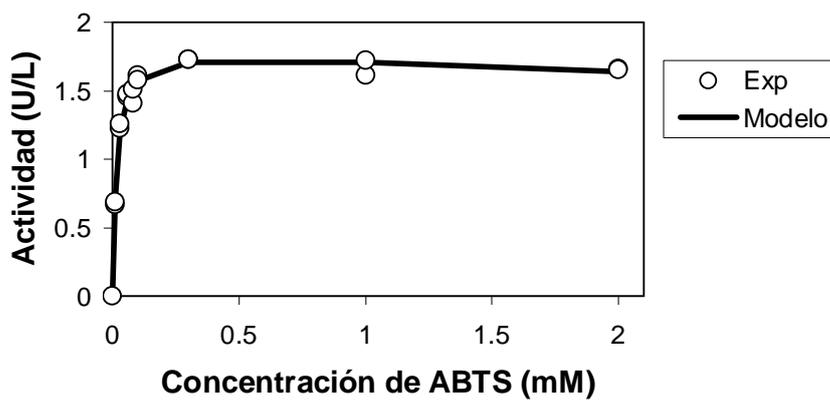
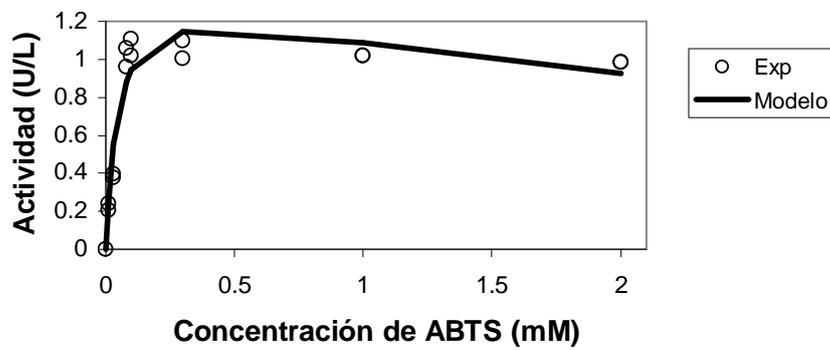
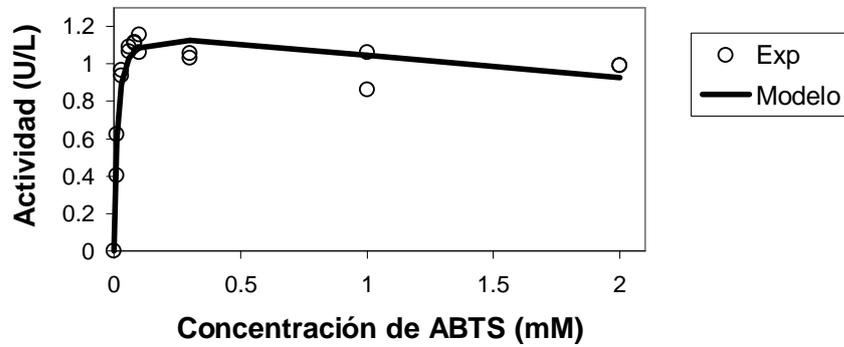
U =  $\mu$ mol de ABTS oxidado por minuto

**Tabla 7.** Parámetros cinéticos aparentes de las lacasas parcialmente purificadas a diferentes temperaturas, con 2,6-DMP como sustrato.

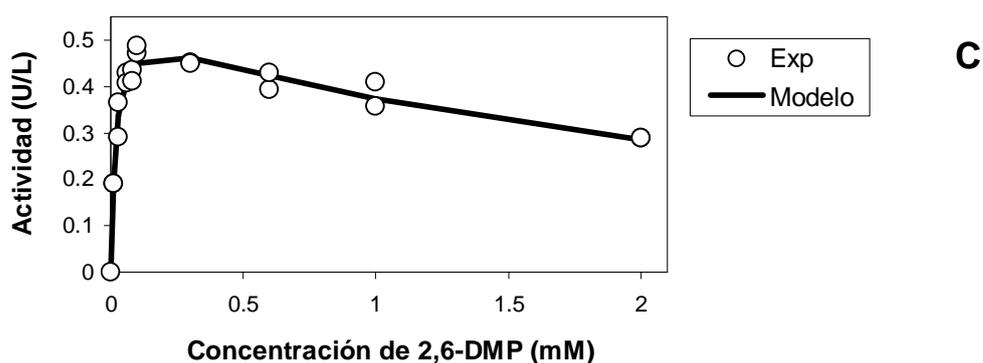
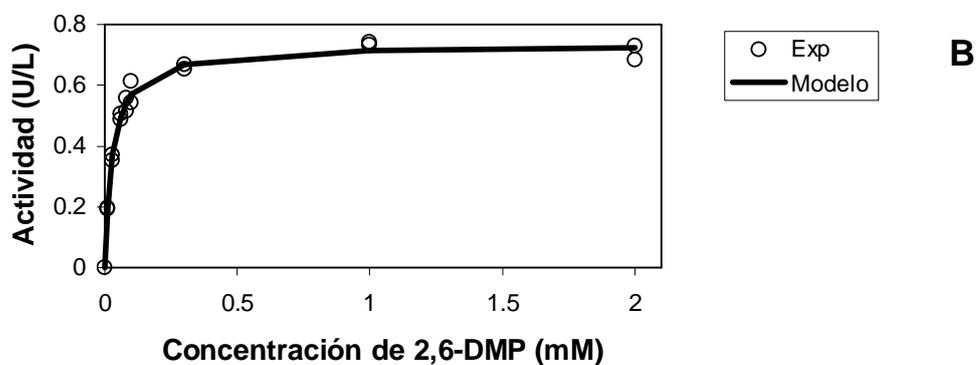
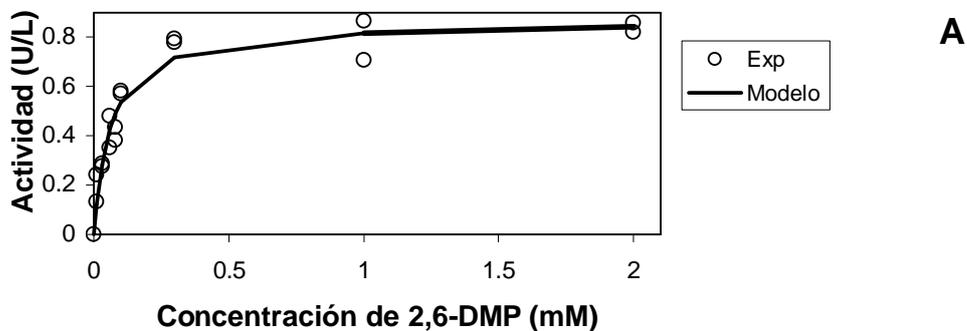
<b>Parámetros cinéticos aparentes</b>				
<b>Temperatura °C</b>	<b><math>K_M</math> (mM)</b>	<b><math>V_{max}</math> (U/L)</b>	<b><math>k_{cat}</math> (<math>min^{-1}</math>)</b>	<b><math>K_I</math> (mM)</b>
<b>20</b>	0.061	0.86	2398	ND
<b>40</b>	0.029	0.73	2036	ND
<b>60</b>	0.019	0.55	1534	2.12

U =  $\mu$ mol de 2,6-DMP oxidado por minuto

ND = No determinado



**Figura 12.** Cinéticas de Michaelis-Menten con ABTS como sustrato de las lacasas producidas por el hongo EUM1 parcialmente purificadas a diferentes temperaturas A) 20°C, B) 40°C y C) 60°C. Las cinéticas presentaron inhibición por sustrato.

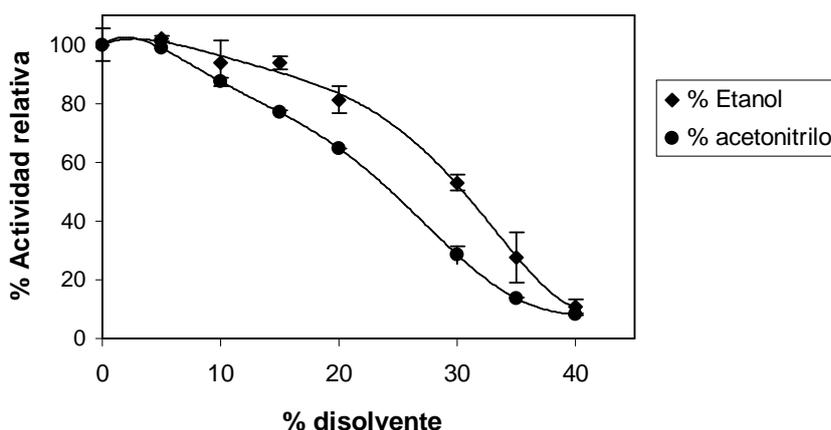


**Figura 13.** Cinética de Michaelis-Menten con 2,6-DMP como sustrato de las lacasas producidas por el hongo EUM1 parcialmente purificadas a diferentes temperaturas A) 20°C, B) 40°C y C) 60°C. Las cinética C) presentó inhibición por sustrato.

## 6.12. Efecto de disolventes sobre la actividad de la lacasa

En la figura 14 se observa que las lacasas producidas por el hongo EUM1, conservan aproximadamente el 80 y 65 % de su actividad con 20 % de etanol, y acetonitrilo respectivamente; y disminuyeron la actividad al 10%, aproximadamente, al aumentar la concentración de disolvente a 40 %.

Una ventaja de que las lacasas del hongo EUM1 conserven el 80 y 65 % de su actividad con etanol y acetonitrilo, es que las enzimas podrían ser utilizadas con diferentes sustratos que sean parcialmente solubles en agua y que la lacasa los oxide directamente sin necesidad del mediador.



**Figura 14.** Actividad de lacasas del hongo EUM1 con diferentes concentraciones de etanol y acetonitrilo

Las enzimas lacasa 2 fueron más estables durante una hora con etanol al 10 % que con acetonitrilo a la misma concentración, ya que con etanol conservaron el 52.24 % de su actividad remanente. Sin embargo al 20 % de disolvente ocurrió lo contrario, debido a que con acetonitrilo conservó el 31.08 % de actividad remanente

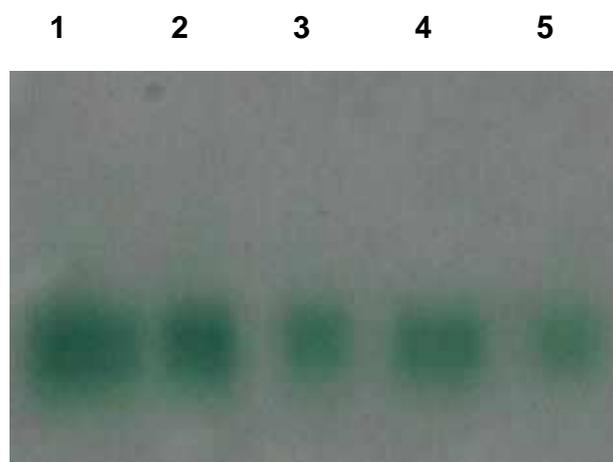
(Tabla 7). Se observó que en presencia de 10 y 20 % de acetonitrilo las actividades de las enzimas lacasa 2 fueron igual de estables, ya que conservan aproximadamente el 30 % de su actividad remanente.

**Tabla 8.** Estabilidad a los disolventes de la lacasas parcialmente purificadas.

	% Etanol			% Acetonitrilo		
	10	20	30	10	20	30
<b>% de actividad remanente</b>	52.24	9.96	0	30.50	31.08	0

El valor del % de actividad remanente fue obtenido después de incubar durante una hora las enzimas lacasas, con disolvente.

Las dos isoformas caracterizadas con el nombre de lacasa 2, fueron resistentes a la temperatura y a los disolventes etanol y acetonitrilo, ya que al hacer un zimograma después de incubar las enzimas durante una hora diferentes temperaturas y concentraciones de disolventes, aparecieron las dos bandas al ser oxidado el ABTS, por lo tanto no tuvieron efecto desnaturizante en las enzimas. En la figura 15 se observan las dos bandas después de que las enzimas lacasa 2 fueron incubada durante 1 hora a 60°C con 10 y 20 % de etanol y acetonitrilo, se hicieron experimentos a 70 y 80°C y a 30, 40 y 50 % de dilsovente, pero bajo estas condiciones no hubo actividad en los zimogramas debido a que se desnaturizaron las dos isoformas de lacasas. Por la tanto las dos enzimas son termoresistentes a 60°C en presencia de 10 y 20 % de disolvente.



**Figura. 15.** Zimograma de actividad con ABTS como sustrato, después de haber incubado las muestras a diferentes temperaturas y diferentes concentraciones de disolventes, durante 1 hora. **1)** Control (Lacasa 2 sin incubar y sin disolvente), **2)** 10 % de etano y 60°C, **3)** 20 % de etanol y 60°C, **4)** 10 % de acetonitrilo y 60°C y **5)** 20 % de acetonitrilo y 60°C.

## 7. Discusión

Para realizar este trabajo primero fue necesario seleccionar un hongo que produjera enzimas lacasas extracelulares termoresistentes; por lo tanto, para llevar a cabo esta selección, dos hongos termofílicos silvestres (MA2M2 y HEB8) productores de ligninasas, aislados a partir de desechos lignocelulósicos en Mérida, Yuc. (Medina, 2000), se sembraron en medios sólidos de extracto de malta al 2 % con ABTS como sustrato de la enzima lacasa, pero al cuarto día de cultivo se empezó a observar una ligera coloración verde (ABTS oxidado) en el centro del reverso de la colonia. Esto indica que las lacasas que producen estos dos *Penicillium* probablemente están asociadas al micelio o a la esporulación. Después de aproximadamente 8 días de cultivo se observó una lacasa al parecer extracelular que oxidó el ABTS y se difundió en el medio de cultivo, lo cual sugiere la expresión de varios genes que codifican para la lacasa en los *Penicillium*. Debido a que las lacasas extracelulares de los *Penicillium* se produjeron después de 8 días, fue necesario hacer un nuevo aislamiento de hongos basidiomicetos termofílicos productores de lacasas extracelulares en Mérida, Yucatán. De esta manera se aislaron 6 hongos que fueron capaces de crecer a 40°C en medios de extracto de malta y de oxidar el ABTS en placas que contenían el mismo medio de aislamiento. De esta colección se seleccionó el hongo EUM1, debido a que presentó poco crecimiento y halos más grandes de ABTS oxidado (Figura 2).

A partir del hongo EUM1 se llevó a cabo el proceso de producción de enzimas lacasas en un medio de bran flakes al 3 %, ya que Pickard y col. (1999) aumentaron aproximadamente 100 veces la producción de lacasas a partir de *Corioloopsis gallica*, en comparación de su medio control, que estaba compuesto por glucosa al 1 %, extracto de malta al 3.5 % y extracto de levadura al 2.5 %. En este trabajo después de 10 días de cultivo se aumentó 25 veces la producción de las enzimas lacasas con respecto a un medio de extracto de malta al 2 % (control). Esto posiblemente ocurrió debido a que el Bran flakes está constituido por ligninas, las cuales podrían estar

induciendo la expresión de genes que codifican para lacasas, por la presencia de diversos compuestos fenólicos aún no caracterizados. Cabe señalar que la lignina esta compuesta principalmente por tres alcoholes aromáticos: *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico (Sariaslani, 1989) los cuales podrían estar actuando como inductores de los diferentes genes del hongo EUM1 que codifican para lacasas, y también este cereal contiene vitaminas y minerales que pueden favorecer el crecimiento del hongo, por lo tanto es un buen medio para obtener altos rendimientos de la enzima lacasa de interés.

En el proceso de purificación se observó que el hongo EUM1 produjo tres lacasas, la lacasa 1 (pI = 6) y la lacasa 2 (pI = 4) que fueron separadas durante la cromatografía de intercambio aniónico. En la lacasa 2 se identificaron dos isoenzimas, que no se pudieron separar con los métodos de purificación usados debido a que comparten características moleculares muy parecidas como su pI de aproximadamente 4 y su peso molecular de aproximadamente 77.37 KDa. Por lo general es común encontrar en un hongo isoenzimas de lacasas con un pI similar como es el caso de *Ridoporus lignosus* (Cambria *et al.* 2000) y de *Pleurotus eryngii* (Muñoz *et al.* 1997) que ambos tienen dos isoformas con un pI de 3.2 y 3.25 y de 4.2 y 4.1, respectivamente. Las isoenzimas lacasa 2 resultaron ser de gran interés ya que fueron resistentes a la temperatura y a los disolventes orgánicos (etanol y acetonitrilo), propiedades buscadas en enzimas industriales. Junto con estas dos enzimas se observaron en los geles de electroforesis, al menos 4 bandas de proteínas contaminantes que no lograron eliminarse (Figura 8).

Aunque las isoenzimas lacasa 2 tuvieron un pH óptimo de 4, fueron estables durante una hora en un amplio rango de pH entre 4 y 10 conservando aproximadamente el 100 % de su actividad. Esta estabilidad al pH representa una ventaja si se compara con las lacasas producidas por los hongos *Phanerochaete flavido-alba* (Pérez *et al.* 1996), *Chaetomium thermophilum* (Chefetz *et al.* 1998) y

*Ridoporus lignosus* (Cambria *et al.* 2000), que sólo conservan el 100 % de su actividad a pH 5, 6 y 7 después de una hora.

Los parámetros cinéticos aparentes de la lacasa 2 se determinaron a 20°C para poder compararlos con los de la lacasa que produce *Myceliophthora thermophila* (Li *et al.* 1999), la cual es producida industrialmente de manera recombinante a partir de *Aspergillus oryzae* (Berka *et al.* 1997) por Novo Nordisk. En este experimento la lacasa 2 con un  $K_{M\ ap}$  de 0.01 mM y una  $k_{cat}$  de 3402  $\text{min}^{-1}$  (Tabla 5) resultó ser aproximadamente 10 veces más afin al ABTS y 8 veces más veloz que la lacasa de *M. thermophila* (Li *et al.* 1999). A 40°C se determinaron los parámetros cinéticos por ser la temperatura a la cual crece el hongo EUM1 y a 60°C por ser la temperatura óptima de la lacasa 2 (Figura 10). En el caso del ABTS el  $K_{M\ ap}$  fue de 0.046 y 0.015 mM y la  $k_{cat}$  de 3904 y 5076  $\text{min}^{-1}$  a 40 y 60°C respectivamente. Con 2,6-DMP a 60°C tuvo un  $K_{M\ ap}$  de 0.019 aproximadamente 5 veces menor comparado con la lacasa de *M. thermophila* (Li *et al.* 1999).

En la actualidad el uso de enzimas con disolventes orgánicos ha revolucionado el desarrollo de la biotecnología, debido a que se han sustituido procesos de síntesis y oxidación química por biocatálisis en medios no acuosos. En este trabajo las isoenzimas lacasa 2 producidas por el hongo silvestre EUM1 fueron resistentes durante una hora con 10 % de disolventes. Conservando aproximadamente el 50 y 30 % de su actividad remanente con etanol y acetonitrilo. Esto resultó muy interesante, ya que sustratos de interés industrial solubles en medios semiacuosos, podrían ser probados estas enzimas, a temperaturas superiores a los 50°C.

Es de notarse que en este trabajo se utilizaron muy pocas cepas de origen tropical. Pero se lograron resultados iguales o mejores a los obtenidos por una empresa industrial de muchos recursos, como es Novo Nordisk. Esto sugiere que la biodiversidad tropical puede ser una fuente accesible e importante de basidiomicetos

productores de lacasas de interés industrial y que muy probablemente, se puedan encontrar lacasas de cepas extremófilas mucho mejores que las ahora estudiadas.

Por tanto, el estudio sistemático de la biodiversidad tropical puede ofrecer nuevos nichos de producción de enzimas y esta frontera debería ser aprovechada por empresas nacionales capaces de aislar, caracterizar y, en un futuro, clonar genes de nuevas lacasas para su aprovechamiento comercial.

## 8. Resumen de resultados

- El Hongo termofílico EUM1 aislado a partir de madera, produjo halos más grandes de oxidación de ABTS en placa a las 48 horas de crecimiento, a comparación de 5 hongos termofílicos lignicelulósicos.
- La actividad de lacasas producida a los 10 días de cultivo en medio de bran flakes al 3%, por el hongo EUM1 fue de aproximadamente 650 U/L, 35 veces mayor comparada con la actividad producida en el medio de extracto de malta.
- La cromatografía de intercambio aniónico separó dos fracciones con actividad nombradas lacasa 1 (pl 6) y lacasa 2 (pl 4), esta última fue termoestable y resistente a acetonitrilo y etanol al 20 %.
- La fracción de intercambio iónico que tiene actividad con acetonitrilo y etanol (lacasa 2), son dos lacasas.
- Los pI de las isoenzimas lacasas (lacasa 2) fueron aproximadamente de 4.
- En las etapas de purificación de la lacasa 2, a partir del extracto crudo del hongo EUM1, se obtuvo un rendimiento final de 14.1 % y 21.1 veces de purificación.
- La lacasa 2 con ABTS como sustrato, tuvo un pH óptimo de 4 y fue estable en un amplio rango de pH (4 a 10) durante 1 hora, conservando aproximadamente el 100 % de su actividad.

- La lacasa 2 con ABTS como sustrato, tuvo una temperatura óptima de 60°C, y fue termoestable a 50 y 60°C durante 1 hora, conservando aproximadamente el 100 % de su actividad.
- La lacasa 2 tuvo una  $k_{cat}$  de 3,402  $\text{min}^{-1}$  con ABTS como sustrato, la cual es aproximadamente 8 veces mayor en comparación con la lacasa producida por *M. thermophila*.
- La lacasa 2 es más a fin al 2,6-DMP cuando aumenta la temperatura de 20 a 60°C, ya que su  $K_M$  disminuye de 0.61 a 0.019 mM.
- El hongo EUM1 en medios de Bran Flakes a pH 6, incubado a 40°C durante 10 días, produce 2 lacasas resistentes a la temperatura y a disolventes orgánicos.
- La lacasa 2 conservó el 52 y 30 % de actividad remanente después de haber incubado durante una hora con etanol y acetonitrilo respectivamente.

## **9. Conclusión**

Las lacasas producidas por el hongo termofílico lignocelulósico silvestre EUM1 fueron estables a 50 y 60°C durante una hora conservando aproximadamente el 100% de actividad. Esto indica que las lacasas producidas por el hongo EUM1 podrían ser utilizadas en procesos industriales que se lleven a cabo a altas temperaturas como es el caso de la industria textil para la decoloración de telas y efluentes, otra ventaja que presentaron estas lacasas es la resistencia a disolventes orgánicos, propiedad que abre la posibilidad de utilizarlas en medios semiacuosos, por lo tanto, la búsqueda de microorganismos en México que produzcan enzimas con propiedades nuevas o que superen características de las enzimas ya existentes es importante para el desarrollo de nuevos procesos biotecnológicos y para reducir costos de los mismos.

## 10. Referencias

- Agemato, H.; Komimato, M.; Shibamoto, T.; Yoshika, H.; Nishida, R.; Kamoto, O.; Shin, T. y Murao. 1993. Transformation of 7-(4-hidroxifenilacetamido) cephalosporonic acid into a new cephalosporonic acid by laccase. *Biosciences, Biotechnology and Biochemistry*. 57: 1387-1388.
- Andreasson, L. E. y Reinhammar, B. 1979. The mechanism of electron transfer in laccase-catalysed reactions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 568:145-156.
- Andrews. 1964. Estimation of the molecular weights of proteins by sephadex gel-filtration. *Biochemical Journal*. 91: 222-233.
- Berka, R. M.; Schneider, P.; Golightly, E. J.; Brown, S. H.; Madden, M.; Brown, K. M.; Halkier, T.; Mondorf, K. Y Xu, F. 1997. Characterization of the gene encoding and extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 3151-3157.
- Bollag; , D. M. y Edelstein, S. J. 1991. Concentrating protein solutions (cap. 4). En: *Protein Methods*. 71-93. Wiley-VCH.
- Bourbonnais, R. y Paice, M. G. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters*. 267: 99-102.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Brena, O. y Bianchi, E. 1990. Immobilized laccase for phenolic removal must and wine. *Biotechnology*. 16: 34-40.
- Brock, T. D. 1985. Life at high temperatures. *Science*. 230: 132-138.
- Buswell, J. A. y Odier, E. 1987. Lignin biodegradation. *CRC Crit. Rev. Biotechnol*. 1: 1-60.
- Call, H. P. 1994. Process for modifyng, breaking down or beaching lignin, material containing lignin or like substance. *World Patent Application*. W094/29510.
- Cambria, M. T.; Cambria, A.; Ragusa, S. y Rizzarelli. 2000. Production, purification, and properties of an extracellular laccase from *Rigidoporus lignosus*. *Protein Expression and Purification*. 18: 141-147.

- Chefetz, B.; Chen, Y. y Hadar, Y. 1998. Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and role in humification. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 3175-3179.
- Cliffe, S.; Famer, M. S.; Maier, G.; Takata, K. y Ritter, G. 1990. Enzyme assay for the phenolic content of natural juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42: 1824-1828.
- Collins, P. J.; Kotterman, M. J. J.; Field, J. A. y Dobson, A. D. W. 1996. Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 4563-4567.
- Deleé, W.; Oneil, C.; Hawkes, F. R. Y Pinheiro, H. M. 1988. Anaerobic treatment of textil effluents: a review. *Journal Chemical Technology, Biotechnology*. 73: 323-335.
- Fischer, L. 1980. *Gel filtration chromatography*. Elsevier, Amsterdam.
- Fukushima, Y. y Kirk, T. K. 1995. Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispora* lignin-degrading system. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 872-876.
- Giardina, P.; Cannio, R.; Martirani, L.; Marzullo, L.; Palmieri, G. Y Sannia, G. 1995. Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 2408-2413.
- Giuvaudan, A.; Effose, A.; Faure, D.; Potier, P.; Bouillant, M. L. y 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: 205-210.
- Hagel, L. y Janson, J. C. 1992. *Size-exclusion chromatography*. 5ª. Edición, p.p. A267- AA307. Elsevier, Amsterdam.
- Hatakka, A. 1994. Lignin – modifying enzymes from selected white-rot fungi: and role in lignin degradation. *FEMS. Microbiology*. 13: 125-135.
- Heinzkill, M.; Bech, L.; Halkier, T.; Schneider, P. y Anke, T. 1998. Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi: (family *Coprinaceae*). *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 1601-1606.
- Heukeshoven, J. y Dernick, R. 1985. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*. 6: 103-112.

- Janson, J. C. y Rydén<sup>1</sup>, L. 1998. Introduction (Cap. 1). En: Protein Purification. 3-40. Wiley-VCH.
- Janson, J. C. y Rydén<sup>2</sup>, L. 1998. Ion Exchange Chromatography (cap. 4). En: Protein Purification. 145-205. Wiley-VCH.
- Jung, H.; Xu, F. y Li, K. 2002. Purification and characterization of laccase from Wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LKY-7. Enzyme and Microbial Technology. 30: 161-168.
- Klibanov, A. M. 2001. Improving enzymes by using them in organic solvents. Nature. 409: 241-246.
- Kristjansson, S. 1989. Thermophilic organisms as sources of thermostable enzymes. Tibtech. 7: 349-353.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.
- Larsson, S.; Cassland, P. y Jönson, L. J. 2001. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. Applied and Environmental Microbiology. 67: 1163-1170.
- Li, K.; Xu, F. y Eriksson, K. E. 1999. Comparison of fungal and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. Applied and Environmental Microbiology. 65: 2654-2660.
- Lindqvist, B. y Storgards, T. 1955. Molecular-sieving properties of starch. Nature. 175: 511-512.
- Logan, S. R. 2000. Fundamentos empíricos de la cinética química (Cap. 1). En: Fundamentos de cinética química. 1-21. Addison Wesley Iberoamericana.
- López, J. 2003. Posgrado de Biotecnología (UAM-I). Comunicación personal. Comunicación personal.
- Maheshwari, R.; Bharadwaj, G. y Bhat, M. K. 2000. Thermophilic fungi: Their physiology and enzymes. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 64: 461-488.

- Mansur, M.; Suárez, T. y González, A. E. 1998. Differential gene expression in the laccase gene family from basidiomycete I-62(CECT 20197). *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 771-774.
- Mayer, A. M. y Staples, R. C. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*. 60: 551-565.
- Medina, E. 2000. Aislamiento y selección de hongos termofílicos productores de lacasas a partir de desechos de medera. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico de Mérida.
- Muñoz, C.; Guillén, A.; Martínez, A. T. y Martínez, M. J. 1997. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn<sup>2+</sup> oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 2166-2174.
- Pelczar, M. J.; Reid, R. D. y Chan, E. C. S. 1982. Cultivo de las bacterias (cap. 6). En: *Microbiología*. 88-101. McGraw Hill.
- Pérez, J. Martínez, J. y de la Rubia, T. 1996. Purification and partial characterization of laccase from the white rot fungus *Phanerochaete flavid-alba*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 4263-4267.
- Périé, F. H.; Reddy, G. V. B.; Blackburn, N. J. y Gold, M. H. 1998. Purification and characterization of laccases from the white-rot basidiomycete *Dichomitus squalens*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 353: 349-355.
- Pezet, R. 1998. Purification and characterization of a 32 KDa laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. *Microbiology letters*. 167: 203-208.
- Pickard, M. A., Vandertol, H., Roman, R. y Vazquez-Duhalt, R. 1999. High production of ligninolytic enzymes from whit rot fungi in cereal bran liquid medium. *Canadian Journal Microbiology*. 45: 627-631.
- Reihammar, B. y Oda, Y. 1979. Spectroscopic and analytic properties of *Rhus vernicifera* laccase depleted in type 2 copper. *Inorganic Chemistry*. 11: 115.
- Reyes, P.; Pickard, M. A. y Vazquez-Duhalt, R. 1999. Hydroxybenzotriazole increases the range of textile dyes decolorized by immobilised laccase. *Biotechnology Letters*. 21: 875-880.
- Rodríguez, E.; Pickard, M. A. y Vazquez-Duhalt, R. 1999. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. 38: 27-32.

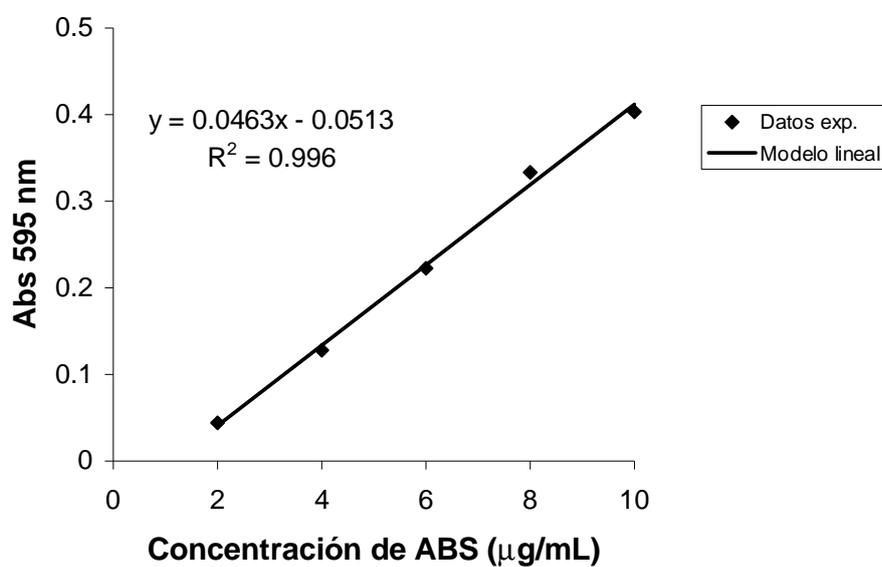
- Sariaslani, F. S. 1989. Microbial enzymes for oxidation of organic molecules. *Critical Reviews in Biotechnology*. 9: 171-257.
- Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, A.; Kiener, A.; Wubbolts, M. y Witholt, B. 2001. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*. 409: 258-268.
- Sidjanski, S.; Mathews, G. V. y Vanderberg, J. P. 1997. Electrophoretic separation and identification of phenoloxidases in hemolymph and midgut of adult *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Journal Parasitology*. 83: 686-691.
- Solomon, E. I.; Sundaram, U. M.; y Machonkin, T. E. 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews*. 96(7):2563-2605.
- Thurston, C. F. 1994. The structure and function of fungal laccase. *Microbiology*. 140: 19-26.
- Villaseñor, F. 2003. Posgrado de Biotecnología (UAM-I). Comunicación personal.
- Voet, D. y Voet, J. 1990. Velocidades de las reacciones enzimáticas (cap. 13). En: *Bioquímica*. 356-382. Omega.
- Wahleithner, J. A.; Xu, F.; Brown, K. M.; Brown, S. H.; Golightly, E. J.; Halkier, T.; Kauppinen, S.; Pederson, A. y Schneider, P. 1996. The identification and characterization of four laccase from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics*. 29: 395-403.
- Whitaker, J. R. 1963. Determination of molecular weights of protein by filtration on sephadex. *Analytical Chemistry*. 35: 1950-1953.
- Wiegel, J. y Ljungdahl, L. G. 1984. The importance of thermophilic bacteria in biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*. 3: 39-108.
- Yaropolov, A. T.; Skorobogat'ko, O. V.; Vartanov, S. S. Y Varfolomeyev, S. D. 1994. Laccase. Properties, catalytic mechanism, and applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 49: 257-280.
- Yaver, D. S.; Xu, F.; Golightly, E. J.; Brown, K. M.; Brown, S. H.; Rey, M. W.; Schneider, P.; Halkier, T.; Mondorf, K. y Dalboge, H. 1996. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 834-841.

- Yaver, D. S. y Golightly, E. J. 1996. Cloning and characterization of three laccase genes from the white-rot basidiomycete *Trametes villosa*: genomic organization of the laccase gene family. *Gene*. 181: 95-102.
- Yoshida, H. 1883. Chemistry of Lacquer (*Urushi*) part. 1. *Journal of the Chemical Society*. 43: 472-486.
- Zamost, B. L.; Nielsen, H. K. y Starnes, R. L. 1991. Thermostable enzymes for industrial applications. *Journal of Industrial Microbiology*. 8: 71-82.
- Zheng, Z.; Levin, R. E.; Pinkham, J. L. y Shetty, K. 1999. Decolorization of polymeric dyes by a novel *Penicillium* isolate. *Process Biochemistry*. 34: 31-37.

## Anexo 1

### Curva estándar de albúmina sérica bovina (ASB).

La proteína se determino por el método de Bradford (Sección 5.5.).



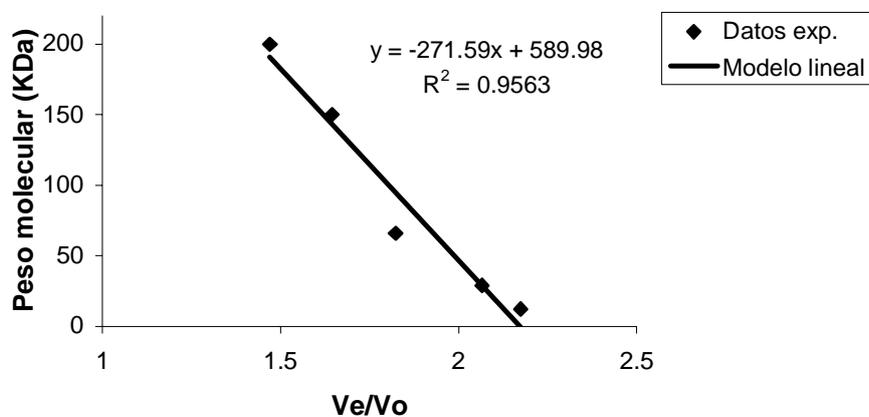
Datos experimentales:

<b>Concentración de ABS</b>			
<b>(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Absorbancia 1</b>	<b>Absorbancia 2</b>	<b>Promedio</b>
2	0.0404	0.0479	0.0441
4	0.1215	0.1336	0.1275
6	0.2178	0.2271	0.2224
8	0.3316	0.3361	0.3338
10	0.395	0.4123	0.4036

## Anexo 2

### Curva estándar de pesos moleculares en condiciones nativas.

Los volúmenes de elución de los marcadores se obtuvieron por cromatografía de filtración en gel (Sección 5.8.1).



Datos experimentales:

Proteínas	Peso Molecular		
	(KDa)	$V_e$	$V_e/V_o$
Citocromo c	12.4	17.89	2.17
Anhidrasa carbónica	29	17	2.06
Albúmina sérica bovina	66	15	1.82
Alcohol deshidrogenasa	150	13.54	1.64
Aamilasa	200	12.10	1.47
Azul dextrán	2000	8.23	-----

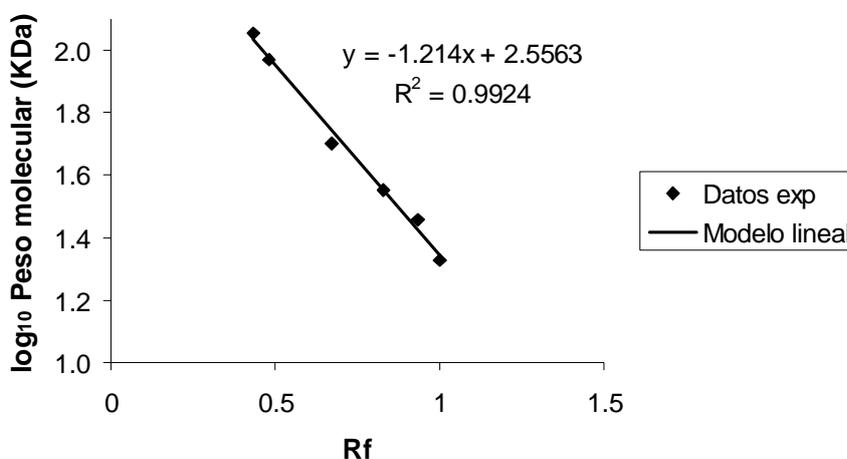
$V_e$  = Volumen de separación

$V_o$  = Volumen vacío =  $V_e$  del azul dextrán

### Anexo 3

#### Curva estándar de pesos moleculares en condiciones desnaturalizantes.

Los Rf de los marcadores se obtuvieron a partir de un gel de electroforesis (Sección 5.10.2.).



$$Rf = \frac{\text{Distancia de migración de la proteína}}{\text{Distancia de migración del frente de corrida}}$$

Proteína	Peso Molecular (KDa)	Migración de la proteína (cm)	Rf	Log <sub>10</sub> Peso molecular
Lisozima	21.4	5.8	1.00	1.33
Inhibidor tripsina de soya	28.8	5.4	0.93	1.45
Anhidrasa Carbónica	35.5	4.8	0.82	1.55
Ovalbúmina	50.3	3.9	0.67	1.70
Albúmina sérica bovina	93	2.8	0.48	1.96
Fosforilasa	113	2.5	0.43	2.05

Migración del frente de corrida = 5.8 cm