



Cambios en el crecimiento microscópico hifal y del patrón de secreción de enzimas durante la adaptación térmica del hongo de pudrición blanca *Fomes* sp. EUM1

TESIS

para obtener el grado de Doctor en Biotecnología

PRESENTA

M. en B. Armando Ordaz Hernández

DIRECTOR

Dr. Octavio Loera Corral

México, D. F., 2012

México, D. F, 2012

El jurado designado por la comisión de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

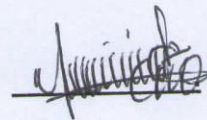
“Cambios en el crecimiento microscópico hifal y del patrón de secreción de enzimas durante la adaptación térmica del hongo de pudrición blanca *Fomes* sp. EUM1”

Que presentó

M. en B. Armando Ordaz Hernández

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Octavio Loera Corral
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (U)



JURADO

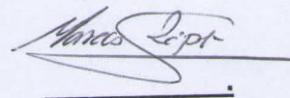
Presidente

Dr. Ernesto Favela Torres
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (U)



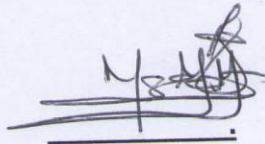
Secretario

Dr. Marcos Meneses Mayo
Universidad Anáhuac México-Norte



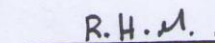
Vocal

Dr. Marcos López Pérez
Universidad Autónoma Metropolitana-Lerma (UAM-)



Vocal

Dr. Ricardo Hernández Martínez
Universidad Politécnica de Tlaxcala (UPT)



AGRADECIMIENTOS

Dios, gracias por brindarme la vida y por concederme el don para maravillarme con tantos fenómenos naturales hermosos

Agradezco el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (No. 202362)

Gracias al Dr. Octavio Loera Corral por la paciencia y consejos brindados durante la realización de este trabajo

Gracias a mis hermanos y a sus familias por el cariño y amistad brindados. También a mis amigos por todos los momentos de felicidad y de amistad, que realmente, fueron inolvidables

Agradezco a mis padres, Carmen y Francisco, por confiar en que saldría adelante y estar siempre orgullosos de mis logros

De todo corazón admiro a mi esposa Tere, quien siempre estuvo a mi lado en los momentos más difíciles. Gracias por brindarme amor, paciencia, confianza y dos hermosos hijos

Gracias a mis hijos, Isai e Ian, por brindarme mucha alegría para seguir soñando y continuar maravillandome de este mundo, donde casi nadie lo hace.

La dicha de la vida consiste en tener siempre algo que hacer, alguien a quien amar y alguna cosa que esperar (Thomas Chalmers)

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Hongos de pudrición blanca	2
1.2 Hidrólisis enzimática de la lignocelulosa por los hongos de pudrición blanca.....	3
1.3 Crecimiento de hongos de pudrición blanca.....	6
1.4 Mecanismos fisiológicos del crecimiento hifal	12
1.5 Aplicaciones biotecnológicas potenciales de los hongos de pudrición blanca del género <i>Fomes</i>	16
1.6 Análisis morfométrico del crecimiento de hongos filamentosos	16
1.7 Crecimiento de hongos filamentosos en cultivo sólido	18
1.7.1 Características de los sustratos.....	19
1.7.2 Tamaño de partícula	19
1.7.3 Humedad y actividad de agua	20
1.7.4 El pH	21
1.7.5 Temperatura	21
1.8 Hongos de pudrición blanca termotolerantes	22
2 JUSTIFICACIÓN	24
3 HIPÓTESIS	24
4 OBJETIVOS	25
4.1 General	25
4.2 Específicos.....	25
5 MATERIALES Y MÉTODOS	26
5.1 Identificación molecular del microorganismo	26
5.1.2 Cultivo y propagación del hongo de pudrición blanca	26
5.1.3 Cultivo de la bacteria <i>Escherichia coli</i> DH5 α	26
5.1.4 Marcador de masa molecular	27
5.1.5 Cebadores	27
5.1.6 ADN genómico total.....	28
5.1.7 Enzimas <i>Taq</i> polimerasa, enzima de restricción <i>pstI</i> y ligasa <i>T4</i> de ADN.....	30

5.1.8 Vector plasmídico pGEM-T Easy	30
5.1.9 Antibiótico	31
5.1.10 Soluciones de X-Gal y IPTG	31
5.1.11 PCR de gradiente de temperatura.....	32
5.1.12 Purificación de productos de PCR	34
5.1.13 Ligación	36
5.1.14 Células electrocompetentes	37
5.1.15 Transformación de células de <i>E. coli</i>	38
5.1.16 Análisis de transformantes de <i>E. coli</i> DH5 α	39
5.1.17 Extracción de ADNp a pequeña escala (Miniprep)	40
5.1.18 Extracción de ADNp a gran escala (Midiprep-Kit)	41
5.1.19 Electroforesis en gel de agarosa	43
5.2 Análisis macroscópico del crecimiento en función de la temperatura	44
5.2.1 Medio de cultivo.....	44
5.2.2 Técnica de inoculación para analizar crecimiento macroscópico.....	45
5.2.3 Cultivos superficiales en caja Petri y condiciones de cultivo	45
5.2.4 Cuantificación del crecimiento	46
5.3 Análisis del crecimiento microscópico en función de la temperatura.	47
5.3.1 Medio de cultivo.....	47
5.3.2 Técnica de inoculación para analizar crecimiento microscópico.....	47
5.3.3 Cultivos superficiales en caja Petri y condiciones de cultivo	47
5.3.4 Medición de variables morfométricas	47
5.4 Producción de enzimas lignocelulolíticas en condiciones de estrés térmico	49
5.4.1 Cultivo en medio sólido	49
5.4.2 Recuperación de enzimas del sustrato.....	49
5.4.3 Concentración de extractos enzimáticos.....	50
5.4.4 Zimogramas en geles SDS-PAGE	51
5.4.5 Zimogramas de celulasas y xilanasas	51
5.4.6 Zimogramas de lacasas	52

5.4.7 Ensayos enzimáticos	53
5.5 Análisis estadístico de los resultados	56
6 RESULTADOS	57
6.1 Identificación molecular del microorganismo	57
6.2 Análisis del crecimiento macroscópico a diferentes temperaturas	64
6.3 Análisis del crecimiento microscópico del micelio a diferentes temperaturas	68
6.4 Producción de enzimas lignocelulolíticas en medio sólido a temperaturas crecimiento altas.....	74
6.5 Patrón de secreción de isoenzimas en condiciones térmicas diferentes	78
7 DISCUSIÓN	81
7.1 El hongo de pudrición blanca <i>Fomes</i> sp. EUM1 es una especie no reportada.....	81
7.2 El hongo <i>Fomes</i> sp. EUM1 es un microorganismo termotolerante	82
7.3 Los cambios microscópicos del crecimiento micelial están relacionados con la termotolerancia de <i>Fomes</i> sp. EUM1	84
7.4 La termotolerancia de <i>Fomes</i> sp. EUM1 es una ventaja en cultivo sólido para producir enzimas.....	86
7.5 La adaptación térmica de <i>Fomes</i> sp. EUM1 involucra modificar el patrón de secreción de isoenzimas.....	89
8 CONCLUSIONES	91
9 PERSPECTIVAS.....	92
10 REFERENCIAS	93
11 ANEXOS.....	112

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Crecimiento de un hongo de pudrición blanca del género <i>Fomes</i>	2
Fig. 2 Enzimas involucradas en la hidrólisis de la celulosa.....	4
Fig. 3 Enzimas involucradas en la hidrólisis de la hemicelulosa	5
Fig. 4 Enzimas involucradas en la oxidación de la lignina.....	6
Fig. 5 Proceso de formación del micelio a partir de una espora	7
Fig. 6 Hifa distal ramificada mostrando la zona de extensión	8
Fig. 7 Hifas con ramificación apical y lateral	9
Fig. 8 Proceso de ramificación de una hifa.....	10
Fig. 9 Capas de micelio formadas durante el crecimiento superficial fúngico	11
Fig. 10 Delimitación axial de una hifa.....	13
Fig. 11 Descripción hipotética del crecimiento hifal.....	14
Fig. 12 Patrón electroforético del DNA ladder	27
Fig. 13 Mapa y puntos de referencia de la secuencia del vector pGEM-T Easy	31
Fig. 14 Gel de agarosa al 1% mostrando el AND genómico extraído de micelio del hongo de pudrición blanca.	58
Fig. 15 Gel de agarosa al 1% mostrando la amplificación de los genes del ADNr 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S mediante la PCR de gradiente.....	58
Fig. 16 Gel de agarosa mostrando el amplicón purificado.....	59
Fig. 17 Análisis del ANDp recombinante lineal de células de <i>E. coli</i> transformadas	61
Fig. 18 Análisis de ADNp recombinante puro en gel de agarosa (1%).	62

Fig. 19 Gel de agarosa mostrando la amplificación del ADNr que estuvo clonado en el vector pGEM-T easy.....	62
Fig. 20 Producción de biomasa (g L⁻¹) durante el crecimiento superficial de <i>Fomes</i> sp. EUM1 en caja Petri a diferentes temperaturas.....	65
Fig. 21 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento macroscópico de <i>Fomes</i> sp. EUM1.	68
Fig. 22 Cambios morfométricos del micelio de <i>Fomes</i> sp. EUM1 a diferentes temperaturas.	70
Fig. 23 Cambios en la longitud de las hifas distales durante el crecimiento de <i>Fomes</i> sp. EUM1 en condiciones térmicas diferentes.....	71
Fig. 24 Cambios morfométricos del diámetro y de la relación área a volumen de las hifas distales de <i>Fomes</i> sp. EUM1 respecto a la temperatura.	72
Fig. 25 Modificación del grado de ramificación del micelio y del área superficial de las hifas distales de <i>Fomes</i> sp. EUM1 respecto a la temperatura	73
Fig. 26 Efecto de la temperatura en la producción de enzimas lignocelulolíticas de <i>Fomes</i> sp. EUM1.	75
Fig. 27 Efecto de la temperatura en la productividad de enzimas lignocelulolíticas de <i>Fomes</i> sp. EUM1.	77
Fig. 28 Aumento de la actividad proteolítica con la temperatura durante el cultivo de <i>Fomes</i> sp. EUM1 en medio sólido sobre rastrojo de maíz.	77
Fig. 29 Zimograma de lacasas presentes en los extractos obtenidos durante el crecimiento de <i>Fomes</i> sp. EUM1 en cultivo sólido a varias temperaturas.79	
Fig. 30 Zimograma de las celulasas presentes en los extractos enzimáticos obtenidos durante el crecimiento de <i>Fomes</i> sp. EUM1 en cultivo sólido a varias temperaturas.....	79
Fig. 31 Zimograma de las xilanasas presentes en los extractos enzimáticos obtenidos durante el crecimiento de <i>Fomes</i> sp. EUM1 en cultivo sólido a varias temperaturas.....	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Lista detallada de reactivos necesarios para la PCR	33
Tabla 2 Componentes empleados en la reacción de ligación Vector-Inserto.	37
Tabla 3 Resultado del análisis de secuencia de nucleótidos del ADNr por BLAST.	63
Tabla 4 Análisis comparativo de las regiones de ITS de <i>Fomes</i> sp. EUM1 con la de otras especies del mismo género.	64
Tabla 5 Cambios macroscópicos del crecimiento de <i>Fomes</i> sp. EUM1 con la temperatura	66
Tabla 6 Cambios microscópicos del crecimiento de <i>Fomes</i> sp. EUM1 con la temperatura.	69
Tabla 1. Actividad enzimática final en extractos concentrados con sulfato de amonio	112

RESUMEN

Se identificó un hongo de pudrición blanca termotolerante del género *Fomes* aislado de la madera que no se ha reportado en documentos científicos. La cepa denominada como *Fomes* sp EUM1 exhibió crecimiento máximo a 30 °C con valores de velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.03 h⁻¹, energía de activación (E_a) e inactivación (E_i) del crecimiento de 68 kJ mol⁻¹ y 32 kJ mol⁻¹, respectivamente. Los cambios microscópicos sobre la morfología hifal se relacionaron con la termotolerancia del hongo. En el intervalo de temperatura de 30 °C a 40 °C se observó una disminución en la frecuencia de ramificación del micelio (15%), además de la formación de hifas con menor diámetro (13%) y mayor longitud (32%). En el intervalo de 25 °C a 40 °C el área superficial cubierta por las hifas y la velocidad de crecimiento superficial aumentaron 43% y 193%, respectivamente. Por otro lado, el hongo formó micelio aéreo abundante a temperaturas mayores que 30 °C, sugiriendo ser importante para mejorar la difusión de oxígeno al resto del micelio. La modificación de la morfología hifal parece ser una estrategia del hongo para colonizar áreas con mayor cantidad de nutrientes disponibles con mayor rapidez y con un gasto mínimo de energía para la formación de biomasa a temperaturas elevadas (>30 °C). Los cambios en el patrón de secreción de hidrolasas y la síntesis de isoenzimas nuevas fueron otros mecanismos fisiológicos relacionados con la adaptación térmica de *Fomes* sp. EUM1 (> 30 °C).

La producción de celulasas y de xilanasas mejoró 1.6 y 2.8 veces, respectivamente, de 30 a 40 °C; mientras que, de 30 a 35 °C los niveles de lacasas mejoraron 2.7 veces. En las temperaturas mencionadas, la productividad de celulasas, xilanasas y lacasas aumento 2.1, 3.8 y 2.3 veces, respectivamente. El hongo termotolerante produjo un patrón diferente de isoenzimas de celulasas (6 tipos) y xilanasas (3 tipos) a temperaturas mayores que 30 °C. Los cambios en el patrón de secreción de isoenzimas sugirieron ser una respuesta celular importante para suministrar glúcidos simples con una mayor rapidez para mantener el crecimiento micelial a temperaturas altas. La termotolerancia del hongo resultó ser una ventaja en cultivo sólido donde el crecimiento microbiano se lleva a cabo en condiciones no-isotermicas que limitan el desempeño de la formación de enzimas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Hongos de pudrición blanca

Los hongos de pudrición blanca son basidiomicetos capaces de crecer sobre la madera en descomposición, principalmente, sobre los árboles en decadencia ó muertos. La denominación de pudrición blanca se debe a que dejan una coloración blanca durante el proceso de asimilación de los polímeros estructurales de la madera (Goodell *et al.*, 2008). Estos hongos oxidan la lignina (polímero que confiere coloración café a las fibras de la madera) dejando residuos de celulosa que en su estado natural es blanca. En la naturaleza también existen los denominados de pudrición café, los cuales dejan una coloración café-rojiza al ser incapaces de oxidar la lignina (Martínez *et al.*, 2005). Los hongos de pudrición blanca se distinguen fácilmente en la naturaleza por la forma ondulada, porosa y coloreada de su basidiocarpo, además, por el crecimiento característico sobre la madera en forma de repisas (Fig. 1) (Goodell *et al.*, 2008).



Fig. 1 Crecimiento de un hongo de pudrición blanca del género *Fomes*.

En su hábitat natural crecen sobre la mayoría de los residuos vegetales y, por ello, se consideran los principales microorganismos despolimerizantes de la lignocelulosa. Estos microorganismos secretan hidrolasas y oxidasas para llevar a cabo la ruptura de los polímeros estructurales de la lignocelulosa hasta

compuestos simples y fácilmente asimilables para el crecimiento (Evans *et al.*, 1994; Martínez *et al.*, 2005). El complejo enzimático secretado por los hongos de pudrición blanca se denomina comúnmente como enzimas lignocelulolíticas. Este complejo enzimático involucra a las hidrolasas como las celulasas y las xilanasas que actúan sinérgicamente sobre los polímeros de la celulosa y la hemicelulosa, respectivamente (Cullen y Kersten, 1992; Pérez *et al.*, 2002). A diferencia de éstas, las oxidasas, lacasas, lignino peroxidasas (LiPs) y manganeso peroxidasas (MnPs) actúan sobre la lignina (Martínez *et al.*, 2005).

1.2 Hidrólisis enzimática de la lignocelulosa por los hongos de pudrición blanca

La lignocelulosa está conformada por polímeros de celulosa, hemicelulosa y lignina. La celulosa es un polímero constituido en promedio por 3,500 unidades de glucosa que se unen por enlaces glicosídicos β -1,4. La polimerización de las unidades de glucosa forman las denominadas microfibrillas, las cuales se agrupan formando fibras de celulosa. Las fibras de la celulosa presentan regiones cristalinas (arreglo ordenado) y regiones amorfas (arreglo desordenado), siendo las últimas más susceptibles a la hidrólisis enzimática (Cullen y Kersten, 1992). La hidrólisis de la celulosa involucra la actividad de tres tipos de celulasas (Fig. 2): I) las *endoglucanasas* (EGs), *endo-1,4- β -glucanasas* ó *carboximetilcelulasas* hidrolizan los enlaces químicos presentes en las regiones amorfas de las fibras de la celulosa generando sitios nuevos para la actividad enzimática de las llamadas celobiohidrolasas. Durante la actividad enzimática de las EGs se pueden generar dímeros de celobiosa, aunque éstos son el principal producto de las enzimas cuya actividad se describe a continuación; II) las *celobiohidrolasas* (CBHs), *exo-1,4- β -glucanasas* ó *exoglucanasas* actúan en los extremos finales de las fibras de la celulosa y en los sitios nuevos formados en las regiones amorfas de las fibras de celulosa durante la actividad de las EGs. La actividad de las CBHs genera moléculas de celobiosa y monómeros de glucosa; III) las *β -glucosidasas* (β G) hidrolizan las moléculas de celobiosa a monómeros de glucosa (Pérez *et al.*, 2002; Dashtban *et al.*, 2009).

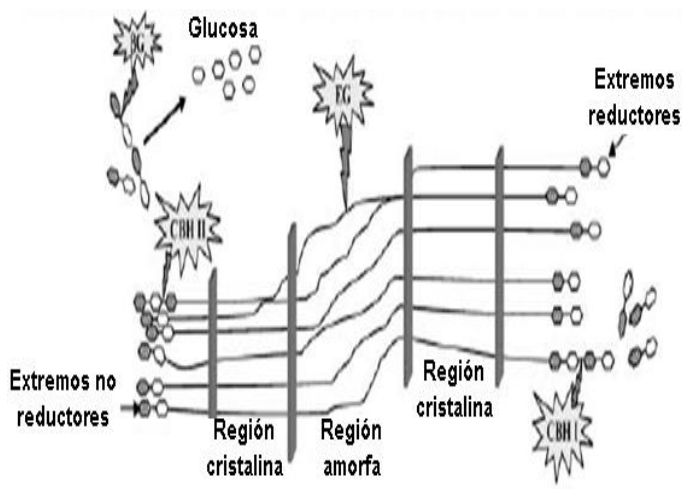


Fig. 2 Enzimas involucradas en la hidrólisis de la celulosa (Pérez *et al.*, 2002)

El polímero de la hemicelulosa rodea las fibras de la celulosa y se compone básicamente por unidades de xilosa, manosa, galactosa, glucosa, arabinosa y ácido glucorónico, las cuales se unen por enlaces glicosídicos β -1,4 y, ocasionalmente, por β -1,3. El xilano es el polisacárido mayoritario, que forma parte de la hemicelulosa y se forma por la unión de unidades de xilosa (150-200). El xilano presenta ramificaciones de manosa, arabinosa, galactosa, glucosa, arabinosa y ácido glucorónico (Polizeli *et al.*, 2005). La hemicelulosa es hidrolizada por varios tipos de xilanasas (Fig. 3): I) las *endoxilanasas* (EXs) ó endo-1,4- β -xilanasas, hidrolizan los enlaces químicos internos β -1,4 del xilano generando oligómeros ramificados, dímeros y monómeros de xilosa. Las EXs actúan usualmente donde existen ramificaciones con azúcares específicos; II) las *β -xilosidasas* actúan simultáneamente con las enzimas *acetil esterasas*, *glucoronidasas*, *arabinofuranosidasas*, y *galactosidasas* para hidrolizar los oligómeros ramificados y los dímeros generados por la acción de las EXs. Durante la actividad de las enzimas mencionadas se liberan unidades de xilosa, ácido glucorónico, arabinosa y galactosa, respectivamente (Beg *et al.*, 2001; Dashtban *et al.*, 2009).

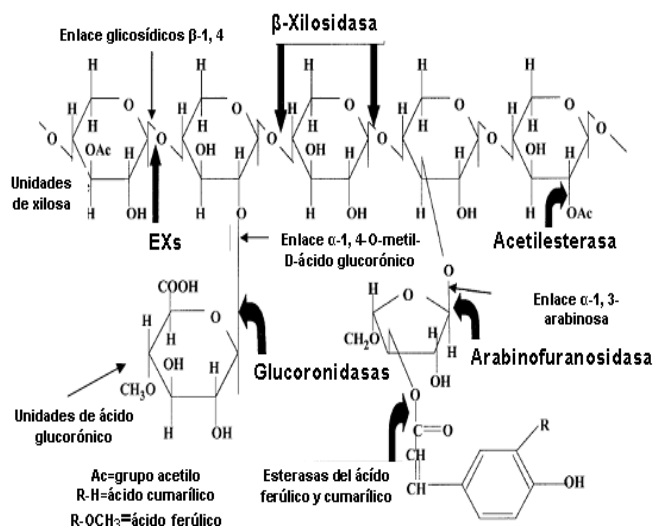


Fig. 3 Enzimas involucradas en la hidrólisis de la hemicelulosa (adaptado de Beg *et al.*, 2001)

La lignina recubre la hemicelulosa y es un polímero conformado por unidades de fenilpropano (alcohol coniferílico, sinapílico y cumarílico) unidas por enlaces carbono-carbono y aril-éter. Éste polímero confiere a la lignocelulosa soporte estructural, impermeabilidad y resistencia al ataque microbiano, por esta razón, se considera un factor limitante para usar la lignocelulosa en procesos biotecnológicos (Dashtban *et al.*, 2009). La oxidación de la lignina involucra principalmente la actividad de las lacasas y las peroxidasas, tales como las lignino peroxidasas (LiPs) y manganeso peroxidasas (MnPs) (Fig. 4). Otras enzimas importantes que participan en la oxidación de la lignina son las Aril-Alcohol-Oxidadas (AAO), Aril-Alcohol-Deshidrogenasas (AAD) y Quinonas Reductasas (QR). Las lacasas y las peroxidasas oxidan el polímero de lignina generando radicales aromáticos, los cuales se muestran en la Fig. 4 como (a). Éstos, al ser compuestos inestables presentan rupturas de enlaces éter (b), rupturas del anillo aromático (c), enlaces C-C (d) y desmetilación (e) (Martínez *et al.*, 2005).

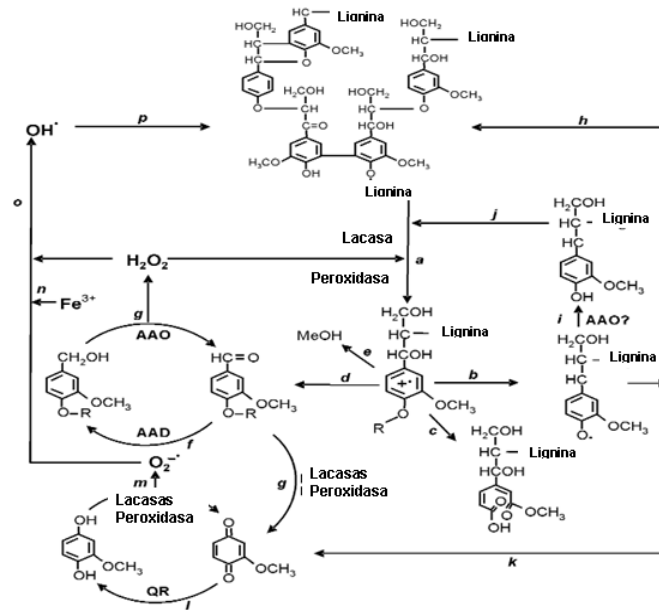


Fig. 4 Enzimas involucradas en la oxidación de la lignina (adaptado de Martínez et al., 2005)

1. 3 Crecimiento de hongos de pudrición blanca

Los hongos de pudrición blanca al igual que todos los hongos filamentosos están constituidos por hifas, que pueden ser entendidos como unos filamentos cilíndricos que se extienden por la región apical y que se ramifican con un patrón ordenado para formar el micelio (Steinberg, 2007; Harris, 2008). Cuando una espora germina se observa la formación de un tubo germinativo (fragmento de una hifa) que se extiende longitudinalmente formando ramificaciones (Fig. 5). La extensión del tubo germinativo se mantiene inicialmente a una velocidad exponencial por un periodo breve y después adquiere una velocidad lineal, al igual que todas las hifas formadas (Trinci, 1974). La velocidad lineal de extensión de las hifas no se observa al estudiarse la extensión total del micelio, ya que, éste último adquiere una velocidad exponencial debido al gran número de ramificaciones formadas en las hifas (Trinci, 1974). El patrón de ramificación característico de las hifas conlleva a la formación de colonias con apariencia circular (Caldwell y Trinci, 1973; Steele y Trinci, 1975).

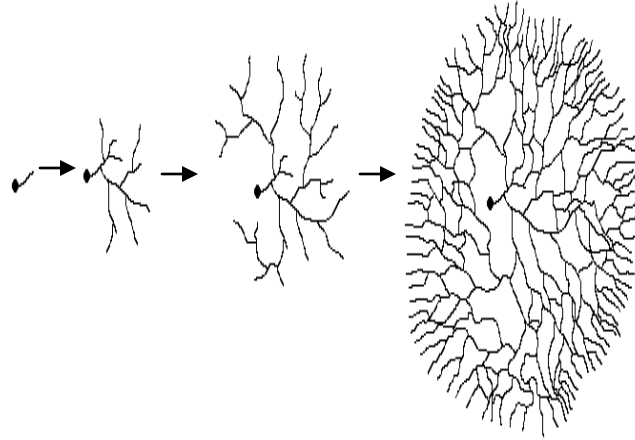


Fig. 5 Proceso de formación del micelio a partir de una espora

La periferia de crecimiento de las colonias esta formada por hifas denominadas distales o guías que contribuyen a la extensión radial del micelio y que se conoce como zona periférica del crecimiento (Prosser y Tough, 1991) (Fig. 6). De acuerdo con Trinci, (1971), las hifas que conforman esta zona se ramifican cuando exceden la llamada unidad de crecimiento hifal, que es la longitud o volumen promedio de las hifas que mantiene el crecimiento apical. La unidad de crecimiento hifal tiende a tener un valor constante durante el crecimiento de los hongos y se obtiene al relacionar la extensión total del micelio entre el número de puntas totales del mismo (Caldwell y Trinci, 1973; Trinci, 1974). Esta variable se aborda para explicar el crecimiento de los hongos filamentosos en forma similar a las bacterias y se ha utilizado para describir la ramificación del micelio; en este sentido, la ramificación decrece entre mayor sea la unidad de crecimiento hifal (Prosser y Tough, 1991).

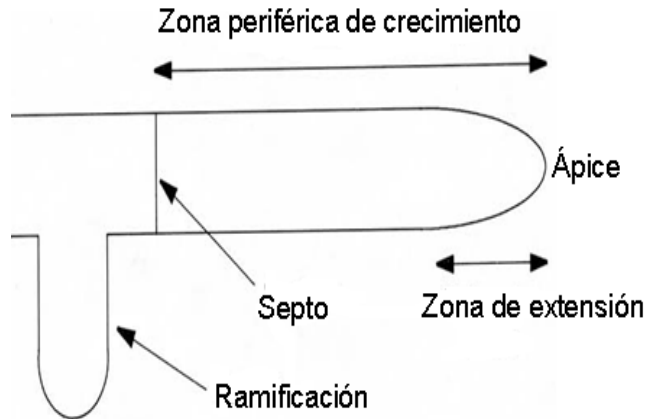


Fig. 6 Hifa distal ramificada mostrando la zona de extensión (Prosser y Tough, 1991)

La unidad de crecimiento hifal se mide sobre micelio con pocos milímetros en longitud dado que es factible calcular la longitud total del micelio y el número total de puntas, sin embargo, es imposible calcularla sobre el micelio de colonias maduras. Alternativamente, se puede medir la longitud promedio de las hifas distales (Viniestra-González *et al.*, 1993; Larralde-Corona *et al.*, 1997).

Bajo condiciones nutricionales favorables los hongos tienden a incrementar la ramificación del micelio al reducir la longitud de la unidad de crecimiento hifal; mientras que en condiciones limitantes de nutrientes el micelio tiende a ser menos ramificado para maximizar la disponibilidad de nutrientes (Prosser y Tough, 1991). La ramificación de las hifas es de suma importancia para colonizar el medio de crecimiento en zonas distantes y para aumentar la eficiencia de suministro de nutrientes al incrementarse el área superficial del micelio (Harris, 2008). La ramificación puede ser apical o lateral, siendo la segunda más frecuente durante el crecimiento de los hongos filamentosos (Riquelme y Bartnicki-García 2004) (Fig. 7).

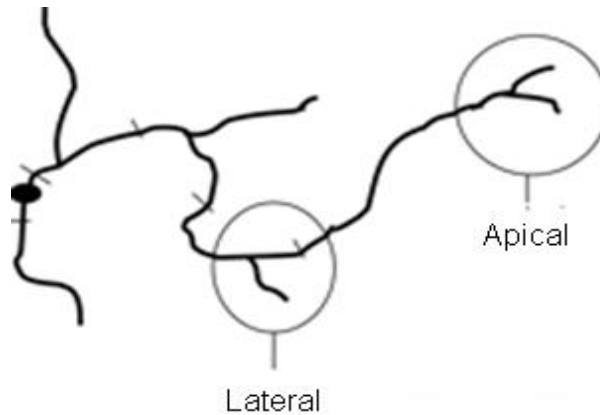


Fig. 7 Hifas con ramificación apical y lateral (Riquelme y Bartnicki-Garcia 2004)

El proceso de ramificación no está bien entendido, pero se sabe que la ramificación se inicia en sitios específicos de las hifas donde se acumulan vesículas que contienen enzimas líticas, precursores de pared celular y componentes de membrana celular (Fig. 8) (Wedlich *et al.*, 2003). Los sitios de ramificación se establecen a una distancia bastante alejada y con longitud usualmente constante del ápice, al parecer donde el efecto denominado dominancia apical es limitado (Harris, 2008; Semighini *et al.*, 2008). En los sitios de ramificación se visualizan vesículas fusionándose con la membrana celular para liberar su contenido hacia el espacio periplasmático. En este proceso, se liberan enzimas líticas hacia la pared celular para disminuir su rigidez al hidrolizarse parcialmente los polímeros estructurales que la componen. La disminución de la rigidez de la pared celular en sitios específicos y la presión de turgor intracelular facilitan la aparición de un nuevo ápice hifal, el cual crece incorporando precursores de pared y de membrana celular hacia la punta de la hifa recién formada (Wedlich *et al.*, 2003; Harris, 2008).

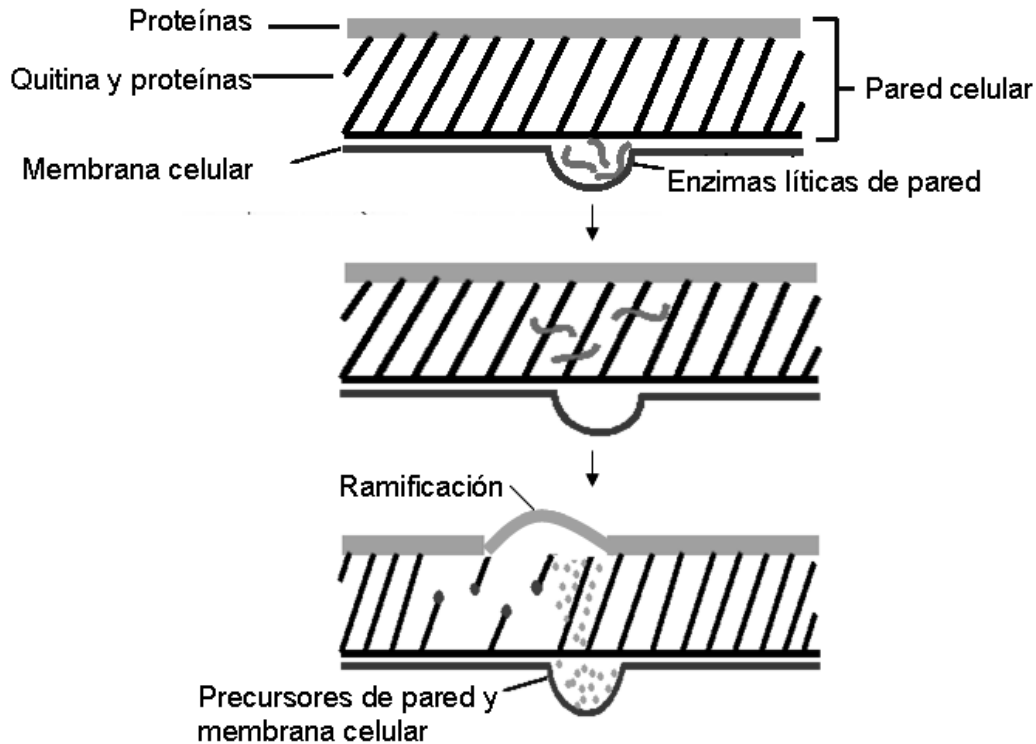


Fig. 8 Proceso de ramificación de una hifa (Wedlich et al., 2003)

Varios trabajos sugieren que la ramificación hifal sucede cuando la velocidad de transporte de los precursores del crecimiento excede la velocidad de extensión del ápice de las hifas (Katz *et al.*, 1972; Harris, 2008). Al parecer, la formación de los septos influye en la ramificación, sugiriéndose que reducen el flujo de material biosintético hacia la punta hifal y favorecen la acumulación en los sitios cercanos a la ramificación (Westfall y Momany, 2002; Gladfelter, 2006). Actualmente, se sabe que el Spizzenkörper (cuerpo apical conformado por vesículas con precursores de pared celular y por filamentos de actina) participa en la morfogénesis de las hifas. El Spizzenkörper alberga todos los componentes necesarios para el crecimiento hifal y se forma *de novo* en los sitios de ramificación. Se ha mencionado que la ramificación y la formación del Spizzenkörper están fuertemente coordinadas con la mitosis celular (Dyensen y Nielsen, 2003). La selección de los sitios de ramificación y la localización simultánea del Spizzenkörper no se han elucidado, sin embargo, la acumulación

de calcio (Grinberg y Health, 1997) y de especies reactivas de oxígeno (Semighini y Harris, 2008) promueven el marcaje de los sitios para la ramificación. Los candidatos más prometedores son las proteínas GTPasas, Cdc42 y Rac1 que participan en la formación del polarisoma, una estructura que recluta en el ápice filamentos de actina y microtúbulos (Wedlich, *et al.*, 2003).

El micelio superficial que se forma por la ramificación de las hifas se puede clasificar en varias capas (Fig. 9). El micelio que inicialmente se extiende penetra en la superficie del sustrato (1) y forma hifas aéreas con una densidad baja (2). Conforme el micelio crece, la capa de hifas superficiales y aéreas se vuelve cada vez más densa y los espacios intersticiales entre las hifas son ocupados por líquido (3). Cuando la densidad micelial llega a ser alta existen limitaciones en la difusión del oxígeno a las capas más internas de la matriz micelial (3) lo que conlleva a un nulo crecimiento del micelio interno o al establecimiento de un proceso fermentativo (Oostr, 2001; Rajardho *et al.*, 2002). Se ha mostrado que en la capa de micelio húmedo la concentración de oxígeno llega a ser nula a una profundidad mayor a 100 μm , mientras que, la capa de micelio aéreo no se encuentra limitada por oxígeno (Rajardho *et al.*, 2002).

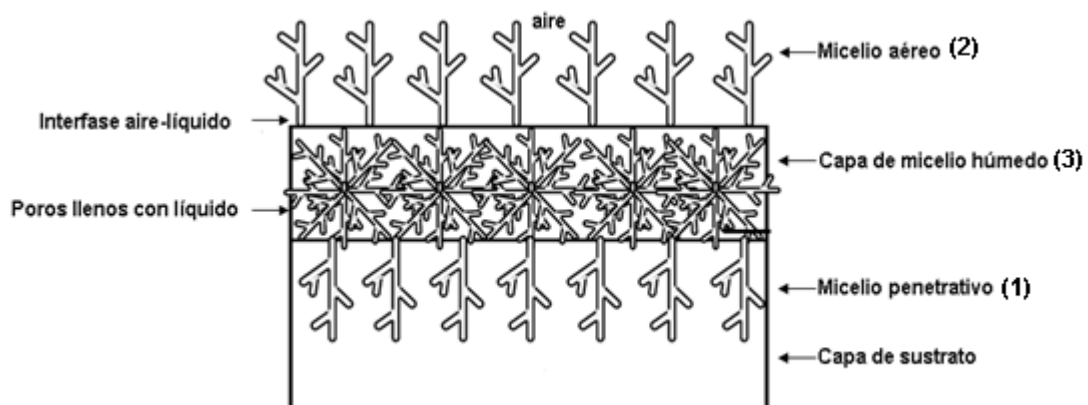


Fig. 9 Capas de micelio formadas durante el crecimiento superficial fúngico (Rahardjo *et al.*, 2002)

Cuando una colonia se desarrolla, la concentración de nutrientes llega a ser limitante en el centro, mientras que, la de biomasa es alta. De acuerdo a Olsson, (1994), las hifas localizadas en la periferia de las colonias distribuyen los nutrientes hacia el centro de crecimiento por un proceso llamado translocación del sustrato. Las hifas localizadas en la periferia también llevan a cabo la mayor secreción de enzimas extracelulares por medio de un proceso bastante estudiado, pero que aún tiene aspectos desconocidos (Wösten *et al.*, 1991; Peberdy, 1994; Iwashita, 2002).

1.4 Mecanismos fisiológicos del crecimiento hifal

Las hifas pueden dividirse axialmente en una región apical, subapical y distal (Fig. 10). La región distal es la más alejada de la punta de las hifas y, principalmente, alberga compuestos de reserva, vacuolas y productos del metabolismo secundario, por ejemplo antibióticos (Parker y Thomas, 1990; Peberdy, 1994). La zona subapical contiene mayoritariamente enzimas y precursores biosintéticos para el crecimiento hifal, que son almacenados en vesículas y microvesículas. En esta zona se lleva a cabo la absorción de nutrientes del medio externo al encontrarse bien establecida la maquinaria del transporte y al concentrarse la mayor parte de los organelos citoplasmáticos como núcleo, ribosomas, mitocondrias y aparato de Golgi (Stainberg, 2007). En la zona apical se llevan a cabo simultáneamente, el crecimiento hifal, la secreción de enzimas extracelulares requeridas para hidrolizar los sustratos junto con las requeridas para la extensión apical de las hifas. También se concentran todas las vesículas conteniendo los precursores biosintéticos para el crecimiento apical hifal (Peberdy, 1994; Iwashita, 2002; Stainberg, 2007).

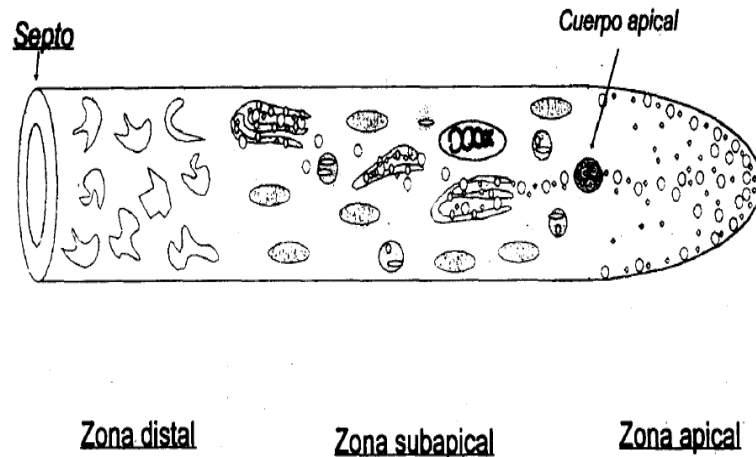


Fig. 10 Delimitación axial de una hifa (Peberdy, 1994; Dinesen y Nielsen, 2003).

El crecimiento de las hifas se lleva a cabo únicamente por la zona apical y puede alcanzar velocidades mayores a $20 \mu\text{m min}^{-1}$ (Seiler y Plamann, 2003; Harris, 2008). Tales velocidades de extensión hifal son posibles al transportar de la región subapical al ápice hasta 38, 000 vesículas conteniendo precursores del crecimiento (Harris, 2008; Steinberg, 2007). El Spitzenkörper logra concentrar las vesículas en la zona apical y al parecer es responsable de los mecanismos de tropismo celular frente a estímulos físicos y químicos (Brand y Gow, 2009). La posición y el movimiento del Spitzenkörper en la zona apical determinan la dirección del crecimiento hifal (Riquelme *et al.*, 1998; Brand and Gow, 2009). Los mecanismos de crecimiento hifal son complejos y se resumen en la Fig. 10.

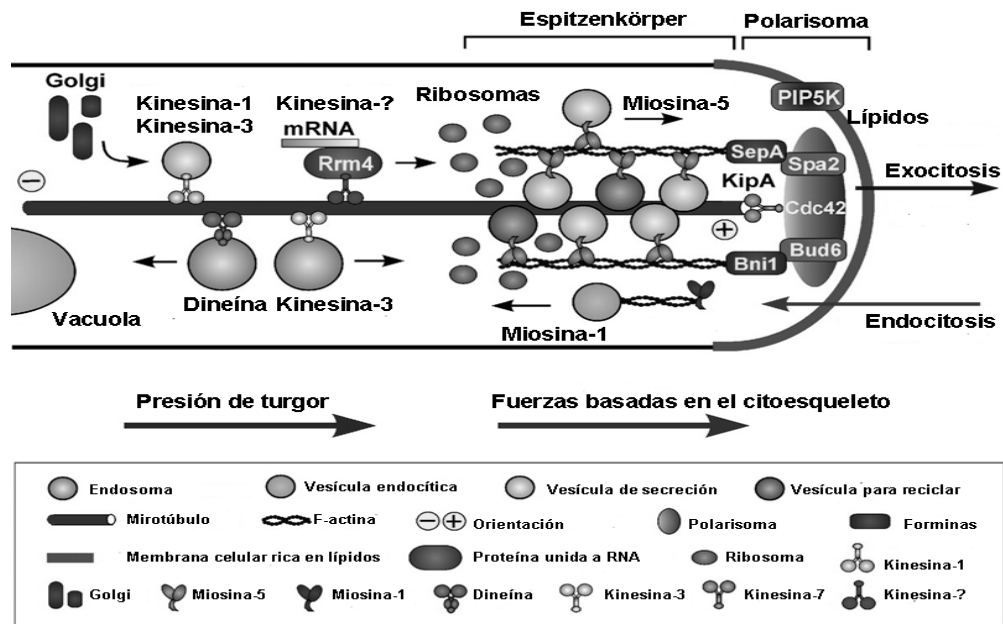


Fig. 11 Descripción hipotética del crecimiento hifal (Stainberg, 2007)

Existen dos modelos que tratan de explicar el crecimiento hifal, entre ellos, se encuentra el modelo del estado estacionario propuesto por Wessels (Sietsma y Wessels, 1994) y el modelo del centro de distribución de vesículas de Bartnicki-García (Bartnicki-García *et al.*, 1995). El primero describe a la pared celular del ápice como flexible y porosa por la falta de polimerización de la quitina y de los glucanos depositados. De acuerdo al modelo, las hifas se extienden por la zona apical flexible por los efectos de la presión de turgor intracelular y por la incorporación simultánea de precursores del crecimiento. Los componentes de la pared celular depositados en la zona apical polimerizan completamente después incorporarse en la zona de crecimiento apical, dando rigidez y forma a las hifas. Los estudios favorecen al modelo de distribución de vesículas, al identificarse el Spitzkörper en la zona apical (Bartnicki-García *et al.*, 1995; Riquelme *et al.*, 1998). El Spitzkörper concentra macrovesículas (70 a 120 nm) y microvesículas (30 a 40 nm) procedentes del aparato de Golgi, que contienen precursores del crecimiento. La estructura celular se mueve en todas direcciones en la zona apical y, además, tiende a regular la velocidad de crecimiento y la dirección hifal al controlar la distribución de vesículas a la zona apical (Steinberg, 2007; Brand y

Gow, 2009), El Spitzenkörper contiene proteínas denominadas forminas, las cuales concentran los extremos de los filamentos de F-actina en el ápice para dar lugar a la formación del llamado polarisoma. Los filamentos de F-actina dan forma al Spitzenkörper y sirven como soporte para el tránsito de vesículas por distancias cortas, desde el Spitzenkörper hacia el ápice. Las proteínas denominadas motoras del crecimiento, miosinas-5 y miosina-1, se unen a las vesículas para transportarlas hacia el ápice a lo largo de los filamentos de F-actina. La miosina-5 se relaciona con el proceso de exocitosis siendo capaz de desplazarse hasta 2 μm por los filamentos de F-actina; mientras que, la miosina-1 está ligada con la endocitosis celular, especialmente para el reciclaje de material biosintético, al parecer no dependiente de los filamentos de actina para transportar vesículas. La maquinaria de transporte de vesículas también requiere de la acción de los microtúbulos (Uchida *et al.*, 2008), además de otras proteínas (dineína y kinesina) para el transporte de vesículas a gran distancia (Steinberg, 2007). Las kinesinas (Kinesina-1 y kinesina-3) transportan vesículas por los microtúbulos de la zona subapical hacia el ápice para mantener un crecimiento polarizado; mientras que, las dineínas están involucradas en el proceso de endocitosis a gran distancia. Los estudios describen a la miosina-5 y kinesinas como los elementos más sobresalientes para mantener el crecimiento polarizado de las hifas y para regular los procesos de exocitosis, entre ellos la secreción de enzimas. En el crecimiento polarizado de las hifas se menciona la importancia de los lípidos (colesterol, esfingolípidos, ergosterol) para unir las forminas en el ápice y para el proceso de endocitosis (Steinberg, 2007). La acción coordinada de los microtúbulos y de las proteínas motoras hacen posible el crecimiento polarizado de las hifas a velocidades tan altas como $10 \mu\text{m s}^{-1}$ (Uchida *et al.*, 2008).

1.5 Aplicaciones biotecnológicas potenciales de los hongos de pudrición blanca del género *Fomes*

Los hongos de pudrición blanca son muy estudiados como fuente de enzimas lignocelulolíticas. Los hongos de los los generos *Pleurotus*, *Lentinus*, *Trametes* y *Phanerochaete* son los más sobresalientes por secretar cantidades considerables de enzimas en medio sólido, principalmente, lacasas (Tellez-Tellez *et al.*, 2008), celulasas y xilanasas (Rodríguez-Couto *et al.*, 2003; Elisashvili *et al.*, 2008; Elisashvili *et al.*, 2009). Las enzimas lignocelulolíticas producidas por estos hongos y, otros más, son de gran interés por los múltiples usos en en varios campos industriales y en sectores de la Biotecnología Ambiental y Alimentaria (Butt *et al.*, 2008; Villalba *et al.*, 2010; Ramesh *et al.*, 2011). Ciertamente, los hongos de pudrición blanca destacan por secretar lacasas, las cuales tienen gran importancia en el sector ambiental donde se emplean junto con sus enzimas para tratar efluentes industriales contaminados con colorantes sintéticos (Wesenberg *et al.*, 2003; Maciel *et al.*, 2010) y para biorremediación en la eliminación de compuestos aromáticos (Maciel *et al.*, 2010; Villalba *et al.*, 2010). Actualmente existen pocos estudios describiendo el potencial de los hongos de pudrición blanca del género *Fomes* para producir enzimas lignocelulolíticas en cultivo sólido (Elisashvili *et al.*, 2009; Papinutti y Forchiassin, 2003; 2007) y para aplicaciones biotecnológicas (Papinutti *et al.*, 2006; Neifar *et al.*, 2010). En el mismo sentido, no existen reportes de hongos termotolerantes del mismo género que muestren el potencial y las ventajas de usarlos en sistemas de cultivo sólido para la producción de enzimas lignocelulolíticas.

1.6 Análisis morfométrico del crecimiento de hongos filamentosos

El análisis de imágenes brinda datos cuantitativos a diferencia de los métodos de microscopía convencional. Las imágenes de los objetos que son capturadas se presentan usualmente como matrices de 512 x 512 pixeles, donde cada pixel tiene un valor de intensidad de color característico dentro de 256 posibilidades entre el negro y el blanco. Los objetos que se capturan en una imagen, por ejemplo las hifas, se distinguirán entre si por la deferencia de intensidad de color (Cox *et al.*,

1998). Las imágenes tienen que procesarse para mejorar el contraste de los objetos capturados y asignar el valor de intensidad de color. De esta manera, se genera una imagen basada en píxeles sobre la cual se pueden hacer mediciones de los objetos capturados al usar un Software específico (Paul y Thomas, 1998).

El análisis de imágenes permite estudiar la morfología de los hongos a nivel microscópico, ya sea, en sistemas de cultivo líquido ó sólido. En ambos sistemas se pueden cuantificar variables morfométricas, tales como la longitud y el diámetro de las hifas, la longitud total del micelio y el número total de puntas en colonias no diferenciadas, todo esto con la finalidad de relacionar la morfología del crecimiento con la productividad de enzimas (Peberdy, 1994; Spohr *et al.*, 1997; Agger *et al.*, 1998; Biesebeke *et al.*, 2005). Hasta la fecha, no existen estudios describiendo la influencia de los cambios microscópicos del crecimiento del micelio sobre la productividad de enzimas en función de la temperatura. Otros avances logrados al estudiar la morfología del crecimiento por el uso del análisis de imágenes es la cuantificación de vacuolas en las diferentes regiones de las hifas y detectar las regiones donde se lleva a cabo la mayor síntesis de metabolitos secundarios (Paul y Thomas, 1998). Los métodos de tinción acoplados al análisis de imágenes han permitido delimitar a las hifas en varias regiones y evidenciar los sitios donde se lleva a cabo la mayor secreción de enzimas (Agger *et al.*, 1998; Gordon *et al.*, 2000; Wösten *et al.*, 1991). Es posible describir la importancia del movimiento de los microtúbulos en el proceso de crecimiento hifal (Uchida *et al.*, 2008), el transporte de vesículas con precursores biosintéticos dentro de las hifas (Barniki-García *et al.*, 2005; Stainberg, 2007) y el tropismo de las mismas frente a estímulos físico-químicos (Brand y Gow, 2009). Los cambios morfológicos del micelio de los hongos filamentosos y los procesos de fragmentación micelial se pueden cuantificar en línea en reactores operando, lo cual ofrece información acerca del desempeño productivo (Nielsen y Krabben, 1995; Paul y Thomas, 1998).

El análisis de imágenes no se restringe a los sistemas de cultivo líquidos. De acuerdo a varios estudios, el análisis de imágenes se ha usado para estudiar el

crecimiento y la diferenciación de los hongos filamentosos sobre superficies sólidas, en cuyo caso, se pueden medir la mayoría de los parámetros mencionados (Olsson, 1994; Larralde-Corona *et al.*, 1997; Spohr *et al.*, 1997; Brand and Gow, 2009). Por otro lado, el uso del análisis de imágenes ha sido útil para describir los perfiles de distribución de nutrientes y de biomasa sobre cultivos superficiales (Olsson, 1994), incluso monitorear y estimar la formación de biomasa en sistemas de cultivo sólido sobre residuos agroindustriales (Couri *et al.*, 2006).

1.7 Crecimiento de hongos filamentosos en cultivo sólido

El cultivo sólido implica el crecimiento de los microorganismos y la producción simultánea de metabolitos sobre matrices sólidas, que pueden ser naturales (material orgánico) ó sintéticas (material inerte). La matriz sólida se caracteriza por contener niveles de agua que no exceden su capacidad de retención, frecuentemente, con actividades de agua entre 0.6 y 0.99 (Krishna *et al.*, 2005). La utilización de sustratos sólidos agroindustriales como fuente de nutrientes representa una ventaja del cultivo sólido para obtener productos de valor agregado a bajo costo, tales como, enzimas, metabolitos secundarios y compuestos orgánicos (Hölker *et al.*, 2004; Krishna *et al.*, 2005). La mayoría de estos metabolitos se producen en cultivo líquido, sin embargo, el cultivo sólido genera gran interés por las ventajas que exhibe respecto al primero, principalmente, para cultivar hongos filamentosos, ya que, éstos a diferencia de las bacterias son capaces de crecer sobre la superficie de los sustratos sólidos y de penetrar en los espacios intra-partícula para acceder a zonas distantes y profundas de los mismos (Varzakas *et al.*, 1998). Algunas ventajas del cultivo sólido respecto al cultivo en medio líquido son la obtención de productividades volumétricas similares ó más altas y menores efectos de inhibición por sustrato (Viniestra-González *et al.*, 2003; Téllez-Jurado *et al.*, 2006), ocasionalmente, se obtienen enzimas con mayor estabilidad al pH y temperatura (Acuña-Argüelles *et al.*, 1995), menores costos de operación (Castilho., *et al* 2000) y la producción de enzimas específicas que no son secretadas en medio líquido (Biesebeke *et al.*, 2005; Oda *et al.*, 2006).

Sin embargo, el sistema de cultivo sólido presenta algunas desventajas a gran escala que usualmente se aprecian a escala de laboratorio. Las desventajas están asociadas con el control de las variables de proceso como la temperatura, la heterogeneidad de los sustratos, el pH y la disponibilidad de oxígeno, tan sólo por citar algunas.

1.7.1 Características de los sustratos

El cultivo sólido usa frecuentemente soportes orgánicos porque proporcionan simultáneamente nutrientes e inductores para el crecimiento microbiano y la producción de enzimas, por tal razón, la composición química de los mismos es difícil de controlar de lote a lote. Los sustratos suelen seleccionarse con base en las características de un microorganismo y de la enzima a producir. En este sentido para producir celulasas y xilanasas es recomendable emplear sustratos con altos contenidos de celulosa y hemicelulosa (Shah y Madamwar, 2005; Membrillo *et al.*, 2011); mientras que, para enzimas oxidasas es preferible utilizar sustratos con alto contenido de lignina (Rodríguez-Couto y Sanromán, 2005; Rosales *et al.*, 2002; Membrillo *et al.*, 2008). El tipo de sustrato es un factor relevante en cultivo sólido para la producción de enzimas lignocelulolíticas por hongos, el cual debe ser considerado en los estudios preeliminares para obtener mayores rendimientos de enzimas por unidad de sustrato (Rosales *et al.*, 2002; Shah y Madamwar, 2005; Jiang *et al.*, 2005).

1.7.2 Tamaño de partícula

Los sustratos usados en el cultivo sólido presentan usualmente una área superficial por unidad de volumen alta (10^3 a 10^6 m²/m³) (Raimbault, 1998). Esta característica de los sustratos favorece una mayor área de transferencia de nutrientes entre los microorganismos y el sustrato (Muniswaran y Charyulu, 1994; Membrillo *et al.*, 2008). Los tamaños de partícula pequeños proporcionan un área superficial de contacto mayor entre el micelio y el sustrato, pero tienden a limitar el intercambio gaseoso en la matriz sólida porque se reducen los espacios intrapartícula. Por otro lado, las partículas grandes favorecen el intercambio gaseoso al disminuirse el grado de empaquetamiento del sustrato, sin embargo, exhiben una

menor área superficial de contacto para el ataque microbiano (Barrios-González *et al.*, 1993; Muniswaran y Charyulu, 1994; Mazutti *et al.*, 2007). Frecuentemente se emplean mezclas de partículas con distintos tamaños para tratar de balancear los efectos mencionados y obtener los mayores rendimientos, pero existen problemas asociados al control de la reproducibilidad de los ensayos por el manejo de un sistema de partículas heterogéneo (Muniswaran y Charyulu, 1994; Krishna, 1999; Hu y Duvnjak, 2004; Botella *et al.*, 2007).

1.7.3 Humedad y actividad de agua

Los niveles de humedad mayores a 90% y menores a 50 % con frecuencia disminuyen la producción de enzimas lignocelulolíticas (Azin *et al.*, 2007). Los requerimientos de humedad dependen del tipo de sustrato, microorganismo y enzima a producir (De Souza *et al.*, 2002; Rosales *et al.*, 2002; Panagiotou *et al.*, 2003; Asgher *et al.*, 2006; Azin *et al.*, 2007). Por esta razón, la humedad del sustrato es una variable considerada en los estudios de optimización junto con las variables ya mencionadas (Jecu, 2000; Shah y Madamwar, 2005; Azin *et al.*, 2007; Jing *et al.*, 2007). La humedad del sustrato es relevante para el crecimiento de los hongos en cultivo sólido, sin embargo, se reconoce que, la eficiencia del proceso depende mayoritariamente de la actividad de agua (A_w), variable que da información acerca de las interacciones físicas entre el agua y los sustratos. Esta variable tiende a modificar drásticamente el crecimiento de los microorganismos y la producción de enzimas (Oriol *et al.*, 1988; Lu *et al.*, 2003; Montiel-González *et al.*, 2004). Esto es porque a niveles de actividad de agua bajos ocurre una difusión lenta de los nutrientes, mientras que, a valores altos los sustratos tienden a compactarse por el exceso de agua. En este sentido, la humedad y la actividad de agua son relevantes para el crecimiento microbiano sobre superficies sólidas (Lu *et al.*, 2003). Los principales problemas asociados con la humedad son el control de la desecación de los sustratos por el calor generado durante el crecimiento microbiano.

1.7.4 El pH

Los niveles de producción de enzimas lignocelulolíticas son modificados drásticamente durante el transcurso del crecimiento de los hongos al acidificarse o alcalinizarse el medio de producción, por ello, se contempla en la mayoría de los estudios de optimización (Jecu, 2000; Panagiotou et al., 2003; Shah y Madamwar, 2005; Jing et al., 2007). La producción de enzimas se ve afectada drásticamente cuando el pH del cultivo sólido es menor que 5 ó mayor que 7. El descenso de pH en los cultivos es usualmente consecuencia de la producción ácidos orgánicos como el oxálico y otros intermediarios del ciclo de Krebs, mientras que, la alcalinización se debe a la presencia de amonio liberado por la presencia de actividad proteolítica (Hakala *et al.*, 2005).

1.7.5 Temperatura

El crecimiento microbiano se lleva a cabo en cultivo sólido en condiciones de temperatura no isotérmicas (Isakari *et al.*, 1997). Estas condiciones de crecimiento son el resultado de la baja conductividad térmica de los sustratos y de los niveles bajos de agua en el sistema. Por estas razones, la temperatura es quizá la variable de proceso más difícil de controlar en cultivo sólido (Shojaosadati *et al.*, 2007). La baja conductividad térmica de los sustratos genera gradientes de temperatura adversos para el crecimiento microbiano. De acuerdo a algunos estudios, pueden ser de 3 hasta 10 °C por centímetro de lecho. Dichos gradientes térmicos ocasionan el cese del crecimiento microbiano y la nula formación de producto. (Mitchell *et al.*, 2002; Shojaosadati *et al.*, 2007; Figueroa *et al.*, 2011). Es un hecho que, el metabolismo de los microorganismos es cada vez más rápido al incrementarse la temperatura, sin embargo, existe una condición térmica limitante para las funciones celulares (Shojaosadati *et al.*, 2007; Figueroa *et al.*, 2011). Se han descrito estrategias para controlar los gradientes de temperatura, sin embargo, no han sido del todo exitosas (Nagel *et al.*, 2001; Mitchell *et al.*, 2002).

En cultivo sólido, la temperatura puede modificar la producción (Jecu, 2000; Azin *et al.*, 2007) y la velocidad de producción de enzimas (Tao *et al.*, 1997); puede llegar incluso a impedir la producción de enzimas y favorecer la muerte del cultivo (Shah y Madamwar, 2005). La temperatura de cultivo también ocasiona la deshidratación de los soportes empleados para el crecimiento microbiano, limitando la producción de enzimas (Mazutti *et al.*, 2007). La desecación de los sustratos reduce la actividad de agua ocasionando una actividad microbiana nula (Weber *et al.*, 2002). Para contrarrestar los problemas del efecto de los gradientes térmicos y sus implicaciones sobre el metabolismo microbiano se podrían emplear los microorganismos termotolerantes para evaluar su capacidad de crecer en condiciones no-isotérmicas sin que la formación del producto se vea afectada.

1.8 Hongos de pudrición blanca termotolerantes

Los hongos crecen en un intervalo amplio de temperaturas clasificándose en tres grupos principales: psicrófilos, mesófilos y termófilos. Los hongos mesófilos crecen usualmente a temperaturas de 5 a 35 °C, pero algunos mantienen crecimiento a temperaturas mayores. Estos últimos se consideran termotolerantes al mostrar una temperatura mínima de crecimiento menor a 20 °C y una máxima cercana a 50 °C (Maheshwari *et al.*, 2000; Cooney y Emerson, 1964). Se ha sugerido que la presencia de ciertos mecanismos de respuesta intracelular puede relacionarse con el crecimiento de los hongos mesófilos a temperaturas elevadas (Sánchez y Lindquist, 1990; Nordström y Laakso, 1992; Maheshwari, 2000; Tereshina, 2005; Abrashev *et al.*, 2008). Actualmente, los hongos termotolerantes y termófilos son estudiados para la obtención de enzimas lignocelulolíticas termoestables para uso industrial y aplicaciones biotecnológicas (Duran y Esposito, 2000; Jing *et al.*, 2007; Neifar *et al.*, 2010). Al respecto, existen pocos estudios describiendo hongos de pudrición blanca termotolerantes con potencial biotecnológico (Snajdr y Baldrian, 2007; Dantán-González *et al.*, 2008; Neifar *et al.*, 2010).

En el 2004 se aisló un hongo de pudrición blanca de residuos de la madera en descomposición en Yucatán, que se denominó como *Trametes* sp. EUM1. Este microorganismo exhibió potencial para producir lacasas en medio líquido a temperaturas no reportadas para los hongos del mismo género (40 °C). Las lacasas secretadas por el hongo mostraron características prometedoras para usarse en biotecnología ambiental al ser estables en sistemas no acuosos y en condiciones extremas de pH y temperatura (Medina, 2003). Las enzimas lacasas resultaron ser inducibles por fuente de nitrógeno y por la presencia de algunos inductores aromáticos (Márquez, 2004), asimismo, se confirmó que las lacasas producidas en medio líquido eran termoestables (Márquez, 2006). Los estudios de Márquez- Araque *et al.* (2007) fueron los primeros en mostrar que el hongo denominado hasta la fecha como *Trametes* sp. EUM1 también secretaba cantidades considerables de celulasas y xilanasas en un sistema sólido basado en el sustrato bagazo de caña.

El presente estudio describe la metodología para clasificar satisfactoriamente al hongo descrito anteriormente, ya que, no se había abordado en los estudios previos. En la parte central de la investigación se describen cambios en el patrón de crecimiento macroscópico y microscópico del hongo, además, en la secreción de enzimas lignocelulolíticas, como respuestas fisiológicas asociadas a la adaptación térmica del hongo. También se analizan las ventajas de los mecanismos de adaptación térmica exhibidos por el hongo en un sistema de cultivo sólido donde las condiciones de crecimiento son no-isotérmicas.

2 JUSTIFICACIÓN

Los hongos de pudrición blanca son microorganismos mesófilos que tienen potencial para producir enzimas lignocelulolíticas sobre residuos agroindustriales en medio sólido (Rodríguez-Couto *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2005; Elisashvili *et al.*, 2008). Estos hongos son capaces de producir altos rendimientos de enzimas sólo cuando se cultivan preferentemente a la temperatura máxima para su crecimiento (28 a 32 °C), después de estas condiciones, la producción de enzimas se ve afectada drásticamente (Pointing *et al.*, 2000; Šnajdr, 2007; Patrick *et al.*, 2011). En este sentido no se han evaluado las ventajas de hongos de pudrición blanca termotolerantes en cultivo sólido para crecer y producir enzimas lignocelulolíticas a temperaturas mayores a su máximo de crecimiento. Con lo cual se contrarrestaría el efecto adverso de la temperatura sobre el cultivo de hongos en medio sólido. Además, no se ha estudiado la relevancia de los cambios microscópicos del crecimiento micelial en la termotolerancia.

3 HIPÓTESIS

El hongo de pudrición blanca *Fomes* sp. EUM1 al crecer a temperaturas mayores a su máximo de crecimiento disminuirá la ramificación del micelio e incrementará la producción de enzimas lignocelulolíticas. Estas respuestas fisiológicas serán favorables en cultivo sólido para contrarrestar los efectos de la temperatura sobre el crecimiento y la formación de enzimas.

4 OBJETIVOS

4.1 General

Analizar los cambios morfológicos del crecimiento micelial y de la producción de enzimas lignocelulolíticas a distintas temperaturas.

4.2 Específicos

- Identificar molecularmente el hongo de pudrición blanca
- Cuantificar el crecimiento micelial del hongo en cultivos superficiales en caja Petri a distintas temperaturas
- Establecer la termotolerancia del hongo de pudrición blanca
- Describir los cambios morfológicos del micelio del hongo de pudrición blanca en cultivos superficiales a distintas temperaturas
- Cuantificar la producción de celulasas, xilanasas y lacasas en medio sólido por el hongo sobre rastrojo de maíz a distintas temperaturas
- Comparar el patrón electroforético de las enzimas lignocelulolíticas producidas por el hongo en cultivo sólido a distintas temperaturas

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Identificación molecular del microorganismo

5.1.2 Cultivo y propagación del hongo de pudrición blanca

El hongo de pudrición blanca se cultivó superficialmente en caja de Petri sobre medio EMELAB con la siguiente composición (g L^{-1}): extracto de malta 40, extracto de levadura 3, agar bacteriológico (Schlosser *et al.*, 1997).

El cultivo se incubó a 30°C durante 7 días para colonizar completamente la superficie de agar. La propagación consistió en inocular medio fresco (EMELAB) con un disco de agar con micelio (0.6 cm de diámetro). El inóculo se tomó de la periferia de crecimiento de una colonia previa con sacabocados porque en esta zona se localiza el micelio con las hifas metabólicamente más activas (Wosten *et al.*, 1997).

5.1.3 Cultivo de la bacteria *Escherichia coli* DH5 α

La bacteria de *E. coli* DH5 α se emplearon para amplificar la región de ITS necesaria para la identificación molecular del hongo de pudrición blanca. La cepa se comercializa por la compañía Promega y con frecuencia es utilizada para construir cepas bacterianas recombinantes debido a que se obtiene un elevado número de células transformantes (5×10^8 transformantes μg^{-1} de ADN) (Hanahan, 1983). La bacteria carece del gen *lac z* (operón *lac*) que codifica para la enzima beta-galactosidasa. El sistema de selección de colonias recombinantes se basa en la complementación del gen beta-galactosidasa. Esta metodología permite diferenciar colonias no transformantes de las transformantes y diferenciar las colonias transformantes con y sin inserto.

La cepa de *E. coli* DH5 α se propagó en caja Petri sobre el medio Luria-Bertani (LB) de la composición siguiente (g L^{-1}): bacto-triptona 10, NaCl 10, extracto de levadura 5. El pH del medio se ajustó a 7.5 con NaOH 2 M y después se esterilizó por 20 min a 1.2 kg cm^{-2} . Cuando se requirió preparar medio sólido se agregó agar bacteriológico al medio LB líquido a una concentración de 20 g L^{-1} (Pérez-Aguirre, 2009).

5.1.4 Marcador de masa molecular

El DNA Ladder (GeneRuler™ de 1kb) se utilizó como marcador de masa molecular en los geles de agarosa. Sus características se muestran en la Fig. 12:

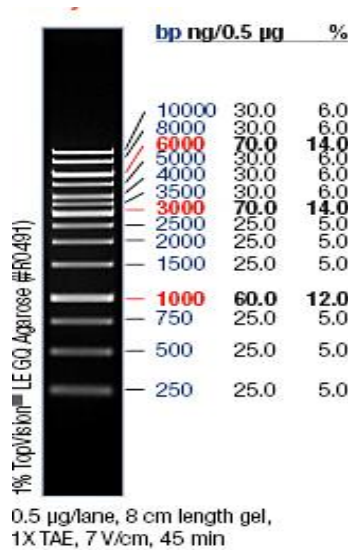


Fig. 12 Patrón electroforético del DNA ladder

5.1.5 Cebadores

Los cebadores ó *primers* ITS1-F y ITS4-B se utilizaron para la amplificación del ADN ribosómico (ADNr). El par de primers presenta gran especificidad para basidiomicetos (Gardes y Bruns, 1993). Los primers amplifican una porción del gene 18S, secuencia completa de los genes espaciadores de transcripción interna (ITS1; ITS2), el gene 5.8S y una porción del gen 28S (Ver Anexo A). Este par de primers también se utilizó para amplificar la región del ADNr (18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S) una vez que se clonó en el vector plasmídico pGEM®-T Easy. Las secuencias de ambos primers se mencionan a continuación: primer Forward ITS1-F, 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'; primer reverse ITS4-B, 5'-CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG-3'. La concentración inicial de ambos primers se ajustó a 100 mM para realizar los ensayos de la PCR. La región del ADNr que

se amplificó por los primers se denotó ambiguamente más adelante como amplicón o inserto (Pérez-Aguirre, 2009).

5.1.6 ADN genómico total

El hongo creció durante 10 días a 30 °C en medio líquido con la composición siguiente: 4% de extracto de malta y 0.3% de extracto de levadura. La biomasa formada se colectó filtrando el micelio en maya de nilón Nyltal estéril con diámetro de poro de 30 μm . El micelio retenido se lavó con 100 mL de NaCl 0.9% (p/v) para eliminar los componentes indeseables de medio de cultivo. El exceso de humedad de la biomasa se redujo colocando el micelio sobre un papel filtro estéril. La biomasa se trasladó a un mortero estéril frío (-20°C) y se le agregó nitrógeno líquido constantemente para evitar su fusión. El micelio se molió con el pistilo en el mortero, siempre en presencia del nitrógeno líquido. El micelio molido se depositó en tubos Eppendorf estériles fríos con ayuda de una espátula fría pequeña, ambos utensilios se enfriaron con baño de nitrógeno líquido. Se depositó en los tubos Eppendorf 50 mg de micelio molido (aproximadamente 0.3 mL del volumen total de los tubos).

El ADN genómico total (ADNg) del hongo de pudrición blanca se extrajo y purificó de acuerdo al protocolo de extracción de ADN Wizard® Genomic Purification Kit (Promega, Cat. A1120; <http://www.promega.com/tbs/tm050/tm050.html>). El método permitió recuperar de 40 hasta 60 ng de ADNg μL^{-1} . El ADNg puro se usó para los ensayos de la PCR para amplificar la región del ADNr 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S. La metodología detallada se describe a continuación:

l) **Lisis celular.** Al micelio en polvo se le agregó 600 μL de la “Solución de Lisis de Núcleos”. Las muestras se mezclaron agitando los tubos en Vórtex por 3 s o manualmente, invirtiendo los tubos 5 veces. Las muestras se incubaron a 65 °C por 20 min en Termomixer (Termo Lab), seguido de su enfriamiento a temperatura ambiente (T_a) por 5 min. El micelio lisado exitosamente se debe observar como un precipitado.

II) Eliminación de ARN. A las muestras lisadas se les adicionó 3 μL de “RNAsa” y los tubos se invirtieron 5 veces manualmente. Las muestras se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 20 min para llevar a cabo la hidrólisis del ARN por la enzima. Las muestras se enfriaron por 5 min a Ta.

III) Eliminación de proteína. Las muestras se mezclaron con 200 μL de “Solución de Precipitación de Proteínas” y los componentes en solución se mezclaron 5 veces manualmente. Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm por 5 min a Ta para precipitar las proteínas y restos celulares. El sobrenadante se trasladó a un tubo eppendorf estéril con la punta de una pipeta, el pellet fue eliminado.

IV) Precipitación y Purificación de ADNg. Al sobrenadante se le agregó 600 μL de isopropanol frío (10 $^{\circ}\text{C}$) para precipitar el ADNg. Los componentes en solución se mezclaron manualmente de manera suave, hasta que fuese visible la formación de una red de filamentos (ADNg). Al no detectarse, las muestras deben reposar toda una noche a -20 $^{\circ}\text{C}$ para precipitar la mayor cantidad de ADNg. Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm por 2 min a Ta y el sobrenadante se descartó al decantar los tubos suavemente. El pellet resultante se le agregó 600 μL de etanol al 70% y se disgregó con la punta estéril de una pipeta y luego al invertir los tubos 10 a 15 veces. Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm por 2 min a Ta y el sobrenadante se desechó. Los tubos se decantaron sobre papel filtro para eliminar el agua residual. El pellet retenido se secó incubando los tubos a 40 $^{\circ}\text{C}$, aproximadamente por 20 a 30 min.

V) Rehidratación de ADNg. Al pellet seco (ADNg) se le adicionó 100 μL de “Solución Rehidratante de ADN¹” y la solución se calentó a 65 $^{\circ}\text{C}$ por 1 h en un Termomixer. Durante este proceso, las muestras se mezclaron cada 30 min, golpeado la base de los tubos con los dedos. Algunas muestras se hidrataron toda una noche manteniendo las muestras a 4 $^{\circ}\text{C}$ para disolver el ADNg. El ADNg hidratado en solución se conservó a -20 $^{\circ}\text{C}$.

¹ **Solución de rehidratación de AND.** Tris-HCl 10 mM y pH 7.4, EDTA 1 mM y pH 8.0.

5.1.7 Enzimas *Taq* polimerasa, enzima de restricción *pstI* y ligasa T4 de ADN

La enzima *Taq* polimerasa GoTaq (5 U μL^{-1} , Promega) se usó en los ensayos de la PCR para amplificar los fragmentos de ADNr (pag. 32). La enzima ligasa de ADN del fago T4 (250 U, Invitrogen) se usó para ligar el inserto de ADNr con el vector pGEM-T Easy. La enzima de restricción *PstI* (8 U μL^{-1} , Invitrogen) se empleó para digerir el plásmido pGEM-T Easy recombinante con la finalidad de liberar el inserto de ADNr clonado.

5.1.8 Vector plasmídico pGEM-T Easy

Este vector se usa para transformar bacterias (pag. 38) y tiene la característica de mejorar la eficiencia de ligación de los productos de la PCR (amplicones). El vector es lineal y presenta en ambos extremos terminales 3' una base nitrogenada de timina (T). Los extremos-T- salientes previenen la formación circular del vector y proporcionan una proyección compatible para los productos de la PCR que se han generado por ciertos tipos de polimerasas, como por ejemplo la *Taq* polimerasa, la cual genera extremos de adenina en el ADN amplificado lo que permite la complementariedad con las timinas del vector y facilita por lo tanto los procesos de ligación. Algunas de las características relevantes del vector son contener un marcador de selección basado en la resistencia a ampicilina y una región que codifica para la enzima beta-galactosidasa (Fig. 13). Esta última región tiene la peculiaridad de contener un sitio de clonación múltiple para fragmentos de ADN foráneos (amplicón). El ADN foráneo que se clona exitosamente en el vector (llamado ahora plásmido recombinante) inactiva por inserción el gen codificante para la enzima beta-galactosidasa. Esto tiene implicaciones prácticas para seleccionar las células de *E. coli* que se transformaron exitosamente. Como ejemplo, un medio suplementado con un sustrato derivado de la galactosa (X-Gal), un inductor de la expresión de la enzima beta-galactosidasa (IPTG) y ampicilina, permitirá el crecimiento de las células transformadas exitosamente, pero éstas no expresarán la enzima beta-galactosidasa, por lo tanto, las células transformantes serán incapaces de hidrolizar el sustrato (Ver Soluciones de X-Gal

y IPTG) y se podrán visualizar como colonias blancas o crema. En contraste, las células transformadas que adquirieron el plásmido sin inserto también crecerán en el medio con ampicilina pero expresarán la enzima, ya que ésta no se inactivó por la ausencia de inserción del amplicón. En este caso, las células transformadas llevarán a cabo la hidrólisis del sustrato y se podrán visualizar como colonias azules, esto es debido a la oxidación de uno de los componentes liberados después de hidrolizar el sustrato derivado de la galactosa (ver X-Gal, IPTG) (Robles y Doers, 1994).

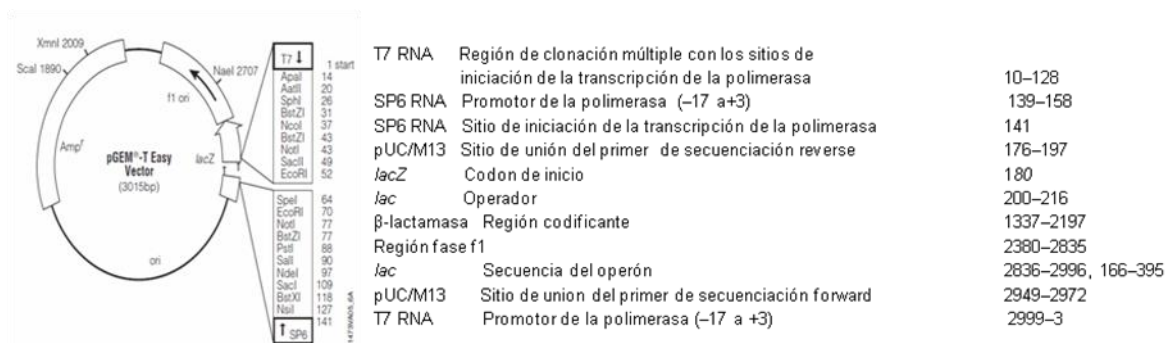


Fig. 13 Mapa y puntos de referencia de la secuencia del vector pGEM-T Easy

5.1.9 Antibiótico

Se suplementó ampicilina al medio de crecimiento de *E. coli* Luria-Bertani (LB) con la finalidad de seleccionar bacterias transformadas con el vector de clonación pGEM-T Easy recombinante, ya que, el vector contiene un marcador de resistencia para el antibiótico. El antibiótico se preparó a una concentración de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para usarse como stock y la solución se esterilizó filtrando en membranas Millipore de 0.20 μm de poro. La solución estéril se distribuyó en tubos Eppendorf en alícuotas de 500 μL para su conservación a -20°C . El medio LB se suplementó con ampicilina a una concentración de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

5.1.10 Soluciones de X-Gal y IPTG

La solución stock de X-Gal e IPTG se suplementan al medio LB para seleccionar transformantes. El X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) se

preparó disolviendo 100 mg del compuesto en 2 mL de N, N'- Dimetilformamida. La solución se envolvió en aluminio y se almacenó a -20 °C para evitar su oxidación. La solución stock de IPTG 0.5mM se preparó disolviendo 1.2 g de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido en 50 mL de agua desionizada. La solución se esterilizó filtrando en membranas Millipore 0.20 μ m de poro (Sigma Aldrich) y se conservó a 4 °C.

Algunas características de ambos compuestos se describen a continuación. El X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) es un derivado de la galactosa formado por la unión covalente de un grupo indol y un residuo de galactosa. Las células de *E. coli* que expresan la beta-galactosidasa hidrolizan al X-Gal a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol, éste último compuesto se oxida tornándose azul. Las células transformadas con el vector pGEM-T Easy recombinante no expresan la enzima beta-galactosidasa y pueden seleccionarse en cultivos en placa por su color crema de las células azules no transformantes.

El IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) es análogo de la lactosa, de modo que induce la transcripción del gen *lac z* que codifica la enzima beta-galactosidasa. El compuesto no se hidroliza por la bacteria, por lo que su efecto de inducción es constante en el medio (Recomendaciones del proveedor Sigma Aldrich).

5.1.11 PCR de gradiente de temperatura

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de gradiente se llevó a cabo variando la temperatura de anillamiento de los *primers* durante la PCR. La finalidad de la PCR de gradiente fue seleccionar las condiciones térmicas óptimas para amplificar el fragmento de ADN ribosomal (ADNr) de interés (amplicón). La PCR consistió de la repetición de tres pasos básicos (desnaturalización de ADN, anillamiento de los *primers* al ADN y elongación de ADN) (Saiki *et al.*, 1985; Mullis and Faloona, 1987), los cuales se efectúan de forma sucesiva en condiciones de temperatura específicas. La metodología seguida para la PCR en gradiente y la preparación de muestras se presentan a continuación.

En un tubo Eppendorf de 500 μL se preparó una mezcla de reacción (Master Mix) en mezclando reactivos en orden específico (Pérez-Aguirre, 2009). Cada reactivo se descongeló lentamente en hielo y se mezcló antes de usarse. La mezcla de reacción se llevo a cabo manteniendo el tubo en hielo y se describe en la Tabla 3.

Tabla 1 Lista detallada de reactivos necesarios para la PCR

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Master Mix x Tubo
H ₂ O desionizada estéril	---	---	25.75
Buffer 10X Taq Polimerasa	10X	1 X	5 μL
MgCl ₂	25 mM	2.5 mM	5 μL
dNTPs	10 mM	200 μM	1 μL
<i>primer</i> Forward ITS1-F	10 μM	1 μM	5 μL
<i>primer</i> Reverse ITS4-B	10 μM	1 μM	5 μL
ADNg	0.1 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$	6 ng μL^{-1}	3 μL
Taq Polimerasa	5 u μL^{-1}	0.025 u μL^{-1}	0.25 μL
Volumen final	---	---	50 μL

El gradiente de temperatura en los ensayos de la PCR se estableció a partir de la temperatura máxima de hibridación (T_{MH}) de ambos *primers* como se describe a continuación:

$$T(^{\circ}\text{C})_{\text{Máxima de Hibridación}} = T(^{\circ}\text{C})_{\text{Mínima entre primers}} - 10^{\circ}\text{C} = 52^{\circ}\text{C}_{\text{ITS1-F}} - 10^{\circ}\text{C} = 42^{\circ}\text{C}$$

Se consideraron cinco temperaturas de hibridación (T_H) de los *primers* estando por abajo de la temperatura máxima de hibridación (T_{MH}) de los mismos. Manejando un intervalo de 2°C, las T_H fueron de 42 °C, 40 °C, 38 °C, 36 °C, 34 °C. La Master Mix se distribuyó en 5 tubos Eppendorf de 200 μ L, todo el material se mantuvo en frío. Los tubos se colocaron en un Termociclador y las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: *desnaturalización* (94 °C por 3'; 94 °C por 30''), *Hibridación* (T_H °C respectiva por 50''), *Elongación* (35 ciclos a 72 °C por 45'', 72 °C por 10'). El tiempo de elongación de 45'' se estableció considerando la velocidad de polimerización de la *Taq* Polimerasa de 1000 nucleotidos min^{-1} y el tamaño del amplicón esperado de aproximadamente 700 pb (18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S).

Los productos de la amplificación se revelaron en un gel de agarosa. La temperatura de anillamiento utilizada en reacciones posteriores fue la que arrojó mejores resultados. Teniendo en cuenta lo anterior, se amplificó nuevamente con la diferencia de que se recuperó mayor volumen de reacción. El producto de la PCR (volumen de 200 μ L) se analizó en gel de agarosa al 1% y el ADNr amplificado se visualizó exponiendo momentáneamente el gel a radiación ultravioleta (UV), esto para evitar la formación de dímeros de timina. La banda visualizada en el gel se cortó con una navaja, se aisló del resto del gel, se seccionó en trozos pequeños y se depositó en un tubo Eppendorf (1.5 mL). La purificación del ADN contenido en gel de agarosa se describe a continuación (Pérez-Aguirre, 2009).

5.1.12 Purificación de productos de PCR

El producto de la PCR se purificó para incrementar la eficiencia de ligación entre el amplicón de interés y el vector de clonación pGEM-T Easy. La purificación también elimina los productos de la PCR amplificados inespecíficamente, evitando que sean clonados con el vector.

Los productos de la PCR se purificaron usando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). El método de purificación permitió extraer y purificar fragmentos de ADNr directamente de las reacciones de la PCR o partiendo de

geles de agarosa contenido ADNr. Esta última metodología permite purificar fragmentos de ADN de 100 bp a 10kb con 90% de recuperación. La metodología se describe a continuación según las recomendaciones del proveedor.

I) Unión del ADN a membrana. La agarosa contenida en los tubos eppendorf se mezcló con solución de unión a membrana (Membrane Binding Solution, MBS) en la siguiente proporción: 10 μ L MBS por cada 10 mg de gel de agarosa. Los tubos se calentaron a 65 °C hasta fundir completamente la agarosa. Durante este paso, las muestras se mezclaron 3 a 4 veces invirtiendo los tubos manualmente de manera cuidadosa. El gel disuelto (700 μ L) se depositó en minicolumnas, las cuales se montaron previamente sobre tubos colectores. Las muestras se dejaron reposar por 1 min a temperatura ambiente (Ta) y se centrifugaron a 14,000 rpm por 1 min. El sobrenadante se descartó y las minicolumnas se montaron nuevamente sobre otros tubos colectores.

II) Lavado del ADN. Un volumen de 700 μ L de solución de lavado de la membrana (Membrane Wash Solution, MWS) se agregó a las minicolumnas que tenían ligado al ADN. Las muestras reposaron por 1 min, se centrifugaron (14, 000 g, 1 min) y las minicolumnas se montaron sobre otros tubos colectores, el sobrenadante fue descartado. El procedimiento descrito se repitió nuevamente bajo las condiciones mencionadas. Las minicolumnas montadas sobre los tubos colectores se centrifugaron por 1 min a Ta para evaporar los remanentes de etanol que son parte de la solución MWS.

III) Elución. Las minicolumnas se montaron ahora sobre tubos Eppendorf estériles (1.5 mL), se les agregó un volumen de 50 μ L de agua libre de nucleasas, se dejaron reposar por 1 min y centrifugaron a 14,000 por 1 min. El volumen de ADN eluído (40 μ L) y recién purificado se mantuvo a 4 °C. El ADN se reveló en gel de agarosa (Fig. 2) para verificar la pureza. Una vez puro, se usó para llevar a cabo su ligación con el vector pGEM-T Easy.

5.1.13 Ligación

Los productos de amplificación se deben ligar a un vector de clonación para transformar bacterias de *E. coli*. El vector recombinante se obtuvo ligando el vector de clonación pGEM-T Easy con el amplicón de interés purificado. La obtención del vector de clonación recombinante fue uno de los pasos más importantes y, a su vez, limitantes para generar células transformantes, ya que, debió ser estable antes y después de la transformación. El ADNr purificado se ligó al vector de clonación pGEM-T Easy por la acción de la ligasa T4. La cantidad de inserto necesario para llevar a cabo la reacción de ligación con el vector pGEM-T Easy se calculó con base en la relación que se menciona a continuación (protocolo pGEM-T Easy Vector Systems). Después de varios ensayos se pudo establecer la proporción Inserto: Vector 1 a 8 partes como la más adecuada:

$$\begin{aligned} ng \text{ Inserto} &= \frac{(ng \text{ Vector})(Kb \text{ Inserto})}{(Kb \text{ Vector})} [\text{Proporción Molar Inserto: Vector}] = \\ &= \frac{(50ng \text{ Vector})(0.65Kb \text{ Inserto})}{(3Kb \text{ Vector})} \left[\frac{8 \text{ Inserto}}{1 \text{ Vector}} \right] = 87ng \text{ Inserto} \\ \mu L \text{ Inserto} &= \frac{ng \text{ Inserto}}{[inicial \text{ Inserto}]} = \frac{87ng \text{ Inserto}}{60ng / \mu L} = 1.5 \mu L \end{aligned}$$

La mezcla de reacción para la ligación Inserto: Vector 1 a 8 partes, se describe en la Tabla 4.

Tabla 2 Componentes empleados en la reacción de ligación Vector-Inserto.

Componente de la reacción	Reacción Estándar	Control Positivo	Control de Ligación
Buffer de ligación 2X	5	5	5
Vector pGEM-T Easy (50ng/μL)	1	1	1
Inserto (Producto de PCR)	1.5	---	---
Inserto de ADN control	---	2	
Ligasa T4 de ADN	1	1	1
Agua libre de nucleasa	1.5	1	1
Volumen total	10	10	10

Los componentes se mezclaron con pipeteo suave (10 veces). La reacción de ligación se corroboró estableciendo varios controles², los cuales se muestran en la Tabla 4. La mezcla de reacción respectiva se calentó a 65 °C por 15 segundos para relajar los fragmentos de ADN y después se mantuvo en hielo. La reacción de ligación prosiguió a 4 °C por 24 h en un refrigerador (también es factible a 10 °C por 24 o 30 h). La reacción de ligación Inserto: Vector y los controles se analizaron en gel de agarosa. El vector recombinante se utilizó para transformar las células electrocompetentes de *E. coli* DH5α (protocolo pGEM-T Easy Vector Systems).

5.1.14 Células electrocompetentes

La transformación bacteriana requirió de células electrocompetentes. Usar células electrocompetentes facilita el paso del ADN plasmídico (ADNp) por la membrana celular. La preparación de células bacterianas se denomina “competencia” y las células que logran incorporar el ADNp se denominan “competentes”. La preparación de células competentes de *E. coli* se describe a continuación. Una

² **Control Positivo.** Corrobora la clonación del inserto con el vector; Control de ligación. Corrobora la funcionalidad de la enzima ligasa.

muestra de células de *E.coli* DH5 α se tomó de un cultivo previo con un palillo estéril. La muestra se inoculó en 5 mL de medio LB y el medio se incubó a 37 °C por 16 h y 200 rpm (D.O_{600 nm} = 0.6 a 0.8). Del cultivo celular se retiró una alícuota de 50 μ L para inocular 50 mL de medio LB (Tubos Falcón). El medio inoculado se incubó por 3 h bajo las condiciones mencionadas (D.O 0.4). El cultivo celular se enfrió en hielo por 15 min y durante este periodo se agitó suavemente para un enfriamiento homogéneo. Varias alícuotas (1 mL) del cultivo celular se transfirieron a tubos Eppendorff y las muestras se centrifugaron (14,000 rpm, 5 min, 4 °C) para sedimentar las células. El sobrenadante se descartó y los tubos con el pellet se mantuvieron en frío sobre una gradilla (enfriada a 4 °C por 24 h). A los tubos se les agregó 1 mL de glicerol 10% frío (4 °C) para resuspender las células, este paso requirió la agitación suave de los tubos. La solución de células se centrifugó nuevamente (14,000 rpm, 5 min, 4 °C) y el sobrenadante se descartó. Los pellets se trataron con glicerol dos veces en las condiciones ya mencionadas. Las células se resuspendieron finalmente en 50 μ L de glicerol 10% frío, se colocaron en una gradilla fría y se conservaron a -70 °C. Las células competentes se emplearon para la transformación (Pérez-Aguirre, 2009).

5.1.15 Transformación de células de *E. coli*

La electroporación o electroporación se empleó para incorporar ADNp recombinante al interior de las células de *E coli* DH5 α . La técnica se basa en aplicar un campo eléctrico a las células competentes para inducir la formación de poros en la membrana plasmática, a través de estos poros penetra el ADN palmídico (ADNp) al interior de las células. Las células deben recibir un voltaje que exceda la rigidez dieléctrica de sus membranas para que se formen los poros, cuando esto sucede, el vector entra a las células e inmediatamente, los poros son reparados. La transformación de células de *E. coli* se describe a continuación (Pérez-Aguirre, 2009).

Los materiales y reactivos mencionados se colocaron previamente en una campana de flujo laminar para mantener las condiciones de esterilidad. Las células electrocompetentes suspendidas en glicerol (50 μ L) y las celdas de

electroporación (0.1 cm) se mantuvieron previamente a -70°C (24 h) y, después, en hielo al momento de usarse. Se preparó medio LB líquido y medio LB suplementado con ampicilina a una concentración final de $100\ \mu\text{g/ml}$. El electroporador se ajustó a un voltaje de $1,100\ \text{V}$.

En un tubo Eppendorff (1.5 mL) se mezclaron suavemente $2\ \mu\text{L}$ del vector pGEM recombinante y $50\ \mu\text{L}$ de células electrocompetentes. La mezcla se depositó al instante en la celda de electroporación fría, ésta se tapó y se introdujo en el electroporador. Las células recibieron 2 pulsos de $1,100\ \text{V}$, la celda se retiró del electroporador y, las células contenidas en ésta, se mezclaron con $200\ \mu\text{L}$ de medio LB. Las células suspendidas en el medio LB se trasladaron en tubo Eppendorf para su cultivo (37°C , $200\ \text{rpm}$, $1\ \text{h}$). El cultivo celular se inoculó sobre un medio de selección específico para seleccionar transformantes (ver análisis de transformantes de *E coli* DH5 α). El proceso de transformación requirió establecer varios controles, los cuales se trataron en las condiciones mencionadas anteriormente (Pérez-Aguirre, 2009).

- a) Electroporación de células sin ADNp recombinante seguido de su cultivo en medio LB y medio LB/Antibiótico para corroborar la viabilidad de las células después de la electroporación y verificar la actividad bactericida de la ampicilina a la concentración empleada ($100\ \mu\text{g mL}^{-1}$).
- b) Electroporación de células con el plásmido clonado con el inserto control (control positivo) para corroborar que la reacción de ligación y la factibilidad de la transformación bacteriana.

5.1.16 Análisis de transformantes de *E. coli* DH5 α

La electroporación de las células competentes de *E coli* DH5 α generó células transformantes con el plásmido sin inserto y con el plásmido recombinante. Para facilitar la selección de las células transformadas con el plásmido recombinante se realizó el cultivo de las células transformadas en placa sobre el medio LB/Ampicilina/IPTG/X-Gal. Las transformantes deseadas se visualizaron como

colonias blancas o crema y las células transformadas con el plásmido no recombinante como colonias azules. La selección de las transformantes se describe a continuación (Pérez-Aguirre, 2009).

Varias placas con medio LB/Ampicilina/IPTG/X-Gal³ se inocularon con 50 y 150 μL de células transformadas. El inóculo se distribuyó sobre toda la superficie del medio nutritivo con una varilla de vidrio estéril. Las placas se incubaron a 37 °C por 18 a 24 h para visualizar la formación de colonias. Las placas con colonias definidas (1-2 mm diámetro) se mantuvieron a 4 °C para facilitar la visualización del color de las colonias. Las colonias blancas que contienen el plásmido recombinante se numeraron y se punzaron con la punta de un palillo estéril para inocular placas con medio LB/Ampicilina/agar por picadura, esto para disponer de las células transformantes. Las colonias blancas se picaron nuevamente con otro palillo estéril y, la punta del éste, se colocó por 5 min en el interior de un tubo Eppendorf conteniendo 1 mL de medio LB/Ampicilina. Los cultivos respectivos crecieron a 37 °C (16 h a 200 rpm) y, posteriormente, se utilizaron para proseguir con la extracción de ADNp (Pérez-Aguirre, 2009).

5.1.17 Extracción de ADNp a pequeña escala (Miniprep)

Las células transformadas se cultivaron a escala pequeña (minipreparaciones) para extraer y analizar el ADN plasmídico (ADNp) de varias colonias en un solo ensayo.

El ADNp se extrajo por el método de “Boiling” que describe Holmes y Quigley (1981). Las células suspendidas en medio LB/Ampicilina se precipitaron centrifugando a 14,000 rpm por 5 min a Ta. El pellet se resuspendió en 350 μL de STET4 al agitar los tubos suavemente, después, se añadieron 20 μL de solución de lisozima (10 mg mL⁻¹)⁵. Los tubos se agitaron por 2 min en un Mixer para homogeneizar la suspensión y se mantuvieron en ebullición por 45 s en baño

³ **Medio LB/Ampicilina/IPTG/X-Gal.** Añadir 15 g L⁻¹ al medio LB, esterilizar 15 min a 1.2 kg cm⁻², enfriar el medio hasta 50 °C, añadir solución de ampicilina al medio para alcanzar una concentración final de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, IPTG a una concentración final de 0.5 mM, X-Gal a una concentración final de 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Verter 30 mL de medio en cajas Petri.

⁴ **STET.** EDTA 50 mM pH 8.0, Sacarosa al 8% (p/v), Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y Tritón X-100 al 0.5% (v/v).

⁵ **Lisozima.** Se pesó 0.01 g de lisozima (Sigma) y se disolvió en 1 mL de Tris-HCl 10 mM pH 8.0.

maría. Los restos celulares precipitaron centrifugando las muestras a 14,000 rpm por 10 min a Ta. El pellet se retiró del fondo de los tubos con la punta de un palillo estéril. El sobrenadante se mezcló con 45 µL de acetato de sodio (3 M, pH 5.2) y 600 µL de isopropanol (las muestras se mantuvieron a 4 °C por 2 h cuando no se observó precipitación). Las muestras se mezclaron invirtiendo los tubos 10 veces, se mantuvieron en reposo por 5 min a Ta y se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 min a Ta. El pellet (ADNp) se mezcló con 400 µL de etanol 70% y se lavó invirtiendo los tubos 10 veces, las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm por 5 min a Ta. El paso anterior se repitió nuevamente. El pellet se secó, primero por capilaridad al decantar los tubos en papel filtro estéril y, después, por calentamiento de las muestras en un Termomixer a 40 °C. El pellet (ADNp) se resuspendió en 30 µL de agua de alta pureza y se conservó a -20 °C. El ADNp se analizó en gel de agarosa para corroborar la presencia de éste en las colonias transformantes analizadas. Las células transformantes (colonias blancas) con el plásmido recombinante se inocularon en medio LB/Amp/Agar (37 °C, 16 h) para proseguir con la extracción de ADNp a escala mayor (Midiprep).

5.1.18 Extracción de ADNp a gran escala (Midiprep-Kit)

El ADNp se amplificó a gran escala creciendo células de *E. coli* transformantes en un volumen mayor de medio LB/Amp. La finalidad es recuperar el ADNp en cantidades suficientes para proseguir con su purificación. La purificación de ADNp se llevó a cabo mediante columnas de Qiagen-100 (Quiagen Plasmid Midi Kit). El procedimiento se describe a continuación de acuerdo al protocolo de Quiagen Plasmid Midi Kit, donde se destacan algunas modificaciones.

I) Cultivo celular. Las colonias blancas que incorporaron el plásmido recombinante (análisis Miniprep) se cultivaron en 100 mL de medio LB/Amp (100µg mL⁻¹) a 37 °C, 300 rpm y 16 h. El cultivo celular se trasladó a tubos de centrifuga estériles de 10 mL fríos (4 °C) y las células se precipitaron al centrifugar las muestras a 4,000 rpm por 20 min a 4 °C, el sobrenadante se descartó.

II) Lisis celular alcalina. El pellet se resuspendió en 2 mL de **Buffer P1** con pipeteó suave (5 veces). La suspensión de células se trasladó a un tubo de

centrifuga estéril y se le añadió 2 mL de **Buffer P2**. Los tubos se invirtieron suavemente (4 a 6 veces) para mezclar los componentes, las muestras se incubaron a Ta por 5 min.

III) Eliminación de restos celulares. Las muestras se mezclaron con 2 mL de **Buffer P3** frío (4 °C) de 4 a 6 veces, y después, se incubaron en hielo (10 °C) por 15 min. Las células lisadas se precipitaron centrifugando las muestras a 14,000 rpm por 30 min y 4 °C. El sobrenadante que contenía el ADNp se trasladó a otro tubo de centrifuga y se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo Falcón estéril (15 mL).

IV) Unión de ADNp a columna. Las columnas de QIAGEN-100 se montaron sobre matraces de 125 mL. Las columnas se les agregó 4 mL de **Buffer QBT** y se mantuvieron en reposo hasta que la solución eluyó completamente por flujo gravitacional. El sobrenadante contenía el ADNp se agregó a las columnas QIAGEN-100 y se permitió que eluyera completamente por flujo gravitacional.

V) Lavado del ADNp. Las columnas se lavaron 2 veces con 10 mL de **Buffer QC** y se mantuvieron en reposo hasta que la solución agregada eluyó completamente (sin presencia de goteo).

VI) Elución del ADNp. Las columnas se montaron sobre un tubo Falcón (50 mL) y el ADNp eluyó agregando a las columnas 5 mL de **Buffer QF**. El eluyente se recolectó y se distribuyó en tubos eppendorf (2 mL) en alícuotas de 800 µL.

VII) Precipitación de ADNp. El ADNp en solución precipitó adicionando a las muestras 560 µL de isopropanol (0.7 veces del volumen inicial total). Los tubos se invirtieron suavemente (6 veces) para mezclar los componentes y las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm por 30 min a 4°C, el sobrenadante se descartó decantando los tubos.

VIII) Lavado de ADNp. El pellet (ADNp) se mezcló con 800 µL de etanol 70% y se lavó invirtiendo los tubos los tubos 6 veces (a veces fue necesario desprender el pellet con la punta estéril de una pipeta). Las muestras se centrifugaron nuevamente a 14,000 rpm por 5 min a 4°C, el sobrenadante fue descartado. El

pellet se secó por capilaridad decantando los tubos en papel filtro estéril. El pellet (ADNp) se resuspendió agregando 50 μ L de H₂O de alta pureza y mezclando las muestras por pipeteo suave. El ADNp puro en solución contenido en varios tubos se juntó en una sola muestra para conservarse a -20°C. El ADNp purificado se usó para amplificar la región de ADNr 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S. El producto amplificado se analizó en gel de agarosa y después fue purificado (ver purificación de productos de la PCR). La secuencia de nucleótidos del amplicón se obtuvo con un secuenciador automatizado ABI3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA USA) (protocolo Quiagen Plasmid Midi Kit; Pérez-Aguirre, 2009).

5.1.19 Electroforesis en gel de agarosa

Los geles permitieron determinar el tamaño de los ácidos nucleicos, su conformación y su integridad. Los geles de agarosa⁶ se prepararon al 1 % (p/v) en amortiguador TAE 1X⁷ para separar fragmentos de ADN de 0.5 kb hasta 10 kpb. La agarosa se disolvió en la solución TAE calentando la mezcla en un microondas, usualmente por 1 min al nivel de potencia 9. El agua evaporada durante el calentamiento se compensó agregando agua deionizada a la solución. La solución de agarosa se dejó enfriar hasta 35 °C o hasta que el contenedor se pudiera asirse con las manos. La solución se vació sobre la base de la cámara de electroforesis (montada previamente con el peine) y se dejó solidificar a Ta. Los geles de agarosa se sumergieron en amortiguador TAE 1X para llevar a cabo la electroforesis (Pérez-Aguirre, 2009).

Las muestras de ADN se prepararon como se describe a continuación: las muestras de ADN genómico (ADNg) o plasmídico (ADNp) se mezclaron, en su caso, con amortiguador de carga AC-6X⁸. El volumen de AC-6X siempre fue un décimo del volumen final que se incorporó en los geles. Por ejemplo, para incorporar 10 μ L de solución de carga por pozo se mezclaron 3 μ L de ADNg ó

⁶ **Agarosa 1% (p/v):** Disolver 1 g de agarosa en amortiguador TAE 1X y aforar a 100 mL.

⁷ **TAE 1X.** Disolver 57.1 mL de ácido acético glacial, 100 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0, 242 g Tris base y H₂O desionizada hasta completar 1 L.

⁸ **Amortiguador de carga AC-6X.** Azul de bromofenol 0.25% (p/v), Sacarosa 40% (p/v) y Xileno cianol 0.25% (p/v). Disolver los componentes en agua desionizada. La solución se esteriliza a 15 lb/in² durante 20 min y se conserva a 4°C.

ADNp, 1 μL de amortiguador de carga AC-6X y el volumen apropiado de agua desionizada estéril para ajustar a 10 μL . Las muestras y el marcador de tamaño molecular⁹ (6 μL ADN Ladder x pozo) se cargaron en el gel de agarosa una vez que estuvo inmerso en TAE 1X. La electroforesis se llevó a cabo a 80 Volts hasta que, el frente de corrida se situó 3 cm antes del borde del gel (usualmente tomó 1 ó 1.5 h). El ADN contenido en el gel de agarosa se tiñó por 10 min con bromuro de etidio¹⁰ 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Este compuesto se intercala a la doble cadena del ADN permitiendo su visualización después que se irradian los geles con luz ultravioleta. Las imágenes de los geles se capturaron con un transiluminador (GelDoc 2000, Bio-Rad) que emite luz a una longitud de onda de 302 nm (Pérez-Aguirre, 2009).

5.2 Análisis macroscópico del crecimiento en función de la temperatura

5.2.1 Medio de cultivo.

El microorganismo creció superficialmente en caja Petri sobre el medio de cultivo EMAERM, cuya composición es la siguiente (% p/v): extracto de malta 3 y agar bacteriológico 1.5 en extracto de rastrojo de maíz. La solución se esterilizó por 15 min a 1.2 kg cm^{-2} y 121 °C obteniéndose un pH final de 6.3. El extracto de rastrojo de maíz se preparó suspendiendo 50 g de rastrojo de maíz molido, que previamente había sido esterilizado por 20 min bajo las mismas condiciones mencionadas, en 1 L de agua destilada bajo condiciones de agitación de 200 rpm (2 h y 85 °C). La suspensión se filtró a través de papel Whatman No. 1 y el volumen recuperado se ajustó a 1 L con agua destilada (Membrillo *et al.*, 2008).

⁹ **Marcador de tamaño molecular ADN Ladder 1kb.** Buffer de mantenimiento 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM EDTA. Colorante de ADN de carga 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.03% azul de bromofenol, 0.03% xileno cianol, 60% glicerol, 60mM EDTA. Cargar 6 μL de la siguiente mezcla, 1 μL ADN Ladder, 1 μL colorante de carga 6X, 4 μL H₂O desionizada.

¹⁰ **Bromuro de etidio.** Prepar una solución de 10 mg mL^{-1} en agua y conservar a 4°C. Para usarse, disolver 50 μL de la solución anterior en 1 L de H₂O desionizada.

Varias cajas Petri (9 cm de diámetro x 1.5 mm de profundidad) se prepararon con 30 mL de medio de cultivo EMAB para alcanzar una altura de medio de 1 cm. El medio EMAERM se usó para evaluar el crecimiento, ya que, facilitó la medición de hifas distales independientes.

5.2.2 Técnica de inoculación para analizar crecimiento macroscópico

La inoculación en placa se hizo distribuyendo una suspensión de micelio fragmentado de *Fomes* sp. EUM1 sobre agar como se describe a continuación. Las placas se inocularon distribuyendo 200 μ L de suspensión de micelio fragmentado en cuatro zonas de la superficie de agar. El inóculo se distribuyó homogéneamente sobre la superficie de agar con una varrila de vidrio estéril. Este método permitió obtener crecimiento micelial uniforme sobre toda la superficie de medio de cultivo, por lo que se usó para cuantificar la formación de biomasa por peso seco.

La obtención de la suspensión de micelio fragmentado se describe a continuación. De una colonia crecida en caja Petri (30 °C, 7 días) se cortaron con sacabocados unos 100 cilindros de agar con micelio (0.6 cm en diámetro). Los cilindros de agar con micelio se retiraron con una pinza de disección estéril y, después, el micelio se separó del resto del agar cortando la superficie con micelio con un bisturí estéril. Los discos con el micelio superficial obtenidos se depositaron en un tubo Falcón estéril (50 ml), que contenía 6 mL de solución Tween 80 al 0.05 % (p/v) y 50 perlas de vidrio. El contenido de los tubos Falcón se mezcló por 3 min con un Vórtex (SUPER-MIXER 1290) para fragmentar el micelio y obtener la suspensión de micelio fragmentado.

5.2.3 Cultivos superficiales en caja Petri y condiciones de cultivo

La influencia de la temperatura sobre el crecimiento macroscópico se analizó en cultivos superficiales logrados al usar la técnica de inoculación descrita. Los cultivos inoculados se incubaron a 25, 26, 28, 30, 32, 35, 37 y 40 °C por 20 días. Los perfiles de crecimiento en función del tiempo y para cada condición de

temperatura se obtuvieron cuantificando la formación de biomasa por peso seco (ver cuantificación del crecimiento). Los valores experimentales de la biomasa se ajustaron a un modelo con el uso de la ecuación logística Verhulst-Pearl (López *et al.*, 2010),

$$\frac{dx}{dt} = \mu \left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right) X$$

Donde X (g L^{-1}) es la concentración de biomasa en el tiempo, μ (h^{-1}) es la velocidad específica de crecimiento y X_{max} (g L^{-1}) es la concentración de biomasa máxima que se logra bajo las condiciones de cultivo mencionadas, básicamente cuando $\frac{dx}{dt} = 0$. Los parámetros cinéticos del crecimiento μ (h^{-1}) y X_{max} (g L^{-1}) se estimaron minimizando la suma de cuadrados del error residual entre valores experimentales y teóricos para $X(t)$ por medio del uso del Solver (Microsoft Excel).

5.2.4 Cuantificación del crecimiento

Se determinó gravimétricamente al cuantificar la formación de biomasa por peso seco. El agar y el micelio contenido en caja Petri se trasladaron a un vaso de precipitados de 1L que contenía un volumen de 300 mL de agua destilada. Las muestras se calentaron en un horno de microondas por 4 min al nivel 9 de potencia para fundir el agar completamente. El tiempo y la potencia se establecieron después de varios ensayos. La suspensión caliente se filtró inmediatamente en papel Whatman No. 1 para recuperar el micelio. El micelio retenido se lavó inmediatamente con 100 mL de agua destilada caliente (>80 °C) para eliminar restos de medio de cultivo. La biomasa húmeda se deshidrató calentando las muestras a 65 °C por 24 h, estas condiciones fueron adecuadas para alcanzar el peso constante de las muestras (Acuña-Argüelles *et al.*, 1995).

5.3 Análisis del crecimiento microscópico en función de la temperatura.

5.3.1 Medio de cultivo

El microorganismo creció superficialmente en caja Petri sobre el medio de cultivo EMAERM bajo las condiciones de temperatura mencionadas con anterioridad. Sin embargo, la técnica de inoculación fue modificada.

5.3.2 Técnica de inoculación para analizar crecimiento microscópico

Un fragmento de agar con micelio (0.6 cm de diámetro) se colocó en el centro de varias placas con medio EMAERM. Los fragmentos de agar con micelio se tomaron de la periferia de una colonia previa, crecida a 30 °C por 7 días.

El método de inoculación descrito se empleó para lograr visualizar las hifas distales ubicadas en la periferia de crecimiento radial de las colonias, con ello, fue factible medir los cambios morfológicos de las hifas durante el crecimiento a varias temperaturas.

5.3.3 Cultivos superficiales en caja Petri y condiciones de cultivo

Los cultivos superficiales crecieron a las temperaturas mencionadas para el crecimiento macroscópico. Por otro lado, los cambios microscópicos del crecimiento se analizaron para cada condición de temperatura, básicamente, consistieron en medir la morfometría de las hifas distales localizadas sobre la periferia del crecimiento de colonias. Las variables morfométricas que se midieron fueron la velocidad de crecimiento superficial U_r ($\mu\text{m h}^{-1}$), la longitud L_h (μm) y el diámetro D_h (μm) de las hifas distales.

5.3.4 Medición de variables morfométricas

La velocidad de crecimiento superficial, U_r ($\mu\text{m h}^{-1}$) se determinó registrando el crecimiento radial de las colonias sobre la superficie de las cajas Petri, en cuatro direcciones de un plano cartesiano y a intervalos de 12 ó 20 h de acuerdo a la rapidez del crecimiento con la temperatura. El crecimiento radial de las colonias se

midió con un Vernier y los valores registrados se graficaron en función del tiempo y de la temperatura. Los valores experimentales se ajustaron a un modelo de regresión lineal simple para obtener la ecuación de una recta. La velocidad de crecimiento superficial representó la pendiente de la misma.

Las mediciones de la longitud L_h (μm) y del diámetro D_h (μm) hifal se hicieron sobre las hifas distales localizadas en el margen de crecimiento de las colonias a cada temperatura de cultivo analizada. El margen de crecimiento del micelio se estableció 2 ó 3 cm del borde de las cajas Petri para evitar cambios en el patrón de crecimiento lineal de las hifas distales, una respuesta asociada a estímulos físicos y químicos, tales como obstáculos y gradientes de nutrientes (Band y Gow, 2009). Las hifas distales localizadas sobre el agar se capturaron tomando varias imágenes (Formato TIF, 512 x 512 píxeles), para esto, fue necesario la adaptación mecánica de una cámara fotográfica (Olympus KP-D51/D50) a un microscopio óptico (Olympus, CX31RTSF). La longitud y el diámetro de las hifas se visualizaron en el microscopio con los objetivos 10X y 40X, respectivamente. Las áreas de visualización óptica se eligieron al azar y se enfocaron, usualmente, hasta tres elementos hifales por campo de visualización. La medición de la longitud L_h (μm) y del diámetro D_h (μm) de las hifas distales se hizo directamente sobre las imágenes capturadas de las hifas al usar el programa Image 2000 (Biocom, Francia).

El área superficial A_{sh} (μm^2), la relación área a volumen A_{sh}/V_h (μm^{-1}) y la frecuencia de ramificación U_r/L_h (h^{-1}) de las hifas distales se determinaron con base en la magnitud de U_r ($\mu\text{m h}^{-1}$), L_h (μm) y D_h (μm). Las variables A_{sh} (μm^2) y A_{sh}/V_h (μm^{-1}) se calcularon considerando la geometría de las hifas distales como un cilindro, de manera que, se utilizaron los valores del diámetro y de la longitud hifal que se registraron en cada condición de temperatura. La relación de variables microscópicas del crecimiento U_r/L_h fue un parámetro que logra estimar el crecimiento macroscópico en función de la ramificación micelial (Larralde-Corona *et al.*, 1997).

5.4 Producción de enzimas lignocelulolíticas en condiciones de estrés térmico

5.4.1 Cultivo en medio sólido

El hongo *Fomes* sp. EUM1 creció sobre el sustrato rastrojo de maíz para producir celulasas, xilanasas y lacasas. Los cultivos se mantuvieron a la temperatura de 30 °C y en condiciones de 35 °C, 40 °C y 45 °C. El cultivo se llevó a cabo en matraces Erlenmayer de 250 mL con 3.3 g de rastrojo de maíz de los siguientes tamaños de partícula: 4.06 mm, 2.52 mm, 0.9 mm. La humedad del sustrato se ajustó hasta 80% (p/p), al agregar por separado una proporción de agua e inóculo, como se describe a continuación. El sustrato se asperjó con 7 mL de agua destilada, se mezcló con espátula para distribuir uniformemente el líquido sobre el sustrato y se esterilizó por 25 min a 120 °C. El sustrato húmedo estéril se inoculó con 4 mL de suspensión de micelio fragmentado, preparado tal y como se describió en un apartado anterior. El inóculo se mezcló homogéneamente con el sustrato usando una espátula estéril para tratar de obtener un crecimiento uniforme. La suspensión de micelio fragmentado se obtuvo mezclando por 3 min en Vórtex, 4 mL de agua destilada estéril, 50 perlas de ebullición estériles y el micelio superficial adherido en 4 discos de agar (0.6 cm), los cuales se tomaron de una colonia previa (30 °C, 7 días). La humedad del sustrato de 80% se corroboró en un analizador de humedad (OHAUS MB45) y el tamaño de inóculo cuantificado por peso seco fue de 0.092 mg de biomasa/g de sustrato seco, la masa de sustrato seco inicial fue de 3 g. Los matraces se incubaron por 8 días a 30, 35, 40 y 45 °C. Las pérdidas de humedad de los cultivos se minimizaron colocando en el interior de las cámaras de incubación un depósito de agua destilada. El tiempo de cultivo establecido de 8 días garantizó la fase de producción máxima de todas las enzimas.

5.4.2 Recuperación de enzimas del sustrato

Las enzimas adsorbidas sobre el rastrojo de maíz se recuperaron con agua destilada usando la siguiente proporción: 25 mL agua destilada/1g sustrato seco inicial. La recuperación consistió en agitar la suspensión a 400 rpm por 30 min y

10 °C, seguido de su filtración en papel Whatman No 1 para retener los sólidos. El extracto enzimático se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min y 4 °C para sedimentar los sólidos indeseables en suspensión (Ordaz-Hernández, 2008).

5.4.3 Concentración de extractos enzimáticos

Los extractos enzimáticos obtenidos durante el crecimiento del hongo a 30, 40 y 45 °C se concentraron al precipitar las proteínas con sulfato de amonio de 20% a 80% de saturación. Una etapa inicial saturación de 0 a 20% se llevó a cabo para eliminar la mayor cantidad de compuestos indeseables en los extractos enzimáticos.

El extracto enzimático clarificado se depositó en un vaso de precipitados frío (4 °C) y se mantuvo en agitación constante de 200 rpm a 0 °C. El sulfato de amonio se agregó paulatinamente a los extractos enzimáticos hasta elevar la concentración de saturación de sal de 0 a 20% según lo describe el programa EnCor Biotechnology Inc. El descenso de pH, debido al tratamiento de los extractos enzimáticos con la sal, se compensó adicionando hidróxido de amonio (NH₄OH) 0.2 M. Posteriormente, la solución se mantuvo en agitación por 3 h a 0 °C para precipitar las proteínas y los sólidos indeseables. La solución se centrifugó a 10,000 rpm por 30 min a 4 °C para separar los sólidos en suspensión. El sobrenadante se trasladó a un vaso de precipitados y la saturación prosiguió hasta modificar la concentración de saturación de sal de 20 a 80%. La solución se mantuvo en agitación por 12 h a 0 °C para precipitar las proteínas de interés en la mayor cantidad posible (Ali, *et al.*, 2008). La solución se centrifugó nuevamente y el sobrenadante fue desechado. El pellet de proteínas se resuspendió en 5 mL de amortiguador de citratos (50 mM y pH 6) y, este extracto concentrado, se mezcló con un volumen de una mezcla de inhibidores de proteasas, con la proporción siguiente: 10 µL inhibidor mL⁻¹ de extracto. La muestra se dializó en membranas de celulosa (tamaño de poro 10 kDa) contra 500 mL de amortiguador de citratos (25 mM, pH 6), por 20 h a 4 °C y en condiciones de agitación constante de 200rpm. Es importante mencionar que las membranas de celulosa se trataron antes de usarse con 400 mL de agua desionizada por 30 min a 50 °C y en

condiciones de agitación de 100 rpm. El amortiguador de citratos se recambió hasta las 12 h de iniciarse la diálisis y, posteriormente, se recambió cada 2 h en cuatro ocasiones (Ali, *et al.*, 2008). Los extractos enzimáticos dializados se analizaron por zimografía para detectar el patrón electroforético de celulasas, xilanasas y lacasas

5.4.4 Zimogramas en geles SDS-PAGE

Los extractos enzimáticos concentrados se analizaron por Zimografía para detectar diferencias en el patrón de secreción de isoenzimas (celulasas, xilanasas y lacasas) durante el crecimiento de *Fomes* sp. EUM1 a diferentes temperaturas. Las proteínas se separaron en gel de poliacrilamida con duodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) basándose en el método de Laemmli, (1970) con condiciones no desnaturizantes y el protocolo de Bio Rad (Mini Protean Cell 3). Los zimogramas de celulasas y xilanasas se obtuvieron bajo las condiciones descritas por Brecia *et al.* (1995) y Gupta *et al.* (2002); los zimogramas de lacasas se obtuvieron usando el ABTS como sustrato ensayando las mismas recomendaciones.

5.4.5 Zimogramas de celulasas y xilanasas

La actividad enzimática de celulasas y xilanasas se estandarizó a 2 mU por pozo para ser analizada en gel SDS-PAGE. El volumen de extracto enzimático requerido se mezcló con amortiguador de carga modificado (ACM)¹¹ en un tubo Eppendorf (1.5 mL) en la proporción: 3 partes de muestra: 1 parte de ACM. Las soluciones se mezclaron 30 veces por pipeteo sucesivo y la mezcla se calentó a 50 °C por 20 ó 25 min para separar las proteínas y favorecer la unión del SDS a las mismas. A las muestras se les adicionaron 10 µL de agua desionizada para compensar el agua perdida durante el calentamiento, además, se mezclaron nuevamente con 30 repeticiones y se cargaron en el gel (Brecia *et al.*, 1995; Gupta *et al.*, 2002).

¹¹ **ACM:** para preparar 10 mL mezclar en el orden de aparición, 1.50 ml de H₂O desionizada, 1.25 mL de 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 5 mL de glicerol anhidro, 2 mL de SDS al 20%, 0.25 mL de azul de bromofenol al 0.5%.

La concentración de acrilamida en el gel de concentración fue 4% y de 10% para el gel de separación. En el gel de separación se incorporó un volumen adecuado de solución de xilano ó carboximetilcelulosa (CMC) para alcanzar la concentración final de 0.3% . Los geles se corrieron en presencia de amortiguador de corrida 1X¹² a 150 Volts por 2 h y a 4 °C. Después del corrimiento electroforético de las muestras, los geles se sumergieron en 300 mL de Tritón X-100 (0.1% p/v) por 20 min para remover el SDS y renaturalizar las proteínas. La solución de Tritón X-100 se desechó y los residuos en el gel se eliminaron lavando con 200 mL de agua desionizada en 3 ocasiones. Los geles se incubaron a 50 °C por 30 a 40 min en 200 mL de amortiguador de citratos 50 mM (pH 6 para geles conteniendo xilano y pH 5 para geles conteniendo carboximetilcelulosa). La solución de amortiguador se desechó y los geles se tiñeron con 100 mL de rojo Congo (0.1% p/v) a temperatura ambiente por no mas de 18 min. La solución de colorante se desecho y los remanentes en el gel se retiraron lavando con 200 mL de agua desionizada. Para desteñir los geles, éstos se sumergieron en 200 mL de solución de NaCl 1 M y se incubaron a 50 °C manteniendo agitación suave (50 0 100 rpm). La solución de NaCl se recambió cada 12 min hasta que se visualizaran las bandas con actividad de celulasas o de xilanasas, usualmente, fueron necesarios 3 recambios de 12 min. La solución de NaCl se desechó cuando se visualizaron las bandas con actividad enzimática. La resolución de las bandas mejoró sumergiendo los geles en 50 mL de ácido acético al 0.2% (v/v), ya que, son tornados del rojo al azul. Los geles se colocaron en un trasiluminador de luz blanca para ser capturados (imágenes 512x512 pixeles) con una cámara fotográfica (Brecia *et al.*, 1995; Gupta *et al.*, 2002).

5.4.6 Zimogramas de lacasas

Las muestras se estandarizaron por actividad a 0.01 mU y se trataron bajo las condiciones mencionadas arriba. La concentración de acrilamida en el gel de

¹² **Amortiguador de corrida 1X:** preparar solución stock a una concentración 10X disolviendo 30.3 g Trizma base, 144 g de glicina, 10 g de SDS. Disolver, aforar a 1 L con H₂O_d, no ajustar el pH. Para usarlo a la concentración 1X, disolver 100 mL de stock 10X en 900 mL de H₂O_d.

concentración fue de 4% y de 12% para el gel de separación. Los geles se corrieron en presencia de amortiguador de corrida 1X a 150 Volts por 1 h y a 4 °C. Los geles se trataron con 300 mL de Tritón X-100 al 0.1% por 20 min para remover el SDS. El tritón X-100 se desechó y el gel se lavó con 200 mL de agua desionizada en 3 ocasiones para remover los remanentes de Tritón X-100. Los geles se incubaron a 40 °C, en presencia de una solución de ABTS (0.5 mM, pH 5), hasta que se visualizaran las bandas con actividad de lacasas, usualmente, ocurrió después de 10 min. Los geles se colocaron en un trasiluminador de luz blanca y las imágenes (512x512 pixeles) de los mismos se capturaron con una cámara fotográfica (Brecia *et al.*, 1995; Gupta *et al.*, 2002).

5.4.7 Ensayos enzimáticos

La actividad enzimática de celulasas se cuantificó midiendo los azúcares reductores liberados por la hidrólisis de la carboximetilcelulosa (CMC). Los azúcares reductores se detectaron como lo describe Miller (1960), empleando el reactivo DNS (ácido 3,5–dinitro-salicílico). El reactivo reacciona con los azúcares reductores produciendo una coloración cuya intensidad es proporcional a la cantidad de azúcares reductores presentes en solución. La mezcla de la reacción consistió de 0.9 mL del sustrato carboximetilcelulosa al 0.5% p/v (preparada en amortiguador de citratos 50mM, pH 5) y 0.1 mL de una dilución adecuada de extracto enzimático. El sustrato se preincubó a 50 °C por 5 min y después se agregó el extracto enzimático para iniciar la reacción enzimática. La reacción enzimática se llevó a cabo a 50 °C por 20 min y, después, se interrumpió agregando a la mezcla de reacción 1.5 mL del reactivo DNS, la finalidad de esto fue desnaturalizar las enzimas presentes. Los azúcares reductores que inicialmente estaban en los extractos enzimáticos y, que no fueron liberados por la acción de las celulasas, se cuantificaron al preparar un control negativo de actividad enzimática de celulasas. El control negativo se preparó por cada muestra analizada bajo las condiciones mencionadas, sólo que, el reactivo DNS se agregó antes que el extracto enzimático. Simultáneamente, se preparó un blanco, para calibrar el espectro, mezclando 0.9 mL de carboximetilcelulosa, 0.1 mL de

amortiguador de citratos (50 mM, pH 5) y 1.5 mL de reactivo DNS. Las mezclas de reacción se mantuvieron en ebullición por 5 min en baño maría para desarrollar color y, a continuación, se enfriaron en agua con hielo por 10 min. La absorbancia de las muestras se registró a 640 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640. La actividad enzimática consideró los reductores generados por la acción enzimática, por ello, se realizó la diferencia de absorbancias entre el control positivo y negativo. La cantidad de azúcares se calculó con base en una curva estándar de glucosa y la actividad enzimática se expresó en unidades internacionales. Una U se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de glucosa por min bajo las condiciones de reacción empleadas.

La actividad de xilanasas se cuantificó siguiendo el método descrito para los ensayos de celulasas, pero se uso xilano de abedul al 0.5% como sustrato (preparado en amortiguador de citratos 50 mM, pH 6.3). El tiempo de reacción enzimática fue de 5 min a 50 °C y el blanco consistió de 0.9 mL de de xilano, 0.1 mL de amortiguador de citratos (50 mM, pH 6.3) y 1.5mL de reactivo DNS. Los azúcares reductores generados por la actividad de las xilanasas se calcularon a partir de una curva patrón de xilosa. La actividad enzimática se expresó en unidades. Una U se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de xilosa por min en las condiciones de reacción empleadas (Brecia *et al.*, 1995; Gupta *et al.*, 2002).

La actividad enzimática de lacasas se determinó de acuerdo al método descrito por Bourbonnais *et al.* (1997) usando ABTS como sustrato (2, 2, azinobis, 3, etilbenzotiazolina, ácido sulfónico; $\epsilon_{420 \text{ nm}} = 36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La mezcla de reacción se hizo en el interior de una celda de plástico de 1 mL y consistió de 0.5 mL de ABTS 0.5 mM (preparada en amortiguador de citratos 50mM, pH 5) y 0.5 mL de una dilución adecuada de extracto enzimático. Inicialmente, la celda que contenía el sustrato se preincubó por 3 min a 40 °C y, después, se agregó el extracto enzimático para iniciar la reacción. La oxidación del ABTS se midió en línea registrando la absorbancia de las muestras por 1.5 min a una longitud de onda de 420 nm (Beckman DU 640). La velocidad de oxidación del ABTS se

determinó calculando la pendiente de los valores experimentales. El blanco consistió de una mezcla de 0.5 mL de ABTS y 0.5 mL de amortiguador de citratos (50 mM, pH 5). La actividad enzimática se expresó en unidades (U) basándose en el uso de la ecuación de Beer-Lambert. Una U se definió como la cantidad de enzima que oxida 1 μmol de ABTS por min en las condiciones de reacción ensayadas (Téllez-Jurado *et al.*, 2006).

La actividad de proteasas se midió siguiendo la metodología descrita por Lee (1998), al usar caseína Hammerstein como sustrato. El método cuantifica los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptófano) liberados después de la hidrólisis de la caseína por proteasas. La mezcla de la reacción consistió de 0.8 mL de caseína Hammerstein al 1% (preparada en amortiguador de fosfatos 50mM, pH 7) y 0.2 mL de una dilución adecuada de extracto enzimático. El sustrato se preincubó a 40 °C por 5 min y, después, se agregó extracto enzimático para iniciar la reacción. La reacción enzimática prosiguió a 40 °C por 15 min y, después, se detuvo agregando a la mezcla de reacción 2 mL de ácido tricloroacético al 5% (ATC), este proceso desnatura y precipita las proteínas presentes. Los aminoácidos aromáticos inicialmente presentes en la mezcla de reacción se cuantificaron sobre un control negativo, el cual se preparó agregando el reactivo TCA antes que el extracto enzimático. Simultáneamente, se preparó un blanco para calibrar el espectro que consistió de 0.9 mL de caseína, 0.1 mL de amortiguador de fosfatos (50 mM, pH 7) y 2 mL de TCA. Las muestras se mezclaron en Vórtex por 5 s y, después, reposaron en agua con hielo (10 °C) por 15 min para completar la precipitación de las proteínas. Las muestras se centrifugaron a 5,000 rpm (10 min y 10 °C) y el sobrenadante se filtró en papel Whatman No1 para evitar la presencia de cualquier sólido en suspensión, ya que, interfieren con las mediciones. La absorbancia de las muestras se registró a 280 nm en un espectrofotómetro (Beckman DU 640). La cantidad de aromáticos liberados durante la reacción enzimática se calculó a partir de una curva patrón de tirosina. La actividad de proteasas se expresó en unidades. Una U se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de tirosina por min bajo las condiciones de reacción (Lee, 1998).

La proteína extracelular se cuantificó por el método de Bradford (1976). La mezcla de reacción consistió de 800 μ L de una dilución adecuada de extracto enzimático (1:100) y 200 μ L de reactivo de Bradford (Kit Biorad). La reacción prosiguió a temperatura ambiente por 5 min y la absorbancia de las muestras se registró a 595 nm (Beckman DU 640). El blanco consistió de de 800 μ L de agua destilada y 200 μ L del reactivo de Bradford. La concentración de proteína en las muestras se calculó con base en una curva patrón de seroalbúmina bovina (SAB).

5.5 Análisis estadístico de los resultados

El Software SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) se empleó para el análisis de los datos. Las pruebas estadísticas consistieron de un análisis de varianza de una vía y una prueba de la mínima diferencia significativa de Tukey ($p < 0.05$).

6 RESULTADOS

6.1 Identificación molecular del microorganismo

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación se analizan y comparan en un apartado posterior de discusión. La primera etapa de la investigación consistió en obtener ADN genómico (ADNg) de pureza y calidad aceptable para llevar a cabo la identificación molecular del microorganismo (Fig. 14). El ADNg obtenido de varias muestras analizadas fue de calidad satisfactoria al obtenerse en concentración adecuada, baja presencia de sales y bajo grado de degradación. La muestra de ADNg con mayor calidad se usó para llevar a cabo la amplificación de los genes de ADNr que contenían la región 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S. En una primera etapa, la región de ADNr se amplificó con *primers* distintos a los descritos en materiales y métodos, pero la amplificación fue inespecífica al obtenerse un patrón de bandas no deseadas. La especificidad de la amplificación del ADNr mejoró al usar *primers* que fueron diseñados para sitios específicos del ADNr de basidiomicetos. Para amplificar específicamente la región de ADNr se investigó la temperatura idónea de hibridación de los *primers* (ITS1-F y ITS4-B) mediante la técnica de la PCR de gradiente de temperatura. La amplificación del ADNr resultó satisfactoria para las condiciones de temperatura de hibridación ensayadas al obtenerse una cantidad considerable del amplicón de interés (Fig. 4). Sin embargo, la amplificación resultó ser mejor a 38 °C al visualizarse en gel una banda de buena calidad (Fig. 15). El tamaño del amplicón fue de 700 pb, lo cual es esperado cuando se amplifican los genes del ARN ribosomal.

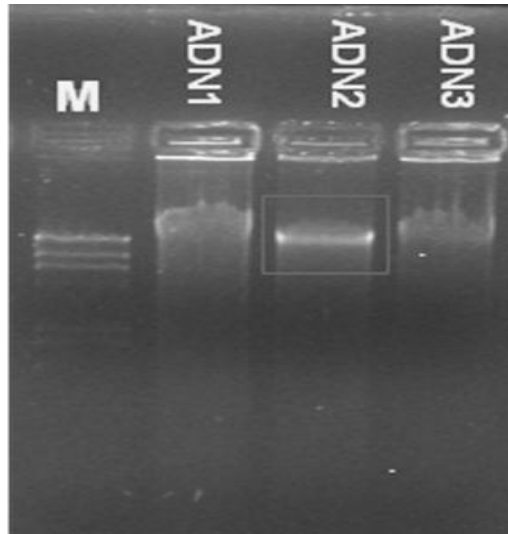


Fig. 14 Gel de agarosa al 1% mostrando el ADN genómico extraído de micelio del hongo de pudrición blanca. El corrimiento de la banda indica la presencia de sales en la muestra y ADN degradado. El ADN de mejor calidad se indica en recuadro verde. M- marcador ADN Ladder 1kb. ADN1-concentración 50 ng mL⁻¹. ADN2-concentración 60 ng mL⁻¹. ADN3-concentración 40 ng mL⁻¹.

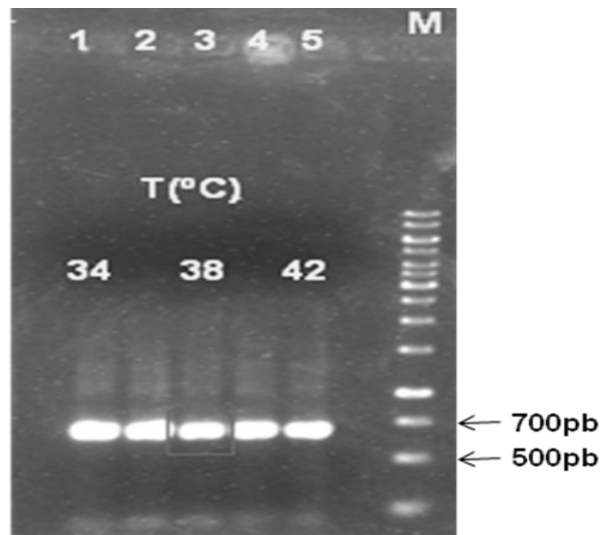


Fig. 15 Gel de agarosa al 1% mostrando la amplificación de los genes del ADNr 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S mediante la PCR de gradiente. La temperatura de amplificación seleccionada se indica en un recuadro. La concentración del amplicón osciló entre 200-250 ng μ L⁻¹ en todos los casos. M-Marcador de tamaño ADN Ladder 1kb. Temperatura de amplificación 1-34 °C. 2-36 °C. 3-38 °C. 4-40 °C. 5-42 °C.

La amplificación del ADNr se realizó a 38 °C para proseguir con su purificación partiendo de geles de agarosa. El ADNr purificado se verificó en gel de agarosa para corroborar la eliminación de los productos de amplificación indeseables, en este sentido, se logró obtener una banda única de concentración adecuada y de excelente calidad (Fig. 16).

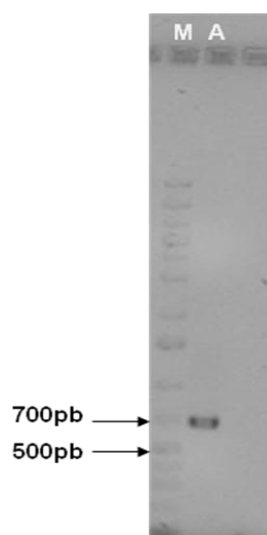


Fig. 16 Gel de agarosa mostrando el amplicón purificado. M-Marcador de tamaño. A-Producto de amplificación 150 ng μL^{-1} .

El ADNr purificado se usó directamente para los ensayos de la secuenciación, sin embargo, la secuencia de nucleótidos de la región 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S presentó interferencias en un 30 % de la secuenciación (700 pb) (Anexo A). La secuencia de nucleótidos obtenida se comparó en bases de datos (Genbank) obteniéndose una similitud baja (< 90%). Al respecto, los microorganismos relacionados exhibieron un patrón de ordenamiento por género confuso que fue inadecuado para clasificar satisfactoriamente al microorganismo estudiado (Anexo A).

Para descartar la contaminación de las muestras de ADN con la de otros microorganismos se procedió a obtener un cultivo monohifal para obtener un cultivo puro. El ADNg de los cultivos puros se extrajo para continuar con el proceso de secuenciación del ADNr. La obtención de una secuencia de nucleótidos pura y confiable también implicó emplear la técnica de clonación. Con esta metodología, sólo un tipo de amplicón puede ligarse al vector y las bacterias competentes que sean transformadas pueden mantener únicamente un tipo de vector recombinante. La estrategia consistió en clonar los productos de la PCR purificados (secuencia de ADNr) en el vector de clonación pGEM-T Easy y transformar las bacterias de *E. coli* con el vector recombinante. La estrategia de clonación permitió aislar una colonia transformante que integró el vector recombinante de interés. En este sentido, las células de *E. coli* DH5 α transformadas con el vector recombinante se detectaron sobre un medio de selección específico por su color como colonias blancas (3 colonias/placa) y las transformantes sin el vector recombinante como colonias azules (20 colonias/placa). Las colonias blancas (5 colonias blancas) se analizaron para confirmar la presencia de ADNp recombinante, ya que, pueden perder sus características durante su cultivo, asimismo, se verificó la presencia del plásmido recombinante deseado. Las colonias blancas analizadas incorporaron el plásmido recombinante de interés, el cual se visualizó en gel de agarosa con un tamaño molecular de aproximadamente 3700 pb (Fig. 17), el tamaño del vector más el inserto.

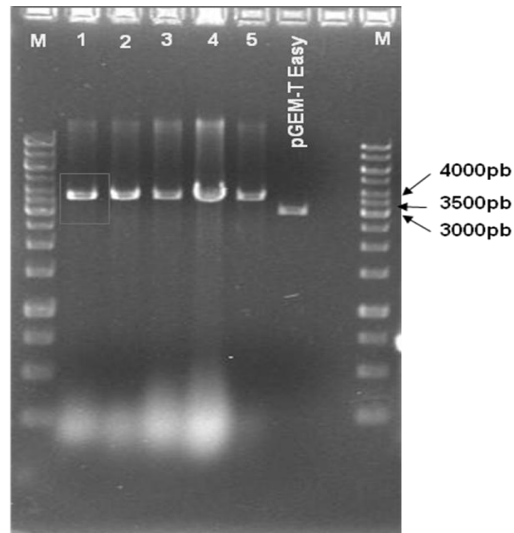


Fig. 17 Análisis del ANDp recombinante lineal de células de *E. coli* transformadas. El ADN de las transformantes se extrajo por boiling y se digirió con la enzima de restricción *Pst*I. La banda enmarcada hace referencia a la colonia seleccionada para el Midiprep. M-Marcador de tamaño. Números-colonias analizadas. pGEM-T Easy-vector plasmídico lineal como control.

Las células transformadas de *E. coli* DH5 α se cultivaron a gran escala para amplificar el ADNp recombinante y purificarlo. El ADNp purificado se visualizó en gel con calidad satisfactoria en forma lineal y circular (Fig. 18), por lo que, se usó como molde en los ensayos de la PCR para amplificar la región de ADNr de interés (inserto) y proseguir con la secuenciación.

En este experimento se obtuvo un amplicón que mostro una calidad y pureza adecuada en gel de agarosa (Fig. 19).

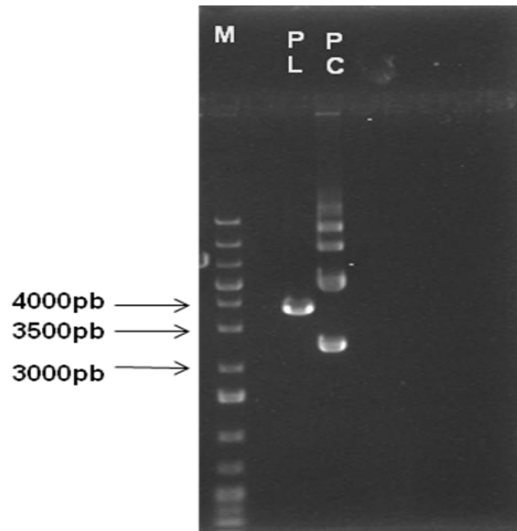


Fig. 18 Análisis de ADNp recombinante puro en gel de agarosa (1%). M-Marcador de tamaño. PL-Plásmido lineal digerido *Pst*I (3700 pb). PC- Plásmido circular intacto 100 ng μL^{-1} ; Las formas del plásmido se visualizan en gel como bandas de tamaño distinto, de la parte inferior hacia la superior corresponden a la forma circular covalentemente cerrada (CCC), lineal (L), circular abierta (CA), dímeros de CCC ó CA. La banda superior sugiere la presencia de ADNg.

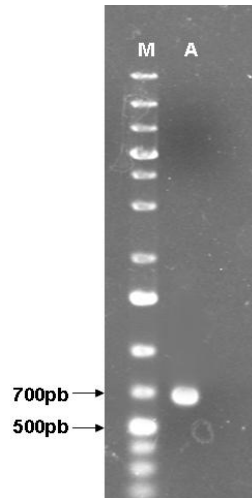


Fig. 19 Gel de agarosa mostrando la amplificación del ADNr que estuvo clonado en el vector pGEM-T easy. M-Marcador de tamaño. A-Producto de amplificación 200 ng μL^{-1}

La secuenciación del ADNr (18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S) exhibió una calidad alta al estar libre de interferencias. La comparación de la secuencia de nucleótidos con

las disponibles en GenBank desplegó un patrón ordenado de los microorganismos relacionados por género (Tabla 3). No obstante, el nivel de identidad máximo continuó siendo bajo (90%) y similar a lo obtenido en resultados previos. El microorganismo estudiado mantuvo una similitud mayor con los hongos de pudrición blanca del género *Fomes*, específicamente, con el hongo *Fomes fomentarius* (90%) (Tabla 3). El porcentaje de identidad obtenido (90%) fue razonable para asignar el género confiablemente, de modo que, se le asignó el nombre de *Fomes* sp. EUM1 (numero de acceso GenBank HM136871). La comparación de la secuencia de nucleótidos de *Fomes* sp. EUM1 con las de otras especies del mismo género detectó diferencias en la secuencia nucleótidos de las regiones espaciadoras de transcripción interna (ITS) (Tabla 4). Las diferencias fueron mayores en la región ITS2 y consistieron en algunos cambios de nucleótidos, ausencia y adición de éstos (1 hasta 3 nucleótidos contiguos). Estos resultados y sus implicaciones se analizan en una sección posterior de discusión.

Tabla 3 Resultado del análisis de secuencia de nucleótidos del ADNr por BLAST.

Cepa	Alineación	Valor-E	Identidad
<i>Fomes fomentarius</i> FF-TdQ-br	99%	0.0	90%
<i>Fomes fomentarius</i> FF-TdQ-gr	99%	0.0	90%
<i>Fomes fomentarius</i>	99%	0.0	90%
<i>Fomes fomentarius</i> ZJU-FM	99%	0.0	90%
<i>Fomes fomentarius</i> FS656174	99%	0.0	90%

Nota. La secuencia de nucleótidos del ADNr (18S-ITS1-5.8S-28S) fue de 627 nucleótidos.

Tabla 4 Análisis comparativo de las regiones de ITS de *Fomes* sp. EUM1 con la de otras especies del mismo género.

Cepa	Número de nucleótidos diferentes		Número de nucleótidos faltantes (F) y adicionales (A)	
	ITS1	ITS2	ITS1	ITS2
<i>Fomes fomentarius</i> FF-TdQ-br	11	13	3 (F) 10 (A)	8 (F) 5 (A)
<i>Fomes fomentarius</i> FF-TdQ-gr	11	16	3 (F) 10 (A)	8 (F) 5 (A)
<i>Fomes fomentarius</i>	12	17	2 (F) 10 (A)	7 (F) 4 (A)
<i>Fomes fomentarius</i> ZJU-FM	12	19	4(F) 10(A)	8(F) 4(A)
<i>Fomes fomentarius</i> FS656174	11	21	2(F) 12(A)	3(F) 6(A)

6.2 Análisis del crecimiento macroscópico a diferentes temperaturas

El crecimiento macroscópico del hongo *Fomes* sp. EUM1 se analizó en función de la temperatura sobre cultivos superficiales con crecimiento homogéneo. El análisis consistió en comparar los parámetros cinéticos X_{max} (g L⁻¹) y μ (h⁻¹) estimados a condiciones térmicas distintas y en medio EMAERM.

Para analizar el crecimiento macroscópico de *Fomes* sp. EUM1 en caja Petri fue necesario lograr un crecimiento superficial homogéneo. Después de varios ensayos se logró obtener inoculando la superficie de agar por césped con micelio fragmentado. De esta manera, la variación del estado fisiológico del micelio se minimizó al invadirse homogéneamente el medio nutritivo, puesto que inoculando el medio nutritivo en un solo punto, la edad del micelio varió considerablemente en dirección radial de su crecimiento. Los cultivos superficiales de *Fomes* sp. EUM1 crecieron de 25 °C hasta 40 °C para obtener los perfiles de producción de biomasa (Fig. 20). La producción de biomasa máxima (X_{max}) tendió a incrementarse con la

temperatura hasta alcanzar su máximo valor a 30 °C con una concentración de biomasa $X_{max} = 14 \text{ g L}^{-1}$ (Fig. 20; Tabla 5). A temperaturas mayores a 30 °C, la producción de biomasa máxima tendió a decrecer gradualmente hasta un 82% a 40 °C, asimismo, la fase de crecimiento inicial mostró un rezago gradual al aumentarse la temperatura (Fig. 20; Tabla 5); en ambos casos, se evidenció el efecto adverso de la temperatura sobre el proceso de formación de biomasa. A pesar de esto, *Fomes* sp. EUM1 destacó por su capacidad para crecer satisfactoriamente a 40 °C, lo cual es inusual para el crecimiento de los hongos de pudrición blanca. El crecimiento del microorganismo se mantuvo por un tiempo prolongado para cada una de las temperaturas al lograrse los niveles producción de biomasa máximos después de 14 días (350 h) (Fig. 20), esto evidenció el crecimiento lento del hongo *Fomes* sp. EUM1.

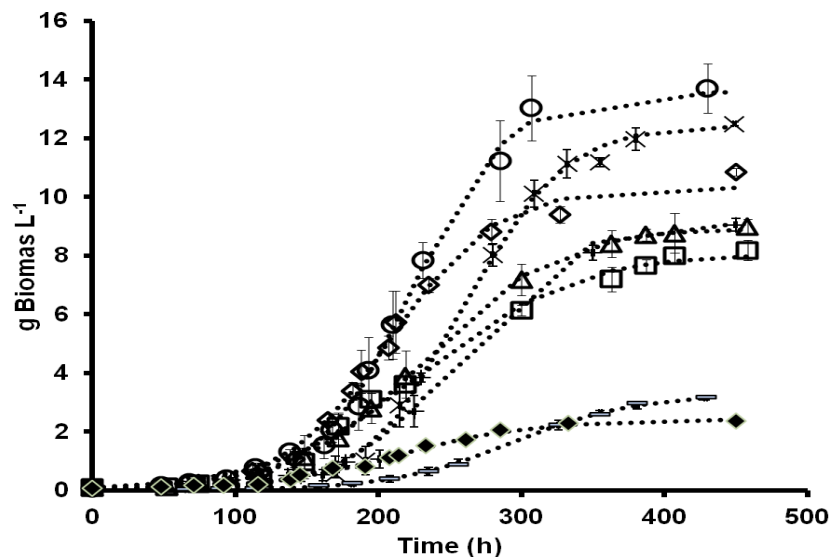


Fig. 20 Producción de biomasa (g L^{-1}) durante el crecimiento superficial de *Fomes* sp. EUM1 en caja Petri a diferentes temperaturas. La biomasa se reporta en peso seco por litro de medio EMAERM. a) (□) 25 °C, (Δ) 26 °C, (◇) 28 °C, (O) 30 °C, (x) 32 °C, (+) 35 °C, (-) 37 °C, (◆) 40 °C.

La velocidad específica de crecimiento μ (h^{-1}) se estimó en los cultivos superficiales bajo las mismas condiciones de temperatura descritas (Tabla 5). La variable mantuvo un comportamiento parabólico y similar a la producción de biomasa máxima, al incrementar su valor con la temperatura en el intervalo de 25 a 30 °C y, decrecer a temperaturas mayores a 30 °C. De este modo, la velocidad máxima de formación de biomasa se obtuvo a 30 °C, donde se logró la mayor producción de biomasa (Tabla 5). El valor máximo de la velocidad específica de crecimiento ratificó el lento crecimiento de *Fomes* sp. EUM1, que es comparado con otros hongos de pudrición blanca según se describe en la sección posterior de discusión.

Tabla 5 Cambios macroscópicos del crecimiento de *Fomes* sp. EUM1 con la temperatura. Los cultivos crecieron superficialmente en caja Petri sobre medio EMAERM

T (°C)	U_r^+ ($\mu\text{m h}^{-1}$)	$X_{min} \times 10^{-2}$ (g L^{-1})	X_{max} (g L^{-1})	$\mu \times 10^{-3+}$ (h^{-1})	$R^{2\infty}$
25	110±1.4 ^a	9.37±0.88 ^a	8.08±0.17 ^c	19.2±0.2 ^a	0.995
26	150±4.5 ^b	4.70±0.21 ^c	9.15±0.20 ^d	22.5±0.3 ^b	0.980
28	234±3.6 ^c	3.39±0.49 ^d	10.32±0.05 ^e	27.5±1.7 ^{de}	0.951
30	285±1.1 ^d	1.64±0.70 ^e	13.59±0.75 ^f	30.5±2.4 ^f	0.991
32	301±2.7 ^e	6.24±0.18 ^b	13.05±0.03 ^f	29.3±0.8 ^{ef}	0.998
35	326±0.4 ^{de}	1.12±0.16 ^e	9.09±0.38 ^d	26.2±0.2 ^{cd}	0.961
37	326±1.3 ^e	3.10±0.06 ^d	3.28±0.17 ^b	23.8±0.1 ^{bc}	0.984
40	322±0.2 ^e	2.58±0.52 ^d	2.43±0.04 ^a	21.3±0.9 ^{ab}	0.995

Nota: ⁺ Valor promedio de tres mediciones hechas sobre muestras independientes. [∞] Ajuste de valores experimentales del crecimiento macroscópico con la ecuación logística. Notación respectiva: T , Temperatura; U_r , velocidad de crecimiento superficial; μ , velocidad específica de crecimiento; X_{max} y X_{min} , producción de biomasa mínima y máxima, respectivamente.

La velocidad específica de crecimiento obtenida a varias temperaturas se representó en un gráfico de Arrhenius (Fig. 21) con la finalidad de estimar la temperatura máxima de crecimiento y los respectivos parámetros termodinámicos, tales como, energía de activación (E_a , KJ Mol^{-1}) e inactivación (E_i , KJ Mol^{-1}). La

temperatura de máximo crecimiento de *Fomes* sp. EUM1 se estimó como el punto de intersección algebraica de dos ecuaciones de primer orden ($\ln \mu$ versus $1/T$) obtenidas al ajustar los valores experimentales de velocidad específica de crecimiento, entre 25 a 28 °C y de 32 a 40 °C. El gráfico de Arrhenius permitió obtener la temperatura del crecimiento máximo de *Fomes* sp. EUM1 que resultó ser a 30.1 °C (Fig. 21), donde se obtuvieron los valores máximos de la velocidad específica de crecimiento (μ) y de formación de biomasa (X_{max}) (Tabla 5). La región de activación del crecimiento se identificó entre 25 y 30 °C por la tendencia creciente de la velocidad específica de crecimiento con la temperatura (Fig. 21); mientras que, la de inactivación se hizo evidente a temperaturas mayores a 30 °C por la disminución gradual de la velocidad específica de crecimiento. La energía de activación e inactivación respectivas para ambas regiones se estimaron con base en la pendiente de las ecuaciones de primer orden expresadas en su forma logarítmica ($\ln \mu$ versus $1/T$). El decremento gradual de μ (h^{-1}) a temperaturas mayores a 30 °C influyó en la magnitud de la energía de inactivación. Como resultado, la energía de inactivación para el crecimiento ($E_i = 32 \text{ KJ Mol}^{-1}$) resultó ser menor que la energía de activación ($E_a = 68 \text{ KJ Mol}^{-1}$). La magnitud menor de la energía de inactivación estableció claramente la termotolerancia de *Fomes* sp. EUM1, una característica que puede estar asociada a múltiples respuestas de protección intracelular. El criterio termodinámico, $E_i < E_a$, permitió clasificar a *Fomes* sp. EUM1 como un hongo de pudrición blanca termotolerante y sus implicaciones son analizadas en el apartado de discusión. El resultado fue destacable, ya que, hasta la fecha no se han descrito hongos de pudrición blanca termotolerantes del género *Fomes*, incluso son poco reportados los hongos de pudrición blanca termotolerantes de otros géneros.

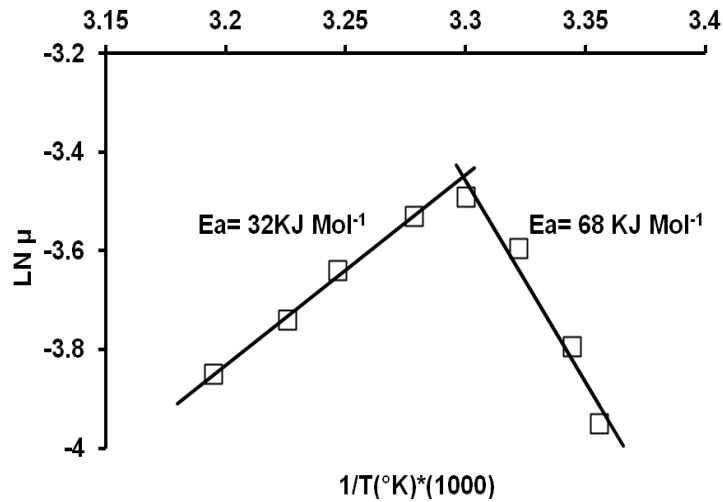


Fig. 21 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento macroscópico de *Fomes* sp. EUM1. Se muestran la región de activación e inactivación del crecimiento y los parámetros termodinámicos respectivos. (□) Valores experimentales, (—) Ajuste lineal de los valores experimentales con la ecuación de Arrhenius.

6.3 Análisis del crecimiento microscópico del micelio a diferentes temperaturas

Una etapa subsecuente a la caracterización del crecimiento macroscópico de *Fomes* sp. EUM1 fue tratar de mostrar la presencia de cambios microscópicos en el crecimiento micelial de *Fomes* sp. EUM1 y relacionarlos con la termotolerancia del hongo (adaptación térmica). Los cambios microscópicos del crecimiento se midieron en cultivos superficiales con más de 3 días de crecimiento, donde se evidenció el inicio de la fase del crecimiento macroscópico (Fig. 20). El crecimiento microscópico presentó cambios morfométricos importantes que estuvieron relacionados con la adaptación térmica de *Fomes* sp. EUM1 y su relación es analizada detalladamente en la sección de discusión. Los cambios morfométricos fueron bastante evidentes en la velocidad de crecimiento superficial (U_r) y la longitud de las hifas distales (L_h); estas variables incrementaron simultáneamente entre 25 y 40 °C en magnitud diferente (Tabla 6; Fig. 22).

Tabla 6 Cambios microscópicos del crecimiento de *Fomes* sp. EUM1 con la temperatura. El análisis se hizo sobre cultivos con crecimiento superficial en caja Petri sobre medio EMAERM.

T (°C)	L_h^* (μm)	A_{sh}^* (μm^2)	D_h^* (μm)	U_r/L_h^* (h^{-1})	A_{sh}/V_h^* (μm^{-1})
25	307±23 ^a	5304±155 ^a	5.52±0.26 ^b	0.36±0.03 ^a	0.726±0.034 ^a
26	337±24 ^{ab}	5853±385 ^{ab}	5.53±0.03 ^b	0.45±0.02 ^a	0.724±0.004 ^a
28	365±12 ^{abc}	6343±383 ^{bc}	5.53±0.22 ^b	0.64±0.02 ^b	0.724±0.029 ^a
30	385±28 ^{bc}	6612±446 ^{bcd}	5.47±0.12 ^b	0.74±0.05 ^c	0.732±0.016 ^a
32	419±16 ^{cd}	7280±153 ^{cde}	5.53±0.09 ^b	0.72±0.03 ^{bc}	0.723±0.012 ^a
35	462±25 ^{de}	7934±368 ^e	5.46±0.04 ^b	0.71±0.04 ^{bc}	0.732±0.006 ^a
37	494±11 ^e	8225±394 ^e	5.30±0.28 ^b	0.66±0.02 ^{bc}	0.756±0.039 ^a
40	509±30 ^e	7591±376 ^{de}	4.75±0.06 ^a	0.63±0.04 ^b	0.842±0.011 ^b

Nota: * Valor promedio obtenido de tres muestras independientes. Cada muestra comprendió de 40 mediciones. Notación respectiva: T , Temperature; L_h , longitud de las hifas distales; A_{sh} , área superficial de las hifas distales; D_h , Diámetro hifal; U_r/L_h , grado de ramificación del micelio; A_{sh}/V_h , relación área a volumen de las hifas.

El incremento observado para ambas variables fue proporcional entre 25 y 35 °C, mientras que, a temperaturas mayores, los cambios tendieron gradualmente hacia un valor asintótico que evidenció el inicio de los efectos negativos de la temperatura sobre los procesos de elongación hifal (Fig. 22). En las condiciones térmicas evaluadas (25 y 40 °C) la velocidad de crecimiento superficial (U_r) presentó los cambios más evidentes al incrementar su valor 3 veces; mientras que, la longitud de las hifas distales (L_h) sólo incremento un 66%.

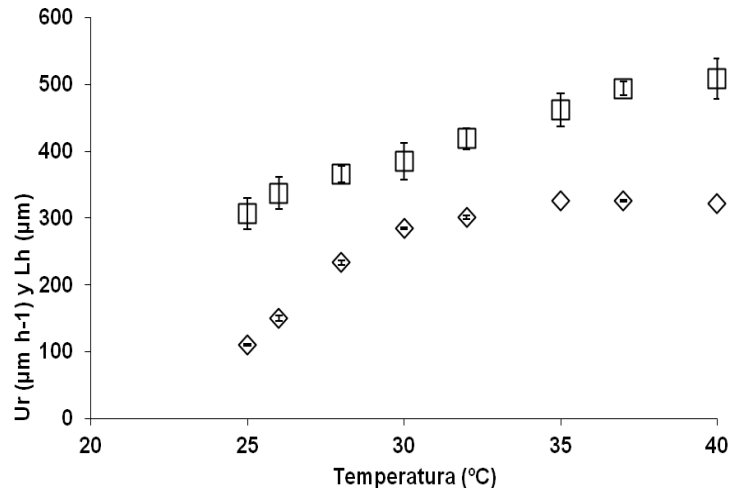


Fig. 22 Cambios morfométricos del micelio de *Fomes* sp. EUM1 a diferentes temperaturas. (\diamond)- U_r ($\mu\text{m h}^{-1}$), velocidad de crecimiento superficial; (\square)- L_h (μm), longitud de las hifas distales.

El aumento simultáneo de U_r y L_h relacionó la mayor velocidad de crecimiento superficial con la presencia de hifas distales largas, y la menor velocidad de crecimiento superficial con la formación de hifas cortas. Las imágenes capturadas del crecimiento micelial de *Fomes* sp. EUM1 muestran claramente la formación de hifas cada vez más largas conforme se incrementó la temperatura (Fig. 23).

El diámetro de las hifas distales (D_h) presentó cambios menos evidentes que los observados para U_r y L_h . Mientras estas variables se incrementaron con la temperatura, el diámetro hifal tendió a decrecer. La reducción del diámetro hifal (13% hasta 40 °C) con la temperatura ocasionó una mayor relación área/volumen de las mismas (Fig. 24; Tabla 6).

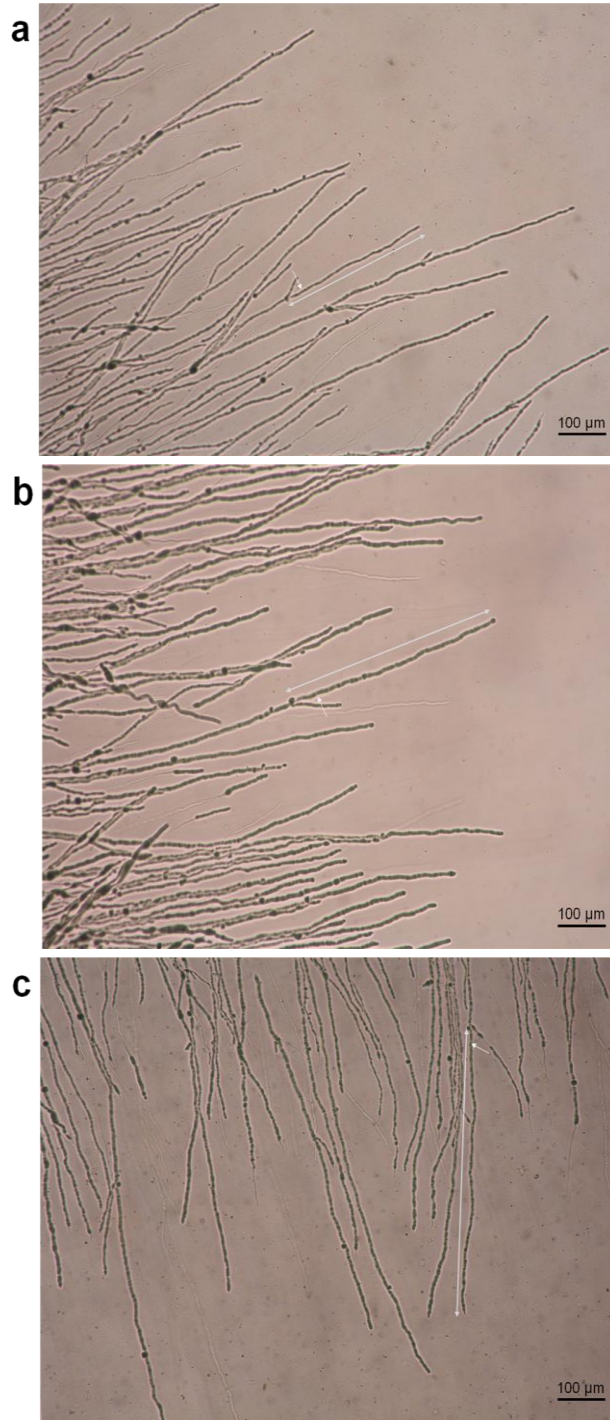


Fig. 23 Cambios en la longitud de las hifas distales durante el crecimiento de *Fomes* sp. EUM1 en condiciones térmicas diferentes. a) Temperatura baja (25 °C); b) Temperatura idónea (30 °C); c) Temperatura alta (40 °C)

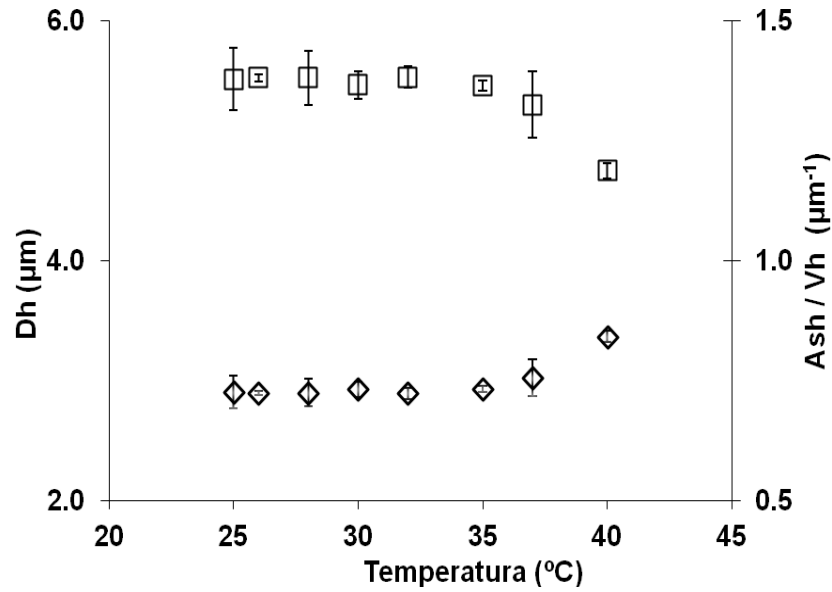


Fig. 24 Cambios morfológicos del diámetro y de la relación área a volumen de las hifas distales de *Fomes* sp. EUM1 respecto a la temperatura. (□) Diámetro- D_h ; (◇) Área/volumen- A/V .

El incremento de la longitud hifal con la temperatura influyó en la frecuencia de ramificación del micelio (U_r/L_h), variable morfológica que mide el número promedio de ramificaciones formadas por unidad de tiempo y de el área superficial de las hifas distales (Fig. 25). El grado de ramificación del micelio fue incrementándose hasta obtener su máximo valor a la temperatura máxima de crecimiento de *Fomes* sp. EUM1 (30 °C) (Fig. 25; Tabla 6). De acuerdo a esto, el mayor grado de ramificación del micelio concordó con la máxima formación de biomasa ($X_{max} = 14 \text{ g L}^{-1}$). Temperaturas mayores que 30 °C disminuyeron el grado de ramificación del micelio (15% hasta 40 °C), ocasionando menores niveles de formación de biomasa (Tabla 5; 6). La disminución de la ramificación micelial y el descenso en la formación de biomasa fueron compensadas con un crecimiento superficial mayor a temperaturas adversas. Las ventajas fisiológicas de modificar el crecimiento microscópico del micelio a temperaturas altas son analizadas en la sección de discusión.

La longitud creciente de las hifas distales con la temperatura implicó mayor área superficial de las hifas, A_{sh} (Fig. 25; Tabla 6), hasta un 43% de 25 a 40 °C,

indicando un área de contacto mayor entre las hifas y el medio nutritivo. Además de los cambios morfométricos descritos, los cultivos formaron micelio aéreo considerable (hifas aéreas) cuando crecieron en condiciones térmicas desfavorables ($>30\text{ }^{\circ}\text{C}$), contribuyendo a la disminución de la densidad micelial. La posible función del micelio aéreo en los cultivos crecidos a altas temperaturas es descrita en el apartado de discusión.

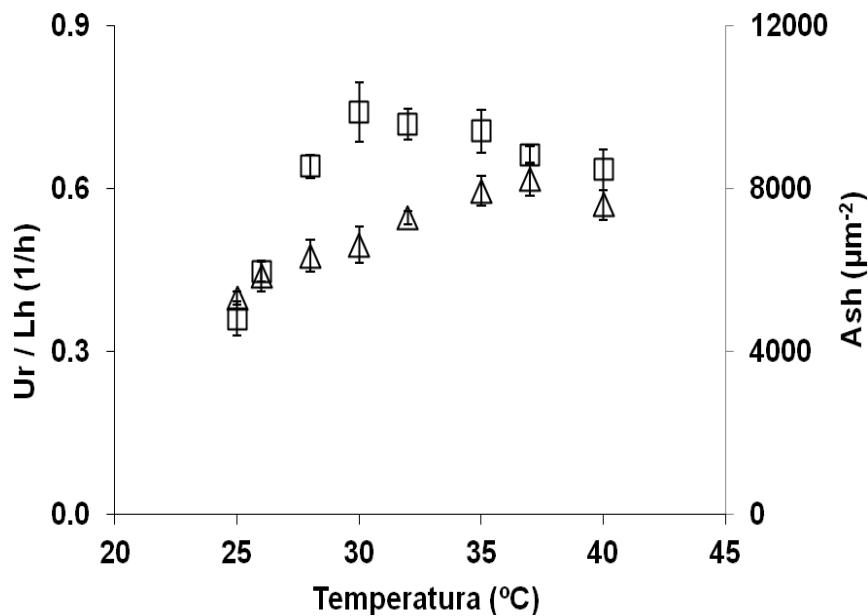


Fig. 25 Modificación del grado de ramificación del micelio y del área superficial de las hifas distales de *Fomes* sp. EUM1 respecto a la temperatura. (\square) U_r/L_h ; (Δ) Ash

Los resultados mostraron que los ajustes microscópicos del crecimiento superficial de *Fomes* sp. EUM1 influyeron en el crecimiento macroscópico y que dichos cambios estuvieron relacionados con la termotolerancia del microorganismo, especialmente, cuando crece a temperaturas desfavorables ($>30\text{ }^{\circ}\text{C}$). El aumento de la capacidad invasiva del micelio con la temperatura y la adaptación térmica que involucra el modificar la morfología hifal, podrían ser ventajas para el crecimiento de *Fomes* sp. EUM1 en cultivo en medio sólido sobre residuos agroindustriales, ya que, el crecimiento microbiano se lleva a cabo en condiciones no-isotérmicas que afectan la formación de producto. Para probar este hecho, el

hongo de pudrición blanca *Fomes* sp. EUM1 se cultivo sobre rastrojo de maíz a temperaturas mayores que 30 °C (máxima de crecimiento) y se cuantificó simultáneamente la producción de enzimas lignocelulolíticas (celulasas, xilanasas y lacasas), así como la producción de proteasas.

6.4 Producción de enzimas lignocelulolíticas en medio sólido a temperaturas crecimiento altas

La producción de enzimas lignocelulolíticas fue superior cuando *Fomes* sp. EUM1 creció a temperaturas mayores a su máxima de crecimiento (30 °C) (Fig. 26). La producción de celulasas y xilanasas tendió a incrementarse 1.6 y 2.8 veces, respectivamente, al modificarse las condiciones térmicas de 30 °C a 40 °C (Fig. 26a, b). El efecto adverso de la temperatura en la producción de ambas enzimas se evidenció a temperaturas mayores. El aumento de la temperatura (30 a 40 °C) también ocasionó la disminución del tiempo necesario para alcanzar los niveles de producción máximos de ambas enzimas de 8 a 6 días (Fig. 26a, b). La producción de lacasas se afectó a temperaturas mayores a 35 °C, pero el incremento en la producción de 2.7 veces de 30 °C a 35 °C se comparó a lo obtenido para celulasas y xilanasas (Fig. 26c). La temperatura de 40 °C afectó negativamente su producción en 25% respecto a 35 °C. Contario a lo esperado, la producción de lacasas tendió a ser estable a 45 °C lográndose niveles comparables a los obtenidos a 35 °C (Fig. 26c).

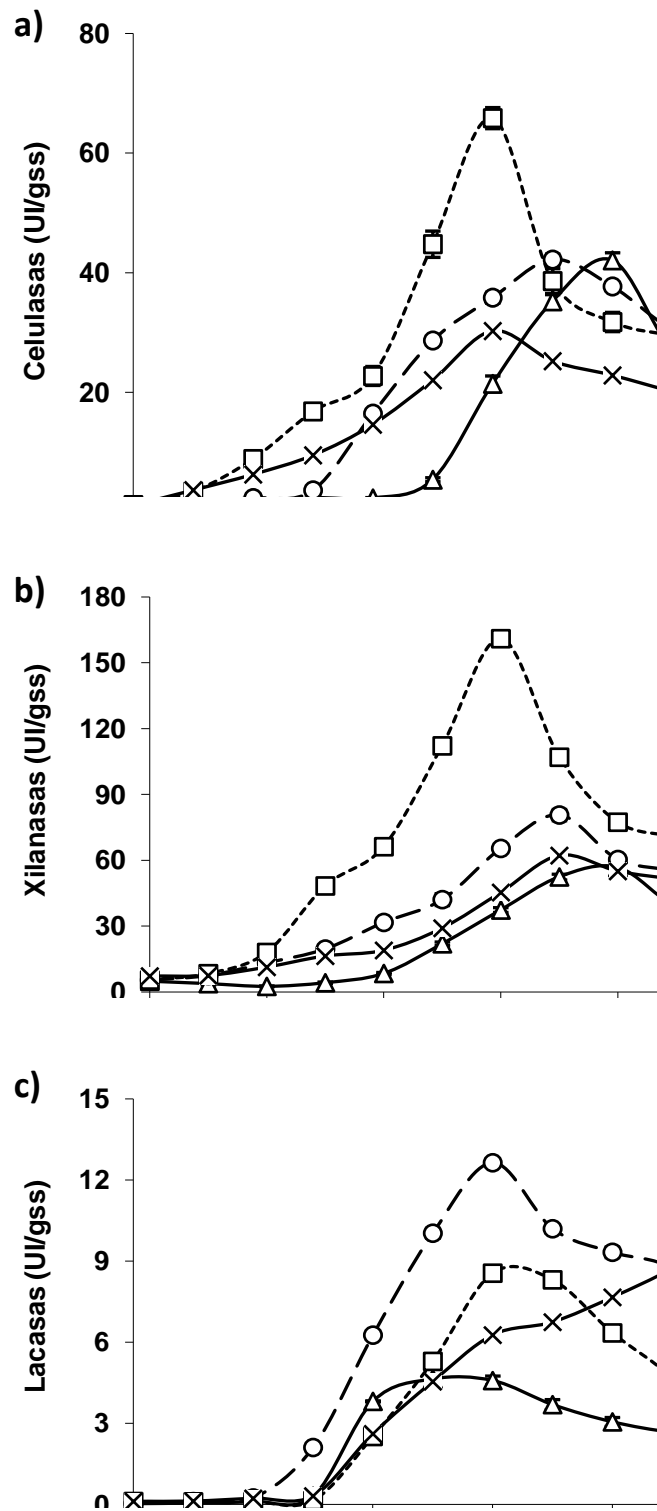


Fig. 26 Efecto de la temperatura en la producción de enzimas lignocelulolíticas de *Fomes* sp. EUM1. El hongo creció en medio sólido usando rastrojo de maíz como sustrato. (Δ) 30 °C, (O) 35 °C, (\square) 40 °C, (x) 45 °C.

La producción máxima de celulasas y de xilanasas se obtuvo a la temperatura de 40 °C (Fig. 26a, b); mientras que, la de lacasas a 35 °C (Fig. 26c). En este sentido, la temperatura máxima de producción de enzimas fue mayor que la máxima de crecimiento.

La productividad de las enzimas también se incrementó de manera similar a la producción (Fig. 27). Al respecto, la productividad de xilanasas y de celulasas mejoró 3.8 y 2.1 veces de 30 a 40 °C, respectivamente; mientras que, las lacasas fue 2.3 veces, pero de 30 a 35 °C.

Una de las desventajas observadas durante el crecimiento de *Fomes* sp. EUM1 fue la caída drástica de la actividad enzimática después que se alcanzaron los niveles máximos de producción de enzimas (Fig. 26). Las caídas de actividad enzimática fueron más evidentes a 40 °C para celulasas y xilanasas; mientras que, las lacasas permanecieron constantes únicamente a 45 °C. Para explicar las caídas de actividad enzimática se determinó la actividad proteolítica durante el cultivo de *Fomes* sp. EUM1 en las condiciones térmicas adversas para su crecimiento. La actividad proteolítica fue mayor a temperaturas elevadas, especialmente a 40 °C, donde se observaron las caídas abruptas de la producción enzimática (Fig. 28). La producción de proteasas tendió a ser constante después que alcanzo su máximo nivel, de manera que, la persistencia y cantidad de proteasas se relacionaron con las pérdidas de actividad enzimática. Los resultados obtenidos durante el crecimiento del hongo a altas temperaturas, como el aumento de la producción y de la productividad de enzimas lignocelulolíticas, así como, de la presencia de una cantidad considerable de proteasas, son explicados en el apartado posterior de discusión.

La adaptación térmica de *Fomes* sp. EUM1 involucró ajustes microscópicos del crecimiento micelial y fue una ventaja en cultivo en medio sólido para obtener mayores rendimientos de enzimas lignocelulolíticas con mayor rapidez. La desventaja fue la presencia de actividad proteolítica en el medio de producción. Sin embargo, las proteasas también son una respuesta fisiológica de *Fomes* sp. EUM1 para crecer en condiciones térmicas adversas.

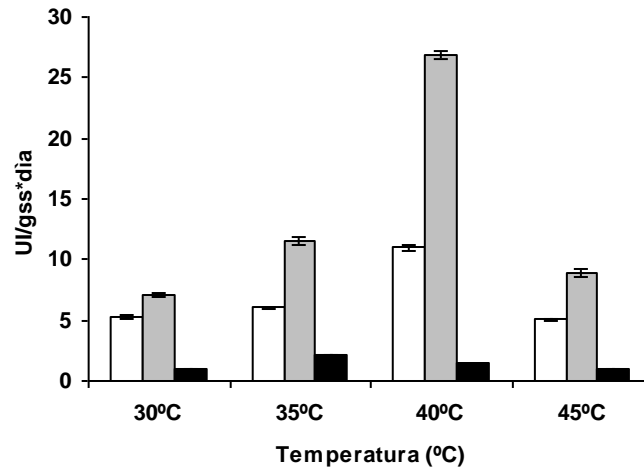


Fig. 27 Efecto de la temperatura en la productividad de enzimas lignocelulolíticas de *Fomes* sp. EUM1. (□) Celulasas, (■) Xilanasas, (■) Lacasas.

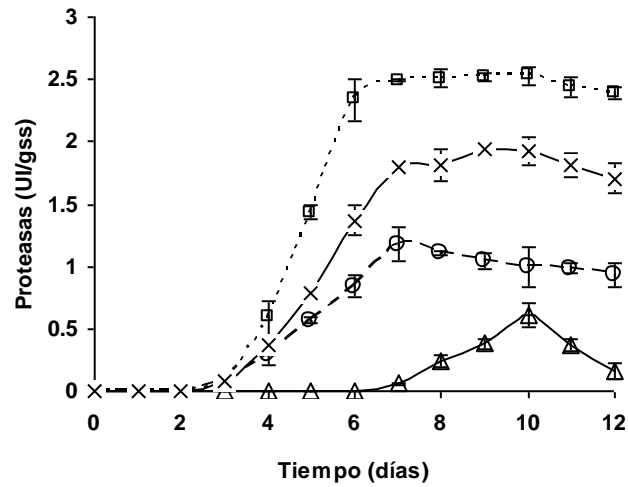


Fig. 28 Aumento de la actividad proteolítica con la temperatura durante el cultivo de *Fomes* sp. EUM1 en medio sólido sobre rastrojo de maíz. (Δ) 30 °C, (O) 35 °C (□) 40 °C, (x) 45 °C.

6.5 Patrón de secreción de isoenzimas en condiciones térmicas diferentes

Se investigó la posible síntesis de isoenzimas nuevas (hidrolasas y lacasas) como otra respuesta adaptativa de *Fomes* sp. EUM1 a temperaturas altas. Para probar esto, se analizó por zimografía el patrón de las isoenzimas presentes en los extractos enzimáticos obtenidos al crecer *Fomes* sp. EUM1 a la temperatura máxima de crecimiento (30°C) y a temperaturas mayores (40 y 45°C). El patrón de isoenzimas se detectó en geles SDS-PAGE partiendo de extractos enzimáticos concentrados (Anexo A).

El hongo termotolerante *Fomes* sp. EUM1 presentó un patrón electroforético distinto para la secreción de celulasas y xilanasas a temperaturas elevadas (30 a 45 °C); mientras que, el patrón de secreción de lacasas fue el mismo. Los zimogramas evidenciaron la presencia de una banda con actividad de lacasas cuando el hongo creció a temperaturas adversas (Fig. 29). La lacasa detectada exhibió una masa molecular (MM) aparente de aproximadamente 46 kDa. Los zimogramas de celulasas mostraron la presencia de seis bandas con actividad enzimática (Fig. 30) La celulasas CI (197 kDa), CII (80.5 kDa) y CIII (27.5 kDa) se detectaron en todas las condiciones térmicas de crecimiento, denotando así, su importancia. Cuando la temperatura de crecimiento de *Fomes* sp. EUM1 se modificó de 30 °C (máximo crecimiento) hasta 40 °C, aparecieron distintas isoenzimas de celulasas denominadas CIV (24 kDa) y CV (21.3kDa). En las condiciones de temperatura elevadas (45 °C) la actividad de CV no persistió y su actividad fue complementada por la presencia de la isoensima CVI (152 kDa).

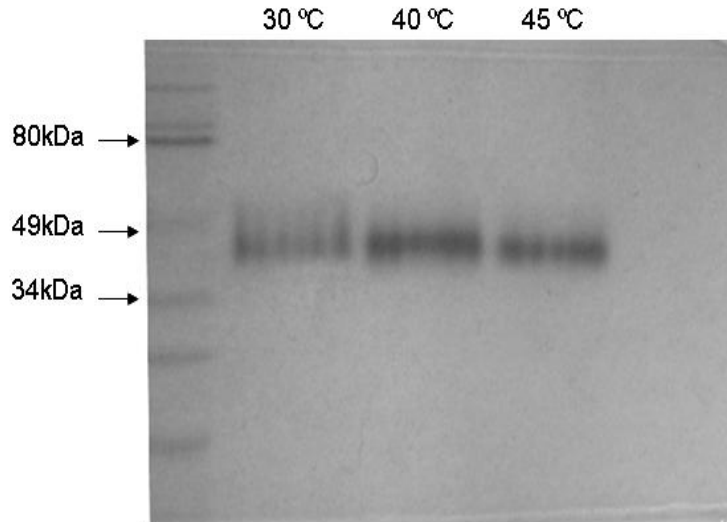


Fig. 29 Zimograma de lacasas presentes en los extractos obtenidos durante el crecimiento de *Fomes sp. EUM1* en cultivo sólido a varias temperaturas.

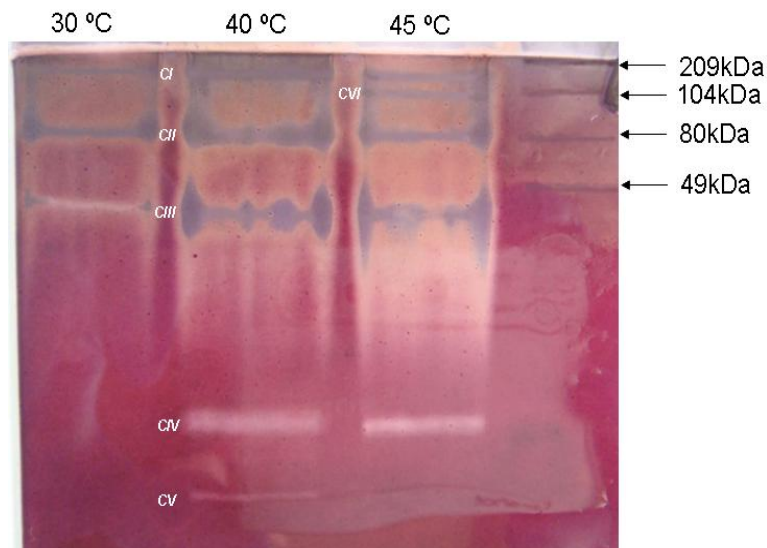


Fig. 30 Zimograma de las celulasas presentes en los extractos enzimáticos obtenidos durante el crecimiento de *Fomes sp. EUM1* en cultivo sólido a varias temperaturas.

El zimograma de xilanasas también mostró la secreción de otras isoenzimas a temperaturas elevadas, pero en número menor. Se detectó la presencia de cuatro bandas definidas con actividad xilanasas denominadas Xyl, XylII, Xyl3, Xyl4 (Fig. 31). La masa molecular (MM) aparente de Xyl y XylII fue 140 kDa y 130 kDa; respectivamente, las xilanasas XylIII y XylIV exhibieron 95 kDa y 120 kDa. La xilanasas Xyl se secretó durante el crecimiento de *Fomes sp. EUM1* a 30 y 40 °C,

pero no a 45 °C; mientras que, XylII y XylIII se secretaron en todas las condiciones térmicas de crecimiento. De manera interesante, se detectó la presencia de otra isoenzima de xilanasas (XylIV) a la temperatura más elevada de (45 ° C), aparentemente, complementando la deficiencia de Xyl. La xilanasas Xyl pareció ser importante para el crecimiento de *Fomes* sp. EUM1 a 45 °C. La masa molecular de las isoenzimas lignocelulolíticas detectadas a temperaturas altas y su posible función en la adaptación térmica se analizan posteriormente en la sección de discusión

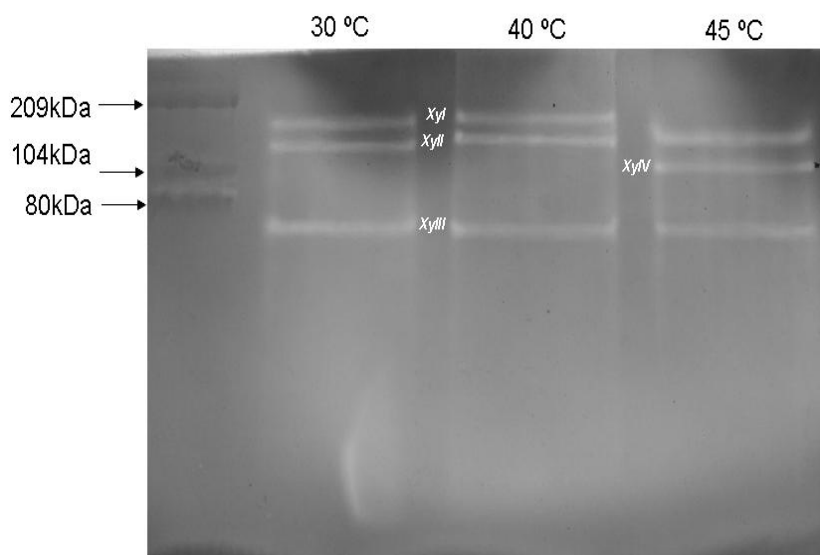


Fig. 31 Zimograma de las xilanasas presentes en los extractos enzimáticos obtenidos durante el crecimiento de *Fomes* sp. EUM1 en cultivo sólido a varias temperaturas.

7 DISCUSIÓN

7.1 El hongo de pudrición blanca *Fomes* sp. EUM1 es una especie no reportada

El hongo estudiado se había denominado anteriormente como *Trametes* sp. EUM1, un hongo de pudrición blanca, capaz de secretar lacasas termoestables en medio líquido e hidrolasas en medio sólido (Medina, 2003; Márquez, 2004; Márquez-Araque *et al.*, 2007). La identificación molecular hecha en esta investigación permitió clasificar nuevamente al microorganismo como un hongo de pudrición blanca del género *Fomes*, el cual, se denominó *Fomes* sp. EUM1. El análisis genético se hizo con los espaciadores transcritos internos del ADNr o ITS, uno de los marcadores moleculares más empleados para identificar hongos (Riberg *et al.*, 2009) debido a su fácil amplificación al encontrarse con gran número de copias en el genoma y por presentar un alto grado de variación entre especies (Gardes y Bruns, 1993). La especie no se estableció con certeza, ya que, la secuencia de nucleótidos de los ITS presentó una similitud baja (90 %) respecto a las reportadas. Al respecto, algunos estudios muestran que la especie de algunos hongos puede ser asignada confiablemente usando porcentajes de identidad $\geq 97\%$ (Henry *et al.*, 2000). Con porcentajes de identidad menores se han descrito diferencias notorias en las secuencias de nucleótidos de los ITS de algunos hongos, como inserciones y eliminaciones, que han indicado la identificación de nuevas especies. Se ha mencionado que las modificaciones en las secuencias de nucleótidos de los ITS están relacionadas con el proceso de selección natural por efecto de varios factores ambientales. (Henry *et al.*, 2000). Al respecto, las modificaciones presentes en la secuencia de nucleótidos de *Fomes* sp. EUM1 junto con el índice de identidad bajo de 90% sugieren la identificación de una especie nueva de un hongo de pudrición blanca del género *Fomes* que hasta la fecha no ha sido reportada. Hoy en día, se reportan hongos cuya especie es desconocida o atribuida inconsistentemente a pesar del gran número de secuencias reportadas (Riberg *et al.*, 2009). El hongo *Fomes* sp. EUM1 que fue aislado de la diversidad del trópico de México podría representar una

fuente de estudio para sus enzimas y su fisiología. Actualmente, existen pocos estudios científicos describiendo el potencial biotecnológico de los hongos del género *Fomes* (Papinutti y Forchiassin, 2007; Neifar *et al.*, 2010).

7.2 El hongo *Fomes* sp. EUM1 es un microorganismo termotolerante

La temperatura de máximo crecimiento de *Fomes* sp. EUM1 (30 °C) fue una característica peculiar que se ha observado para el crecimiento de los hongos de pudrición blanca del género *Fomes*, ya que, se cultivan a temperaturas de 28 y hasta 35 °C para la obtención de enzimas lignocelulíticas (Papinutti y Forchiassin, 2003; Papinutti y Forchiassin, 2007; Elisashvili *et al.*, 2008; Neifar *et al.*, 2010). A diferencia de éstos, el hongo *Fomes* sp. EUM1 fue capaz de crecer a temperaturas mayores (40 °C) que son inusuales en lo descrito para el crecimiento de los hongos del mismo género, no obstante, las velocidades específicas de crecimiento y de formación de biomasa fueron comparables a lo obtenido para otros hongos de pudrición blanca bajo condiciones de cultivo diferentes (0.02 h⁻¹ a 0.05 h⁻¹) (Márquez-Rocha *et al.*, 1999; Tecuítl-Beristain *et al.*, 2008; Xavier *et al.*, 2010). Comparando la velocidad específica de crecimiento de *Fomes* sp. EUM1 con la de hongos sobreproductores de hidrolasas como *Aspergillus* y *Trichoderma*, ésta es aproximadamente 10 veces menor (Smith *et al.*, 1996; Chipeta *et al.*, 2008).

Los estudios de crecimiento de *Fomes* sp. EUM1 a temperaturas de 25 a 40 °C permitieron estimar, mediante la ecuación de Arrhenius, los valores de energía de activación y desactivación del crecimiento. La región de activación y desactivación del crecimiento mostraron una tendencia lineal al representar valores de velocidad específica en función del inverso de la temperatura (LN μ vs 1/T), esta característica también se ha observado estudiando la influencia de la temperatura sobre el crecimiento microbiano de otros hongos (Bokhari *et al.*, 2008), en la producción de xilosa (Sánchez, *et al.*, 2004) y etanol (Phisalaphong *et al.*, 2008), aunque, en ciertos casos ha sido difícil establecer una relación lineal. La energía de activación ($E_a = 68 \text{ KJ Mol}^{-1}$) del crecimiento de *Fomes* sp. EUM1 fue similar a lo reportado para el crecimiento celular de otros hongos (Saucedo-Castañeda *et al.*, 1990;

Sánchez, *et al.*, 2004; Phisalaphong *et al.*, 2008) e incluso para la formación de producto (Converti y Dominguez, 2001; Rajoka *et al.*, 2005), estando en el orden de 30 a 80 KJ Mol⁻¹. Sin embargo, la energía de inactivación ($E_f = 32$ KJ Mol⁻¹) de *Fomes* sp. EUM1 fue mucho menor a lo esperado para el crecimiento celular de los hongos mesófilos que se han descrito para los estudios mencionados, estando en el orden de 100 a 200 KJ Mol⁻¹. La energía de inactivación menor que la de inactivación es una característica que se ha confirmado para los hongos termotolerantes (Bokhari *et al.*, 2008) y para sus respectivas enzimas (Rajoka, 2007). Los resultados termodinámicos ($E_i < E_a$) establecen claramente la termotolerancia de *Fomes* sp. EUM1, una característica que puede estar asociada con múltiples respuestas celulares a altas temperaturas. Son varios los mecanismos de protección celular que pueden explicar la adaptación térmica de *Fomes* sp. EUM1; algunos de ellos se han descrito a nivel intracelular e involucran la síntesis de proteínas de choque térmico (HSP) (Sánchez y Lindquist, 1990) y de trehalosa (Tereshina, 2005), ambas para proteger proteínas intracelulares. También se ha reportado la síntesis de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa y catalasa) para reducir los efectos adversos de los radicales libres generados a temperaturas de crecimiento altas (Abrashev *et al.*, 2008). Además de estos, se describe que los microorganismos pueden modificar la composición lipídica de su membrana celular para regular el transporte de nutrientes a altas temperaturas (Nordström y Laakso, 1992; Maheshwari, 2000).

La clasificación de *Fomes* sp. EUM1 como un hongo termotolerante se hizo considerando un criterio termodinámico, que es menos ambiguo que el uso de las temperaturas cardinales de crecimiento (mínima y máxima de crecimiento), como lo hace Cooney y Emerson, (1964). La clasificación hecha, no obstante, concuerda con la definición hecha por los autores para clasificar termotolerantes, como aquellos microorganismos capaces de crecer a temperaturas menores de 20 °C y cercanas a 50 °C. Existen pocos estudios describiendo hongos de pudrición blanca con características de termotolerancia de acuerdo a la temperatura de crecimiento (Chairattananokorn *et al.*, 2006; Dantán-González *et al.*, 2008).

Este hecho se describe por primera vez en un hongo de pudrición blanca termotolerante del género *Fomes*, incluso para otros hongos de pudrición blanca.

7.3 Los cambios microscópicos del crecimiento micelial están relacionados con la termotolerancia de *Fomes* sp. EUM1

La termotolerancia del *Fomes* sp. EUM1 estuvo relacionada con la modificación del crecimiento microscópico del micelio, especialmente, cuando el hongo creció a temperaturas mayores a su máxima de crecimiento. El aumento simultáneo de la velocidad de crecimiento superficial y de la longitud hifal ha sido relacionado con la dinámica (movimientos de contracción y elongación) de los microtúbulos y con las proteínas motoras (dineína y la quinesina) que efectúan su movimiento. Uchida *et al.* (2008) mostró que la dinámica de los microtúbulos explica la velocidad de elongación de las hifas y, por consiguiente, la velocidad de crecimiento superficial de un microorganismo. En el mismo sentido, Steinberg, (2007) menciona que la velocidad de elongación hifal también depende de la dinámica de las proteínas motoras, dineína y quinesina, las cuales transportan precursores de pared celular a la punta de las hifas.

Los efectos de la temperatura en el diámetro hifal de los hongos ha sido estudiado en *Neurospora crassa*, sin encontrarse cambios relevantes cuando el hongo creció entre 15 y 37 °C (Steel y Trinci, 1975). Algunos estudios señalan que el diámetro es una variable que regula la longitud de las hifas. Dynesen y Nielsen, (2003) mencionan que la longitud hifal puede incrementarse manteniendo el volumen citoplasmático cuando las hifas reducen su diámetro. Este hecho explica la formación de las hifas más largas durante el crecimiento de *Fomes* sp. EUM1 a temperaturas adversas (>37 °C), cuando la longitud crítica de las hifas parecía estar limitada por los procesos de elongación hifal.

Los cambios observados en la velocidad de crecimiento superficial y en la longitud de las hifas tuvieron implicaciones importantes en la ramificación del micelio de *Fomes* sp. EUM1. Spohr, (1997) encontró resultados similares al describir la morfología de cepas recombinantes de *A. oryzae*, su estudio mostró que las cepas con mayor densidad micelial se conformaban por hifas más cortas en comparación

a las colonias con menor densidad micelial, las cuales se conformaban por hifas más largas; asimismo, mostró que las cepas con mayor densidad micelial secretan mayor cantidad de enzimas. Varios estudios han mostrado que la frecuencia de ramificación del micelio depende de la longitud de las hifas (Spohr *et al.*, 1997; Dynesen y Nielsen, 2003); en este sentido, han mostrado que una hifa se ramificará hasta que exceda su longitud crítica, la cual está determinada por el volumen citoplasmático mínimo que puede mantener una hifa en función de los procesos que rigen la elongación hifal (Dynesen y Nielsen, 2003; Steinberg, 2007; Harris, 2008).

La modificación de la frecuencia de ramificación del micelio de *Fomes* sp. EUM1 podría estar relacionado con la eficiencia para asimilar los nutrientes (Hood y Shew, 1997; Dynesen y Nielsen, 2003; Brand y Gow, 2009), para regular la disponibilidad y los eventos de señalización entre las hifas de una misma colonia (Harris, 2008; Brand y Gow, 2009). En este sentido, la disminución de la frecuencia de ramificación del micelio de *Fomes* sp. EUM1 y el aumento sucesivo del área superficial de las hifas, sugieren ser estrategias del hongo para colonizar zonas ricas en nutrientes con mayor rapidez, de modo que, se involucre un gasto de energía mínimo para formar biomasa, especialmente, a temperaturas adversas para su crecimiento.

La formación de micelio aéreo abundante sobre los cultivos de *Fomes* crecidos a temperaturas mayores que su máxima de crecimiento (>30 °C) sugiere ser una estrategia para incrementar la disponibilidad de oxígeno al resto del micelio vegetativo. De acuerdo a Rajardio *et al.* (2002), el micelio aéreo favorece el proceso respiratorio de *Aspergillus oryzae* al incrementarse la difusión del oxígeno en las zonas menos densas de la matriz micelial. Posiblemente, al facilitarse el proceso respiratorio se genere suficiente energía para mantener el metabolismo celular a altas temperaturas (Wongwicharn *et al.*, 1999; Khun *et al.*, 1980).

Algunos de los cambios microscópicos del crecimiento micelial de *Fomes* sp. EUM1 han sido descritos para otros hongos en condiciones ambientales distintas. Por ejemplo, la morfología del micelio de varias cepas de *Aspergillus* cambia al

modificarse la concentración de oxígeno (Rajardio *et al.*, 2003), dióxido de carbono (McIntyre y McNeil, 1997) y de nutrientes (Hood y Shew, 1997; Dynesen y Nielsen, 2003).

7.4 La termotolerancia de *Fomes sp.* EUM1 es una ventaja en cultivo sólido para producir enzimas

El hongo de pudrición blanca *Fomes sp.* EUM1 creció satisfactoriamente en medio sólido sobre rastrojo de maíz, además, fue capaz de producir cantidades considerables de enzimas lignocelulolíticas sin suplementar una fuente de carbono y nitrógeno externa. El rastrojo de maíz se describe poco en cultivo sólido como un sustrato para la obtención de enzimas por hongos, aun cuando exhibe potencial como sustrato para la obtención de enzimas lignocelulolíticas, al obtenerse niveles aceptables de celulasas y xilanasas con una cepa de *Fusarium*, entre 200 y 800 U/g. respectivamente (Panagiotou *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2008; Ghori *et al.*, 2011). La mayoría de los estudios enfatizan su pretratamiento por medios biológicos, especialmente con hongos y sus enzimas, para mejorar su digestibilidad y valor proteico (Wan y Li, 2010, 2011; Zhu *et al.*, 2011).

Los hongos de pudrición blanca del género *Fomes* son poco estudiados, a pesar que producen enzimas lignocelulolíticas en medio sólido (Papinutti y Forchiassin, 2003; Papinutti y Forchiassin, 2007; Elishavili *et al.*, 2009) y, que sus enzimas, especialmente lacasas, exhiben actividad prometedora para ser aplicados sobre efluentes contaminados con colorantes textiles (Papinutti *et al.*, 2006; Neifar *et al.*, 2010). Actualmente, los hongos de pudrición blanca de los géneros *Trametes*, *Pleurotus*, *Lentinus* y *Phenerochaete* son los más estudiados en cultivo sólido (Rodríguez-Couto *et al.*, 2003; Elisashvili *et al.*, 2008; Sarnthima *et al.*, 2009) y líquido (Elisashvili *et al.*, 2008; Patrick *et al.*, 2011) por producir cantidades considerables de enzimas lignocelulolíticas, sin embargo, son microorganismos reportados como mesófilos con potencial para crecer y producir cantidades considerables de enzimas lignocelulolíticas sólo a temperaturas cercanas a su óptimo de su crecimiento (entre 28 y 32 °C); después de estas condiciones térmicas la producción de enzimas se ve afectada drásticamente. Esto implica

desventajas en cultivo sólido porque el crecimiento microbiano se lleva a cabo en condiciones no isotérmicas (Isakari *et al.*, 1999), con gradientes de temperatura de 1 hasta 10 °C que afectan la síntesis de enzimas drásticamente (Mitchell *et al.*, 2002; Figueroa-Montero *et al.*, 2011).

La adaptación térmica del hongo *Fomes* sp. EUM1 representó una ventaja en cultivo sólido para contrarrestar los efectos adversos de la temperatura sobre el crecimiento microbiano, ya que, la secreción de enzimas se incrementó durante el crecimiento a temperatura altas (> 30 °C). El aumento de la secreción de las enzimas sugiere ser relevante para suministrar con rapidez los carbohidratos simples que se requieren en mayor cantidad para mantener el crecimiento a altas temperaturas. Los niveles de secreción de celulasas (hasta 70 U/ gss) y xilanasas (hasta 170 U/gss) obtenidos por *Fomes* sp. EUM1 fueron comparables a los reportados por otros hongos de pudrición blanca que oscilan entre 20 y 200 U/g sustrato para celulasas (Elisashvili *et al.*, 2008; Elisashvili *et al.*, 2009; Sherief *et al.*, 2010) y para xilanasas entre 50 y 300 U/gss (De Souza *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2004; Kachlishvili *et al.*, 2005; Elisashvili *et al.*, 2009). La producción de lacasas de *Fomes* sp. EUM1 (hasta 12.6 U/gss) fue mayor que lo reportado para algunos hongos mesófilos de los géneros *Pleurotus*, *Lentinus*, y *Trametes* que están entre 2 a 5 U/gss (De Souza *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2004; Kachlishvili *et al.*, 2005), pero fueron menores que lo obtenido por otros hongos que sobreproducen lacasas como *Pycnoporus*, *Trametes* y *Pleurotus* (50 hasta 800 U/gss) (Vikineswary *et al.*, 2006; Jing *et al.*, 2007; Levin *et al.*, 2008; Landolo *et al.*, 2011). La mayoría de los estudios mencionados fueron optimizados, mientras que, el medio de producción de enzimas lignocelulolíticas para *Fomes* sp. EUM1 consistió de rastrojo de maíz como única fuente de nutrientes.

La adaptación térmica de *Fomes* sp. EUM1 favoreció una alta capacidad invasiva del micelio sobre el rastrojo de maíz a temperaturas altas, ocasionando la disminución del tiempo de fermentación de 8 a 6 días para alcanzar los rendimientos más altos. Esta ventaja de proceso sobresale respecto a otros hongos de pudrición blanca, los cuales alcanzan las productividades más altas

después de 15 días de cultivo (Sun *et al.*, 2004; Papinutti y Forchiassin, 2003; Elisashvili *et al.*, 2008; Elisashvili *et al.*, 2009). Otra ventaja observada cuando *Fomes* sp. EUM1 creció a temperaturas altas (> 30 °C) fue la disminución de contaminación por otros microorganismos. La alta capacidad invasiva del micelio de *Fomes* sp. EUM1, su habilidad para modificar la morfología hifal junto con el patrón de producción de enzimas a temperaturas adversas, fueron algunas de las ventajas observadas durante su cultivo en medio sólido sobre rastrojo de maíz. De acuerdo a Varzakas, (1998), la degradación de los polímeros estructurales de los residuos agroindustriales se asocia con el mayor grado de dispersión del micelio y con la liberación de enzimas hidrolíticas en las zonas profundas de las partículas de los sustratos agroindustriales.

Una de las desventajas de proceso observadas durante el crecimiento de *Fomes* sp. EUM1 a temperaturas adversas fue la magnificación de la actividad proteolítica y con ello, el efecto adverso de las proteasas sobre las enzimas de interés, Estudios de Shah y Madamwar, (2005) y Li *et al.* (2008) describen resultados similares al mostrar el efecto adverso de las proteasas sobre las xilanasas secretadas por una cepa de *Aspergillus*. Otros estudios resuelven el problema de las proteasas al suplementar en el medio de producción una fuente externa de nitrógeno orgánico (Shah y Madamwar, 2005; Kachlishvili *et al.*, 2005) o adicionando inhibidores de proteasas, ya sea, al medio de producción ó a los extractos enzimáticos (Dosoretz *et al.*, 1990; Aguilar *et al.*, 2002). Desde el punto de vista fisiológico, las proteasas son importantes para asimilar el nitrógeno, hidrolizar proteínas dañadas y para el recambio de proteínas en condiciones de estrés por nutrientes y por temperatura (Dosoretz *et al.*, 1990; Rao, 1998; Staszczak, 2008).

7.5 La adaptación térmica de *Fomes* sp. EUM1 involucra modificar el patrón de secreción de isoenzimas

Durante la adaptación térmica de *Fomes* sp. EUM1 se hizo evidente la síntesis de isoenzimas nuevas de celulasas y xilanasas, como otra respuesta adaptativa para crecer a temperaturas adversas. Esta respuesta no fue observada para las lacasas al secretarse un sólo tipo de isoenzima. Esto sugiere que el aumento de la producción se debe a una mayor expresión del gen que codifica para las lacasas (Ohga *et al.*, 2001) y que el restablecimiento de los niveles de producción a 45 °C no se debe a la síntesis de nuevas isoenzimas, aunque se favorece la acumulación por una disminución de la actividad de proteasas. La masa molecular de la lacasa producida por *Fomes* sp. EUM1 fue similar a lo reportado para las lacasas de otros hongos del mismo género, sin embargo, los hongos del género *Fomes* secretan por lo menos tres tipos de isoenzimas en condiciones de cultivo diferentes, con masas moleculares entre 30, 50 y 150 kDa (Papinutti y Forchiassin, 2007; Neifar *et al.*, 2010). En otras condiciones ambientales diferentes a la temperatura se puede inducir la secreción de nuevas isoenzimas de lacasas, como se ha observado al modificar la concentración de cobre (Palmeri *et al.*, 2000), variar la fuente de nitrógeno y carbono (Piscitelli *et al.*, 2011) y agregar compuestos aromáticos al medio de cultivo (Lu *et al.*, 2010). La información es limitada acerca de la inducción térmica de las lacasas y los resultados sugieren que la expresión de las lacasas de *Fomes* sp. EUM1 es regulada parcialmente por temperatura, al restablecerse los niveles de producción de enzima a 45 °C.

El hongo *Fomes* sp. EUM1 secretó varias isoenzimas de celulasas (seis isoenzimas) y de xilanasas (cuatro isoenzimas) con un patrón de síntesis diferente respecto a la temperatura de crecimiento. Ciertos tipos de isoenzimas de celulasas (CI, CII y CIII) y de xilanasas (XyII y XyIII) fueron secretadas en todas las condiciones térmicas de crecimiento, sugiriendo su relevancia para el metabolismo independientemente de las condiciones de crecimiento. Lenartovicz *et al.*, (2002), resaltó la importancia de algunas isoenzimas de xilanasas en el metabolismo de una cepa de *Aspergillus* al secretarse con un mismo patrón en condiciones de

temperatura y de cultivo diferentes. La secreción de nuevas isoenzimas de celulasas (CIV, CV, ambas a 40 °C-45 °C y CVI a 45 °C) y de xilanasas (XylIV a 45 °C) estuvo relacionada con la adaptación térmica de *Fomes* sp. EUM1 y su secreción sugiere que es importante para mantener el crecimiento a temperaturas adversas. Al respecto, la modificación del patrón de secreción de isoenzimas de celulasas fue una de las rutas más vesátiles implicadas en la adaptación térmica de *Fomes* sp. EUM1. Las respuestas descritas no se han reportado para otros hongos filamentosos. Se sabe que *Aspergillus fumigatus* secreta varias isoenzimas de xilanasas, pero sólo es capaz de modificar la actividad de cada una ellas cuando crece en condiciones térmicas diferentes (Lenartovicz *et al.*, 2002). Otros reportes muestran que *Aspergillus niger* suprime la secreción de algunas isoenzimas cuando crece en condiciones adversas de temperatura (45 °C) y que las isoenzimas no afectadas se sobreproducen para complementar la actividad total con la finalidad de mantener el crecimiento (Mendicuti *et al.* 1997). La masa molecular de algunas isoenzimas de celulasas y xilanasas secretadas por *Fomes* sp. EUM1 es mucho mayor que lo reportado para los hongos, estando entre 20 y 60 kDa (Clausen, 1995; Mendicuti *et al.*, 1997; Polizeli *et al.*, 2005; Valášková y Baldrian, 2006; Lahjouji, *et al.*, 2007). Son pocos los estudios que han caracterizado xilanasas en hongos con tamaños moleculares de más de 150 kDa (Milagres y Sales, 2001; Butt *et al.*, 2008), entre estos, destaca un hongo alcali-tolerante (Antony, 2011). Solo algunas isoenzimas de *Fomes* sp. EUM1 presentaron masas moleculares similares a lo destrito en otros reportes (Clausen, 1995; Mendicuti *et al.*, 1997; Lenartovicz *et al.*, 2002). Los estuios de Ponpium *et al.* (2000), pordrían explicar las altas masas moleculares de las hidrolasas de *Fomes* sp. EUM1. De acuerdo a este autor, existen complejos multienzimáticos que, después de separarse por condiciones extremas, liberan enzimas con alta masa molecular.

La modificación del patrón de hidrolasas también se ha encontrado variando el tipo de sustrato agroindustrial para el crecimiento (Teunisseng *et al.*, 1992; Badhan *et al.*, 2004) y los estudios mencionados sugieren la inducción de nuevas isoenzimas por los carbohidratos presentes en los materiales lignocelulósicos. Hasta la fecha, no existen reportes que describan la caracterización de las isoenzimas hidrolíticas secretadas por hongos del género *Fomes* para realizar estudios comparativos.

8 CONCLUSIONES

El hongo *Fomes* sp. EUM1 es una especie de hongo de pudrición blanca termotolerante no descrito hasta la fecha. Este hongo termotolerante disminuye la frecuencia de ramificación del micelio y aumenta el área superficial de sus hifas para crecer a temperaturas mayores a su máximo de crecimiento, lo que sugiere ser una estrategia del hongo para colonizar zonas ricas en nutrientes con mayor rapidez, con la finalidad de gastar la energía mínima para formar biomasa.

La formación de micelio aéreo a temperaturas adversas sugiere ser importante para mejorar la difusión de oxígeno al resto del micelio al reducirse la densidad micelial.

El hongo *Fomes* sp. EUM1 también incrementa la secreción de enzimas lignocelulolíticas en cultivo sólido para mantener crecimiento a temperaturas elevadas. El aumento de la producción de las enzimas sugiere ser relevante para suministrar con rapidez los carbohidratos simples que se requieren en mayor cantidad para mantener el crecimiento a altas temperaturas.

La modificación del patrón de secreción de hidrolasas, especialmente, celulasas sugiere ser una de las vías más versátiles para la adaptación térmica de *Fomes* sp. EUM1.

La secreción de varias isoenzimas tuvo implicaciones importantes para complementar la secreción de algunas enzimas sensibles al calor cuando el hongo creció en condiciones térmicas elevadas.

La adaptación térmica de *Fomes* sp. EUM1 y las respuestas fisiológicas asociadas fueron una ventaja durante el crecimiento del hongo en cultivo sólido para producir cantidades considerables de enzimas. En este sentido, la adaptación térmica del hongo lograría contrarrestar los efectos adversos de los gradientes de temperatura formados en cultivo sólido, los cuales afectan el crecimiento y la formación de producto.

9 PERSPECTIVAS

Con base en los resultados obtenidos, como continuación de la línea de investigación sería interesante medir la expresión de las enzimas medidas con la finalidad de entender su regulación por la temperatura, lo cual está poco estudiado. Además de encontrar otras respuestas celulares como la producción de radicales libres y la acción de enzimas antioxidantes, así como, la síntesis de proteínas HSP, trealosa y grado de glicosilación para relacionarlo con la termoestabilidad de las enzimas. Otra perspectiva interesante sería la aplicación de enzimas en procesos biotecnológicos. Es necesario caracterizar las hidrolasas para discernir si las altas masas moleculares se deben a la formación de agregados, puesto que no existen muchos reportes describiendo masas molares tan altas.

10 REFERENCIAS

- Abadula, E.; Tzanov, T., Costa, S., Robra, K., Cavaco, A., Gübitz, G. M., (2000) Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Applied Environmental Microbiology*, 66 (8): 3357-3362.
- Abrashev, R. I., Pashova, S. B., Stefanova, L. N., Vassilev, S. V. *et al.*, (2008) Heat-shock-induced oxidative stress and antioxidant response in *Aspergillus niger* 26. *Canadian Journal of Microbiology*, 54: 977-983
- Acuña-Argüelles, M. E., Gutiérrez-Rojas, M., Viniestra-González, G., Favela-Torres, E., (1995) Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43 (59): 808-814.
- Agger, T., Spohr, A., Carlsen, M., Nielsen, J., (1998) Growth and product formation of *Aspergillus oryzae* during submerged cultivations: Verification of a morphologically structured model using fluorescent probes. *Biotechnology and Bioengineering*, 57 (3): 321-329.
- Anthony, T., (2003) High molecular weight cellulase-free xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fumigatus* AR1. *Enzyme and Microbial Technology*, 89 (5): 647-654.
- Azin, M., Moravej, R., Zareh, D., (2007) Production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on a mixture of wheat bran and wheat straw: Optimization of culture condition by Taguchi method. *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 801-805.
- Barrios-González, J., González, H., Mejía, A., (1993) Effect of size particle, parking density and agitation on penicillin production in solid state fermentation. *Biotechnology Advances*, 11 (3): 539-547.
- Bartnicki-Garcia, S., Bartnicki, D. D., Gierz, G., Lopez-Franco, R., Bracker, C. E., (1995) Evidence that Spitzenkörper behavior determines the shape of a fungal hypha: a test of the hyphoid model. *Experimental Mycology*, 19:153-159.

- Beauchemin, K. A., Colombatto, D., Morgavi, D. P., Yang, W. Z., (2003) Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *Journal Animal Science*, 81 (14): E37-E47.
- Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G. S., (2001) Microbial xylanases and their industrial applications: review in *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56 (3-4): 326-338.
- Biesebeke, R., van Biezen, N., de Vos, W. M., van den Hondel, C. A., Punt, P. J (2005) Different control mechanisms regulate glucoamylase and protease gene transcription in *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67 (1): 75-82.
- Biesebeke, R., Record, E., van Biezen, N., Heerikhuisen, M., Franken, A., Punt P. J., van den Hondel, C. A., (2005) Branching mutants of *Aspergillus oryzae* with improved amylase and protease production on solid substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69 (81): 44-50.
- Bizukojc, M., Ledakowicz, S., (2010) The morphological and physiological evolution of *Aspergillus terreus* mycelium in the submerged culture and its relation to the formation of secondary metabolites. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26 (1): 41-54.
- Bokhari; I. A. S., Latif; L., Rajoka, I. M., (2008) Kinetics of high-Level of β -glucosidase production by a 2-deoxyglucose-resistant mutant of *Humicola lanuginosa* in submerged fermentation. *Brazilian Journal Microbiology*, 39 (4): 724-733.
- Botella, C., Diaz, A., Ory, I., Webb, C., Blandino, A., (2007) Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 42: 98-101.
- Bourbonnais, R., Pice, M. G., Freiermuth, B., Bodie, E. and Borneman, S., (1997) Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied Environmental Microbiology*, 63 (12): 4627-4632.
- Bradford, M. M., (1976) A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1-2): 248-254.

- Brand, A and Gow, N., (2009) Mechanisms of hypha orientation of fungi. *Current Opinion in Microbiology* 12 (4): 350-357.
- Brijwani, K., Rigdon, A., Vadlani, P., (2010). Fungal laccases: production, function, and applications in food processing. *Enzyme Research*: doi:10.4061/2010/149748.
- Butt, S. M., Tahir-Nadeem, M., Ahmad, Z., Sultan, M. T., (2008) Xylanases and their applications in baking industry. *Food Technology and Biotechnology*, 46 (1) 22-31.
- Caldwell, Y., Trinci, A. P. J., (1973) The growth unit of the mould *Geotrichum candidum*. *Archives of Microbiology*, 88 (1): 1-10.
- Castilho, L. R., Polato, C. M. S., Baruque, S. A., Sant, G. L., Freire, D. M. G., (2000) Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. *Biochemical Engineering Journal*, 4 (3): 239-247.
- Clausen, C. A., (1995) Dissociation of the multi-enzyme complex of the brown-rot fungus *Postia placenta*. *Microbiology Letters*, 127 (1-2):73-78.
- Chairattananokorn, P., Imai, T., Kondo, R., Ukita, M., Prasertsan, P., (2006) Screening thermotolerant white-rot fungi for decolorization of wastewaters. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 128 (3): 195-204.
- Chipeta, Z. A., du Preez, J. C., Christopher, L., (2008) Effect of cultivation pH and agitation rate on growth and xylanase production by *Aspergillus oryzae* in spent sulphite liquor. *Journal Indian Microbiology and Biotechnology*, 35 (6): 587-594.
- Cooney, D. G., Emerson, R., (1964) *Thermophilic Fungi. An account of their biology, activities and classification.* W. H. Freeman and Company, San Francisco, CA, USA.
- Couri, S., Mercedes, E. P., Neves, B. C. V., Senna, L. F., (2006) Digital image processing as a tool to monitor biomass growth in *Aspergillus niger* 3T5B8 solid-state fermentation: preliminary results. *Journal of Microscopy*, 224 (3):290-297.

- Cox, P. W., Paul, G. C., Thomas, C. R., (1998) Image analysis of the morphology of filamentous microorganisms. *Microbiology*, 144: 817-827.
- Cullen, D., Kersten, P., (1992) Fungal enzymes for lignocellulose degradation. In *Applied molecular genetics of filamentous fungi*, Edited by Kinghorn, J. R, Turner, G., New York, Chapman and Hall. Chapter 4: 100-131.
- Dantán-González, E., Vite-Vallejo, O., Martínez-Anaya, C., Méndez-Sánchez., *et al.*, (2008) Production of two novel laccase isoforms by a thermotolerant strain of *Pycnoporus sanguineus* isolated from an oil-polluted tropical habitat. *International Microbiology*, 11: 163-169.
- Dashtban, M., Schraft, H., Qin, W., (2009) Fungal bioconversion of lignocellulosic residues: opportunities and perspectives. *International Journal of Biology and Science*, 5 (6): 578-595.
- De Souza, M., Giatti C., Zilly A., Rosane P. M., (2002) Production of laccase as the sole phenoloxidase by a Brazilian strain of *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation. *Journal Basic of Microbiology* 42 (2): 83-90.
- Dosoretz, G. C., Chen, C., Grethlein, E. H., (1990) Effect of environmental conditions on extracellular protease activity in lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Environmental and Microbiology*, 56 (2): 395-400.
- Duran, N. and Esposito, E., (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidases-like compounds in wastewater and soil treatment: A review. *Applied Catalysis B: Environmental*, 28 (2): 83-99.
- Dynesen, J., Nielsen, J., (2003) Branching is coordinated with mitosis in growing hyphae of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 40 (1), 15-24.
- Elisashvili, V., Penninckx, M., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N. *et al.*, (2008) *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresource Technology*, 99 (3): 457–462.
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., Metreveli, E., (2009). Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot Basidiomycetes isolated from the

- forests of Georgia. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 25 (2), 331–339.
- Evans, S. C., Dutton, V. M., Guillén, F., Veness, G. R., (1994) Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. *FEMS Microbiology Reviews*, 13 (2-3): 235-239.
- Figueroa-Montero, A., Esparza-Isunza, T., Saucedo-Castañeda, G., Huerta-Ochoa, H., Gutiérrez-Rojas, M., Favela-Torres, E., (2011) Improvement of heat removal in solid-state fermentation tray bioreactors by forced air convection. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 86 (10): 1321-1331.
- Gardes, M., Bruns, T. D., (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes -application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2 (12):13-118.
- Gao, J., Weng, H., Zhu, H., Yuan, M., Guan, F., Xi, Y., (2008). Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. *Bioresource Technology*, 99 (16): 7623-7629.
- Ghori, I. M., Ahmed, S., Malana, M. A., Jamil, A., (2011) Corn stover-enhanced cellulase production by *Aspergillus niger* NRRL 567 *African Journal of Biotechnology*, 10 (31): 5878-5886.
- Gladfelter, A. S., (2006) Control of filamentous fungal cell shape by septins and formins. *Nature Reviews Microbiology*, 4: 223-229.
- Goodell, B., Qian, Y., Jellison, J., (2008) Fungal Decay of Wood: Soft Rot-Brown Rot-White Rot. In *Development of Commercial Wood Preservatives*, Edited by Schultz, T. P, Militz, H., *et al.*, *CS Symposium Series*, American Chemical Society, Chapter 2, Vol. 982, pp. 9-31.
- Gordon, C. L., Archer, D. B., Jeenes, D. J., Doonan, J. H., Wells, B., Trinci, A. P. J., Robson, G. D., (2000) A glucoamylase::GFP gene fusion to study protein secretion by individual hyphae of *Aspergillus niger*. *Journal of Microbiological Methods*, 42 (1): 39-48.
- Grinberg, A., Heath, I. B., (1997) Direct evidence for Ca²⁺ regulation of hyphal branch induction. *Fungal Genetic and Biology*, 22: 127-139.

- Hakala, T. K., Lundell, T., Galkin, S., Maijala, P., Kalkkinen, N., Hatakka, A., (2005) Manganese peroxidases, laccases and oxalic acid from the selective white-rot fungus *Physisporinus rivulosus* grown on spruce wood chips. *Enzyme and Microbial Technology* 36 (2): 461-468.
- Hanahan, D., (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166 (4): 557-580.
- Harris, S. D., (2008) Branching of fungal hyphae: regulation, mechanisms and comparison with other branching Systems. *Mycologia*, 100 (6): 823-832.
- Henry, H., Iwen, C. P., Hinrichs, H. S., (2000) Identification of *Aspergillus* Species Using Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2. *Journal Clinical Microbiology*, 38 (4): 1510-1515.
- Hood, M. E., Shew, H. D., (1997) The influence of nutrients on development, resting hyphae and aleurospore induction of *Thielaviopsis basicola*. *Mycologia*, 89 (5): 793-800.
- Hölker, U., Höfer, M., Lenz, J., (2004) Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64: 175-186.
- Holmes, D. S. and Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry*, 114 (1):193-197.
- Hu, J., Duvnjak, Z., (2004) Production of a laccase and decrease of the phenolic content in canola meal during the growth of the fungus *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation. *Processes Engineering in Life Sciences* 4 (1): 50-55.
- Ikasari, L., Mitchell, D.A., Stuart, D.M., (1999) Response of *Rhizopus oligosporus* to temporal temperature profiles in a model solid-state fermentation system. *Biotechnology and Bioengineering*, 64 (6): 722-728.
- Iwashita, K., (2002) Recent Studies of protein secretion by filamentous fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94 (6): 530-535.
- Jecu, L., (2000) Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. *Industrial crops and Products* 11: 1-5.

- Jiang, Z. Q., Yang, S. Q., Yan, L. T., Li., Tann S. S., (2005) Optimizing xylanase production by a newly isolated strain CAU44 of thermophile *Thermomyces lanuginosus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21: 863-867.
- Jing, D., Li, P., Stagnitti, F., Xiong, X., (2007) Optimization of laccase production from *Trametes versicolor* by solid fermentation. *Canadian Journal of Microbiology* 53 (2): 245-251.
- Kachlishvili E., Penninckx J. M., Tsiklauri, N., and Elissashvili, V., (2005) Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white rot basidiomycetes under solid state cultivation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22 (4): 391-397.
- Katz, D., Goldstein, D., Rosenberger, R. F., (1972) Model for branch initiation in *Aspergillus nidulans* based on measurements of growth parameters. *Journal of Bacteriology*, 109: 1097-1100.
- Khun, H. J., Cometta, S., Fiechter, A., 1980. Effects of growth temperature on maximal specific growth rate, yield, maintenance, and death rate in glucose-limited continuous culture of the thermophilic *Bacillus caldotenax*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 10, 303–315.
- Krishna, C., (1999) Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes. *Bioresource Technology*, 69 (3): 231-239.
- Krishna, C., (2005) Solid-state fermentation systems-an overview. *Critical Reviews of Biotechnology*, 25 (1-2): 1-30.
- Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lahjouji, K., Storms, R., Xiao, Z., Joung, B. K., *et al.*, (2007) Biochemical and molecular characterization of a cellobiohydrolase from *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75 (2): 337-346.
- Landolo, D., Piscitelli, A., Sannia, G., Faraco, V., (2001) Enzyme production by solid substrate fermentation of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on tomato pomace. *Applied Biochemistry And Biotechnology*, 163 (1): 40-51.
- Larralde-Corona, C. P., López-Isunza, F., Viniegra-González, G., (1997). Morphometric evaluation of the specific growth rate of *Aspergillus niger*

- grown in agar plates at high glucose levels. *Biotechnology and Bioengineering*, 56 (3): 287-294.
- Lee, K. J., Kim, Y., Sunitha, K. and Kwang, T., (1998) Expression of thermostable alkaline protease gene from *Thermoactinomyces* sp. E79 in *E. coli* and heat activation of the gene product. *Biotechnology Letters*. 20 (9): 837-84.
- Lenartovicz, V., De Souza, M. G., Moreira, G. F., Peralta, M. R., (2002) Temperature effect in the production of multiple xylanases by *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Basic Microbiology*, 42 (6): 388-395.
- Levin, L., Herrmann, C., Papinutti, V. L., (2008). Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the whiterot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology. *Biochemical and Engineering Journal*, 39 (1): 207-214.
- Li, Q., McNeil, B., Linda M. H., (2008) The effects of bioprocess parameters on extracellular proteases in a recombinant *Aspergillus niger* B1-D. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78 (2):333-341.
- López, M., Loera, O., Guerrero-Olazarán, M., Viader-Salvadó, J. M. *et al.*, (2010). Cell growth and *Trametes versicolor* laccase production in transformed *Pichia pastoris* cultured by solid-state or submerged fermentations. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85, 435–440.
- Lu, W., Li, D., Wu, Y., (2003) Influence of water activity and temperature on xylanase biosynthesis in pilot-scale solid-state fermentation by *Aspergillus sulphureus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 32 (2): 305-311.
- Lu, X., Ding, S., (2010) Effect of Cu²⁺, Mn²⁺ and aromatic compounds on the production of laccase isoforms by *Coprinus comatus*. *Mycoscience*, 51 (1): 68-74.
- Maciel, M. J. M., Silva, A. C., Ribeiro, H. C. T., (2010) Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13 (6): doi: 10.2225.
- Maheshwari, R., Bharadwaj, G., Bhat, K. M., (2000) Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (3): 461-488.

- Marqu ez O. A. E., (2004) Determinación de patrones de inducción de lacasas en el hongo *Trametes sp.* EUM1. Tesis de Especialización en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F.
- Marqu ez O. A. E., (2006) Estudios para la producción de una lacasa termoestable por el hongo *Trametes sp.* EUM1. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F.
- Márquez-Araque, A. T., Mendoza-Martínez G. D., González-Muñoz, S. S., Buntinx, S. E. and Loera, O. (2007) Fibrolytic activity of enzymes produced by *Trametes sp.* EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 and *Aspergillus niger* AD96.4 in solid fermentation. *Interciencia*, 32 (11): 1-6.
- Márquez-Rocha, F., Guillén, G. K., Sánchez, J. E., Vázquez-Duhalt, R., (1999) Growth characteristics of *Pleurotus ostreatus* in bioreactors. *Biotechnology Techniques*, 13 (1): 29-32.
- Martínez, T. A., Speranza, M., Ruiz-Due nas, J. F., Ferreira, P., *et al.*, (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*, 8 (3): 195-204.
- Mazutti, M., Ceni, G., Di Luccio, M., Treichel, H., (2007) Production of inulinase by solid-state fermentation: effect of process parameters on production and preliminary characterization of enzyme preparations. *Bioprocess of Biosystems Engineering*, 30: 297–304.
- McIntyre, M., McNeil, B., (1997) Dissolved carbon dioxide effects on morphology, growth, and citrate production in *Aspergillus niger* A60. *Enzyme Microb. Technol.*, 20, 135-142.
- Medina R.E. (2003) Caracterización de lacasas producidas por un hongo termof lico silvestre aislado a partir de desechos lignocelul sicos. Tesis de Maestr a. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F.
- Membrillo, I., Sánchez, C., Meneses, M., Favela, E., Loera, O., (2008) Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. *Bioresource Technology*, 99 (16): 7842-7847.

- Membrillo, I., Sánchez, C., Meneses, M., Favela, E., Loera, O., (2011) Particle geometry affects differentially substrate composition and enzyme profiles by *Pleurotus ostreatus* growing on sugar cane bagasse. *Bioresource Technology* 102: 1581-1586.
- Milagres, M. F., Sales, M. R., (2001) Evaluating the basidiomycetes *Poria medularpanis* and *Wolfiporia cocos* for xylanase production. *Enzyme and Microbial Technology* 28 (6): 522-526.
- Miller, G. L., Blum, R., Glannon, W. E., Burton, A.L., (1960) Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Analytical Biochemistry* 2: 127-132.
- Mitchell, A. D., Tongta, A., Stuart, M. D., Krieger, K., (2002) The potential for establishment of axial temperature profiles during solid-state fermentation in rotating drum bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 80 (1): 114-122.
- Mendicuti, C. P, Trejo-Aguilar B. A, Osorio, G. A., (1997) Thermostable xylanases produced at 37 degrees C and 45 degrees C by a thermotolerant *Aspergillus strain*. *FEMS Microbiology Letters*, 146 (1): 97-102.
- Montiel-González, A. M., Viniegra-González, G., Fernández, F.J., Loera, O., (2004) Effect of water activity on invertase production by improved diploids strains of *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry* 39 (12): 2085-2090.
- Mullis, K. B., Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*. 155: 335-350.
- Muniswaran, P. K. A, Charyulu, N. C. L. N., (1994) Solid substrate fermentation of coconut coir pith for cellulase production. *Enzyme and microbial technology* 16 (5): 436-440.
- Nagel, F. J., Tramper, J., Bakker, M. S., Rinzema, A., (2001) Temperature control in a continuously mixed bioreactor for solid-state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 72 (2): 219-230.
- Neifar, M., Jaouani, A., Ellouze-Ghorbel, R., Ellouze- Chaabouni, S., (2010) Purification, characterization and decolourization ability of *Fomes*

- fomentarius* laccase produced in solid medium. Journal Molecular Catalysis B-Enzymatic, 64: 68-74.
- Nielsen, J., Krabben, P., (1995) Hyphal growth and fragmentation of *Penicillium chrysogenum* in submerged cultures. Biotechnology and Bioengineering 46 (6): 588-598.
- Nordström, K.M., Laakso, S.V., (1992) Effect of growth temperature on fatty acid composition. Applied and Environmental Microbiology, 58: 1656-1660.
- Oda, K., Kakizono, D., Yamada, O., Lefuji, H., Akita, O., Iwashita, K., (2006) Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. Applied and Environmental Microbiology, 72 (5): 3448-3457.
- Ohga, S., Royse, J. D., (2001) Transcriptional regulation of laccase and cellulase genes during growth and fruiting of *Lentinula edodes* on supplemented sawdust. FEMS Microbiology Letters, 201 (1): 111-115.
- Olsson, S., (1994) Uptake of glucose and phosphorus by growing colonies of *Fusarium oxysporum* as quantified by image analysis. Experimental Mycology, 18 (1): 33-47.
- Oostra, J., le Comte, E. P., van den Heuvel, J. C., Tramper, J., Rinzema, A., (2001) Intra-particle oxygen diffusion limitation in solid-state fermentation. Biotechnology and Bioengineering, 75 (1): 13-24.
- Oriol, E., Raimbault, M., Rousous, S., Viniegra-Gonzalez, G., (1988). Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. Applied Microbiology and Biotechnology 27 (5-6): 498-503.
- Osma F. J., Moilanen, U., Toca-Herrera., L. J., Rodríguez-Couto, S., (2011) Morphology and laccase production of white-rot fungi grown on wheat bran flakes under semi-solid-state fermentation conditions. FEMS Microbiology Letters, 318 (1): 27–34.
- Panagiotou, G., Kekos, D., Macris, B.J., Christakopoulos, P., (2003) Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. Industrial Crops and Products, 18 (1): 37-45.

- Papinutti, V. L., Forchiassin, F., (2003). Optimization of manganese peroxidase and laccase production in the South American fungus *Fomes sclerodermeus* (Lév.) Cke. *Journal Industrial of Microbiology and Biotechnology*, 30: 536-541.
- Papinutti, V. L., Mouso, N., Forchiassin, F., (2006) Removal and degradation of the fungicide dye malachite green from aqueous solution using the system wheat bran-*Fomes sclerodermeus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 848–853.
- Papinutti, V. L., Forchiassin, F., (2007) Lignocellulolytic enzymes from *Fomes sclerodermeus* growing in solid-state fermentation. *Journal of Food Engineering*, 81, 54–59.
- Palmeri, G., Giardina, P., Blanco, C., Fontanela, B., Sannia, G., (2000) Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied Environmental and Microbiology*, 30: 920-924.
- Packer, H. L., Thomas, C. R., (1990). Morphological measurement on filamentous microorganisms by fully automatic image analysis. *Biotechnolgy and Bioengineering*, 35: 870-881.
- Patrick, F., Mtui, G., Mshandete M. A., Kivaisi, A., (2011) Optimization of laccase and manganese peroxidase production in submerged culture of *Pleurotus sajorcaju*. *African Journal of Biotechnology* 10 (50): 10166-10177.
- Paul, G. C., Thomas, C. R., (1998). Characterisation of mycelial morphology using image analysis. *Advances of Biochemical and Engineering Biotechnology*, 60: 1-60.
- Peberdy, J. F., (1994) Protein secretion in filamentous fungi - trying to understand a highly productive black box. *Trends in Biotechnology*, 12 (2): 50-57.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., Rubia, T., Martínez, J., (2002) Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: overview *International Microbiology*, 5 (2): 53-63.
- Peterson, R., Nevalainen, H., (2012) *Trichoderma reesei* RUT-C30-thirty years of strain improvement. *Microbiology*, 158 (1): 58-68.

- Piscitelli, A., Giardina, P., Lettera, V., Pezzella, C., Sannia, G., Faraco, V., (2011) Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. *Current Genomics*, 12 (2): 104-112.
- Phisalaphong, M., Srirattana, N., Tanthapanichakoon, W., (2006) Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 28 (1): 36-43.
- Pointing, S. B., Jones, E. B. G., Vrijmoed, L. L. P., (2000) Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture. *Mycologia*, 92 (1): 139–144.
- Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., Amorim, D. S., (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67(5): 577-591.
- Ponpium, P., Ratanakhanokchai, K., Kyu, L., (2000) Isolation and properties of a cellulosome-type multienzyme complex of the thermophilic *Bacteroides* sp. strain P-1. *Enzyme and Microbial Technology* 26 (4): 459–465.
- Prosser, J. I., Tough, A. J., (1991) Growth Mechanisms and Growth Kinetics of Filamentous Microorganisms. *Critical Reviews in Biotechnology*, 10 (4): 253-274.
- Rahardjo, Y. S., Sie, S., Weber, F. J., Tramper, J., Rinzema, A., 2003. Effect of low oxygen concentrations on growth and alpha-amylase production of *Aspergillus oryzae* in model solid-state fermentation systems. *Biomolecular Engineering*, 21, 163–72.
- Rahardjo, Y.S., Weber, F.J., le Comte, P. E., Tramper, J., Rinzema, A., (2002) Contribution of aerial hyphae of *Aspergillus oryzae* to respiration in a model solid-state fermentation system *Biotechnology and Bioengineering*, 78 (5): 539-544.
- Rahardjo, Y. S., Sie, S., Weber, F. J., Tramper, J., Rinzema, A., (2005) Effect of low oxygen concentrations on growth and alpha-amylase production of *Aspergillus oryzae* in model solid-state fermentation systems. *Biomolecular Engineering*, 21 (6):163-72.

- Raimbault, M., (1998) General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3): 717-3458.
- Rajoka, I. M., Akhtar, W. M., Hanif, A., Khalid, A. M., (2006) Production and characterization of a highly active cellobiase from *Aspergillus niger* grown in solid state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22 (9): 991-998.
- Rajoka I. M., (2006) Kinetic parameters and thermodynamic values of β -xylosidase production by *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technology*, 98 (11): 2212-2219.
- Ramesh, C. K., Gupta, R., Singh, A., (2011) Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Research*: doi:10.4061/2011/280696
- Rao, B. M., Tanksale, M. A., Ghatge, S. A., Deshpande, V. V., (1998) Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (3): 597-635.
- Read, N, D., 2(2011) Exocytosis and growth do not occur only at hyphal tips. *Molecular Microbiology*, 81 (1); 4-7.
- Riquelme M., Reynaga-Peña, C. G., Gierz, G., Bartnicki-García, S., (1998) What determines growth direction in fungal hyphae?. *Fungal Genetics and Biology*, 24 (1-2): 101-109.
- Riquelme M, Bartnicki-Garcia S., (2004) Key differences between lateral and apical branching in hyphae of *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 41 (9): 842-51.
- Robles, J. and Doers, M. (1994) pGEM®-T Vector Systems troubleshooting guide. *Promega Notes* 45, 19–20.
- Rodríguez-Couto, S., Moldes, D., Liébanas, A., Sanromán, A., (2003) Investigation of several bioreactor configurations for laccase production by *Trametes versicolor* operating in solid-state conditions. *Biochemical Enginnering Journal*, 15 (1): 21-26.
- Rodríguez-Couto, S., Moldes, D., Liébanas A. Sanroman, A., (2005). Application of solid state fermentation to lignolytic enzymes production. *Biochemical Enginnering Journal*, 22 (3): 211-219.

- Rosales, E., Rodríguez, C. S., Saromán, A., (2002) New uses of food waste: application to laccase production by *Trametes hirsutia*. *Biotechnology Letters*, 24: 7001-7004.
- Ryberg, M., Kristiansson, E., Sjökvist, E., Nilsson, H. R., (2009) An outlook on the fungal internal transcribed spacer sequences in GenBank and the introduction of a web-based tool for the exploration of fungal diversity. *New Phytologist*, 181: 471-477.
- Saiki, R. K., Scharf, S. J., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N., (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230 (4732): 1350-1354.
- Sanchez, Y., Lindquist, S.L., (1990) HSP104 required for induced thermotolerance. *Science*, 248: 1112-1115.
- Sánchez, S., Bravo, V., Moya, A.J., Castro, E., Camacho, F., (2004) Influence of temperature on the fermentation of D-xylose by *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol and xylitol. *Process Biochemistry*, 39: 673–679.
- Sarnthima, K., Khammuang, S., Svasti, J., (2009) Extracellular ligninolytic enzymes by *Lentinus polychrous* Lév. under solid-state fermentation of potential agro-industrial wastes and their effectiveness in decolorization of synthetic dyes *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14 (4): 513-522.
- Saucedo-Castañeda, G., Gutiérrez-Rojas, M., Bacquet, G., Raimbault, M., Viniegra-González, V., (1990) Heat Transfer Simulation in Solid Substrate Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 35: 802-808.
- Seiler, S., Plamann, M., (2003) The genetic basis of cellular morphogenesis in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Molecular Biology of the Cell*, 14: 4352-4364.
- Semighini, C. P., Harris, S. D., (2008) Regulation of apical dominance in *Aspergillus nidulans* hyphae by reactive oxygen species. *Genetics* 179:1919-1932.
- Schlosser D., Grey R., Fritsche W., 1997. Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra-and intracellular enzyme activities

- during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47 (4): 412-418.
- Shah, R. A., Madamwar, D., (2005) Xylanase production under solid-state fermentation and its characterization by an isolated strain of *Aspergillus foetidus* in India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21 (3): 233-243.
- Shah, A. F., Aziz, S., Memon, R. S., Rajoka, I.M., (2010) Ethanol production kinetics by a thermo-tolerant mutant of *Saccharomyces Cerevisiae* from starch industry waste (Hydrol). *Pakistan Journal of Analytical and Environmental Chemistry*, 11(1): 16-21.
- Sherief, A. A., Tanash E. L., Temraz. A. M., (2010) Lignocelulolytic enzymes and substrate utilization during growth and fruiting of *Pleurotus ostreatus* on some solid wastes. *Journal of Environmental Science and Technology*, 3(1): 18-34.
- Shojaosadati, S. A., Hamidi-Esfahani., Z., Hejazi, P., Vasheghani-Farahani, E., Rinzema, A., (2007) Evaluation of strategies for temperature and moisture control in solid state packed bed bioreactors. *Iranian Journal of Biotechnology*, 5 (4): doi 92820070402.
- Sietsma, J., Wessels, J., (1994) Apical wall biogenesis, In *The Mycota I*, Edited by Wessels, J., Meinhardt, F., Springer-Verlag, Berlin, Germany. p. 126-141.
- Smits, P. J., Rinzema, A., Tramper, J., Van-Sonsbeek, H. M., Knol, W., (1996) Solid-state fermentation of wheat bran by *Trichoderma reesei* QM9414: substrate composition changes, C- balance, enzyme production, growth and kinetics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46 (5-6): 489-496.
- Smits, P. J., Rinzema, A., Tramper, J., Van-Sonsbeek, H. M., Knol, W., (1998) The influence of temperature on kinetics in solid-state fermentation. *Enzyme Microbial Technology*, 22 (1): 50–57.
- Snajdr, J., Baldrian, P., (2007) Temperature affects the production, activity and stability of ligninolytic enzymes in *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor*. *Folia Microbiologica*, 52 (5): 498-502.

- Spohr, A., Carlsen, M., Nielsen, J., Villadsen, J., (1997) Morphological characterization of recombinant strains of *Aspergillus oryzae* producing alpha-amylase during batch cultivations. *Biotechnology Letters*, 19 (3): 257-262.
- Staszczak, M., Nowak, G., Grzywnowicz, K., Leonowicz, A., (2008) Proteolytic activities in cultures of selected white-rot fungi *Journal of Basic Microbiology*, 36 (3): 193-203.
- Steele, G. C., Trinci, A. P. J., (1975) The extension zone of mycelial hyphae. *New Phytologist* 75 (3): 583-587.
- Steinberg, G., (2007) Hyphal Growth: a Tale of Motors, Lipids, and the Spitzenkörper. *Eukaryotic Cell*, 6 (3): 351-360.
- Sun X., Zhang R., Zhang Y., (2004). Production of lignocellulolytic enzymes by *Trametes gallica* and detection of polysaccharide hydrolase and laccase activities in polyacrylamide gels. *Journal of Basic Microbiology* 44 (3): 220-31.
- Tao, S., Beihui, L., Deming, L., Zuohu, L., (1997) Effect of elevated temperature on *Trichoderma viride* SL-1 in solid state fermentations. *Biotechnology Letters* 19: 171-174.
- Téllez-Jurado, A., Arana-Cuenca, A., González Becerra, A. E, Viniegra-González, G., Loera, O., (2006) Expression of a heterologous laccase by *Aspergillus niger* cultured by solid-state and submerged fermentations. *Enzyme and Microbial Technology* 38 (5): 665-669
- Tellez-Tellez, M, Fernandez F. J, Montiel-Gonzalez A. M, *et al.* (2008) Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(4): 675-679.
- Tereshina, V. M., (2005) Thermotolerance in fungi: The role of heat shock proteins and trehalose. *Microbiology*, 74: 247-257.
- Teunisseng, M. J., Kort, V. M. G, Huub, J. M., Op De Camp, J. M., Huisin, H. J., (1992) Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes during growth of the anaerobic fungus *Piromyces* sp. on different substrates. *Journal of General Microbiology*, 138:1657-1664.

- Tlecuitl-Beristain, S., Sánchez, C., Loera, O., Robson, G. D., Díaz-Godínez, (2008) Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: production of a novel laccase isoform. *Mycological Research*, 112 (9): 1080-1084.
- Trinci, A. P. J., (1971) Influence of the width of the peripheral growth zone on the radial growth rate of fungal colonies on solid media. *Microbiology*, 67 (3): 325-344.
- Trinci, A. P. J., (1974) A study of the kinetics of hyphal extension and branch initiation of fungal mycelia. *Journal Genetics and Microbiology*, 81: 225-236.
- Trinci, A. P. J., (1978) The duplication cycle and vegetative development in moulds. In *The Filamentous Fungi III*, Edited by Smith, J. E., Berry, D. R., New York, John Wiley and Sons, pp. 132–163.
- Uchida, M., Mouriño-Pérez, R. R., Freitag, F., Bartnicki-García, S., Roberson, R. W., (2008) Microtubule dynamics and the role of molecular motors in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 45 (5): 683-692.
- Valášková, V., Baldrian, P., (2006) Degradation of cellulose and hemicelluloses by the brown rot fungus *Piptoporus betulinus*—production of extracellular enzymes and characterization of the major cellulases. *Microbiology*, 152 (12): 3613-3622.
- Varzakas, T., (1998) *Rhizopus oligosporus* mycelial penetration and enzyme diffusion in soya bean tempe. *Process Biochemistry*, 33: 741-747.
- Vikineswary, S., Abdullah, N., Renuvathani, M., Sekaran M., Pandey A., Jones E. B., (2006) Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by *Pycnoporus sanguineus*. *Bioresource Technology* 97(1):171-177.
- Villalba, L. L., Fonseca, I. M., Giorgio, M., Zapata, D. P., (2010) White rot fungi laccases for biotechnological applications. *Recent patents on DNA gene sequences*, 4 (2): 106-112.
- Viniegra-González¹, G., Saucedo-Castañeda, G., López-Isunza, F., Favela-Torres, E., (1993). Symmetric branching model for the kinetics of mycelial growth. *Biotechnology and Bioengineering*, 42 (1): 1-10.

- Wan, C., Li, Y., (2010) Microbial delignification of corn stover by *Ceriporiopsis subvermispora* for improving cellulose digestibility. *Enzyme and Microbial Technology*, 47 (1-5): 31-36.
- Weber, F. J, Oostra, J, Tramper, J, Rinzema, A., (2002). Validation of a model for process development and scale-up of packed bed solid state bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering* 77 (4): 381-393.
- Wedlich, S. R., Altschuler, S., Wu, L., Li, R., (2003) Spontaneous cell polarization through actomyosin-based delivery of the Cdc42, GTPase. *Science* 299: 1231-1235.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I., Agathos, S., (2003) White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*, 22 (1-5):161-187.
- Westfall, P. J., Momany, M., (2002) *Aspergillus nidulans* septin AspB plays pre- and postmitotic roles in septum, branch, and conidiophore development. *Molecular Biology of the Cell*, 13: 110-118.
- Wösten, H. A. B., Moukha, S. M., Sietsma, J. H., Wessels, J, G. H., (1991) Localization of growth and secretion of proteins in *Aspergillus niger*. *Microbiology*, 137 (8): 2017-2023.
- Zhu, S. Y., Zhang, H., Zhang, I. Y., Huang, F., (2011) Lignocellulose degradation, enzyme production and protein enrichment by *Trametes versicolor* during solid-state fermentation of corn stover. *African Journal of Biotechnology*, 10 (45): 9182-9192.

11 ANEXOS

AI Características de los extractos enzimáticos obtenidos durante el crecimiento de *Fomes* sp. EUM1 sobre rastrojo de maíz a diferentes temperaturas

Tabla 7. Actividad enzimática final en extractos concentrados con sulfato de amonio

T (°C)	Celulasas ¹		Xilanasas		Lacasas	
	AEF (UI/mg)	AVF (UI/mL)	AEF (UI/mg)	AVF (UI/mL)	AEF (UI/mg)	AVF (UI/mL)
30	1.2	1.2	1.6	1.5	0.3	0.3
40	2.2	1.6	2.1	1.5	1.6	1.1
45	0.8	0.8	0.8	0.8	0.36	0.36

¹ La actividad enzimática se determinó cuantificando los azúcares reductores por el reactivo DNS como lo describe Miller, (1980). ² La actividad enzimática se detectó cuantificando la oxidación de ABTS como lo describe Bourbonais *et al.* (1998).

Notación: T, Temperatura; AEF, actividad específica y AVF, actividad volumétrica final.

AII Resultados de la secuenciación de ADNr

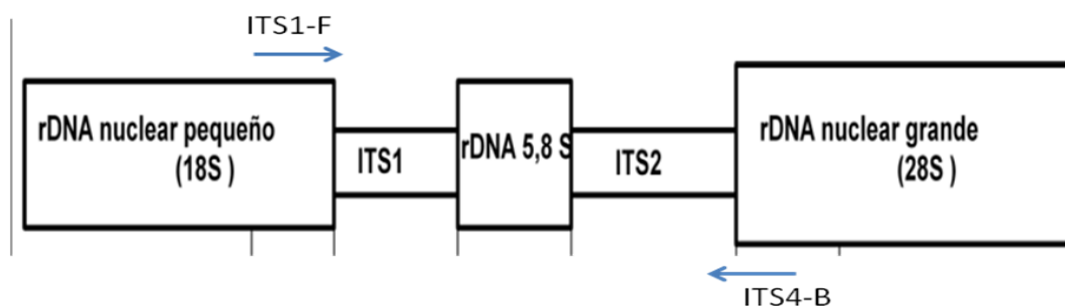


Fig. 1 Región del ADN ribosómico (ADNr) amplificada para identificar molecularmente a los hongos. Se muestran el par de *primers* empleados para amplificar ADr de hongos de pudrición blanca.

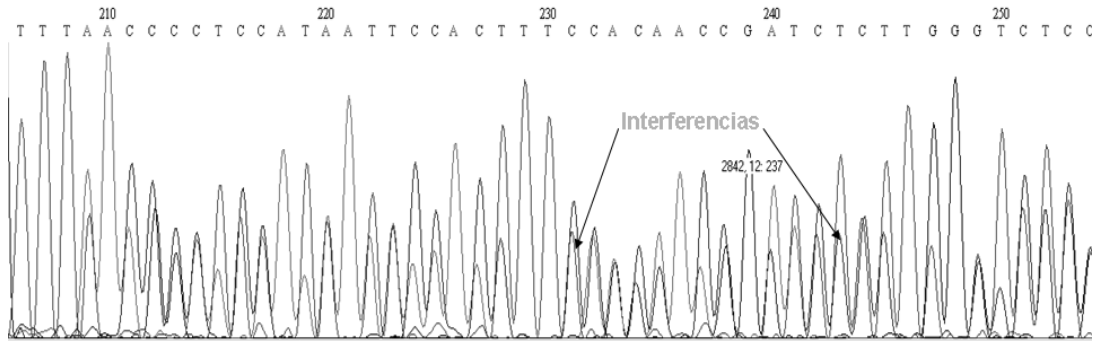


Fig. 2 Electroferograma obtenido después de la secuenciación del ADNr purificado

Tabla 2 Microorganismos relacionados al comparar las secuencia de nucleótidos del ADNr 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S. Los primeros tres microorganismos son el resultado de comparar la secuencia Forward y los siguientes con la secuencia Reverse

Cepa	Alineación	Valor-E	Identidad
<i>Ganoderma applanatum</i>	71%	3e-172	93%
<i>Ganoderma philippii</i>	71%	3e-172	93%
<i>Ganoderma</i> sp. E7108	71%	3e-172	93%
<i>Fomes fasciatus</i>	77%	2e-139	88%
<i>Fomes fomentarius</i> FF-TdQ-br	73%	6e-139	87%
<i>Fomes fomentarius</i> FF-TdQ-gr	73%	2e-139	86%

