

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

Efecto del estrés térmico en la producción de lacasas en *Fomes* sp. EUM1

TESIS

para obtener el grado de

Maestro en Biotecnología

PRESENTA

Francisco Javier Martínez Valdez

Director

Octavio Loera Corral

México D.F. agosto de 2011

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465

México D.F. a 2 de Agosto del 2011

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

**Efectos del estrés térmico en la producción de lacasas en
Fomes sp. EUM1**

que presentó

Francisco Javier Martínez Valdez

Comité Tutorial:

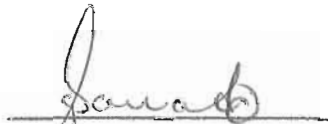
Director: Octavio Loera Corral

Asesor: Francisco José Fernández Perrino

Asesor: Gerardo Díaz Godínez.

Jurado:

Presidente: Dr. Gerardo Saucedo Castañeda



Secretario: Dr. Francisco José Fernández Perrino



Vocal: Dra. Florina Ramírez Vives



Vocal: Dr. Gerardo Díaz Godínez



RESUMEN.

El hongo termotolerante *Fomes* sp. EUM1 es capaz de crecer sobre rastrojo de maíz como única fuente de nutrientes. En este trabajo se determinó el efecto del estrés térmico en la producción y productividad de lacasas en cultivo superficial usando rastrojo de maíz (25 g/L) con un tamaño de partícula menor a 2 mm , así como la termoestabilidad de las enzimas producidas bajo estas condiciones.

Se inició propagando el hongo *Fomes* sp. EUM1 en un medio de cultivo con agar extracto de malta. Para preservar la cepa por tiempo prolongado, la conservación se realizó durante 8 meses sobre tiras de papel de filtro almacenadas en viales que contenían agua destilada. Se observó una disminución en la producción de lacasas y la velocidad de crecimiento radial del hongo en función del tiempo de conservación, sin apreciarse diferencias en su morfología.

Para obtener la mejor producción de lacasas se utilizaron 3 medios de cultivo: extracto de malta (40 g/L), infusión de rastrojo de maíz (25 g/L) con extracto de malta (40 g/L) y rastrojo de maíz (25 g/L) con partícula menor a 2 mm. Después de 6 días, la máxima producción de lacasas (16 UI/gssi), donde gssi es gramo de sustrato seco inicial, se registró en el medio con rastrojo de maíz. Una vez seleccionado este medio, las cinéticas de producción se realizaron inoculando el hongo en forma de césped en las cajas de Petri durante 12 días. La incubación se hizo a 35 °C los primeros 6 días, posteriormente la mitad de estas cajas se cambiaron a 45 °C durante otros 6 días, aumentando así el estrés térmico en *Fomes* sp. EUM1 sin reducir la producción de biomasa al inicio del cultivo (en un estudio previo se había determinado que la temperatura óptima de crecimiento del hongo es de 30 °C).

El cambio de temperatura incrementó en un 20% la productividad de lacasas, lo que podría deberse a cambios en la membrana citoplasmática provocados por la temperatura que hacen que se libere una mayor cantidad de lacasas. Por otra parte, la presencia de proteasas (que se ha descrito asociada como respuesta al estrés térmico) se midió en los extractos producidos a 35 y 45 °C, observándose que a la temperatura de 35 °C aumentó progresivamente hasta alcanzar valores de 5 UI/gssi, mientras que a 45 °C disminuyó la producción de proteasas de 4 UI/gssi a 2.5 UI/gssi a partir del cambio de la temperatura.

Este fenómeno no se había descrito anteriormente y posiblemente se deba a que el hongo *Fomes* sp. EUM1 deja de producirlas o a una desnaturalización de las proteasas en esas condiciones.

Para observar la posible producción de isoenzimas de lacasas debida al estrés térmico se realizaron zimogramas, no detectándose isoenzimas nuevas bajo estas condiciones. Sin embargo, para comparar la termoestabilidad de las lacasas producidas en estas condiciones se realizaron pruebas de termoestabilidad a 40, 45, 50, 60 y 70 °C. Los resultados indican que las lacasas producidas bajo estas condiciones son moderadamente termoestables, debido a que en ambos extractos enzimáticos tienen una vida media de 12 horas, aproximadamente, a 50 °C.

Por último, se realizaron mediciones morfológicas (longitud hifal, diámetro hifal y velocidad de crecimiento radial) del hongo *Fomes* sp. EUM1 cultivado a 35 y 45 °C. Cuando el hongo se cultiva en condiciones de estrés térmico sufre cambios morfológicos.

ABSTRACT.

The thermotolerant fungus *Fomes* sp. EUM1 can grow on corn stover as a sole source of nutrients. In this study we determined the effect of heat stress on production and productivity of laccase in culture surface using corn stover (25 g / L) with a particle size of less than 2 mm, and the thermostability of the enzymes produced under these conditions.

It started spreading the fungus *Fomes* sp. EUM1 in a culture medium with malt extract agar. To preserve the strain for a long time, conservation was carried out for 8 months on strips of filter paper stored in vials containing distilled water. Decrease in the production of laccases and radial growth rate of the fungus depending on the shelf, showing no differences in morphology.

For the best production of laccases were used 3 culture media: malt extract (40 g / L) infusion of corn stover (25 g / L) with malt extract (40 g / L) and corn stover (25 g / L) with particles smaller than 2 mm. After 6 days, the maximum production of laccase (16 IU / gssi), which is gssi (gram of initial dry substrate) was recorded in the middle with corn stover. Once selected, this means the kinetics of production were made by inoculating the fungus on a lawn in Petri dishes for 12 days. Incubation was at 35 ° C the first 6 days, then half of these boxes were changed to 45 ° C for another 6 days, increasing the thermal stress on *Fomes* sp. EUM1 without reducing the production of biomass at the beginning of the crop (in a previous study had found that the optimum temperature for fungus growth is 30 ° C).

The change in temperature increased by 20% the productivity of laccases, which could be due to changes in the cytoplasmic membrane caused by temperature causing it to release more of laccases. Moreover, the presence of protease (which has been described in association in response to heat stress) was measured in the extracts produced 35 and 45 ° C, showing that a temperature of 35 ° C increased progressively to reach values of 5 IU / gssi, while at 45 ° C decreased the protease production of 4 IU / gssi to 2.5 IU/ gssi from the change in temperature. This phenomenon had not been described previously and may reflect the fungus *Fomes* sp. EUM1 longer produce or denaturation of proteases in these conditions.

To observe the possible production of laccase isoenzymes due to heat stress zymograms were performed, no new isoenzymes were detected under these conditions. However, to compare the thermostability of the laccase produced in these conditions were tested for thermostability at 40, 45, 50, 60 and 70 ° C. The results indicate that laccase produced under these conditions are moderately heat stable, because in both enzymatic extracts have a shelf life of 12 hours at approximately 50 ° C.

Finally, morphological measurements were made (hyphal length, hyphal diameter and radial growth rate) of the fungus *Fomes* sp. EUM1 grown to 35 and 45 ° C. When the fungus is grown under heat stress undergoes morphological changes.

Contenido General

1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. Microorganismos productores de enzimas ligninolíticas.	12
1.2. Lacasas.	14
1.3. Aplicaciones de las lacasas.	15
1.4. Mecanismo de reacción de Lacasas.	16
1.5. Termoestabilidad de lacasas.	18
1.6. El género <i>Fomes</i>	20
1.7. Microorganismos termotolerantes.	22
2. ANTECEDENTES	24
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. HIPÓTESIS	29
5. OBJETIVO GENERAL	29
5.1. Objetivos Específicos.	29
MATERIALES Y MÉTODOS	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS	31
6.1. Microorganismo.	31
6.2. Conservación.	31
6.3. Medio de propagación.	32
6.4. Medio de cultivo.	33
6.5. Extracción de enzimas.	34
6.6. Determinación de proteína soluble.	35
6.7. Medición de pH.	35
6.8. Actividad enzimática de lacasas.	35
6.9. Determinación de proteasas.	36
6.10. Realización de zimogramas.	37

6.11. Determinación de la termoestabilidad.....	39
6.12. Parámetros morfológicos.....	40
7. RESULTADOS y DISCUSIÓN	42
7.1. Conservación del hongo <i>Fomes</i> sp. EUM1.....	42
7.2. Comparación de medios de cultivo.....	43
7.3. Medición de actividad enzimática de las lacasas en diferentes sustratos.....	44
7.4. Determinación de pH y proteína extracelular.....	45
7.5. Cinéticas enzimáticas de lacasas.....	47
7.6. Actividad específica.....	50
7.7. Determinación de proteasas.....	51
7.8. Zimogramas.....	53
7.9. Determinación de termoestabilidad.....	56
7.10. Parámetros morfológicos a 35 y 45 °C.....	60
8. CONCLUSIONES.....	63
9. REFERENCIAS.....	65
ANEXO I.....	72
• Curva patrón de albúmina sérica bovina (ASB).....	72
• Curva patrón de proteasas.....	73

Índice de tablas

Tabla 6.1. Preparación de geles.....	37
Tabla 7.1. Velocidad radial de <i>Fomes</i> sp. EUM1 conservado y mantenido mediante resiembra periódica.....	42
Tabla 7.2. Comparación de actividad de lacasas a los 6 días.....	44
Tabla 7.3 Parámetros de estabilidad.....	59

Índice de Figuras

Figura 1.1.1. Estructura de la lignina.....	12
Figura 1.2. Sitios activos en una lacasa (Loera y col., 2006).....	17
Figura 1.3. El ciclo redox de una lacasa catalizada mediante el sistema	18
Figura 1.4. Basidiocarpo de <i>Fomes fomentarius</i>	21
Figura 6.1. Oxidación de ABTS de <i>Fomes</i> sp. EUM1	31
Figura 6.2. Técnicas de conservación de <i>Fomes</i> sp. EUM1	32
Figura 6.3. Cultivo del inóculo para las cinéticas.	32
Figura 6.4. a) Disgregación de micelio inóculo para la cinética.....	34
Figura 6.5. Extracción de enzimas en hielo con agitación durante 45 min.	34
Figura 6.6. Cámara mini-Protean 2 (BioRad) a 100 V en hielo.	39
Figura 6.7. Incubación de los ECE	40
Figura 6.8. Microscopio óptico con cámara y analizador de imágenes.	41
Figura 6.9. Ramificación lateral de una hifa.....	41
Figura 7.1. Comparación de perfiles de producción enzimática utilizando ABTS (líneas continuas) y siringaldazina (líneas punteadas) como sustrato, de los cultivos incubados a 35 °C (color azul) y 45 °C (color rojo).	45
Figura 7.2. Medición de pH (líneas continuas) a 35 °C (color azul) y 45 °C (color rojo) y cuantificación de proteína soluble (líneas punteadas) a 35 °C (color azul) y 45 °C (color rojo). La flecha indica el día en que se inició el cambio de temperatura para una serie de cajas.	46
Figura 7.3. Perfiles de producción de lacasas sobre rastrojo de maíz a 35 °C (color azul) y a partir del día 6 a 45 °C (color rojo).	48
Figura 7.4. Perfiles de productividad de lacasas sobre rastrojo de maíz a 35 °C (color azul) y 45 °C (color rojo).	50
Figura 7.5. Perfiles de actividad específica de lacasas, para un cultivo mantenido a 35 °C y otro incubado a 45 °C a partir del día 6.	51
Figura 7.6. Medición de proteasas a 35 °C (color azul) y 45 °C (color rojo).....	52

Figura 7.7. Zimograma estandarizado para 15.4 UI/gssi de actividad lacasa; días 4, 6, 7 y 8 (los números que aparecen con asterisco se refieren a las muestras provenientes de la cinética realizada a 45 °C).	53
Figura 7.8. Zimograma estandarizado para 15.4 UI/gssi de actividad lacasa; días 10 y 12 (los números que aparecen con asterisco se refieren a las muestras provenientes de la cinética realizada a 45 °C).	54
Figura 7.9. Zimograma estandarizado para 7.13 mg/gssi de proteína soluble; días 4, 6, 7 y 8 (los números que aparecen con asterisco se refieren a las muestras provenientes de la cinética realizada a 45 °C).	55
Figura 7.10. Zimograma estandarizado para 7.13 mg/gssi de proteína soluble; días 10 y 12 (los números que aparecen con asterisco se refieren a las muestras provenientes de la cinética realizada a 45°C).	55
Figura 7.11. Perfiles de termoestabilidad a 45 °C para los ECE de 35 °C (color azul) y 45 °C (color rojo), presentando los datos experimentales (triángulos y rombos) y el modelo lineal ajustado (línea continua).	57
Figura 7.12. Perfiles de termoestabilidad a 50 °C para los ECE de 35 °C (color azul) y 45 °C (color rojo), presentando los datos experimentales (triángulos y rombos) y el modelo exponencial ajustado (línea continua).	58
Figura 7.13. Perfiles de termoestabilidad a 60 °C para los ECE de 35 °C (color azul) y 45 °C (color rojo), presentando los datos experimentales (triángulos y rombos) y el modelo exponencial ajustado (línea continua).	58
Figura 7.14. Velocidad de crecimiento radial obtenida a 35 y 45 °C.	60
Figura 7.15. Longitud promedio hifal distal obtenida a 35 °C (color azul) y 45 °C (color rojo).	61
Figura 7.16. Diámetro promedio hifal distal obtenido a 35 °C (color azul) y 45 °C (color rojo).	62
Figura 7.17. Cultivo superficial de Fomes sp. EUM1 en medio suplementado con rastrojo de maíz después de 6 días: a) 35 °C y b) 45 °C	63

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Microorganismos productores de enzimas ligninolíticas.

El término "lignina" se deriva de la palabra latina "lignum", que significa madera. Anselme Payen, en dos publicaciones en 1838, fue el primero en reconocer la composición de la madera y referirse a una sustancia rica en carbono integrada a la celulosa de la madera (McCarthy e Islam 2000). La lignocelulosa es el componente principal de plantas y del material vegetal descompuesto, y la biomasa más abundante en la Tierra (Tuomela y col., 2000). La lignina protege a la celulosa y estructuralmente es heterogénea (Fig. 1.1), con un arreglo irregular de polímeros de fenilpropano que resiste la degradación química o enzimática. Se ha pensado que la degradación de la lignina es un paso limitante en la velocidad del ciclo del carbono. La actividad metabólica microbiana en la degradación de la lignina y sus componentes parece ser uno de los orígenes plausibles para la vía de degradación de xenobióticos, compuestos aromáticos y/o contaminantes ambientales (entre los que se incluyen los hidrocarburos aromáticos policíclicos, fenoles clorados, bifenilos policlorados, dioxinas, pesticidas, colorantes, etc.). Por esta razón, tanto para la ciencia aplicada como para la conservación ambiental, es importante entender la naturaleza de la descomposición y biodegradación de lignocelulosa por los organismos responsables (Ohkuma y col., 2001).

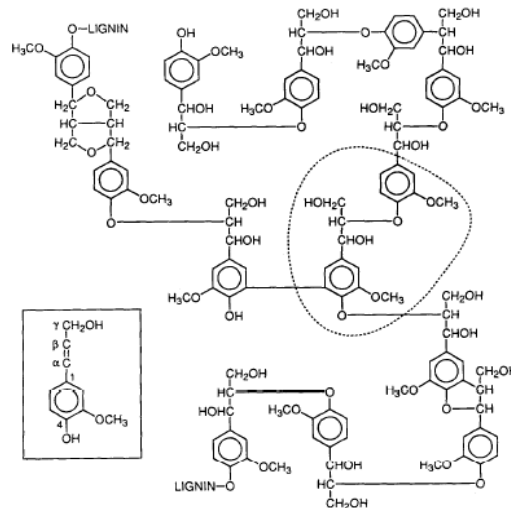


Figura 1.1.1. Estructura de la lignina

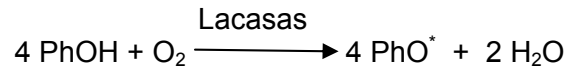
Los microorganismos capaces de producir las enzimas necesarias para la degradación de materiales lignocelulósicos son algunas bacterias y hongos. Los hongos que viven en la madera muerta y degradan preferentemente uno o más de los componentes causando tres tipos de pudrición: la pudrición blanda, la podredumbre parda y la pudrición blanca. La mayoría de los hongos de pudrición blanca son basidiomicetos, excepto *Ustilina vulgaris*, el cual es clasificado como ascomiceto (Kuhad y col., 1997).

Los hongos de pudrición blanca son los únicos con capacidad para degradar todos los componentes de la lignocelulosa, debido a su capacidad para sintetizar las enzimas hidrolíticas y oxidativas extracelulares pertinentes. Los basidiomicetos secretan una o más de las tres enzimas extracelulares esenciales para la degradación de la lignina: ligninas peroxidasas (EC 1.11.1.14), peroxidasas dependientes de manganeso (MnP) (EC 1.11.1.13) y lacasas (EC 1.10.3.2). Sin embargo, la capacidad que poseen las lacasas para actuar sobre una gran variedad de sustratos, junto con el hecho de que estas enzimas emplean oxígeno molecular como aceptor final de electrones (en lugar de peróxido de hidrógeno como lo hacen las peroxidasas ligninolíticas) las convierte en un interesante objeto de estudio con fines de aplicación en procesos industriales o de biorremediación (Camarero y col., 2005).

La división Basidiomycota contiene cerca de 30.000 especies descritas, que es el 37% de las especies de hongos verdaderos descritas hasta la fecha (Kirk y col., 2001). La mayor parte de los basidiomicetos, son hongos que producen estructuras reproductivas, se encuentran en prácticamente todos los ecosistemas terrestres, así como de agua dulce y hábitats marinos (Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1979; Hibbett y Binder, 2002).

1.2. Lacasas.

Las lacasas (*p*-difenol; oxígeno oxidorreductasa EC. 1.10.3.2) pertenecen a las oxidasas que contienen cobre, las cuales catalizan la reducción de moléculas de oxígeno a agua (Morozova y col., 2007):



Las lacasas se obtuvieron por primera vez del árbol de la laca, *Toxicodendron verniciflua* en Japón. Posteriormente se encontraron en otras plantas, varios insectos y en diferentes tipos de hongos, incluyendo levaduras, setas y hongos de pudrición blanca. En particular, en los basidiomicetos (géneros *Phanerochaete*, *Trametes*, *Pycnoporus*, *Nematoloma*, *Sporotrichum*, *Stropharia*, etc.) se han reportado más de 125 genes diferentes de lacasas (Mikolasch y Schauer, 2009).

En la tabla 1.1 se muestran algunas propiedades de las lacasas producidas por hongos. Las lacasas son glicoproteínas, con un peso molecular de 50-130 kDa. Una lacasa típica de hongos es una proteína con un peso aproximado de 60-70 kDa con un punto isoeléctrico (pI) alrededor de 3 a 5 (Morozova y col., 2007). Sin embargo, se ha obtenido una lacasa de sólo 43 kDa y un pI=2.3 a partir de *Pleurotus ostreatus* (Tlecuitl-Beristain y col., 2008).

Los carbohidratos presentes en las lacasas sintetizadas por plantas representan hasta un 45% de su peso molecular, mientras que las lacasas producidas en hongos contienen menos carbohidratos (10-30%). Se cree que los carbohidratos que conforman la estructura dan estabilidad y protegen de la proteólisis, así como de la inactivación por radicales (Morozova y col., 2007).

Tabla 1.1. Propiedades de lacasas provenientes de hongos (Baldrian, 2005)

Propiedades	Media
Peso Molecular (kDa)	61 – 71
pI	3.5 – 4.2
Temperatura óptima (°C)	50 – 70
pH óptimo por sustrato	
ABTS	2.5 – 4.0
2,6-Dimetoxifenol	3.0 – 5.5
Guayacol	4.0 – 6.0
Siringaldazina	4.7 – 6.0
K_m (μM)	
ABTS	18 – 100
2,6-Dimetoxifenol	100 – 880
Guayacol	121 – 1600
Siringaldazina	11 – 131
k_{cat} (s^{-1})	
ABTS	5220 – 41460
2,6-Dimetoxifenol	815 – 6000
Guayacol	115 – 3960
Siringaldazina	18400 – 25500

1.3. Aplicaciones de las lacasas.

Tanto la investigación básica como la aplicada con basidiomicetos han aumentado notablemente en los últimos años, debido a sus aplicaciones para la biotecnología y el medio ambiente, en particular para la producción de enzimas, suplementos dietéticos, compuestos fisiológicamente activos y biorremediación. La dificultad de la degradación de la lignocelulosa ha sido señalada por varios autores, de hecho se realiza a menudo un pre-tratamiento térmico para mejorar la biodegradabilidad de estos materiales (Turner y col., 2007). Una característica común de la pudrición blanca en basidiomicetos es la producción simultánea de celulasas, hemicelulasas, lacasas y peroxidasas (Elisashvili y Kachlishvili, 2009).

Algunas aplicaciones de las lacasas han sido en deslignificación, producción de etanol, análisis de drogas, clarificación de vino, biorremediación de triclorofenoles, alcanos, desechos industriales, tratamiento de colorantes, herbicidas, etc. Las

lacasas son las enzimas ligninolíticas más abundantes en el suelo, lo que atrajo la atención de los ecólogos para estudiar su papel en el ciclo del carbono, especialmente con respecto a diferentes concentraciones de nitrógeno. Básicamente, todos estos usos de las lacasas, y muchos más, pueden deberse a la capacidad que tiene la enzima de producir radicales libres a partir de diferentes sustratos. Las reacciones secundarias son responsables de la versatilidad de productos de oxidación encontrados (Kunamneni y col., 2008).

El descubrimiento de una enzima con un incremento en su estabilidad es importante para aplicaciones industriales. Los microorganismos que producen lacasas en medio sólido y líquido suelen analizarse con ayuda de compuestos indicadores de color, que permiten la detección visual de producción de lacasas. El uso de indicador de color es generalmente muy sencillo ya que no implica la manipulación de las muestras; varios compuestos cambian de color al oxidarse, como el ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), sirviendo como indicadores de la producción de lacasas (Kiiskinen y col., 2004)

1.4. Mecanismo de reacción de Lacasas.

Las lacasas están divididas como de “potencial redox bajo” y “potencial redox elevado”. Esto depende de su estructura y las propiedades del cobre central. El potencial redox elevado ocurre mayormente en basidiomicetos, especialmente en hongos de producción blanca (Mikolasch y Schauer, 2009). Sin embargo, el potencial redox bajo de lacasas (450-800 mV, en comparación con los de peroxidasas ligninolíticas, >1 V) sólo permite la degradación directa de los compuestos con potencial redox bajo y no la oxidación de compuestos aromáticos más recalcitrantes, entre ellos algunos colorantes sintéticos o hidrocarburos aromáticos policíclicos (Baldrian, 2005).

Las lacasas oxidan sustratos mediante la remoción de un electrón, generando a su vez radicales libres. Las enzimas retienen un total de cuatro electrones en su estado totalmente reducido, de esta manera la enzima puede transferir estos electrones a una molécula de oxígeno para formar dos moléculas de agua (Loera y col., 2006).

El cobre tipo 1 (T1) de la lacasa es el primer aceptor de electrones, el cual puede ser reemplazado por mercurio o cobalto (Morozova y col., 2007) y al menos uno de los dos electrones que se requieren para reducir el sitio T3, aceptor de un par de electrones, proviene de este sitio. La tasa de reacción del cobre T1 es el paso limitante de la tasa de reacción total. El cobre T2 es necesario para la oxidación anaerobia del sitio reducido T3, además permitirá que el sitio T3 actúe como un aceptor de 2 electrones. En la figura 1.2 se muestran los sitios activos de las lacasas (Loera y col., 2006).

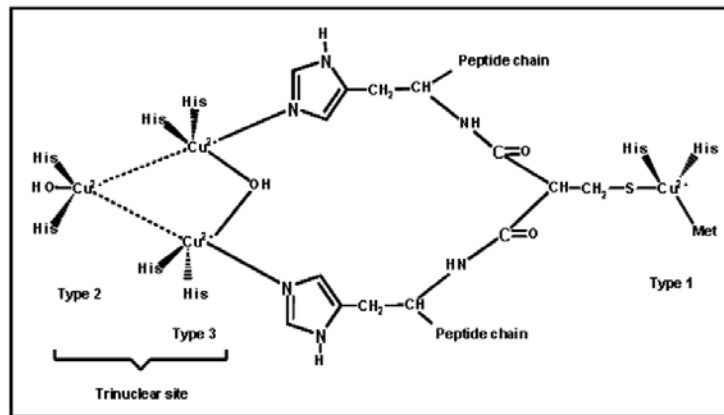


Figura 1.2. Sitios activos en una lacasa (Loera y col., 2006).

Las lacasas son inespecíficas con respecto a la oxidación de sustratos. Catalizan la oxidación de varios sustratos orgánicos, incluidos *o*- y *p*-difenoles, aminofenoles, polifenoles, poliaminas, metoxifenoles, ligninas y algunos iones inorgánicos, con la reducción simultánea directa de oxígeno a agua y sin la producción del intermediario peróxido de hidrógeno (Mayer y Staples, 2002). La oxidación de sustratos crea radicales libres activos que pueden continuar reacciones no enzimáticas, como por ejemplo:

- El entrecruzamiento de monómeros: La oxidación enzimática de compuestos fenólicos y anilinas por lacasas genera radicales que reaccionan entre sí para formar dímeros.

- Degradación de polímeros: Las lacasas están involucradas en la degradación de polímeros complejos naturales, como lignina o ácidos húmicos. La generación de radicales reactivos puede conducir a la ruptura de enlaces covalentes y la liberación de monómeros. A causa de un impedimento estérico, las enzimas no pueden entrar directamente en contacto con los polímeros. En lugar de esto, hay compuestos orgánicos pequeños o metales que se pueden oxidar y ser activados por las lacasas, utilizándose como mediadores redox no fisiológicos en procesos biotecnológicos para aumentar el potencial de oxidación de las lacasas (Fig. 1.3). La presencia de un mediador adecuado puede expandir el espectro de sustratos, compuestos no fenólicos y polímeros orgánicos incluidos, oxidables por las lacasas (Widsten y Kandelbauer, 2008).

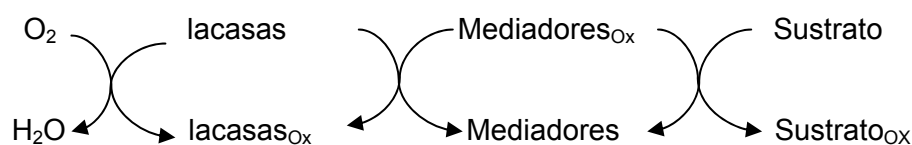


Figura 1.3. El ciclo redox de una lacasa catalizada mediante el sistema

- La división de anillos aromáticos: Se ha reportado que las lacasas catalizan la división de un anillo aromático en diferentes compuestos. (Harald, 2004).

1.5. Termoestabilidad de lacasas

La mayoría de las reacciones se favorecen si se llevan a cabo en temperaturas elevadas, permitiendo acelerar la reacción con períodos cortos de conversión y disminuyendo los tiempos de proceso. Sin embargo, para detener la reacción se requieren temperaturas más elevadas para inactivar las enzimas termoestables (Hildén y col., 2009).

En las enzimas, la termotolerancia es la capacidad transitoria para mantener la actividad catalítica a temperaturas elevadas, mientras que la termoestabilidad es la capacidad para resistir la inactivación irreversible a temperaturas altas y mantener actividad a más de 60 °C por un tiempo prolongado. Las enzimas termoestables

usualmente tienen una resistencia mayor a la desnaturalización química y por pH. La mayoría de las enzimas termoestables soportan también concentraciones altas de sustrato sin perder la capacidad catalítica. Además debido a su alta estabilidad a elevadas temperaturas, las reacciones enzimáticas son más rápidas y menos susceptibles a contaminación microbiana (Turner y col., 2007; Hildén y col., 2009).

Los perfiles de la actividad en lacasas con respecto a la temperatura no difieren, por lo general, de los de otras enzimas extracelulares ligninolíticas, con óptimos entre 50 y 70 °C. Se han descrito pocas enzimas que presenten actividad óptima por debajo de 35 °C, sin embargo, este fenómeno no tiene ninguna relación con el crecimiento óptimo de los hongos (Baldrian, 2005).

La mayoría de las proteínas de hongos termófilos son termoestables. El aumento de los puentes de hidrogeno y de iones en las estructuras se ha observado a menudo, especialmente en las enzimas de las especies hipertermofílicas. Los enlaces disulfuro son otra característica importante para la estabilidad de las proteínas, y que recientemente también se ha demostrado para las proteínas intracelulares hipertermofílicas, siendo especialmente común en las proteínas pequeñas (Turner y col., 2007).

Las bases moleculares de la termoestabilidad de las proteínas han sido objeto de una amplia variedad de estudios, tanto teóricos como experimentales. Las características estructurales de las proteínas termotolerantes de hongos termófilos y extremófilos se compararon con las de hongos mesófilos, sugiriendo que las causas de la termoestabilidad se deben a factores físico-químicos como hidrofobicidad, aumento de aminoácidos en cada giro de las hélices alfa, la densidad de puentes de hidrógeno y enlaces iónicos internos, la distribución de residuos con carga en la superficie y la proporción de ciertos aminoácidos (Yano y Poulos, 2003). Como se sugirió anteriormente, la glicosilación puede tener un efecto específico en las propiedades de las proteínas, dificultando el ataque de proteasas y favoreciendo la secreción de proteínas. Sin embargo, otros estudios recientes indicaron que la glicosilación no explica por sí sola la termoestabilidad, sino que ésta puede ser más

probablemente debido a un mayor contenido de prolina, junto con un empaque más compacto de la proteína (Hildén y col., 2009).

La termoestabilidad de las enzimas es clasificada en tres grupos de acuerdo a su rango de temperatura estable: moderadamente termoestable (45-65 °C), termoestable (65-85 °C) y extremadamente termoestable (> 85 °C). Generalmente, las tres clases de enzima son aisladas de organismos que crecen cerca del rango máximo de estabilidad de la proteína, aunque existen ejemplos de enzimas termoestables aisladas de organismos que crecen a menor temperatura. Las proteínas con estabilidad térmica comparten una estructura característica, que incluye una disminución en la longitud de enrollamiento y su correspondiente incremento en la estructura secundaria, una disminución de residuos lábiles (por ejemplo cisteína, aspartato y glutamato), un incremento de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), interacciones hidrofóbicas, presencia de metales y de oligomerización (Yano y Poulos, 2003)

1.6. El género *Fomes*.

La clasificación taxonómica de los hongos incluye aspectos morfológicos del micelio, tipo de reproducción y la naturaleza de las esporas. Con base en estos aspectos, los hongos se han dividido en Mixomycota y Eucomycota. Esta última se ha subdividido en: *Chytridiomycetes*, *Oomycetes*, *Plasmodiophoromycetes*, *Zygomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* y *Deuteomycetes* (Frioni, 1999).

Herrera y Ulloa (2004) indican la siguiente clasificación para el género *Fomes*:

- Reino: Fungi
- División: Eumycota
- Subdivisión: Basidiomycota
- Clase: Holobasidiomycetes
- Subclase: Hymenomycetidae
- Orden: Polyporales
- Familia: Polyporaceae
- Género: *Fomes*

Este género es de gran importancia económica, se localiza principalmente en América del Norte o Europa y es de un color marrón, gris o beige. Comprende especies saprobias y fitopatógenas, comestibles y tóxicas; además, muchas de ellas

son lignícolas y causan pudrición en la madera. Cuando destruye sólo la celulosa ocasionan la llamada pudrición parda; cuando atacan tanto la celulosa como la lignina, o principalmente ésta produce la pudrición blanca. Estos hongos son imputrescibles, conservando su integridad y algunos de ellos crecen en forma laminar sobre la madera, por lo cual son conocidos como “repisas de la madera” (Fig. 1.4) (Campbell, 1938).



Figura 1.4. Basidiocarpo de *Fomes fomentarius*

El nombre de la familia alude a la característica de que el himenóforo (donde se encuentran las esporas) es casi siempre poroso, es decir está formado por tubos cuyos extremos libres constituyen poros a través de los cuales salen las basidiosporas maduras. El género *Fomes* incluye especies lignícolas con la fructificación en forma de repisa aplanada, de concha o de casco de caballo (ungulada), leñosa y perene, de contexto moreno castaño, claro u oscuro desde las fases juveniles. El himenóforo está constituido por varias capas de tubos, su sistema hifal es trimítico, sin fíbulas. *Fomes pinicola* y *Fomes pini* se desarrollan en troncos caídos de pinos. *Fomes pinicola* tiene la superficie superior de fructificación resinosa y pegajosa, a veces casi seca, con zonas concéntricas de color morado anaranjado, rojizo y gris oscuro, que con la edad se tornan casi negras (Corner 1932). La mayoría de las especies del género *Fomes* son mesofílicas, ya que sus temperaturas óptimas de crecimiento se encuentran entre los 20 y 36 °C, muy pocas especies son termotolerantes (Campbell, 1938). El aislado *Fomes* sp. EUM1 es capaz de crecer en un rango de temperatura que va desde los 20 a los 40 °C, sin embargo su temperatura óptima de crecimiento es de 30 °C (Ordaz y col., 2011).

1.7. Microorganismos termotolerantes.

La temperatura es uno de los factores más importantes que afectan al crecimiento de los hongos. La mayoría de los hongos son mesofílicos, con un crecimiento de 5 a 37 °C, y valores óptimos de temperatura de 25-30 °C. Sin embargo, la termotolerancia varía entre los diversos géneros de hongos e incluso entre distintos aislados de una misma especie. El sustrato también puede tener influencia en la tolerancia a la temperatura. La mayoría de los microorganismos degradadores de la lignina son basidiomicetos, que son en su mayoría mesófilos. Sin embargo, algunos basidiomicetos crecen bien a temperaturas elevadas. El hongo *Phanerochaete chrysosporium* tiene una temperatura óptima de crecimiento de 36-40 °C y una temperatura máxima de 46 - 49 °C. *Colossum ganoderma* es otro hongo de podredumbre blanca, capaz de crecer a 45 °C y con una temperatura óptima de 40 °C. En el género *Coprinus* hay algunas especies que tienen una temperatura óptima de más de 40 °C (Toumela y col., 2000).

La capacidad de algunas especies fúngicas de crecer por encima de 40 °C es un fenómeno que merece la atención. Hasta la década de 1980 se pensaba que los hongos termófilos requerían de nutrientes complejos o inusuales. Sin embargo, se ha observado que hongos termófilos crecen satisfactoriamente en un medio mínimo, con un pH del medio controlado entre 5.5 y 7.0. El pH bajo reduce la solubilidad del CO₂ en el medio de crecimiento y limita su disponibilidad para la asimilación de las enzimas (p. ej. piruvato carboxilasa). Se ha visto que la elección del inóculo (es decir, la inoculación con esporas o micelio) puede influir en la temperatura mínima de crecimiento de los hongos termófilos (Maheshwari y col., 2000).

Para poder crecer a temperaturas altas, muchos organismos cambian la composición de ácidos grasos en la membrana, para que la fluidez de la membrana se mantenga constante para el óptimo funcionamiento de transportadores y enzimas. Por ejemplo, con un aumento de la temperatura, se produce un aumento en la proporción de grasas saturadas y ácidos grasos incorporados en los fosfolípidos, mientras que a menor temperatura, se incorpora una mayor proporción de ácidos grasos insaturados. Este fenómeno se llama adaptación homeoviscosa. Sin embargo, hay poca información disponible sobre el efecto de la temperatura de

crecimiento sobre la síntesis y la actividad de las proteínas que componen los sistemas de transporte en los hongos (Rajasekaran y Maheshwari, 1993).

El estrés por temperatura provoca respuestas enzimáticas, por ejemplo se ha observado la producción de proteasas en organismos termófilos y temotolerantes. Las proteasas son enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos de las proteínas o algunos péptidos y se dividen en endoenzimas o endopeptidasas (las cuales hidrolizan los enlaces dentro de la cadena del péptido) y exoenzimas o exopeptidasas (que hidrolizan los aminoácidos terminales). Entre los hongos termófilos que las producen están algunas especies de *Achaetomium*, *Chaetomium*, *Humicola*, *Rhizopus*, etc. A pesar de que existen claras diferencias entre los organismos, la síntesis de muchas proteasas se rige, al menos en parte, por la concentración de nutrientes disponibles, la represión catabólica y la inhibición por producto final. La producción de proteasas por hongos termófilos como respuesta al estrés térmico se ha estudiado sobre fuentes naturales, salvado de trigo, harina de soja, harina de maíz, caseína y albúmina de huevo (Bhavdish y col., 1985).

El control de proteínas es esencial para la integridad y el buen funcionamiento de una célula. Las chaperonas y proteasas pueden servir en el plegamiento o eliminación de proteínas malformadas o parcialmente desplegadas. Las proteasas no sólo son capaces de ayudar en el plegamiento de proteínas, sino también catalizar la rápida degradación de las proteínas desnaturalizadas o dañadas irreversiblemente. Además de eliminar las proteínas anormales, la degradación de proteínas juega un papel importante en el control temporal de muchos procesos celulares, mediante la regulación de los niveles de proteínas específicas durante el desarrollo o en respuesta a un entorno cambiante (Fisher y col., 2002).

La exposición prolongada al estrés interfiere con la eficacia de las operaciones de la célula, con consecuencias negativas sobre las propiedades bioquímicas de las proteínas (las cuales en condiciones ideales existen en estados termodinámicamente estables). En los entornos de estrés, las proteínas pueden plegarse inadecuadamente y la respuesta a un choque térmico puede ser la síntesis

elevada de chaperones moleculares y proteasas, que ayudarían en la reparación de las proteínas y la recuperación de la célula (Morimoto, 2011).

2. ANTECEDENTES.

Se han explorado microorganismos termotolerantes como fuente de enzimas termoestables, para lo que es importante determinar cuáles son los patrones de producción, así como determinar la posible inducción de isoformas específicas. Uno de estos trabajos se llevó a cabo con *Fomes* sp. EUM1, encontrado en el trópico mexicano (Medina, 2003). En diversos trabajos realizados se ha observado que este hongo produce lacasas termoestables (Medina, 2003; Márquez, 2006).

Se han obtenido dos isoenzimas de lacasa de esta cepa, estables durante una hora en un amplio rango de pH entre 4-10 y a temperaturas de 50 y 60 °C (conservando aproximadamente el 100 % de actividad). Estos resultados abrieron la posibilidad de probar las isoenzimas de lacasa con sustratos de interés industrial (Medina, 2003).

En posteriores investigaciones, se propagó la cepa de *Fomes* sp. EUM1, en medio Kirk (medio definido) con ABTS como sustrato para verificar la presencia de la enzima. En la confirmación de la actividad enzimática mediante la formación de halos de oxidación, se observó que la edad del micelio y el método de inoculación tienen efecto sobre la detección de las lacasas, obteniéndose mejores resultados con micelio maduro y la inoculación con esferas de micelio (pellets). Además del cambio en la producción de las lacasas durante el proceso de crecimiento., se observó que la fuente de nitrógeno tiene efecto sobre la actividad lacasa y la expresión de las isoformas (Márquez, 2004 y 2006).

Estudiando el efecto de la temperatura en la producción y productividad de celulasas, xilanasas y lacasas del mismo hongo, *Fomes* sp. EUM1, en cultivo sólido sobre rastrojo de maíz, se obtuvo un incremento de producción de celulasas y xilanas al aumentar la temperatura de crecimiento de 30 a 40 °C, mientras que en el caso de las lacasas esto ocurrió al pasar de 30 a 35 °C. Es interesante destacar que

en todas las temperaturas de crecimiento se producen proteasas que posiblemente influyan en la estabilidad de las enzimas. Sin embargo, se observó que la actividad de lacasas no decrece, como sí sucede con las otras enzimas, cuando se producen a 45 °C (Ordaz, 2008). Este resultado sugiere que hay isoformas de lacasas resistentes naturalmente al ataque proteolítico, que se producen en especial cuando el hongo crece en condiciones de estrés térmico. Sin embargo, también es posible que bajo tales circunstancias haya una inducción permanente en la síntesis de lacasas.

Por otro lado, la producción de lacasas termoestables con aplicaciones biotecnológicas se han realizado con otros basidiomicetos. Un caso particular fue el uso de una variedad de *Peniophora* productora de lacasas, la cual es una nueva característica de esta especie. *Peniophora* secretó varias isoformas de lacasa con valores de pI entre 3.7 y 4.2 cuando se incubó en un medio con glucosa y harina de soya. Las lacasas producidas por *Peniophora* son similares a las producidas por basidiomicetos con respecto al rango de pH, actividad específica y sensibilidad a inhibidores. La característica más interesante de las lacasas producidas por *Peniophora* fue la termoestabilidad de las isoformas a 60 y 70 °C, con una vida media aproximada de 5 horas y 15 min, respectivamente. El pI de la isoforma termoestable fue de 4.1 y presentó una masa molecular de 63 kDa. La secuencia terminal de aminoácidos de 22 residuos fue de 50 a 63 % idéntica a las de las lacasas de basidiomicetos analizados recientemente (Niku-Paavola y col., 2004).

Pycnoporous sanguineus produjo lacasas cuando se cultivó a 25 °C en melaza diluida. Una lacasa que se purificó presentó una actividad específica de 32.9 U/mg, con un peso molecular de 58 kDa. El rango óptimo de pH estuvo entre 3 y 5 con ABTS, DMP y guayacol como sustratos y su punto isoeléctrico fue de 6.7 (similar a algunas otras lacasas de hongos filamentosos). La temperatura óptima fue de 55 °C y la enzima mostró una máxima termoestabilidad a una temperatura de 75 °C, con una vida media de 170 min. En términos de k_{cat}/K_m para ABTS, siringaldazina y DMP, este último fue el mejor sustrato. El análisis cinético de quince compuestos mostró que se trataba de una lacasa real, con el requerimiento de un grupo-OH libre

en los sustratos. La enzima tuvo una preferencia por *o*-difenoles, por encima de sus homólogos *p*-difenoles (Litthauer y col., 2007).

En el basidiomiceto de pudrición blanca *Physisporinus rivulosus* se obtuvieron dos lacasas con pl diferentes durante el proceso de la degradación de lignina (Lac-3.5 y Lac-4.8). Ambas lacasas mostraron un 100% de actividad durante una hora a 60 °C y un pH óptimo de 3 a 3.5 (Hildén y col., 2007).

Recientemente se purificó una lacasa proveniente de *Trametes hirsuta*, la cual fue clasificada como blanca o amarilla. El hongo fue incubado a 30 °C durante 6 días y la actividad enzimática fue medida a una temperatura de 25 °C; la termoestabilidad de la lacasa se midió a 65 °C y 75 °C, con una vida media de 70 min a 75 °C y 5 h a 65 °C (Haibo y col., 2009).

Las lacasas han recibido mucha atención y gran interés biotecnológico, debido a sus aplicaciones industriales: se han obtenido más de 100 lacasas de diferentes microorganismos. Sin embargo, la mayoría de ellas son lacasas con bajo rendimiento de actividad enzimática y con estabilidad a temperaturas moderadas. Muy pocas lacasas han sido consideradas como termoestables, aunque siguen teniendo rendimientos de actividad bajos (Li-Qiong y col., 2011). Para aplicaciones comerciales, por lo general se requieren de características tales como la estabilidad térmica y la resistencia a ácidos o álcalis. Por lo tanto, es de gran interés la obtención de enzimas con este tipo de propiedades.

La obtención de lacasas de hongos termófilos podría ser una buena alternativa para la obtención de estas enzimas. Se aisló un segmento de ADN genómico que codifica para una lacasa extracelular del hongo termofílico *Myceliophthora thermophila*. La secuencia de aminoácidos de la lacasa proveniente de *M. thermophila* (MTL) mostró similitud con las lacasas de diversos géneros de hongos. El gen de la lacasa se recombinó y expresó en *A. oryzae*. La masa molecular se estimó en aproximadamente 100 a 140 kDa. El análisis reveló que la MTL contenía de un 40 a 60% de glicosilación. La MTL presentó actividad óptima a pH 6.5, mantiene el 100% de su actividad cuando se incubaba a 60 °C durante 20 min. Este

fue el primer informe de la expresión de la clonación y heteróloga de una lacasa termoestable (Berka y col., 1997).

El gen que codifica la lacasa de *Myceliophthora thermophila* fue clonado y expresado en *A. oryzae*, la enzima recombinante (r-MTL) fue purificada, obteniéndose de dos a cuatro veces mayor rendimiento de actividad que la lacasas nativas (MTL). La r-MTL difiere en tres aspectos: la multiplicidad de las isoformas, mayor masa molecular (85 kDa), y una actividad específica mayor. Las isoformas múltiples contenían de 40 hasta 60 % de carbohidratos y se cree que esta mayor glicosilación le confiere mayor estabilidad. La actividad óptima de la enzima se produjo a pH 6.5, manteniéndose la misma durante 20 min a 60 °C. La lacasa obtenida de *Chaetomium thermophilium* se identificó como una glicoproteína de 77 kDa, que se mantuvo estable en un amplio rango de pH (5 a 10), con una vida media de 12 h a 50 °C (Maheshwari y col., 2000).

3. JUSTIFICACIÓN

El descubrimiento de nuevas enzimas, con mayor estabilidad al pH, temperatura, sales y frente a la proteólisis es importante para aplicaciones industriales. Una gran cantidad de microorganismos tienen la capacidad de producir enzimas lignocelulolíticas extracelulares, no obstante, las bacterias y los hongos son los microorganismos que las producen en mayor cantidad, principalmente los basidiomicetos de pudrición blanca, tanto en cultivo sólido como en cultivo líquido y con un intervalo de temperaturas de entre 25 y 35 °C.

La temperatura óptima de crecimiento para *Fomes* sp. EUM1 se determinó en 30 °C por Ordaz y col. (2011). Por ello, a temperaturas superiores a ésta el hongo se encontraría en estrés térmico. En un trabajo previo se determinó que este hongo produce xilanasas y celulasas en cultivo sólido a una temperatura óptima de 40 °C, y lacasas a 35 °C. Sin embargo, las lacasas que se producen a 45 °C podrían presentar resistencia al ataque proteolítico, ya que aunque su actividad fuera menor que a 35 °C son estables durante el cultivo. Hasta ahora se desconoce el motivo de este fenómeno, el cual podría deberse a que la enzima se produce constantemente o a que se produce y permanece estable, por ser resistente a la proteólisis y además con un grado mayor de termoestabilidad. Por las características antes mencionadas, es necesario conocer los patrones de producción de lacasas asociados al estrés térmico en *Fomes* sp. EUM1. Teniendo en cuenta estos aspectos, en este trabajo se evaluaron las causas de la mayor estabilidad de las lacasas durante los cultivos a 45 °C.

4. HIPÓTESIS.

La producción y productividad de lacasas se incrementa al modificarse la temperatura de cultivo de 35 °C a 45 °C en el hongo *Fomes* sp. EUM1.

La disminución en la producción de proteasas al incrementarse la temperatura permite una mayor estabilidad de las lacasas.

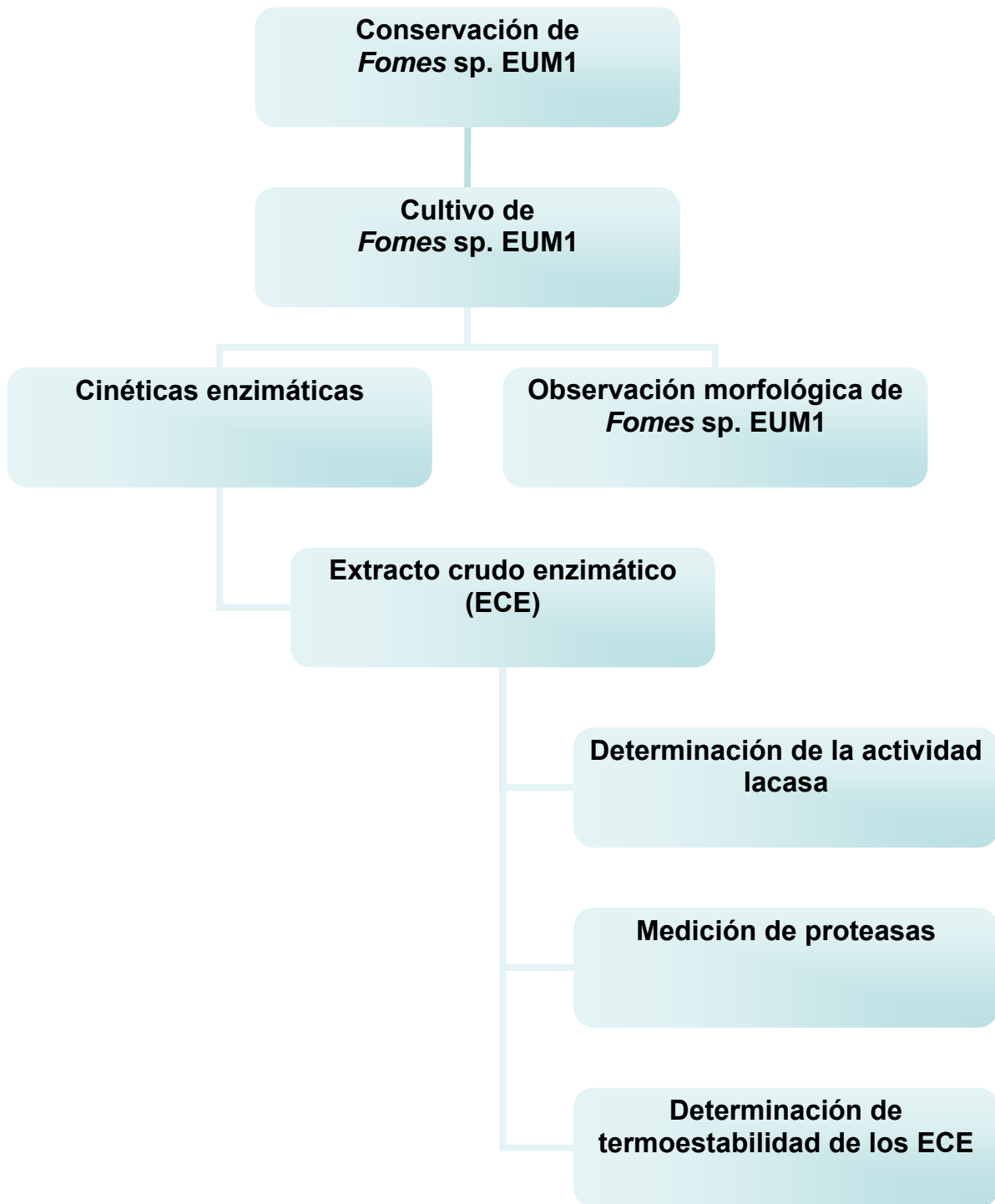
5. OBJETIVO GENERAL.

Determinar los cambios de producción de lacasas por *Fomes* sp. EUM1 al incrementar la temperatura de 35 a 45 °C, así como determinar la termoestabilidad de las lacasas producidas en estas condiciones.

5.1. Objetivos Específicos.

- Conservar la cepa a largo plazo.
- Obtener perfiles de producción de lacasas y proteasas a diferentes temperaturas (35 y 45 °C).
- Analizar la termoestabilidad de las lacasas.
- Identificar las isoformas producidas de lacasas.
- Observar los posibles cambios morfológicos en el hongo *Fomes* sp. EUM1 al aumentarse la temperatura de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Microorganismo.

El hongo de pudrición blanca *Fomes* sp. EUM1 se utilizó para evaluar el efecto de la temperatura en la producción de la enzima lacasa. Este hongo se aisló de residuos de madera en el Estado de Yucatán y se seleccionó de un grupo de 6 basidiomicetos por su capacidad de oxidar rápidamente el ABTS (Fig.6.1.) (Medina, 2003).

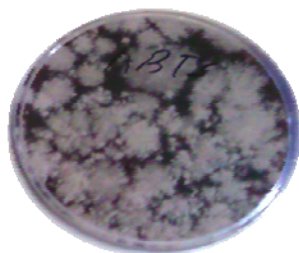


Figura 6.1. Oxidación de ABTS de *Fomes* sp. EUM1

6.2. Conservación.

La conservación de la cepa se realizó manteniendo sumergidas tiras de papel de filtro estéril con micelio en agua destilada, durante 8 meses. El microorganismo creció en caja de Petri sobre medio de cultivo basado en extracto de malta y extracto de levadura. El medio de cultivo se preparó disolviendo los siguientes componentes en agua destilada: extracto de malta (40 g/L), extracto de levadura (3 g/L) y agar bacteriológico (18 g/L) (Schlosser y col., 1997).

Las tiras de papel con micelio se obtuvieron de la siguiente manera: en el centro de una caja de Petri con medio fresco, se colocó un disco de agar con micelio (0.6 cm) con 4 tiras de papel Whatman N° 4 (0.6 cm × 2 cm), distribuidas uniformemente alrededor de la caja (Fig.6.2.). Después de mantener el cultivo en incubación a 35 °C durante 7 días, las tiras se retiraron y depositaron en viales con 4 mL de agua destilada estéril. Para corroborar la esterilidad en el método de conservación propuesto se utilizaron dos viales como controles de esterilidad, con tiras de papel sin micelio. En ambos casos, las muestras conservadas y los controles, los viales fueron sellados con Parafilm y conservados a temperatura ambiente. Para

determinar la viabilidad del microorganismo, se tomaron dos viales y las tiras contenidas en éstos se utilizaron como inóculo para probar la viabilidad del hongo, la cual se determinó por duplicado (Márquez, 2004).

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico NCSS (2007). Con los datos de velocidad de crecimiento radial, obtenidos en el método de conservación, se realizó un análisis t de student ($\alpha = 0.05$) para la cepa conservada y la no conservada.



Figura 6.2. Técnicas de conservación de *Fomes* sp. EUM1

6.3. Medio de propagación.

El medio de cultivo se preparó disolviendo en agua destilada los siguientes compuestos: 40 g/L de extracto de malta y 3 g/L de extracto de levadura. En tubos Falcon de 50 mL se colocó un volumen de 20 mL del medio de cultivo y perlas de ebullición (Fig. 6.3.). El medio de cultivo se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 120 °C y se inoculó con 4 discos de agar con micelio, los cuales se tomaron de un cultivo previo (6 días, 35 °). Un tubo Falcon con medio de cultivo sin inocular se consideró como control. El microorganismo se cultivó a 35 °C durante 6 días.



Figura 6.3. Cultivo del inóculo para las cinéticas.

6.4. Medio de cultivo.

Para realizar las cinéticas enzimáticas se compararon 3 diferentes medios de cultivo:

1. Extracto de malta: 40 g/L
Extracto de levadura: 3 g/L
Agar bacteriológico: 18 g/L
Disuelto en una infusión de 40 g/L de rastrojo de maíz.

2. Infusión de rastrojo de maíz: 40 g/L
Agar bacteriológico: 15 g/L.

3. Rastrojo de maíz: 40 g/L
Agar bacteriológico: 15 g/L.

El rastrojo de maíz empleado se trituró con ayuda de un molino convencional para reducir el tamaño de partícula, menor a 2 mm. Asimismo, el rastrojo se esterilizó antes de su uso, durante 25 min a 120 °C. Los medios 1, 2 y 3 se esterizaron durante 15 minutos a 120 °C.

Una serie de cajas de Petri (90 mm × 15 mm) con 30 mL de medio se inocularon en el centro, con un volumen de 200 µL de una suspensión de micelio (Fig. a) 6.4.). El inóculo se distribuyó sobre la superficie de agar con una varilla de vidrio estéril, con la finalidad de obtener crecimiento en césped (Fig. b) 6.4.). Las cajas se incubaron durante 12 días a 35 °C, aunque una parte de ellas se cambiaron de temperatura a 45° C en el sexto día (Ordaz, 2008).

La suspensión de micelio usada como inóculo se obtuvo como se describe a continuación. La biomasa formada durante el crecimiento del microorganismo en tubos Falcon se separó del medio líquido por decantación. La biomasa y las perlas de ebullición retenidas en los tubos Falcon se mezclaron con 20 mL de Tween 80 al 1% (v/v); posteriormente, los tubos se agitaron en un vórtex durante 10 segundos para realizar la disgregación del micelio.

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico NCSS (2007). Con los datos de actividad enzimática obtenidos en los tres medios de cultivo, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el efecto del medio de cultivo en la actividad enzimática, y una comparación múltiple de medias empleando el método de Tukey ($\alpha = 0.05$).

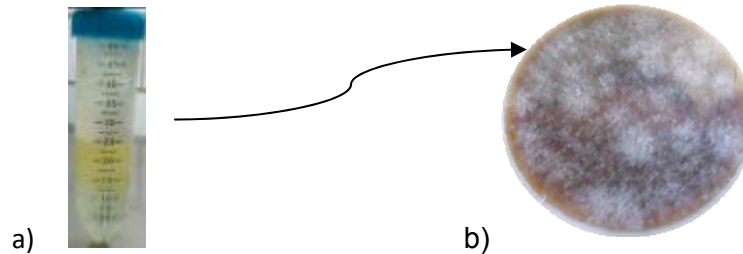


Figura 6.4. a) Disgregación de micelio inoculo para la cinética.
b) Caja de Petri después de 6 días de cultivo.

6.5. Extracción de enzimas.

Las lacasas se recuperaron del medio de cultivo con agua desionizada (Fig.6.5.). Se tomaron 2 cajas de Petri por día de incubación; asimismo, el medio de cultivo sólido se retiró de las cajas de Petri y se fragmentó haciendo cortes longitudinales y transversales. El medio de cultivo fragmentado se colocó en un vaso de precipitado de 250 mL con 100 mL de agua desionizada. Los sólidos se mantuvieron en agitación durante 45 minutos a 10 °C, manteniendo el vaso de precipitados sumergido en agua con hielo. El extracto obtenido se filtró con papel Whatman No. 40 para separar los sólidos residuales. El filtrado se utilizó para determinar la actividad enzimática de lacasas (Márquez, 2006). La actividad enzimática se determinó por duplicado, empleando muestras independientes.



Figura 6.5. Extracción de enzimas en hielo con agitación durante 45 min.

6.6. Determinación de proteína soluble.

La proteína soluble se determinó con el método de Bradford (1976). La reacción se llevó a cabo en tubos de ensayo, agregando 800 μL del ECE con 200 μL del reactivo de Bradford (Sigma Aldrich). La reacción se dejó durante 5 minutos a temperatura ambiente y pasado este tiempo se registró la absorbencia a 595 nm. La concentración de proteína se determinó mediante una curva estándar, utilizando albúmina sérica bovina (Anexo I). Los resultados se reportaron como miligramos de proteína por gramo de sustrato seco inicial (mg/gssi).

6.7. Medición de pH.

El pH se midió durante todo el cultivo superficial, determinándose directamente de los extractos enzimáticos con un potenciómetro (Conductronic pH120).

6.8. Actividad enzimática de lacasas.

La actividad enzimática de las lacasas se determinó empleando los sustratos siringaldazina (Leonowicz y Grzywnowicz, 1980) y ABTS (Bourbonnais y col., 1997). La siringaldazina se usó para verificar que la actividad enzimática detectada fuese específicamente de lacasa. Ambos métodos se basan en la medición de la oxidación de los sustratos por lacasas mediante el coeficiente de extinción molar (siringaldazina $\epsilon_{525 \text{ nm}} = 65,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, y ABTS $\epsilon_{420 \text{ nm}} = 36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Para el procedimiento experimental, en una celda de espectrofotómetro de 1 mL se colocó un volumen de 0.5 mL de una dilución adecuada de extracto crudo enzimático (ECE) con 0.5 mL de ABTS 0.5 mM preparado en amortiguador de citratos (50 mM, pH 5) ó 0.5 mL de siringaldazina 0.1 mM en buffer de acetatos (0.1 M y pH 5.0) la siringaldazina previamente fue disuelta en etanol absoluto. La mezcla de reacción se incubó a 40 °C y la actividad enzimática se determinó midiendo el incremento en la absorbancia cada 10 segundos, durante 2 minutos, a una longitud de onda de 525 nm y 420 nm, para siringaldazina y ABTS, respectivamente, en un espectrofotómetro DU 640 (Beckman). Como blanco se utilizó una mezcla de 0.5 mL del respectivo amortiguador (debido a que el ECE producido no es detectado a esta longitud de onda) con 0.5 mL de sustrato (Ordaz, 2008). La actividad enzimática se

expresó en unidades internacionales por gramo de sustrato seco inicial (UI), donde una UI se define como la cantidad de enzima que oxida 1 μmol de sustrato por minuto en las condiciones de reacción.

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico NCSS (2007). Con los datos de actividad enzimática, obtenidos a las dos temperaturas (35 y 45°C), se realizó un análisis t de student ($\alpha = 0.05$) para las medias obtenidas con ambas temperaturas de las variables: proteína soluble, pH, actividad de proteasas y parámetros morfológicos.

6.9. Determinación de proteasas.

Las enzimas encargadas de la hidrólisis de proteínas se agrupan en: proteinasas (EC 3.4.2 1 -24.X) y peptidasas (EC 3.4.1 1-17.X), dependiendo del sitio del enlace peptídico hidrolizable (en el centro o en los extremos de la proteína, respectivamente). El término proteasa es sólo aceptable cuando se desconoce la especificidad de la enzima (García-Carreño 1996). La detección de actividad proteolítica se basa en la cuantificación de aminoácidos aromáticos (principalmente tirosina y fenilalanina y triptófano) liberados por la acción de las proteasas. La actividad de las proteasas se midió usando como sustrato una solución de caseína grado Hammarsten (caseína pura) (Lee y col., 1997).

Para la preparación de la caseína se pesó 1 g, el cual se disolvió en 100 mL de buffer de fosfatos (50 mM, pH 7) y 1 mM CaCl_2 , en un baño de agua a una temperatura de 60 °C hasta disolverse, observándose como una solución homogénea (aproximadamente a los 4 minutos). La reacción se inició mezclando un volumen de 300 μL de ECE, el cual previamente fue centrifugado durante 15 minutos a 4 °C y 10000 rpm. Al ECE centrifugado se le adicionaron 700 μL de solución de caseína.

La mezcla de reacción se incubó durante 20 minutos a 40 °C. Se realizaron controles negativos (sin ECE), en las mismas condiciones que para los tubos muestra. La reacción enzimática se detuvo agregando 1.5 mL de ácido

tricloroacético al 10%. Posteriormente a este paso, a los tubos de control negativo se les adicionaron los 300 μ L del ECE.

Las muestras se agitaron suavemente con un vórtex durante 30 segundos y se dejaron reposar durante 15 minutos en agua con hielo (10 °C). El precipitado se filtró con papel Whatman No.1 y se registró la absorbancia de la solución a 280 nm (espectrofotómetro Beckman DU 640). La cantidad de aminoácidos aromáticos liberados en la reacción enzimática se calculó a partir de una curva patrón de tirosina (Anexo I). La actividad de proteasas se expresó en unidades internacionales por gramo de sustrato seco inicial (UI/gssi). Una UI se definió como la cantidad de enzima que provoca un cambio de absorbancia equivalente a 1 μ mol de tirosina por min bajo las condiciones de reacción (Ordaz, 2008).

6.10. Realización de zimogramas.

Para identificar el número de isoformas enzimáticas se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida. Los geles se realizaron con 12 % de acrilamida, los cuales se montaron y corrieron en una cámara mini-Protean 2 (BioRad). Las preparaciones de las soluciones y buffer requeridas para su realización fueron de acuerdo con las propuestas previamente por Tellez-Tellez y col. (2005).

En la Tabla 6.1 se indica la forma de preparar el gel de separación y de apilamiento, el gel de separación se agregó hasta 2 cm aproximadamente antes de llenar el molde, adicionando una capa de isopropanol sobre la solución de acrilamida. Después de gelificar (aproximadamente en 40 minutos) se realizó un lavado con agua destilada, enseguida se le adicionó el gel de apilamiento, hasta llenar el molde y se colocó el peine para la formación de los pozos que contendrían la muestra.

Tabla 6.1. Preparación de geles

	Agua desionizada (mL)	Acrilamida 30% (mL)	Buffer* (mL)	SDS 10% (mL)
Gel de separación. 12% acrilamida	3.4	4.0	2.5	0.1
Gel de apilamiento. 4% acrilamida	6.1	1.3	2.5	0.1

El Buffer para los geles de separación y de apilamiento fue Tris-HCl 1.5 M y 0.5 M, a un pH 8.8 y 6.8, respectivamente.

Una vez que se obtuvo la solución de la Tabla 6.1, se desgasificaron durante 10 minutos mediante sonicación (Cole-Parmer 8892), posteriormente se agregaron los catalizadores: 50 μ L de persulfato de amonio (APS) al 10% y 5 μ L de N, N, N', N'-Tetrametiletilenodiamina (TEMED) para el gel de separación y 10 μ L para el gel de apilamiento.

En tubos Eppendorf se combinaron 20 μ L de muestra (estandarizada para una actividad lacasa de 15.4 UI/gssi y una proteína extracelular de 7.13 μ g/gssi), para los días 4, 6 a 35 °C y 7, 8, 10 y 12 para ambas temperaturas (35 °C y 45 °C), con 5 μ L de buffer de corrida, se cargaron los pozos con 10 μ L. En el primer pozo se cargaron 5 μ L de estándares de peso molecular BioRad (cat. 161-0305): lisozima (21,400 Da), inhibidor de tripsina de soya (28,800 Da), anhidrasa carbónica (35,500 Da), ovalbúmina (50,300 Da), albúmina sérica bovina (93,000 Da) y fosforilasa B (113,000 Da).

El buffer de corrida se realizó con los siguientes componentes:

3 g de Tris (25 mM)

14.4 g de glicina (192 mM)

1 g de dodecil sulfato de sodio (0.1%)

800 mL de agua destilada

Se ajustó el pH a 8.3 con un potenciómetro y se aforó a 1 L con agua destilada (Tellez-Tellez y col., 2005).

Para realizar la electroforesis, se colocaron los geles polimerizados en el tanque de la cámara y se agregó al buffer de tanque, asegurándose de que los pozos se cubrieran con el buffer. Las muestras se colocaron en los pozos con ayuda de una micropipeta, se cubrió el tanque con su tapa y se conectó a la fuente de poder con un voltaje de 100 V. La cámara de electroforesis se colocó en hielo (Fig.6.6.).

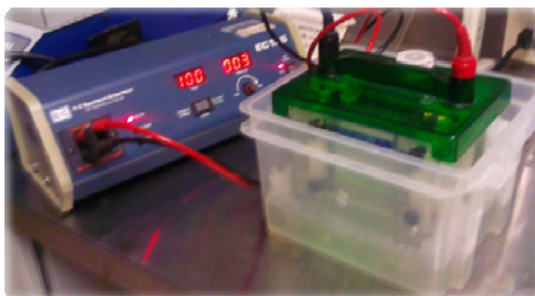


Figura 6.6. Cámara mini-Protean 2 (BioRad) a 100 V en hielo.

La electroforesis terminó cuando el frente de corrida llegó aproximadamente a 1 cm de la parte inferior del gel (aproximadamente 1 h 40 min.). Posteriormente, se desmontaron los geles y se lavaron con Tritón X100, se colocaron en recipientes de plástico con agua desionizada y se lavaron durante 15 minutos, con 3 cambios de agua. Finalmente se agregaron 50 mL de ABTS 50 mM en buffer de citratos 50 mM y pH 5, incubándose a 40 °C durante aproximadamente 20 minutos, para revelar las bandas con actividad de lacasa (Téllez-Téllez y col., 2005).

6.11. Determinación de la termoestabilidad.

Para la determinación de la termoestabilidad de las lacasas producidas, se utilizaron los extractos enzimáticos obtenidos del día de máxima actividad a cada temperatura (35 y 45 °C). En tubos de ensayo con rosca se depositaron 500 µL del ECE y 500 µL de buffer de citratos 50 mM y pH 6, los cuales se incubaron en baño de agua con temperatura controlada a 40, 45, 50 y 60 °C durante el tiempo correspondiente (Fig.6.7.).

Se retiraron periódicamente del baño de agua muestras, y se enfriaron a temperatura ambiente. Por último, se determinó la actividad lacasa para cada una de las muestras provenientes de los tratamientos térmicos por el método descrito por Bourbonnais y col. (1997), y se calculó el porcentaje de la enzima activa presente en los extractos enzimáticos (Membrillo y col., 2008). Los datos se ajustaron a un modelo lineal y a un modelo de decaimiento de primer orden con un ajuste exponencial. Se determinó el tiempo de actividad media $t_{1/2}$ (h) y la constante de inactivación k (h^{-1}).



Figura 6.7. Incubación de los ECE

6.12. Parámetros morfológicos.

Los parámetros medidos para evaluar la morfología de las hifas fueron la velocidad de crecimiento radial ($\mu\text{m}/\text{h}$), longitud (μm) y diámetro (μm) de las hifas distales. La morfología hifal se analizó sobre cultivos superficiales obtenidos en caja de Petri a temperaturas de crecimiento de 35 y 45 °C. Las placas contenían medio de cultivo de la siguiente composición: 25 g/L de rastrojo de maíz y 15 g/L de agar bacteriológico. Las cajas se inocularon en el centro con un disco de agar con micelio (0.6 cm), el cual se tomó de un cultivo previo (35 °C, 6 días). Inicialmente, los cultivos se mantuvieron a 35 °C durante 3 días y posteriormente, una parte de ellos se trasladó a una temperatura de 45 °C durante 6 días.

La velocidad de crecimiento superficial se obtuvo registrando el crecimiento radial sobre la superficie de cajas de Petri cada 24 h, en cuatro direcciones y midiendo con un Vernier. La medición de la velocidad de crecimiento superficial se hizo por triplicado sobre muestras independientes.

Para realizar las mediciones de la morfología hifal primero se realizaron cortes usando un bisturí (3 cm \times 2 cm) sobre la superficie del medio de cultivo que contenía el micelio. Los cortes de agar se observaron en un microscopio óptico (Olympus, CX31RTSF) para analizar la morfología hifal. El diámetro y la longitud hifal distal se observaron por medio de un microscopio óptico usando los objetivos 40x y 10x, respectivamente. Una cámara (Olympus KP-D51/D-50) se adaptó sobre el microscopio con la finalidad de capturar varias imágenes (formato TIF, 512 \times 512 píxeles) de las hifas visualizadas sobre la superficie de agar (Fig.6.8.). Las áreas

visualizadas sobre el agar se eligieron al azar, escogiéndose generalmente tres hifas por imagen. Las mediciones de diámetro y longitud de las hifas distales se realizaron sobre las imágenes capturadas de las hifas usando el programa Imagen 2000 (Biocom, Francia). Las mediciones se hicieron sobre hifas distales con ramificación lateral (longitud $>30\ \mu\text{m}$) y diámetro ($4\ \mu\text{m} < \text{longitud} < 7\ \mu\text{m}$) bien definidos (Fig.6.9.). Los valores del diámetro y longitud de las hifas se obtuvieron con 10 y 30 mediciones en tres muestras independientes (Larralde-Corona y col., 1997).



Figura 6.8. Microscopio óptico con cámara y analizador de imágenes.

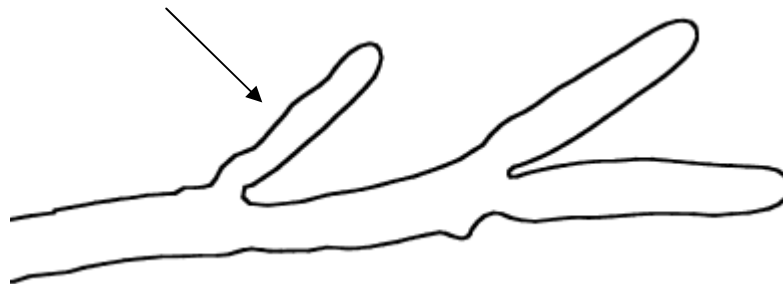


Figura 6.9. Ramificación lateral de una hifa.

7. RESULTADOS y DISCUSIÓN

7.1. Conservación del hongo *Fomes* sp. EUM1.

Muchos hongos filamentosos de pudrición blanca se pueden mantener viables mediante una resiembra periódica. Sin embargo, las propiedades de los hongos en el cultivo pueden variar debido a pérdidas de plásmidos, mutaciones espontáneas, recombinaciones genéticas o cambios degenerativos normales que ocurren en las células. Estos fenómenos pueden provocar modificaciones en las características de la cepa, con lo cual es necesario tener un método adecuado de conservación que permita mantener las características deseables en la cepa. (Hawksworth y Kirsop, 1988).

Existen diferentes métodos de conservación, que pueden ser clasificados en conservación a largo plazo, mediano plazo y otros métodos. Uno de los métodos de conservación a largo plazo se basa en la utilización de agua destilada estéril. Los hongos filamentosos conservados en agua destilada han permanecido viables hasta durante 20 años, dependiendo del tipo de microorganismo (Lastra y col., 2002; Borman y col., 2006).

En la Tabla 7.1 se observa la variación en la velocidad de crecimiento del hongo conservado y el mantenido mediante resiembra periódica: existe una diferencia significativa ($p < 0.05$), con una disminución del 16 % después de conservar el hongo durante 8 meses.

Tabla 7.1. Velocidad radial de *Fomes* sp. EUM1 conservado y mantenido mediante resiembra periódica

<i>Fomes</i> sp. UM1	Velocidad de crecimiento radial ($\mu\text{m/h}$)
Conservado	227.40
Propagado	267.55

Ordaz en 2008 observó que después de conservar el microorganismo durante 5 meses, la velocidad de crecimiento radial disminuyó en 12.6 %; también se encontraron diferencias significativas (11.7%) en la cantidad de biomasa que se

recuperó de la cepa conservada y sin conservar. Sin embargo, *Fomes* sp. EUM1 se sigue manteniendo viable hasta durante 8 meses, lo que demuestra que el método de conservación es bueno ya que mantiene viable al microorganismo, aunque no sea recomendable para tiempos más prolongados.

7.2. Comparación de medios de cultivo.

Los basidiomicetos muestran una gran diversidad en su respuesta a las fuentes de carbono y a su concentración en el medio de cultivo. Por ejemplo, algunos carbohidratos parecen regular la expresión de lacasas en basidiomicetos de pudrición blanca. Se ha mostrado que los compuestos aromáticos y fenólicos solubles derivados de diferentes sustratos lignocelulósicos aumentan sustancialmente la producción de enzimas ligninolíticas (Crestini y col., 1996; Kapich y col., 2004).

Por lo anterior se analizó la actividad lacasa en tres medios de cultivo: infusión de rastrojo de maíz (25 g/L), extracto de malta (40 g/L) disuelto en una infusión de rastrojo de maíz (25 g/L) y rastrojo de maíz (25 g/L).

En la Tabla 7.2. se presentan las actividades enzimáticas obtenidas en el día 6 con los diferentes medios de cultivo, para el organismo conservado y el propagado. El análisis de varianza y el método de Tukey mostraron una diferencia y mayor actividad ($p < 0.05$) (16 UI/gssi) con el medio de rastrojo de maíz, indicando que este hongo no solamente utiliza las partes solubles del rastrojo. El rastrojo de maíz contiene compuestos inductores, como el alcohol veratrílico y diversos compuestos aromáticos, que pueden ser utilizados como inductores de lacasas, provocando incrementos en la actividad enzimática de *Fomes* sp. EUM1 (Arana-Cuenca y col., 2004). Estos resultados dan evidencia de que la conservación no sólo afecta a la velocidad de crecimiento, sino que también tiene efecto sobre la actividad enzimática.

Tabla 7.2. Comparación de actividad de lacasas a los 6 días en tres medios de cultivo, usando 2 tipos de inóculo.

	Infusión de rastrojo de maíz		Rastrojo de maíz		Extracto de Malta	
	Propagado	Conservado	Propagado	Conservado	Propagado	Conservado
Actividad (UI/gssi)	6.23 ± 1.2	2.95 ± 0.19	16 ± 3.5	6.06 ± 0.9	6.7 ± 0.5	3.6 ± 0.09

7.3. Medición de actividad enzimática de las lacasas en diferentes sustratos.

En 1973, Harkin y Obst mostraron que la siringaldazina es un sustrato eficaz para la detección rápida e inequívoca de lacasas en cultivos de hongos descomponedores de madera, debido a que es un compuesto no-autooxidable, que no reacciona con tirosinasas, peroxidases o en presencia de peróxido de hidrógeno. Por ello se decidió comparar los perfiles de actividad medidos con siringaldazina y ABTS, siendo este último el sustrato usado más frecuentemente para la detección de lacasas (Bourbonnais y col., 1997).

En la Figura 7.1 se presentan los perfiles de producción de lacasa sobre rastrojo de maíz; los perfiles de actividad no son diferentes en cuanto al tipo de sustrato utilizado, lo cual es indicativo de que la actividad medida con ABTS sí proviene de las lacasas producidas por *Fomes* sp. EUM1. Esto es corroborado con la medición con siringaldazina, un sustrato más específico de lacasas (Leonowicz y Grzywnowicz, 1980).

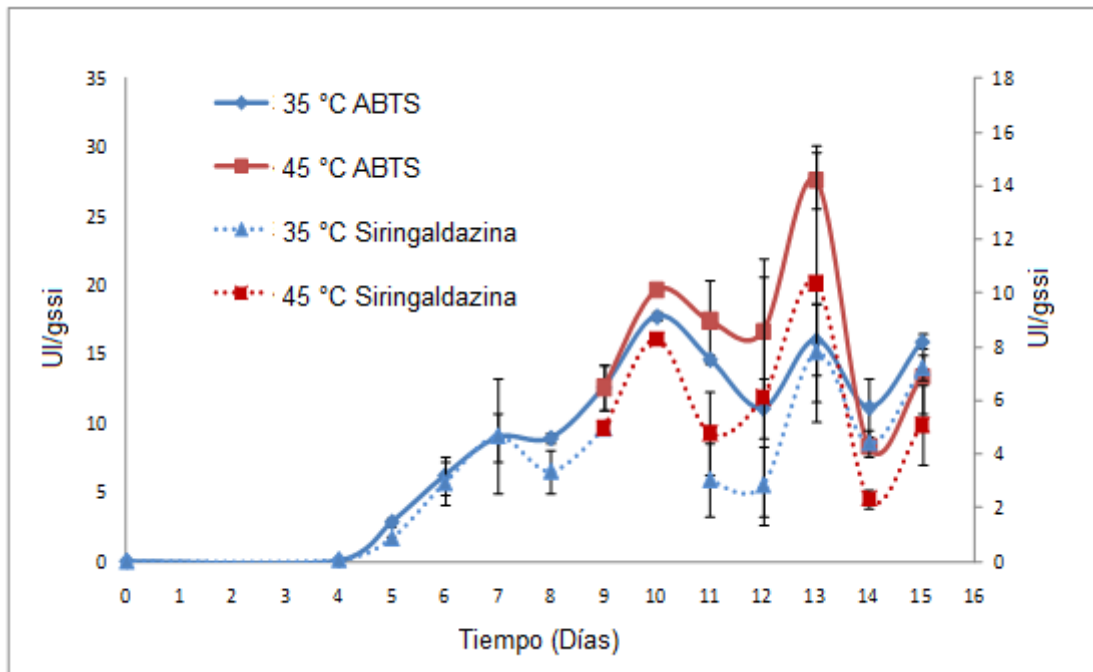


Figura 7.1. Comparación de perfiles de producción enzimática utilizando ABTS (líneas continuas) y siringaldazina (líneas punteadas) como sustrato, de los cultivos incubados a 35 °C (color azul) y 45 °C (color rojo).

7.4. Determinación de pH y proteína extracelular.

Durante el tiempo de cultivo se midió el pH y la proteína soluble (Fig.7.2.), observándose que en ambas temperaturas el pH fue incrementándose paulatinamente hasta un valor cercano a 7 hacia el final del cultivo. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) se encontraron en el día 8, siendo los valores de pH de 6.6 a 45 °C y de 6.2 a 35 °C. El pH más alto que se obtuvo fue de 7.4 en el día 11, con una temperatura de 35 °C. Brijwani y col. (2010) mencionaron que la producción de lacasas de hongos tiene intervalos de pH 4.6–6, con temperaturas de 25-30 °C. Sin embargo, el pH de producción para lacasa se ha observado que varía de un sustrato a otro (Xu, 1996).

Por otra parte, la proteína soluble presentó un comportamiento diferente en ambas temperaturas, siendo similar para el día posterior al cambio de temperatura (día 7), pero con una diferencia en los días 8 y 9 (48 y 72 h del cambio de temperatura). Se encontró una disminución en la proteína soluble en el día 8 a 45 °C. La disminución de proteína soluble podría deberse a una modificación en el metabolismo de *Fomes*

sp. EUM1 debido a la temperatura; Jaszek y col. (2006) al cultivar *Fomes fomentarius* en condiciones de estrés oxidativo (por la adición de diferentes concentraciones de menadiona), observaron cambios en la actividad enzimática debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (producidas normalmente en el metabolismo celular como una consecuencia a la exposición a algún factor estresante, como cambios de temperatura, presencia de iones metálicos o agentes en el ciclo-redox).

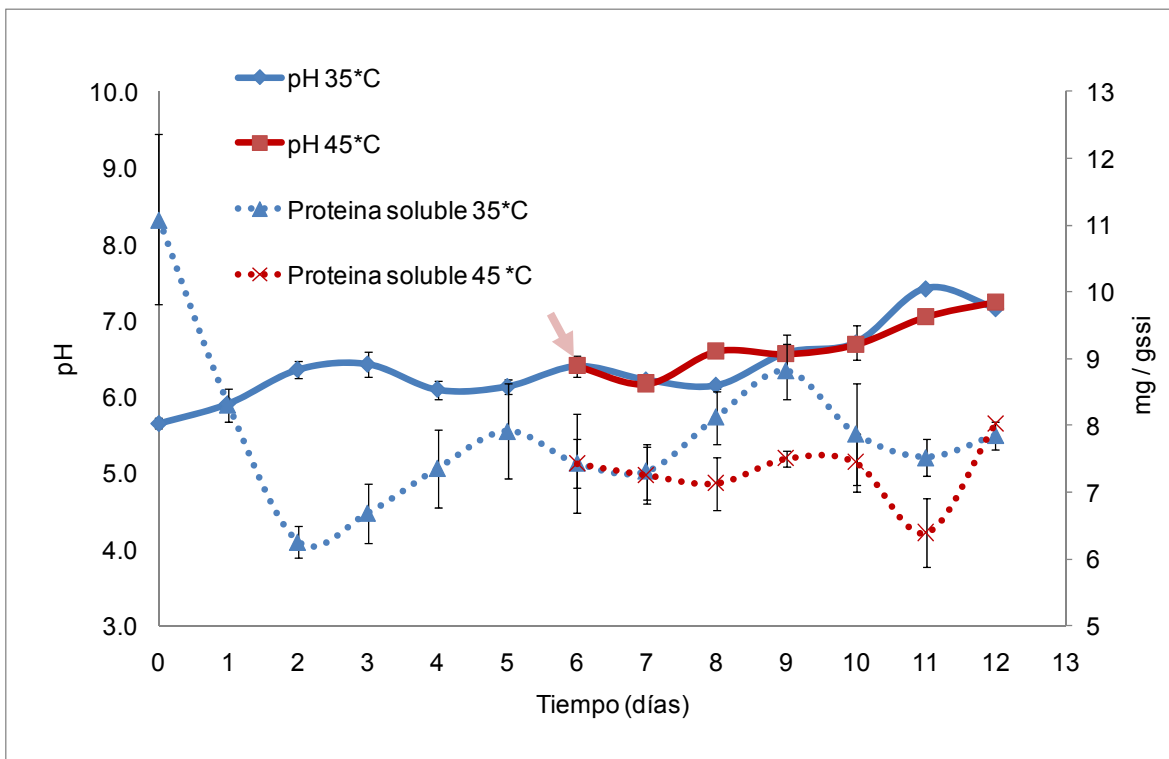


Figura 7.2. Medición de pH (líneas continuas) a 35 °C (color azul) y 45 °C (color rojo) y cuantificación de proteína soluble (líneas punteadas) a 35 °C (color azul) y 45 °C (color rojo). La flecha indica el día en que se inició el cambio de temperatura para una serie de cajas.

Ordaz (2008) en medio de cultivo sólido sobre rastrojo de maíz, obtuvo valores de proteína soluble de 11 mg/gssi a 35 °C y 8 mg/gssi a 45 °C, valores similares a los obtenidos en este trabajo, aunque con una mayor producción de lacasas (como se describirá posteriormente).

7.5. Cinéticas enzimáticas de lacasas.

Con base en los resultados obtenidos, se llevaron a cabo las cinéticas enzimáticas en medio de cultivo utilizando rastrojo de maíz como única fuente de carbono y nitrógeno. En los perfiles de producción de lacasas obtenidos durante 12 días de cultivo, en los cuales se incluye una serie de cajas a las que se cambió la temperatura de 35 a 45 °C en el día 6 (Fig. 7.3.), se observó que la producción fue significativamente diferente ($p < 0.05$) en el día 7 del cultivo, día posterior al cambio de temperatura. Este resultado es indicativo de que la temperatura tiene efecto sobre la producción de lacasas, con un incremento del 20% en la producción. En el día 11, disminuyó la actividad en un 65 % en los cultivos a 45 °C, aunque al final del cultivo (día 12) no se observó diferencia significativa respecto de los cultivos a 35 °C.

Los perfiles de actividad en ambas temperaturas no fueron diferentes. La máxima producción obtenida en este cultivo a 35 y 45 °C fue de 75 y 75.5 UI/gssi, respectivamente, lo que equivale a 0.56 y 0.565 UI/mL; en ambos casos con un pH de 6. Sin embargo, la máxima actividad se logró en menor tiempo para el cultivo de 45 °C, con un día de diferencia; es decir, sí hubo un efecto en la productividad, como se describirá más adelante.

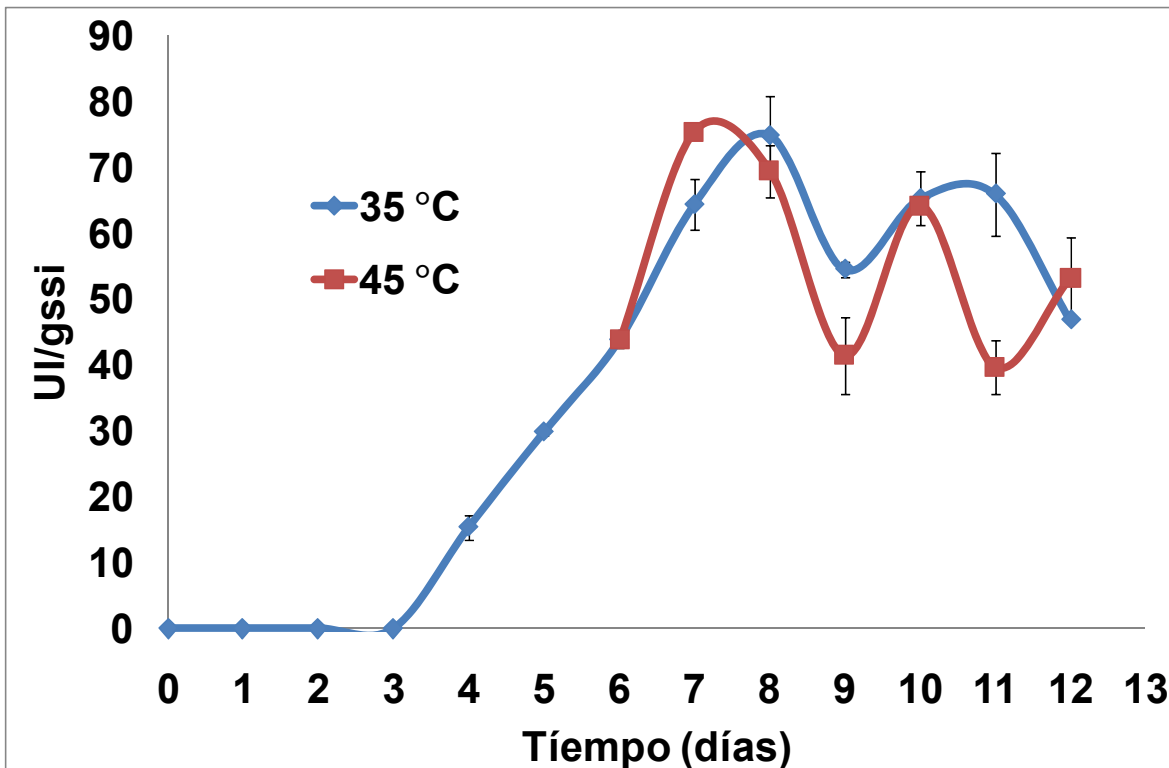


Figura 7.3. Perfiles de producción de lacasas sobre rastrojo de maíz a 35 °C (color azul) y a partir del día 6 a 45 °C (color rojo).

Existe una gran variedad de trabajos enfocados en la producción de enzimas lacasas en basidiomicetos. Elisashvili y col. (2008) trabajaron con *Fomes trogii* en cultivo sólido y sobre paja de trigo y reportaron una producción de 760 UI/L a una temperatura de 27 °C. Chawachart y col. (2004) con *Coriolus versicolor* y usando salvado de trigo y salvado de arroz en una temperatura de 37 °C, reportaron una producción máxima de 0.22 U/mL y 0.09 U/mL, para cada sustrato, respectivamente. Songulashvili y col. (2006) utilizaron residuos del grano de trigo y cultivaron *Ganoderma applanatum* y *Fomes fomentarius* con una temperatura de 25 °C: hallaron una actividad de 580 U/L para *G. applanatum* y de 960 U/L para *Fomes*, siendo estos valores similares a los reportados en el presente trabajo (aunque para una temperatura mayor). En trabajos anteriores realizados con *Fomes* sp. EUM1, Ordaz (2008) obtuvo en medio de cultivo sólido y 35 °C una actividad de 13 UI/gssi, mientras que para 45 °C la actividad fue de 10 UI/gssi. En el presente trabajo se encontró una actividad (a 45 °C) 7.5 veces mayor.

Khisti y col. (2011) reportaron que al cultivar *Aspergillus niger* NCIM 1207 a 30 °C durante los primeros 5 días y con un cambio de temperatura a 36 °C para los 6 días posteriores, la producción de β -glucosidasas y β -xilosidasas se incrementó en 1.4 veces, comparada con los cultivos que permanecen a 30 °C. Esto es debido, posiblemente, a que *A. niger* presenta una fase de crecimiento cuando el cultivo se encuentra a 30 °C y otra de producción, cuando el cultivo se cambia a 36 °C. El fenómeno del incremento en la producción enzimática debido al cambio de temperatura fue similar en el presente trabajo para el día posterior al cambio de temperatura (día 7). Por otra parte, en algunos microorganismos termofílicos se observaron modificaciones en la membrana citoplasmática que alteran el transporte de solutos como un mecanismo de adaptación a temperaturas elevadas (Konings, 2006). Pedneault y col. (2007) observaron modificaciones en la composición de ácidos grasos que conforman la membrana citoplasmática tras cultivar *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus cornucopiae* en un rango de temperaturas de 17 a 27 °C.

Los perfiles de productividad (Fig.7.4.) muestran, de igual manera, una diferencia significativa ($p < 0.05$) en el día 7, un día posterior al cambio de temperatura de 35 a 45 °C. En el día 7 se observó un incremento del 17 %, que corresponde a la máxima productividad del cultivo (10.8 UI/(gssi*d)) y un incremento del 47 % con respecto al día anterior (día 6). La membrana citoplasmática podría modificarse con el cambio de temperatura, alterando el transporte, y esto podría explicar el efecto positivo al cambiar de temperatura en *Fomes* sp. EUM1. Los perfiles de productividad para los demás días fueron similares, con una diferencia significativa ($p < 0.05$) para el día 11, al final del cultivo, en el que se apreció una pérdida del 60 % de la productividad en el cultivo de 45 °C con respecto al día anterior. Esta productividad se recuperó en el día 12.

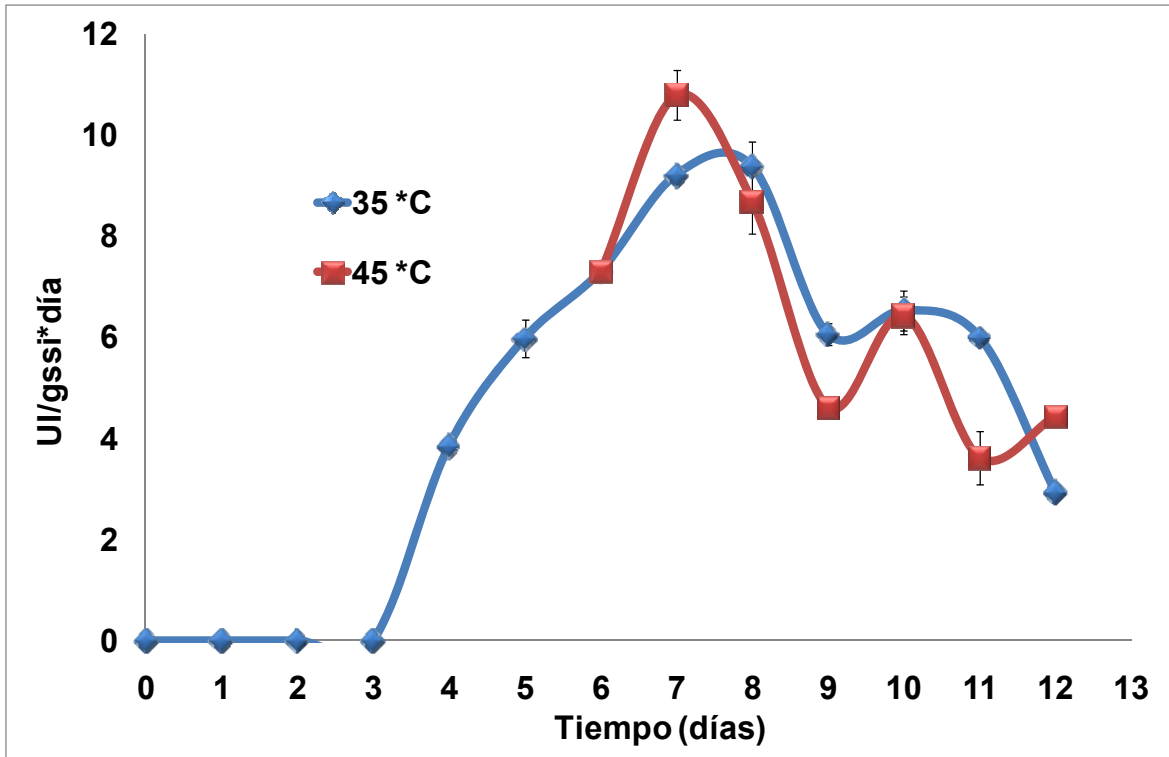


Figura 7.4. Perfiles de productividad de lacasas sobre rastrojo de maíz a 35 °C (color azul) y 45 °C (color rojo).

7.6. Actividad específica.

La actividad específica por mg de proteína soluble se calculó para ambas temperaturas (35 y 45 °C) durante los 12 días de cultivo (Fig.7.5.). Se obtuvo una diferencia significativa ($p < 0.05$) para los días 7 y 11. La actividad específica se incrementó en el día 7 al doble, con respecto al día anterior (día 6 a 35 °C), presentando la máxima actividad específica (10.4 UI/mg). Los valores de proteína soluble se mantuvieron similares para las dos temperaturas en ese día (Fig.7.2). Por otra parte, hacia el final del cultivo (día 11), se observó en los cultivos a 45 °C una disminución en la actividad del 27 % con respecto al día anterior.

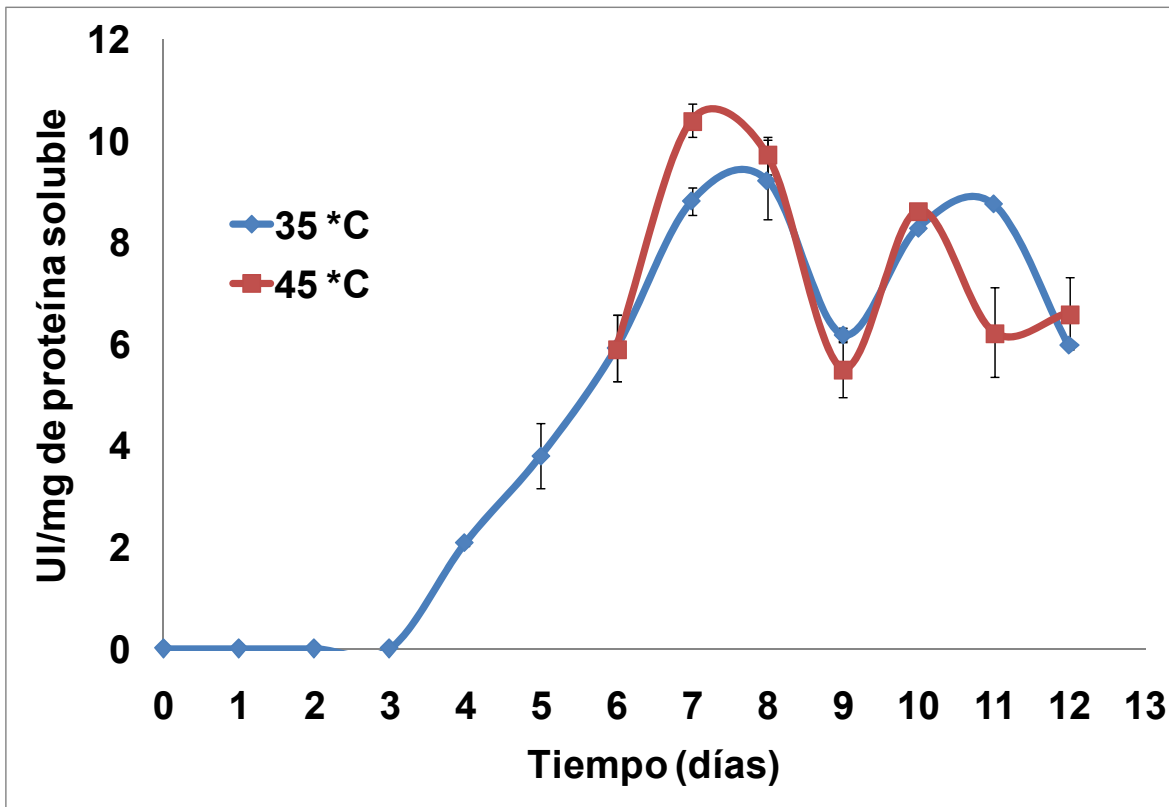


Figura 7.5. Perfiles de actividad específica de lacasas, para un cultivo mantenido a 35 °C y otro incubado a 45 °C a partir del día 6.

7.7. Determinación de proteasas.

La actividad de proteasas se determinó durante los 12 días de cultivo, en las dos temperaturas probadas, debido a que la producción de estas enzimas se ha observado como una respuesta al estrés térmico, con efecto en la producción de algunas enzimas (Parsell y Lindquist, 1993). Las proteasas presentaron un comportamiento muy distinto en ambas temperaturas, manteniendo una actividad aproximada de 5.5 UI/gssi a partir del día 7 a 35 °C, y una pérdida progresiva de actividad en el cultivo a 45°C. Ordaz (2008) reportó en *Fomes* sp. EUM1 en cultivo sólido, utilizando rastrojo de maíz como medio, una producción de proteasas mayor a 45 °C de 2 UI/gssi y de 1 UI/gssi a 35 °C, obteniendo la máxima producción en el día 6 y manteniéndose ésta hasta el día 12 en ambas temperaturas. En ese estudio la medición de proteasas en cultivos mantenidos a 40 °C fue mayor que a los 45 °C. Díaz-Godínez y col. (2001) cultivaron *Aspergillus niger* en medio sólido y líquido,

observando diferencias en la producción de proteasas en ambos medios de cultivo, con una mucho menor actividad en el caso de la fermentación sólida. En el presente estudio, la pérdida de actividad a 45 °C pudo deberse probablemente a la desnaturalización de las proteasas producidas o a la disminución de la producción (Li y col., 1997). Sin embargo, las proteasas que permanecen en este cultivo pudieran seguir siendo activas, de acuerdo a lo que se observará en la prueba de termoestabilidad de los ECE a 45 °C.

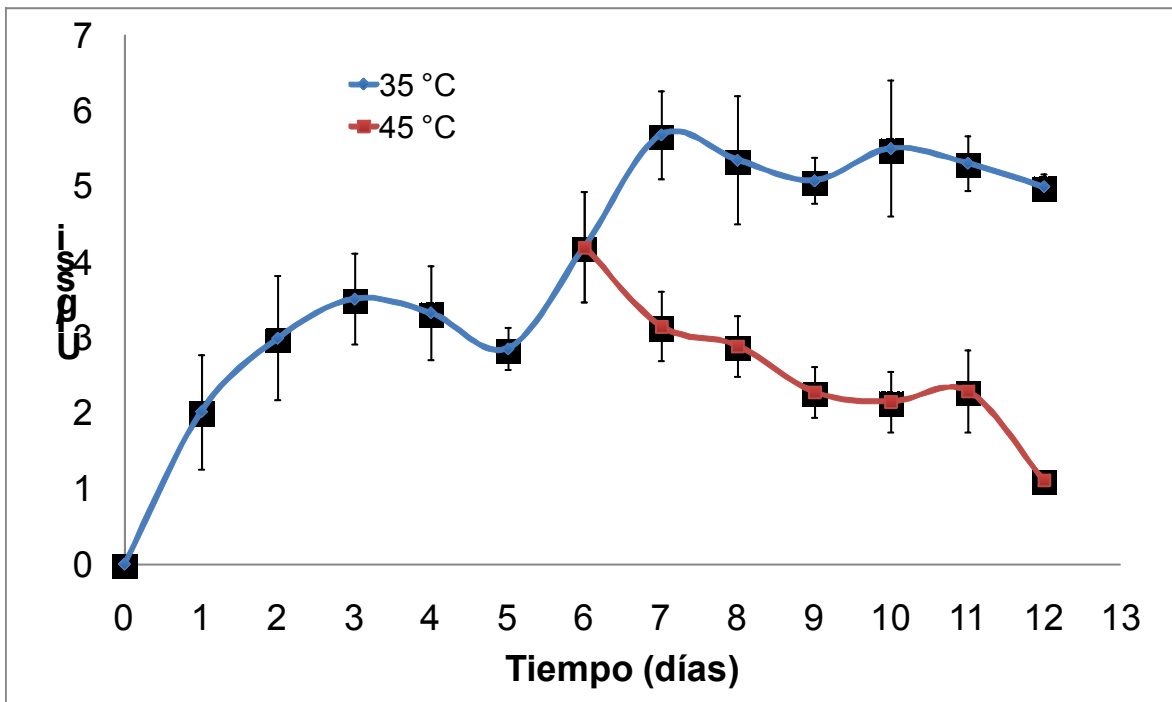


Figura 7.6. Medición de proteasas a 35 °C (color azul) y 45 °C (color rojo).

7.8. Zimogramas.

Posteriormente, tras obtener los ECE correspondientes a las dos temperaturas (35 y 45 °C), se realizaron los zimogramas de actividad lacasa, para observar la posible producción de isoenzimas. Medina (2003) al producir lacasas a diferentes temperaturas detectó la formación de isoenzimas en *Fomes* sp. EUM1. Los zimogramas se realizaron tomando muestra de los ECE producidos en los días 4 y 6 para los cultivos mantenidos a 35 °C y de los días 7, 8, 10 y 12 para ambos cultivos (35 y 45 °C). Las muestras fueron estandarizadas para un valor constante de proteína soluble (7.13 mg/gssi) y de actividad enzimática (15.4 UI/gssi), en dos geles diferentes. En trabajos anteriores se observó que *Fomes* sp. EUM1 presenta distintas isoenzimas al estar sometido a condiciones de estrés térmico (Márquez, 2006), sin embargo, en el presente trabajo, y como se observa en los zimogramas (Fig.7.7., 7.8., 7.9., y 7.10.), no se apreció otra isoenzima bajo estas condiciones, lo que es concordante con los perfiles de producción enzimática encontrados. No obstante, sí se encontraron ligeras diferencias en la intensidad de algunas bandas, lo que podría deberse a una conformación diferente de la proteína, producto de una adaptación a la temperatura del hongo (Somero, 1978).

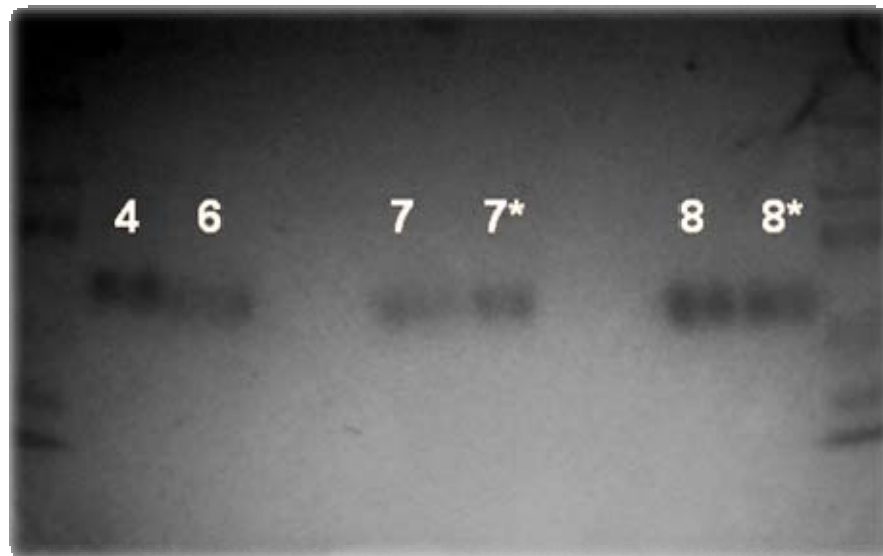


Figura 7.7. Zimograma estandarizado para 15.4 UI/gssi de actividad lacasa; días 4, 6, 7 y 8 (los números que aparecen con asterisco se refieren a las muestras provenientes de la cinética realizada a 45 °C).

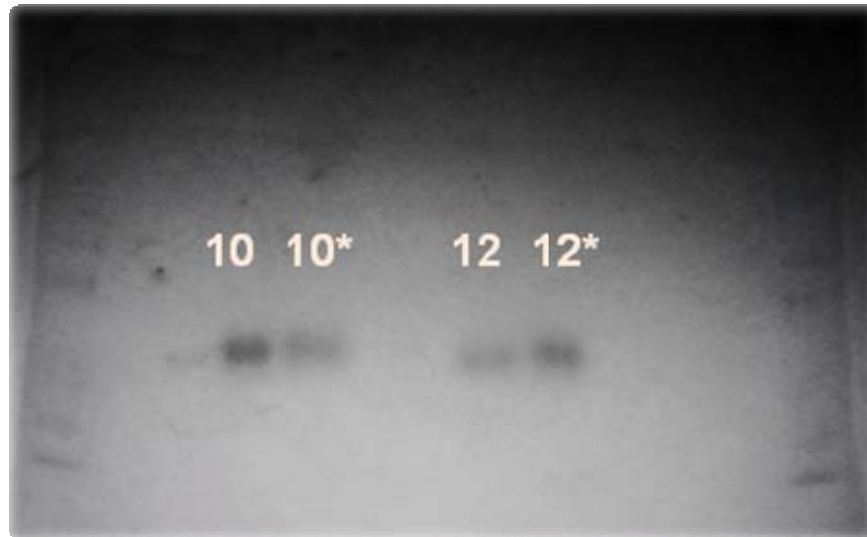


Figura 7.8. Zimograma estandarizado para 15.4 UI/gssi de actividad lacasa; días 10 y 12 (los números que aparecen con asterisco se refieren a las muestras provenientes de la cinética realizada a 45 °C).

En los zimogramas a una concentración de proteína soluble constante (5.94 UI/mL) se observaron ligeras diferencias en los días 7 y 8, con una mayor intensidad, probablemente debido a que éstos fueron los días en los que se obtuvo una mayor producción (día 7 a 45 °C y día 8 a 35 °C). Las bandas de 45 °C son ligeramente más delgadas, posiblemente por una conformación de la enzima diferente debido a la temperatura en que se encuentra el hongo. Para los días 10 y 12, en los que la producción de lacasas fue similar, no se observaron diferencias.

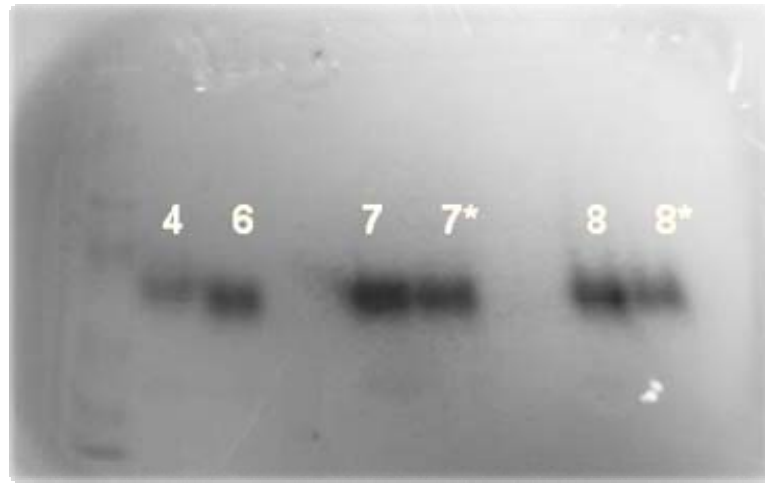


Figura 7.9. Zimograma estandarizado para 7.13 mg/gssi de proteína soluble; días 4, 6, 7 y 8 (los números que aparecen con asterisco se refieren a las muestras provenientes de la cinética realizada a 45 °C).

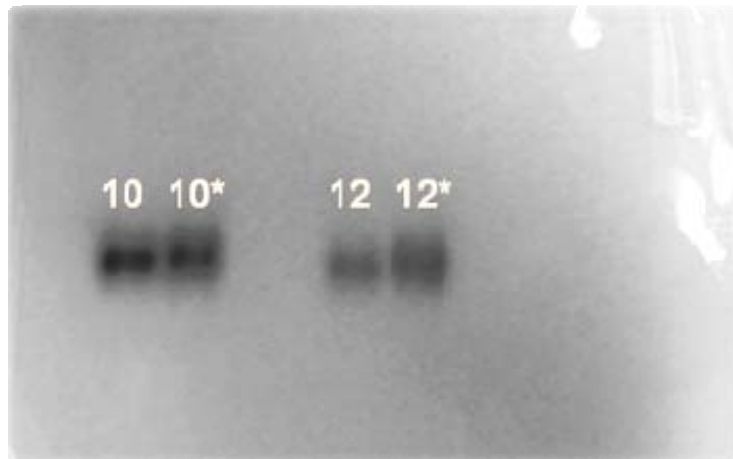


Figura 7.10. Zimograma estandarizado para 7.13 mg/gssi de proteína soluble; días 10 y 12 (los números que aparecen con asterisco se refieren a las muestras provenientes de la cinética realizada a 45°C).

7.9. Determinación de termoestabilidad.

Con la finalidad de conocer la estabilidad de la actividad de los ECE obtenidos a 35 °C y 45 °C y las posibles diferencias entre ellos en estas condiciones, se realizaron análisis de termoestabilidad de los extractos crudos enzimáticos producidos a las siguientes temperaturas 40, 45, 50, 60 y 70 °C.

Los ECE obtenidos a 35 y 45 °C, mantuvieron el 100% de actividad durante 36 horas para la temperatura de 40 °C. En contraste, no se detectó actividad después de 30 minutos a 70 °C. En las Figuras 7.11, 7.112 y 7.13 se presentan los resultados experimentales obtenidos y el modelo al que se ajustaron los datos de las pruebas de termoestabilidad.

La termoestabilidad a 45 °C (Fig.7.11) de los ECE obtenidos de los cultivos a 35 °C y 45 °C fue similar. Sin embargo, el ECE producido en el cultivo de 45 °C tuvo una actividad residual menor durante todo el análisis, con una pérdida, mayor del 40% en la actividad residual a las 36 h, mientras que el ECE producido en el cultivo de 35 °C tuvo una pérdida de sólo el 10 % después de 36 h. Esto es posiblemente debido a que el ECE producido a 35 °C se encontraba a menor temperatura, pudiendo de esta forma mantener una conformación más estable que el ECE producido a 45 °C.

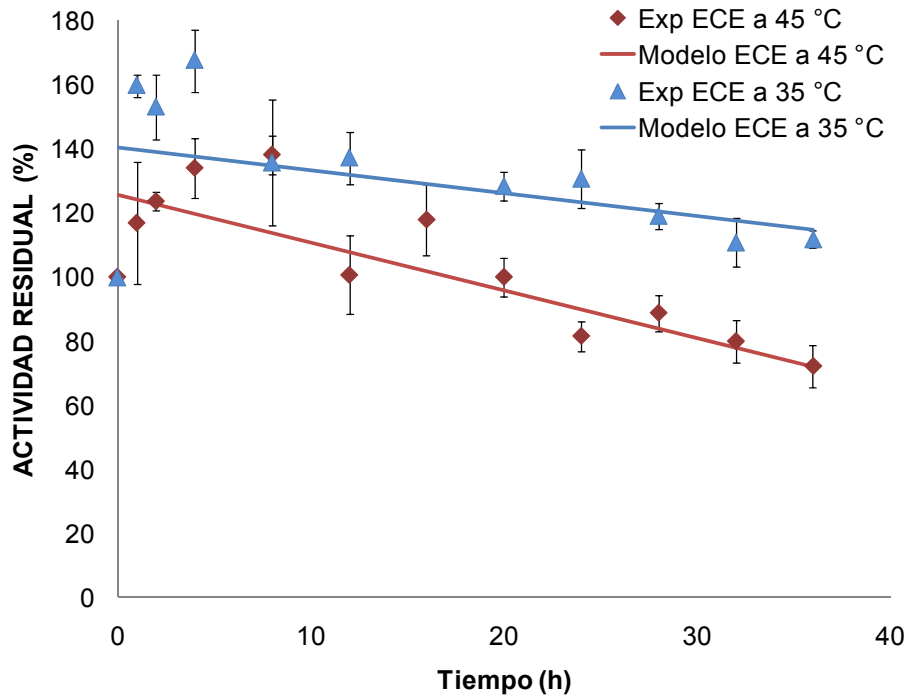


Figura 7.11. Perfiles de termoestabilidad a 45 °C para los ECE de 35 °C (color azul) y 45 °C (color rojo), presentando los datos experimentales (triángulos y rombos) y el modelo lineal ajustado (línea continua)

En la figura 7.12. y 7.13. se muestra la estabilidad a 50 °C y 60 °C, con perfiles muy similares, lo que reafirma los resultados obtenidos en los zimogramas (Fig. 7.7, 7.8., 7.9. y 7.10.), en donde se observó solamente un tipo de isoenzima.

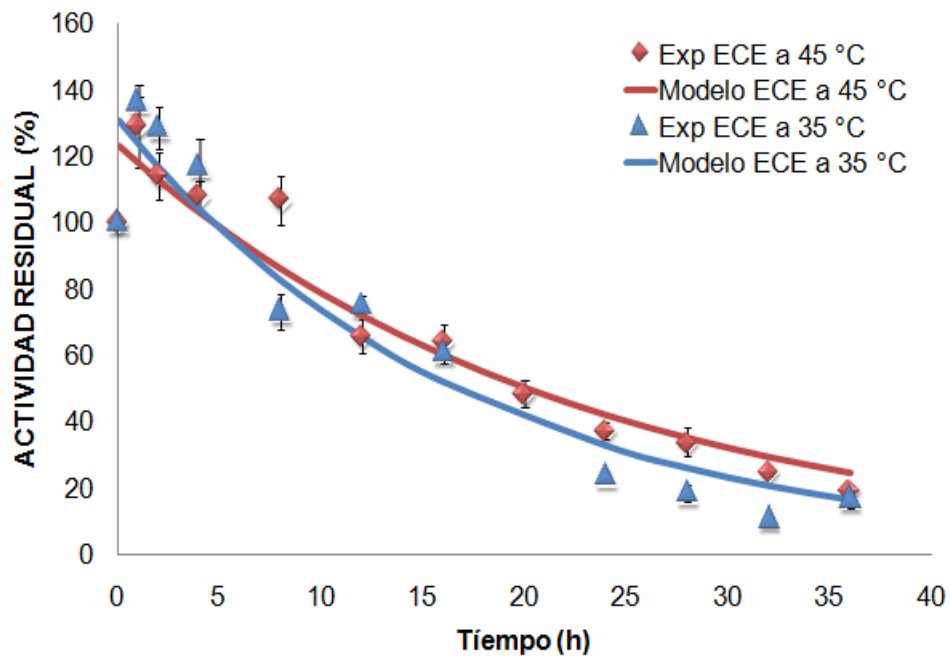


Figura 7.12. Perfiles de termoestabilidad a 50 °C para los ECE de 35 °C (color azul) y 45 °C (color rojo), presentando los datos experimentales (triángulos y rombos) y el modelo exponencial ajustado (línea continua).

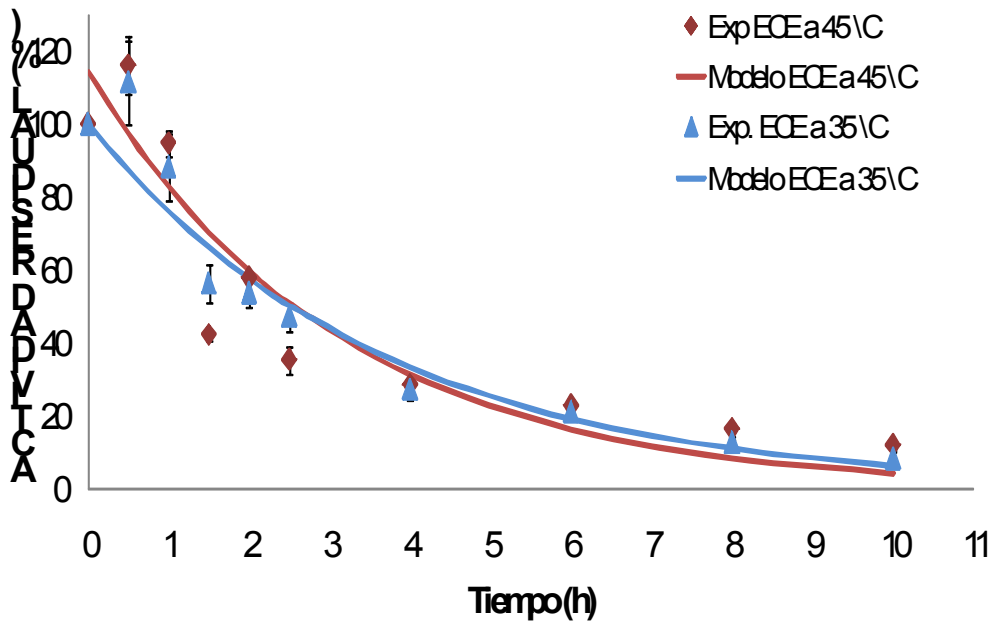


Figura 7.13. Perfiles de termoestabilidad a 60 °C para los ECE de 35 °C (color azul) y 45 °C (color rojo), presentando los datos experimentales (triángulos y rombos) y el modelo exponencial ajustado (línea continua).

En la Tabla 7.3. se muestran los parámetros de estabilidad obtenidos de los ECE producidos a 35 y 45 °C. Se observa una constante de inactivación similar para ambos ECE durante las pruebas de termoestabilidad a las temperaturas de 45, 50 y 60 °C. Los resultados anteriores concuerdan con la producción enzimática, así como con los zimogramas llevados a cabo. Sin embargo, es interesante observar que ambos ECE sí presentaron diferencias respecto de la producción de proteasas, al comparar los niveles de las mismas obtenidos a las dos temperaturas (Fig.7.6). Esto muestra que las lacasas producidas en estas condiciones son resistentes al ataque proteolítico, en especial las producidas a 35 °C.

Tabla 7.3 Parámetros de estabilidad

ECE	T (°C)	k	t _{1/2} (h)
35 °C	45	-0.904 (U/h)	98.4
	50	-0.058 (h ⁻¹)	12
	60	-0.324 (h ⁻¹)	2.5
45 °C	45	-1.386 (U/h)	42.2
	50	-0.045 (h ⁻¹)	15.3
	60	-0.277 (h ⁻¹)	2.1

Los datos de termoestabilidad a 45 °C se ajustaron a un modelo de decaimiento lineal: $S = a - k \cdot t$, mientras que a las demás temperaturas los datos se ajustaron a un modelo de decaimiento exponencial de primer orden $S = S_0 e^{-k \cdot t}$. k es la constante de decaimiento para el modelo lineal (U/h, donde U representa el porcentaje de actividad residual que se pierde) y para el modelo de primer orden (h⁻¹); $t_{1/2}$ es el tiempo de vida media (h).

Papinutti y col. (2008) realizaron un análisis de termoestabilidad a 50 °C de ECE obtenidos de *Fomes sclerodermeus* en cultivo sólido, utilizando salvado de trigo, observando una pérdida de actividad de las lacasas después de 6 h. Neifar y col. (2010) midieron la termoestabilidad de lacasas producidas por *Fomes fomentarius* en salvado de trigo, a una temperatura de 60 °C, obteniendo una vida media de 66 minutos. Haibo y col. (2009) obtuvieron una vida media de 5 h a 60 °C, con lacasas producidas por *Trametes hirsuta* en cultivo sólido con salvado de trigo. En este sentido, los parámetros de termoestabilidad encontrados en este trabajo fueron mayores, hasta en un 100%, a los reportados anteriormente para el hongo *Fomes* sp. EUM1.

7.10. Parámetros morfológicos a 35 y 45 °C.

Debido a que los resultados obtenidos indican que posiblemente sólo existe un tipo de isoenzima en las condiciones probadas, pero la producción de las lacasas prácticamente se mantiene a las dos temperaturas, se observaron los posibles cambios en la morfología que permitían este suceso debido a que Cox y col. (1998) observaron una posible relación entre la morfología de hongos filamentosos y la producción de enzimas. Por esta razón, se realizó la medición de parámetros morfológicos (velocidad de crecimiento radial, Fig.7.12; longitud hifal distal, Fig.7.13; diámetro hifal, Fig.7.14.) en las temperaturas en las que se cultivó el hongo para la producción de lacasas (35 y 45 °C).

En las mediciones llevadas a cabo para la velocidad de crecimiento radial, se encontró una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre ambas temperaturas, observándose una mayor velocidad de crecimiento radial (260 $\mu\text{m/h}$) para el cultivo mantenido a 35 °C en comparación con el de 45 °C (194 $\mu\text{m/h}$). La disminución en la velocidad radial de crecimiento a 45 °C posiblemente se deba a que el aumento de la temperatura induciendo un requerimiento mayor de la energía de mantenimiento, provocando la disminución de la velocidad radial de crecimiento.

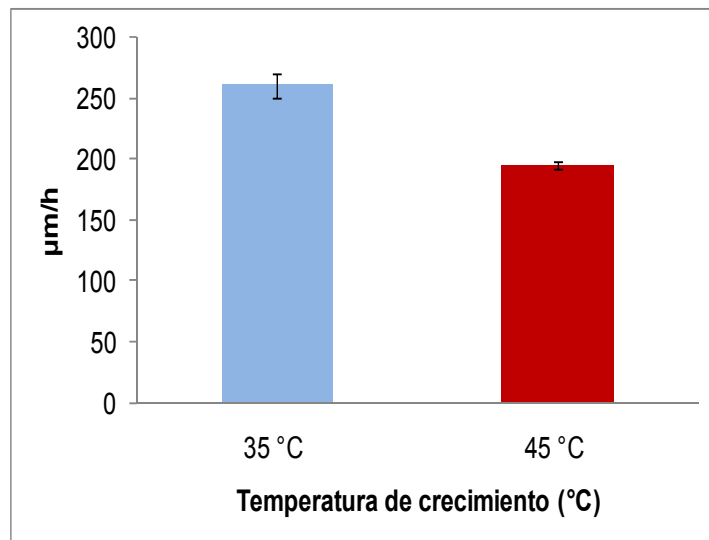


Figura 7.14. Velocidad de crecimiento radial obtenida a 35 y 45 °C.

Sánchez y col. (2004) mencionaron en un trabajo realizado con *Pleurotus pulmonarius* que la mayor producción de lacasas se localiza en la periferia de la colonia, por lo que posibles modificaciones en esta zona pudieran explicar diferencias en la actividad de lacasas.

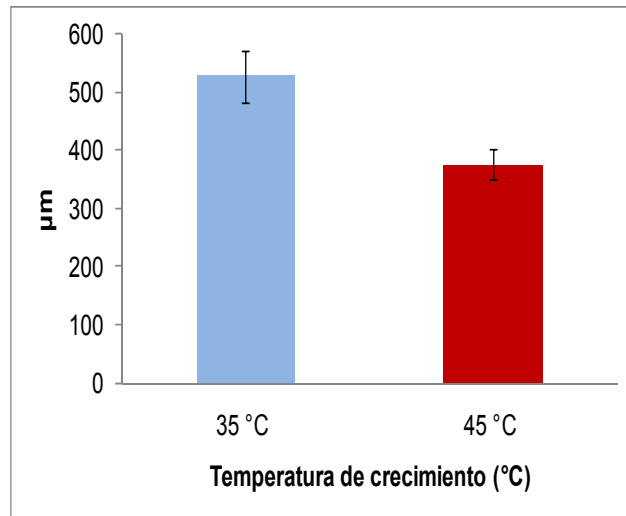


Figura 7.15. Longitud promedio hifal distal obtenida a 35 °C (color azul) y 45 °C (color rojo).

En la medición realizada al final del cultivo (día 6), se halló una diferencia significativa ($p < 0.05$) en la longitud hifal distal (Fig.7.13) para las dos temperaturas analizadas (35 y 45 °C). A 35 °C se obtuvo una longitud hifal distal de 526 µm, equivalente a una frecuencia de ramificación de 0.494 h^{-1} , mientras que a 45 °C se alcanzó una longitud máxima de 375 µm, dando una frecuencia de ramificación de 0.528 h^{-1} . Estos resultados indican que la densidad micelial es similar cuando el hongo crece a ambas temperaturas, pero que se produce menos biomasa (menor V_r , Fig. 7.15) a 45 °C, a pesar de que la producción de lacasa se mantiene.

Los resultados obtenidos para 35 °C fueron similares a los reportados previamente para *Fomes* sp. EUM1. No se habían obtenido datos para 45 °C en cuanto a la longitud y diámetro hifal. Sin embargo, Ordaz y col. (2011) observaron que al aumentar la temperatura, la longitud hifal se incrementó, a diferencia de lo que se describe en el presente trabajo, en el que al aumentar la temperatura disminuyó la

longitud hifal. Por otra parte, no se observaron diferencias en la medición del diámetro hifal para las dos temperaturas, lo que concuerda con el trabajo anterior llevado a cabo con *Fomes* sp. EUM1.

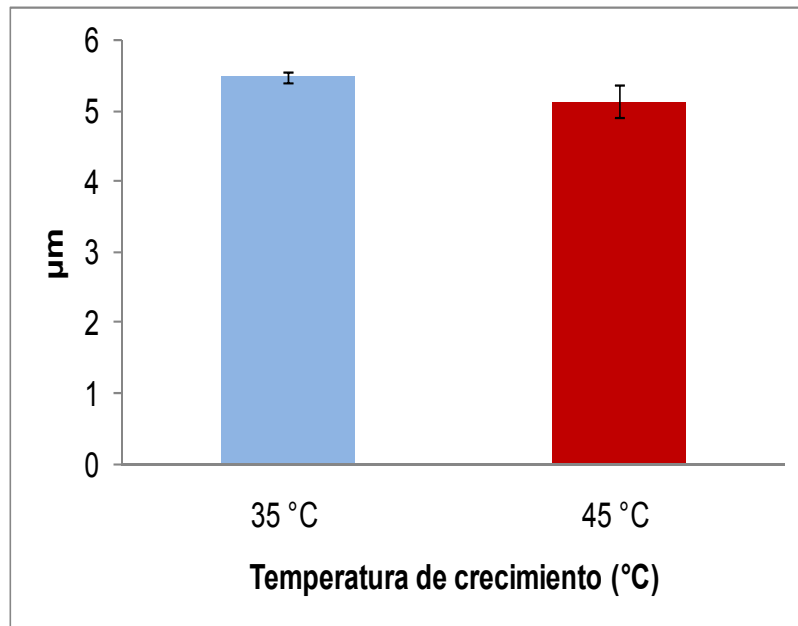


Figura 7.16. Diámetro promedio hifal distal obtenido a 35 °C (color azul) y 45 °C (color rojo).

Estos cambios morfológicos, generados como respuesta al estrés térmico, ya habían sido observados en *Fomes* sp. EUM 1 como una forma de adaptación, en especial cuando se cultiva el hongo a temperaturas más altas a la óptima de crecimiento (30 °C). Ordaz y col. (2011) observaron que la modificación en la ramificación de las hifas podría estar relacionada con la mejora en la asimilación de nutrientes, además los eventos relacionados con la fusión de hifas son importantes para el intercambio de nutrientes y señales entre las hifas en diferentes regiones de la colonia. En el presente trabajo se observó una frecuencia de ramificación ligeramente mayor en el cultivo de 45°C, posiblemente responsable de un mayor intercambio de señales y nutrientes, debido al estrés en que se encuentra el hongo. De acuerdo con Bocking y col. (1999), una mayor ramificación se asocia a una mayor producción de α -amilasa. A pesar de que en el presente trabajo no hay un aumento sustancial en la frecuencia de ramificación, se mantienen los perfiles de producción de lacasa a 45 °C (Fig. 7.3), confirmando la termotolerancia del hongo y su capacidad de producir enzimas en tales condiciones.

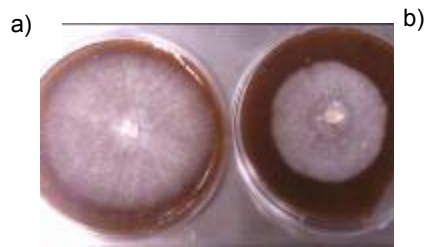


Figura 7.17. Cultivo superficial de *Fomes* sp. EUM1 en medio suplementado con rastrojo de maíz después de 6 días: a) 35 °C y b) 45 °C

8. CONCLUSIONES.

- La conservación de *Fomes* sp. EUM1 sobre tiras de papel es adecuada para tiempos cortos, menores a 5 meses.
- Los perfiles de producción enzimática realizados con ABTS y siringaldazina fueron similares, lo que confirma la detección específica de lacasas.
- La producción y productividad de lacasas se incrementó solamente en las primeras 24 horas posteriores al cambio de temperatura, manteniéndose similar para los demás días en las dos temperaturas probadas. Es decir, la respuesta difiere, comparando el patrón de lacasa observado en cultivos mantenidos a temperatura constante desde el inicio.
- Los ECE producidos a 35 y 45 °C presentan termoestabilidad similar, lo que aunado con que en los perfiles de zimografía sólo se visualiza una sola banda permite afirmar que *Fomes* sp. EUM1 no produce isoenzimas de lacasa distintas como respuesta al aumento en el estrés térmico al pasar de 35 a 45 °C.
- Las lacasas producidas en estas condiciones son estables aún en presencia de proteasas, cuya actividad sí responde al incremento del estrés térmico. Sin embargo, la respuesta proteolítica no es proporcional a este incremento.
- El análisis morfométrico confirmó que el hongo disminuye su velocidad de crecimiento radial, aunque el número de puntas que secretan enzimas (medidas como la frecuencia de ramificación) es similar en las dos temperaturas. Esto explicaría por qué se mantiene la producción de lacasas al aplicarse el estrés térmico.

PERSPECTIVAS.

De acuerdo con los datos obtenidos en este trabajo, se observó que el hongo *Fomes* sp. EUM1 presenta una lacasa estable a la temperatura y a la actividad proteolítica, por lo que es necesario realizar estudios sobre la producción y estabilidad de las propias proteasas producidas en diferentes condiciones de temperatura.

Debido a que en este trabajo la producción de proteasas a 45 °C disminuyó en comparación del cultivo a 35 °C, sin afectar la producción de lacasas, estudios de producción y termoestabilidad de proteasas en condiciones estresantes y no estresantes podrán ayudar al esclarecimiento de la disminución de proteasas en un estado de mayor estrés térmico.

Por otra parte, para entender los posibles cambios morfológicos y su relación con las proteasas producidas al cambio de temperatura, se podría analizar la expresión de genes relacionados con estos procesos, identificando aquellos inducibles por un estrés térmico progresivo.

9. REFERENCIAS.

1. Arana-Cuenca, A., Roda, A., Téllez, A., Loera, O., Carbajo, J.M., Terrón, M.C., González, A.E., 2004. Comparative analysis of laccase-isozymes patterns of several related Polyporaceae species under different culture conditions. *Journal. Basic Microbiology* 44 (2), 79-87.
2. Baldrian P., 2005 Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviu* 30, 215–242
3. Berka R., Schneider P., Golightly E., Brown S., Madden M., Brown K., Halkier T., Mondorf K., Xu F., 1997. Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*. *Applied Environmental Microbiology* 63, 3151–3157.
4. Bhavdish N., Jain S., Chouhan S., 1985. Enzymes from thermophilic fungi: proteases and lipases. *Indian Academy Science. (Plant Sci.)*, Vol. 94, Nos 2 & 3
5. Borman A., Szekely A., Campbell C., 2006. Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. *Mycopathologia* 161 (6): 361-368.
6. Bourbonnais R., Pice M., Freiermuth B., Bodie E., Borneman S., 1997. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied Environmental Microbiology* 63 (12): 4627-4632.
7. Bradford M., 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
8. Brijwani K., Oberoi H., Vadlani P., 2010. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. *Process Biochemistry*, 45 (1), 120-128.
9. Camarero S., Ibarra D., Martinez M., Martinez, A., 2005. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolourization of different types of recalcitrant dyes. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 1775-1784.
10. Campbell W., 1938. The cultural characteristics of the species of *Fomes*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 65, 31--69.

11. Chawachart N., Khanongnuch C., Watanabe T., Lumyong S., 2004. Rice bran as an efficient substrate for laccase production from thermotolerant basidiomycete *Coriolus versicolor* strain RC3. *Fungal Diversity* 15:23-32.
12. Corner E. 1932. A *Fomes* with two systems of hyphae. *Transactions of the British Mycological Society* . 17: 51-81.
13. Cox P. W., Paul C., Thomas C., 1998. Image analysis of the morphology of filamentous micro-organisms. *Microbiology*, 144, 817–827.
14. Crestini C., Kovac B., Giovannozzi-Sermanni G., 1996. Production and isolation of chitosan by submerged and solid-state fermentation from *Lentinus edodes*. *Biotechnology Bioengineering* 50, 207–210.
15. Díaz-Godínez G., Soriano J., Augur C., Viniegra-González G., 2001. Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. *Journal of industrial microbiology and biotechnology* 26:271–275
16. Elisashvili V., Kachlishvili E., 2009. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white rot basidiomycetes. *Journal of Biotechnology* 144:37–42
17. Elisashvili V., Kachlishvili E., Penninckx M., 2008. Lignocellulolytic enzymes profile during growth and fruiting of *Pleurotus ostreatus* on wheat straw and tree leaves. *Journal Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 55(2): 157-168.
18. Fischer B., Rummel G., Aldridge P. y Jenal U., 2002. The FtsH protease is involved in development stress response and heat shock control in *Caulobacter crescentus* *Molecular Microbiology* 44(2), 461–478.
19. Frioni L. 1999. *Procesos Microbianos Tomo II*. Editorial de la fundación Universidad Nacional de Río Cuarto (Córdoba). 286 p.
20. Garcia-Carreño, F.L., 1996. Proteinase inhibitors. *Trends Food Science Technol.* 7, 197–204.
21. Haibo Z., Yinglong Z., Feng H., Peiji G., Jiachuan C., 2009. Purification and characterization of a thermostable laccase with unique oxidative characteristics from *Trametes hirsuta*. *Biotechnology Letters*. 31:837–843.
22. Harald, C. 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*. 35:93-96.
23. Harkin J., Obst J., 1973. Syringaldizine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi. *Experientia*. 29, 381 -387.

24. Hawksworth D., Kirsop B., 1988. Living Resources for Biotechnology. Filamentous Fungi. 209 pp. Cambridge: Cambridge University Press.
25. Herrera T., Ulloa M., 2004. El reino de los hongos, Micología Básica y aplicada. Ed. Fondo de cultura económica. México D.F. Varias páginas.
26. Hibbett D., Binder M., 2002. Evolution of complex fruiting body morphologies in homobasidiomycetes. *Proceedings of the Royal Society B*: 269:1963-1969.
27. Hildén K., Hakala K., Lundell T. 2009. Thermotolerant and thermostable laccase. *Biotechnology Letters* 311:1117:1128.
28. Jaszek M., Grzywnowicz K., Malarczyk E., Leonowicz A., 2006, Enhanced extracellular laccase activity as a part of the response system of white rot fungi: *Trametes versicolor* and *Abortiporus biennis* to paraquat-caused oxidative stress conditions. *Pesticide Biochemistry and Physiology* , 85, 147-154
29. Kapich A., Prior B., Botha A., Galkin S., Lundell T., Hatakka A., 2004. Effect of lignocellulose-containing substrate on production of ligninolytic peroxidases in submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium* ME-446. *Enzyme Microbiology. Technology*. 34, 187–195.
30. Khisti U., Kulbushan B., Gokhale D., 2011. Hyper-production of β -glucosidase an β -xylosidase by *Aspergillus niger* NCIM 1207 in xylan-containing media. *BioResources* 6 (2), 2066-2076.
31. Kiiskinen L., Kristiina K., Michael B., Erkkö Y., Matti S., Markku S., 2004. Expression of *Melanospora albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme. *Microbiology*, 150: 3065-3074.
32. Kirk P., Cannon P., David J., Stalpers J., 2001. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi, 9th ed. CAB International, Wallingford, UK
33. Kohlmeyer J., Kohlmeyer E., 1979. Marine Mycology. The Higher Fungi. Academic Press, NewYork.
34. Konings N., 2006. Microbial transport: adaptations to natural environments. *Antonie Van Leeuwenhoek* 90: 325–342.
35. Kuhad R., Singh A., Eriksson K., 1997. Microorganisms and their enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. *Advance Biochemistry Engineering. Biotechnology*. 57, 47–125.

36. Kunamneni A., Camarero S., Garcia-Burgos C., Plou F., Ballesteros A., Alcalde M., 2008. Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microbial cell Factories* 7:32.
37. Larralde-Corona C., Lopez-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. Bioengineering.* 56 287–294.
38. Lastra L., Hajek A., Humber R., 2002. Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. *Canadian Journal of Botany* 80: 1126–1130.
39. Lee K., Yu S., Liu P., 1997. Alkaline serine protease is an exotoxin of *Vibrio alginolyticus* in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Current Microbiology* 34:110–117.
40. Leonowicz A., Grzywnowicz K., 1980. Quantitative estimation of laccase forms in some white rot fungi using syringaldazine as a substrate. *Enzyme Microbiology Technology* 3:55–58
41. Li D., Yang Y-J, Shen C-Y., 1997. Protease production by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Mycological Research.* 101 (1), 18-22.
42. Li-Qiong G., Shuo-Xin L., Xiao-Bing Z., Zi-Rou H., Jun-Fang Lin., 2011. Production, purification and characterization of a thermostable laccase from a tropical white-rot fungus. *World Journal Microbiology Biotechnology* 27:731–735
43. Litthauer D., Vuuren M., Tonder A., Wolfaardt F., 2007. Purification and kinetics of a thermostable laccase from *Pycnoporus sanguineus* (SCC 108). *Enzyme Microbiology Technology* 40:563–568.
44. Loera O., Pérez C., Barbosa J., Villaseñor F. 2006. Laccases. *Advances in Agricultural and Food Biotechnology.* ISBN: 81-7736-269-0 Ed. Guevara-González R., Torres-Pacheco I., pag. 323-340.
45. Maheshwari R., Bharadwaj G., Mahalingeshwara K., 2000. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews,* September, vol. 64, no. 3, p. 461-488.
46. Márquez O., 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.

47. Márquez O., 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.
48. Mayer M., Staples C., 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*. 60:551-565.
49. McCarthy J., Islam A., 2000. Lignin chemistry, technology and utilization; a brief history. In: Glasser W., Northey G., Schultz T., (Eds.), *Lignin Historical, Biological, and Materials Perspectives*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 2–99
50. Medina E., 2003. Caracterización de lacasas producidas por un hongo termofílico silvestre aislado a partir de desechos lignocelulósicos. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F.
51. 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: 7842-7847.
52. Mikolasch A., Schauer F., 2009. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 82: 605-624
53. Morimoto R., 1998 Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators *Genes and Development* 12:3788–3796
54. Morozova O., Shumakovich G., Gorbacheva M., Shleev S., Yaropolov A., 2007. “Blue” laccases. *Biochemistry Moscow*.72:1136–1150
55. 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 of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 64, 68–74.
56. Niku-Paavola M., Fagerstrom R., Kruus K., Viikari L., 2004. Thermostable laccase from the white-rot fungus *Peniophora* sp. *Enzyme and Microbial Technology* 35, 100–102.

57. Ohkuma M., Maeda Y., Johjima T., Kudo T., 2001. Lignin degradation and roles of white rot fungi: study on an efficient symbiotic system in fungus-growing termites and its application to bioremediation. *Riken Review*, 42,39 – 42.
58. Ordaz A., 2008. Efecto de la temperatura en la producción de enzimas lignocelulolíticas por *Trametes* sp. EUM1 en cultivo sólido. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F.
59. Ordaz A., Favela E., Meneses M., Mendoza G., Loera O., 2011. Hyphal morphology modification in the thermal adaptation by the white rot fungus *Fomes* sp. EUM1. *Journal of basic Microbiology*
60. Papinutti L., Dimitriu P., Forchiassin F., 2008. Stabilization studies of *Fomes sclerodermeus* laccases. *Bioresour. Technology* 99, 419–424.
61. Parsell D., Lindquist S., 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annual Review of Genetics* 27: 437-496
62. Pedneault K., Angers P., Gosselin A., Tweddell R., 2007. Fatty acid profiles of polar and non-polar lipids of *Pleurotus ostreatus* and *P. cornucopiae* var. 'citrinopileatus' grown at different temperatures. *Mycological Research* (10), 1228–1234.
63. Rajasekaran A., Maheshwari R., 1993. Thermophilic fungi: an assessment of their potential for growth in soil. *Journal of Biosciences* 18, 345-354.
64. Sánchez C., Tellez-Tellez M., Díaz-Godínez G., Moore D., 2004. Simple staining detects ultrastructural and biochemical differentiation of vegetative hyphae and fruit body initials in colonies of *Pleurotus pulmonarius*. *Letters in Applied Microbiology* 38: 483-487
65. 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: 412-418.
66. Somero G., 1978. Temperature adaptation of enzymes: biological optimization through structure-function compromises. *Annual Review of Ecology and Systematic*. 9: 1-19.
67. Songulashvili G., Elisashvili V., Wasser S., Nevo E., Hadar Y., 2006. Laccase and manganese peroxidases activities of *Phellinus robustus* and *Ganoderma*

- adpersum* grown on food industrywastes in submerged fermentation. Biotechnology Letters. 28, 1425–1429.
68. Téllez-Téllez M., Sánchez C., Loera O., Díaz-Godínez G., 2005. Differential patterns of constitutive intracellular laccases of the vegetative phase of *Pleurotus* species. Biotechnology Letters 27: 1391–1394
 69. Tlecuítl-Beristain S., Sanchez C., Loera O., Robson G., Diaz-Godinez G., 2008. Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: production of a novel laccase isoform. Mycology Resource, 112: 1080-1084.
 70. Tuomela M., Vikman M., Hatakka A., Itävaara M., 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. Bioresource Technology 72 169-183
 71. Turner P., Mamo G., Karlsson E., 2007. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. Microbial Cell Factories
 72. Wang F., Guo C., Yang L.-r., Liu C.-Z., 2010. Magnetic mesoporous silica nanoparticles: fabrication and their laccase immobilization performance, Bioresource Technology. 101, pp. 8931–8935.
 73. Widsten P., Kandelbauer. 2008. Laccase applications in the forest products industry: A review. Enzyme and Microbial Technology. 42:293-307.
 74. Xu F. 1996. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. Biochemistry. 35, 7608–7614.
 75. Yano J., Poulos T., 2003. New understandings of thermostable and piezostable enzymes. Current Opinion in Biotechnology. 14: 360–365.
 76. Bocking S., Wiebe M., Robson G., Hansen K., Christiansen L., Trinci A., 1999. Effect of branch frequency in *aspergillus oryzae* on protein secretion and culture viscosity. Biotechnology and Bioengineering Volume 65.

ANEXO I

- Curva patrón de albúmina sérica bovina (ASB)

Se preparó una solución de ASB de 1 mg/mL, diluyendo 0.1 g de ASB en 100 mL de agua. Posteriormente se tomó un volumen de 2.5 mL de esta solución y se diluyó con agua destilada hasta 50 mL en un matraz aforado, para obtener una concentración final de 50 µg/mL(*). A partir de esta solución se realizó una serie de diluciones con agua destilada para obtener un intervalo de concentraciones de ASB de 1 a 10 µg/mL. Para iniciar la reacción, se agregó el reactivo de Bradford en cada una de las concentraciones evaluadas. Después de 5 min de reacción a temperatura ambiente se determinó la absorbancia a 595 nm utilizando como blanco la solución sin ASB. La curva se realizó por duplicado.

Tabla 1. Volumen de reactivos empleados para la curva patrón de BSA

Tubo	BSA* (µL)	Agua (µL)	R. Bradford (µL)	[BSA] (µg/mL)
Blanco	0	800	200	0
1	20	780	200	1
2	40	760	200	2
3	60	740	200	3
4	80	720	200	4
5	100	700	200	5
6	120	680	200	6
7	140	660	200	7
8	160	640	200	8
9	180	620	200	9
10	200	600	200	10

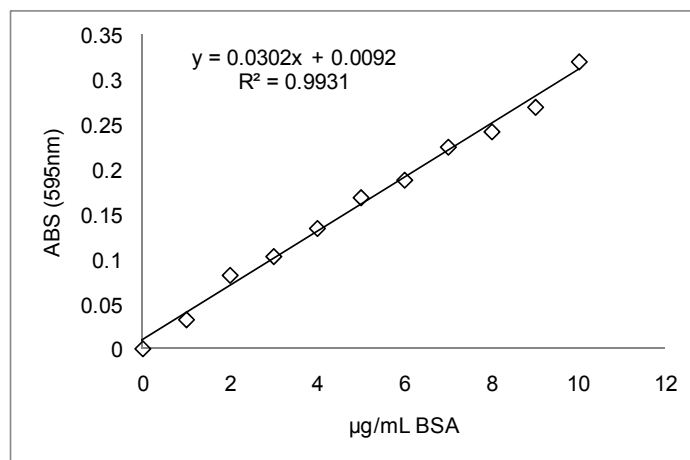


Figura. A1. Curva patrón de albúmina sérica bovina. (□) Datos experimentales, (—) Modelo lineal

- Curva patrón de proteasas.

Se preparó una solución de tirosina a 160 µg/mL, diluyendo 16 mg de tirosina en 100 mL de HCl 0.1 N. A partir de esta solución se realizó una serie de diluciones con agua destilada para obtener un intervalo de concentraciones de tirosina de 16 a 160 µg/mL. Posteriormente, se tomaron diferentes volúmenes, de acuerdo con la tabla 2, depositándose en tubos de ensayo (cada concentración se evaluó por triplicado). Finalmente se les midió la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm, utilizando para ello una celda de cuarzo.

Tabla 2. Volumen de reactivos empleados para la curva patrón de proteasas.

V _{H₂O} (µL)	V _{Tyr} (µL)	[Tyr] (µg/mL)
1000	0	0
900	100	16
800	200	32
700	300	48
600	400	64
500	500	80
400	600	96
300	700	112
200	800	128
100	900	144
0	1000	160

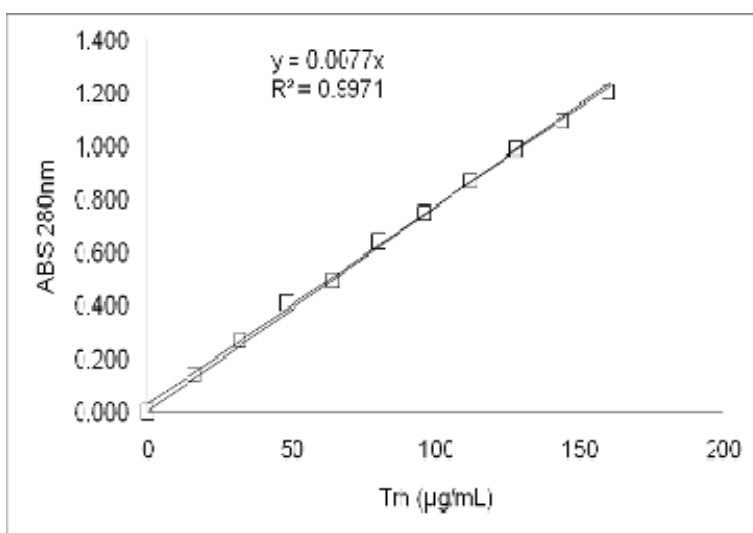


Figura. A2. Curva patrón de tirosina. (□) Datos experimentales, (—) Modelo lineal