



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

**“Estudios para la producción de una lacasa termoestable
por el hongo *Trametes sp. EUM1*”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

ANGEL EDUARDO MÁRQUEZ ORTEGA

DIRECTOR DE TESIS

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

México, D.F.

Mayo de 2006

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana esta incluida en el Padrón Nacional de Posgrados de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y además cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el número de registro 0471-O.

El alumno de Maestría Angel Eduardo Márquez Ortega recibió el apoyo económico del CONACyT con el registro de becario número 180884.

Iztapalapa, D.F. a 8 de Mayo de 2006

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

Estudios para la producción de una lacasa termoestable por el hongo

Trametes sp. EUM1

que presentó el alumno:

Angel Eduardo Márquez Ortega

Comité tutorial:

Director de tesis: Dr. Octavio Loera Corral
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

Asesor: Dra. Ainhoa Arana Cuenca
Universidad Politécnica de Pachuca

Asesor: Dr. Gustavo Viniegra González
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

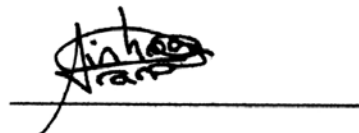
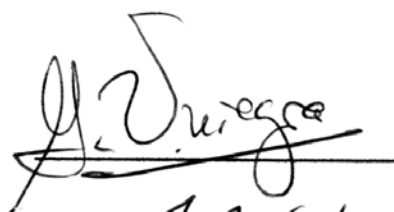
Comité de evaluación:

Presidente: Dr. Gustavo Viniegra González
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

Secretario: Dr. Francisco Cruz Sosa
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

Vocal: Dra. Ainhoa Arana Cuenca
Universidad Politécnica de Pachuca

Vocal: Dr. Alejandro Téllez Jurado
Universidad Politécnica de Pachuca



AGRADECIMIENTOS

Es meritorio agradecer la colaboración de aquellas personas que hicieron posible este estudio. En primer lugar, le doy las gracias a la naturaleza por crear el fascinante mundo de los seres vivos, en especial a los hongos y que me permitió estudiar al hongo *Trametes sp.* EUM1 para lograr la elaboración de esta tesis. Agradezco al Dr. José Juan Zúñiga Aguilar de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) y a sus colaboradores en especial a la bióloga Yumi Elena Nakazawa Ueji por todo el apoyo brindado durante la estancia en el Centro de Investigaciones y aún fuera de este. Agradezco, especialmente, a mi director de tesis, el Dr. Octavio Loera Corral, por su apoyo, orientación profesional y su amistad durante la realización de este trabajo. Gracias a los miembros de mi comité tutorial, la Dra. Ainhoa Arana Cuenca y el Dr. Gustavo Viniegra González por haberme aceptado en su grupo de investigación, por compartir sus valiosas enseñanzas y consejos y porque este proyecto es el fruto de su orientación, sus ideas y sus correcciones.

Agradezco al Profesor-Investigador Edmundo Arturo Pérez Godinez de la Universidad Autónoma de Chapingo por el apoyo brindado durante la realización de la técnica de hibridación con sonda radioactiva y por cumplir siempre con tu vocación de enseñanza. Gracias a la Dra. Diana Verónica Cortes Espinosa por su amistad y la enseñanza de algunas técnicas de biología molecular al inicio del trabajo experimental. También agradezco al Maestro Javier López Cruz por su asistencia y sus sugerencias en la realización del análisis Zimografico.

Gracias a Ruth Torres, Isabel Membrillo, Maria de los Angeles, Oscar Núñez y Cesar Espinosa porque más compañeros se convirtieron en buenos amigos, ya que me brindaron su amistad incondicional y por hacer del laboratorio W-104, un lugar en el

que se puede conversar, además de trabajar; también le agradezco a Ruth sus sugerencias productivas para el desarrollo de esta investigación y su ayuda en el laboratorio. Gracias a mis compañeros de laboratorio: Rafael, Marcos, Divanery, Maria de Jesús, Lorena y en general a todos aquellos con los que conviví y que estuvieron durante la realización de éste trabajo.

Finalmente gracias a mis padres por la persona que soy, ya que ellos con esfuerzo, dedicación al trabajo y ejemplo de perseverancia, lograron educar y motivar para bien a todos sus hijos y consiguieron sacarlos adelante. También agradezco a mis hermanos de los cuales he aprendido con su ejemplo.

RESUMEN

En este trabajo se estudió el efecto que tiene la fuente de nitrógeno en la expresión de las distintas lacasas del hongo termo tolerante *Trametes sp.* EUM1. También se identificó en cuales extractos existían las isoformas con mayor estabilidad térmica. Este estudio radica en la necesidad de encontrar condiciones de cultivo favorables para la producción de isoformas de la enzima lacasa que tengan propiedades de gran importancia para los procesos industriales o biotecnológicos (la producción de pigmentos, degradación de la lignina o de compuestos fenólicos y sus derivados, entre otros). Por esta razón, se han buscado, identificado y clonado genes de la enzima lacasa en diversos géneros de microorganismos, incluyendo el género *Trametes*.

En una primera etapa, se propagó la cepa de *Trametes sp.* EUM1 en medio Kirk líquido, con dos diferentes fuentes de nitrógeno (Tartrato de amonio y Peptona de caseína), y se analizó la actividad y el patrón de producción de lacasas. La actividad enzimática se determinó mediante la oxidación del ABTS (ácido 3-etilbenzo-tiazolin-6-sulfónico) como sustrato y se obtuvo un valor máximo de actividad lacasa de 47 UE/L en el medio con peptona. Una vez confirmados estos datos, se realizó el ensayo de termotolerancia de los extractos enzimáticos provenientes del medio Kirk con peptona, comparándose con una enzima comercial (Novo). Los resultados de esta prueba mostraron que después de una incubación de una hora a 60° C, el extracto enzimático, medido a temperatura ambiente, conservó una mayor actividad residual (hasta un 85%) con respecto a la enzima comercial (58% de actividad residual). Además, el hongo *Trametes sp.* EUM1 produjo al menos una isoforma de lacasa termoestable a 70° C, debido a que mantuvo el 35% de su actividad después de una hora de incubación. Este resultado fue confirmado por medio de zimogramas en condiciones nativas. El ensayo mostró una banda enzimática termoestable similar a banda de la enzima comercial, pero, con un peso molecular aproximado de 50 kDa.

Por otro lado, se observó que la fuente de nitrógeno tiene efecto sobre la actividad lacasa y la expresión de las isoformas. A partir de anterior, se extrajo el ARN_T del medio Kirk con peptona de caseína de los días que presentaron una mayor producción de lacasas termoestables (días 5, 6 y 7) para la generación de una genoteca de ADNc del hongo *Trametes sp.* EUM1, la cual mostró un valor de titulación de 9.20×10^7 pfu/mL, siendo aceptable el resultado según la bibliografía. Se obtuvo una sonda a partir de un fragmento amplificado del ADN genómico de *Trametes sp.* EUM1, con un tamaño de 324 pb y que pertenece a un gen de lacasa, según el resultado correspondiente a su secuencia. Finalmente se realizó la hibridación de la genoteca con la sonda, para rastrear los fragmentos correspondientes a un gen de lacasa y de esta forma se seleccionaron 20 colonias de bacteriófago λ con inserción de distintos fragmentos en su ADN. Desafortunadamente, ninguna de las secuencias mostró que los fragmentos pertenecieran a un gen de lacasa.

La conclusión principal de este trabajo es: la fuente de nitrógeno (peptona vs. tartrato de amonio) tiene un efecto muy marcado en la producción y expresión de isoformas termoestables de la enzima lacasa del hongo termo tolerante *Trametes sp.* EUM1, porque la adición de peptona se asoció con mayor actividad de una banda electroforética de lacasa termoestable. Además, se logró la construcción de una sonda que facilitó la clonación e identificación de un fragmento de ADN genómico del hongo perteneciente a un gen de lacasa. Este avance es necesario para lograr, en un futuro, la clonación de una enzima termoestable de este organismo.

ÍNDICE

	<i>Página</i>
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Lacasas	5
2.2. Organismos productores de lacasas	6
2.2.1. Características del género <i>Trametes</i>	7
2.3. Propiedades moleculares de las lacasas	9
2.3.1. Lacasas termoestables	11
2.3.2. Condiciones de cultivo que afectan la producción de la enzima lacasa	12
2.4. Inducción de lacasas	13
2.4.1. Genes de lacasas	16
2.5. Aplicaciones industriales de las lacasas	20
2.6. <i>Trametes sp.</i> EUM1: un potencial microorganismo para la producción de lacasas termoestables	22
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. HIPÓTESIS	25
5. OBJETIVO GENERAL	25
6. OBJETIVOS PARTICULARES	26

	<i>Página</i>
7. MATERIALES Y MÉTODOS	27
7.1. Microorganismos	27
7.1.1. Hongos	27
7.1.2. Bacterias	27
7.2. Medios de cultivo para bacterias	28
7.2.1. Medio Luria –Bertani (LB)	28
7.2.2. Medio NZY/MgSO ₄	28
7.2.3. Medio Terrific Broth (TB)	29
7.3. Medios de cultivo para hongos	29
7.3.1. Medio Kirk	29
7.3.2. Medio de Malta	30
7.4. Ensayo de fermentación líquida sin agitación	30
7.4.1. Método	30
7.4.2. Determinaciones analíticas	31
7.4.2.1. Actividad Enzimática	31
7.4.2.2. Determinación de la termoestabilidad	31
7.4.2.3. Preparación de los extractos enzimáticos y la enzima comercial	31
7.4.2.4. Precipitación con acetona fría	32
7.5. Zimogramas	33
7.5.1. Método	33
7.5.2. Soluciones para la realización de los zimogramas	33
7.5.3. Preparación del gel de separación	35
7.5.4. Preparación del gel concentrador	35

	<i>Página</i>
7.6. Técnicas de Biología Molecular	36
7.6.1. Obtención de ADN	36
7.6.1.1. Obtención de ADN genómico	36
7.6.1.2. Obtención de ADN plásmidico	37
7.6.1.3. Obtención del ADN de bacteriófago	38
7.6.1.4. Cuantificación de ADN	40
7.6.2. Obtención de ARN	40
7.6.2.1. Obtención del ARN total	40
7.6.2.2. Cuantificación de ARN total	40
7.6.3. Electroforesis	40
7.6.3.1. Electroforesis en geles de agarosa	40
7.6.3.2. Purificación de ADN de geles de agarosa	41
7.6.4. Diseño de Cebadores y PCR	41
7.6.4.1. Diseño de cebadores	41
7.6.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	41
7.6.4.3. Clonación de productos de PCR	43
7.6.5. Digestión con enzimas de restricción	44
7.6.5.1. Digestión del ADN plásmidico con enzimas de restricción	44
7.6.6. Genoteca de ADNc	44
7.6.6.1. Construcción de la genoteca de ADNc	44
7.6.6.2. Conversión de ADN del fago λ TriplEx2 al plásmido pTriplEx2	48

	<i>Página</i>
7.6.7. Hibridación con sondas	48
7.6.7.1. Realización de las placas de lisis	48
7.6.7.2. Transferencia de las placas de lisis a membranas de nylon	49
7.6.7.3. Transferencia de los geles de agarosa a membranas de nylon (Southern) ...	49
7.6.7.4. Marcaje de sonda con ³² P	50
7.6.7.5. Método de la hibridación radioactiva	51
7.6.7.6. Detección radioactiva	52
7.6.7.7. Marcaje de sonda con digoxigenina	52
7.6.7.8. Método de la hibridación no radioactiva	53
7.6.7.9. Detección quimioluminiscente de ADN marcado con digoxigenina	53
7.6.8. Secuenciación de nucleótidos	54
7.6.8.1. Secuenciación automática de ADN	54
7.6.8.2. Análisis de las secuencias de ADN	54
8. RESULTADOS Y DISCUSIONES	55
8.1. Estudios cinéticos	55
8.1.1. Actividad y termoestabilidad de las lacasas	55
8.1.2. Zimogramas	62
8.2. Estudios de biología molecular	64
8.2.1. Obtención de la sonda	64
8.2.2. Genoteca de ADNc	71
8.2.3. Rastreo de la genoteca	74
8.2.4. Conversión de ADN de bacteriófago λ a ADN plásmidico	77

Índice

	<i>Página</i>
RESUMEN DE RESULTADOS	82
CONCLUSIONES	84
BIBLIOGRAFÍA	85

ÍNDICE DE FIGURAS

	<i>Página</i>
Figura 1. <i>Trametes hispida</i>	8
Figura 2. Vector pGEM easy systems	44
Figura 3. Vector λ TriplEx2	45
Figura 4. Gel de poliacrilamida al 12% en condiciones no desnaturalizantes para la detección de la actividad lacasa en los extractos enzimáticos de <i>Trametes sp.</i> EUM1, los cuales fueron sometidos a una hora a diferentes temperaturas	63
Figura 5. Representación de geles de agarosa en los cuales se presenta 5 A) La PCR utilizando cebadores específicos y distintas condiciones y 5 B) fragmento de 300pb purificado	66
Figura 6. Gel de agarosa al 2 % en donde se muestra la digestión del plásmido pEMO1 con la enzima de restricción <i>Eco</i> RI (“- <i>Eco</i> RI”= sin digerir y “+ <i>Eco</i> RI” = digerido por la enzima), tanto para la colonia blanca (Colonia (+)), como para la colonia azul (Control (-)) y a diferentes concentraciones de ADN plásmidico (1 μ L: carril 6 y 7; 2 μ L: carril 2 y 3)	68
Figura 7. 7 A) Fragmento obtenido a partir del programa Clone Manager 5, utilizando las enzimas <i>Spe</i> I y <i>Eco</i> R I para los cortes de los extremos. 7 B) Secuencia del fragmento insertado en el plásmido pGEM	69
Figura 8. Alineamiento del fragmento en el buscador BLAST y los microorganismos de los genes con los que se alineó el fragmento secuenciado	70
Figura 9. Representación de geles de agarosa en los cuales se presenta el ARN total del hongo <i>Trametes sp.</i> EUM1. 9 A) ARN total extraído y 9 B) ARN total tratado con Dnasa I	72
Figura 10. Representación de geles de agarosa en los cuales se presenta 10 A) el ADNc amplificado y 10 B) el fraccionamiento de este mismo	73
Figura 11. Gel de agarosa que muestra 20 colonias de lisis de ADNc contenidos en el λ TriplEx y que fueron obtenidos por PCR	74
Figura 12. Se muestra en: 12 A) la autografía con las colonias seleccionadas por estar marcadas con nuestra sondas; mientras que en 12 B) se encuentra nuestra placa de lisis donde se señalan las colonias encontradas por medio de hibridación	75

	<i>Página</i>
Figura 13. Autografía de la hibridación con digoxigenina de dos colonias de bacteriófagos aisladas de la prueba anterior de hibridación con fósforo	76
Figura 14. En A y B se presenta el ADN plásmidico obtenido después de la conversión del ADN de bacteriófago	77
Figura 15. En A y B se presenta el ADN plásmidico de cada una de las colonias y digerido por las enzimas de restricción <i>Kpn</i> I y <i>Xba</i> I. El círculo muestra algunos fragmentos obtenidos apartir de la digestión del plásmido	79

ÍNDICE DE TABLAS, DIAGRAMAS Y GRAFICAS

TABLAS		<i>Página</i>
Tabla 1. Propiedades moleculares de algunas lacasas en plantas y hongos		10
DIAGRAMAS		
Diagrama 1. Procedimiento de la síntesis de la genoteca de ADNc (SMART™ cDNA Library Construction Kit)		47
GRAFICAS		
Gráfica 1. Perfiles de actividades volumétricas de lacasas en fermentación líquida del hongo <i>Trametes sp.</i> EUM1 a 39°C		55
Gráfica 2. Actividad residual obtenida en la fermentación líquida en los medios utilizados para la prueba de termotolerancia a 60°C		57
Gráfica 3. Actividad residual obtenida en la fermentación líquida en los medios utilizados para la prueba de termotolerancia a 70°C		59
Gráfica 4. Comparación de la actividad residual de los extractos enzimáticos del hongo <i>Trametes sp.</i> EUM1 con la enzima comercial (Novo) en la prueba de termotolerancia		61

1. INTRODUCCIÓN

Las lacasas (p-difenoloxidasas, EC 1.10.3.2) son polifenoloxidasas que catalizan la oxidación de compuestos fenólicos con la reducción correspondiente del O₂ a H₂O sin la necesidad de H₂O₂ para su acción (Koroljova-Skorovogat-ko y col., 1998; Antorini y col., 2002; Colao y col., 2003; Palmieri y col., 2000). Debido a sus propiedades catalíticas, en varias áreas de la industria se han desarrollado tecnologías de oxidación por medio de las lacasas que produce diversos hongos; ya sea utilizando solamente la enzima ó con algún compuesto que se utilice como mediador de ésta (Fabrini y col., 2001).

En la naturaleza las enzimas lacasas son comunes, especialmente en plantas y hongos; aunque también se ha reportado su actividad en algunas bacterias e insectos (Gianfreda y col., 1998; Martins y col., 2002; Arias y col., 2003). Los hongos pertenecientes al género *Trametes* son productores de enzimas lacasas y la gran mayoría de sus especies son microorganismos mesofílicos; ya que crecen en regiones templadas (temperaturas de 10 a 19°C) y subtropicales (temperaturas de 19 a 24°C). Estos hongos tienen la capacidad de desarrollarse sobre los troncos de los árboles, los troncos caídos o quemados y su crecimiento es en forma de repisas (Herrera y Ulloa, 1990). A diferencia de otros hongos de este género, el hongo *Trametes sp.* EUM1 fue aislado en el Sureste de México; el cual posee un clima tropical (temperaturas mayores de 24°C) y además este hongo se dice que es un microorganismo termotolerante porque su mayor crecimiento de micelio es a una temperatura de 45°C, aunque también puede crecer a temperatura de 20°C (Medina, 2003).

Un tema de actualidad es la búsqueda de enzimas que puedan tener propiedades exclusivas, tales como la termoestabilidad, la resistencia a algunos solventes, entre otras. Dentro de este tipo de enzimas se encuentran algunas lacasas termoestables,

las cuales han sido aisladas, caracterizadas, algunas de ellas patentadas y comercializadas (Berka y col., 1997). Estas propiedades les pueden conferir a las enzimas algunas ventajas en los bioprocesos industriales; así como también, similitudes o diferencias en sus propiedades fisicoquímicas y valor económico alto en el mercado. Ciertas lacasas son producidas por algunos hongos termotolerantes. Por esta razón es preciso estudiar las propiedades generales de las lacasas producidas por hongos termotolerantes ó termofílicos.

Por otra parte, muchos hongos son productores de enzimas lacasas, pero sus niveles de producción son muy bajos; por lo que esta fuente económica puede ser importante, si se mejoran las condiciones de producción de las enzimas. Para mejorar dichas condiciones es necesario estudiar algunas aplicaciones y técnicas biotecnológicas tales como el crecimiento en diversos medios de cultivo con la variación de las fuentes de carbono y nitrógeno (Kirk y Fenn, 1982). Algunas otras técnicas comprenden la clonación y expresión de los genes para la sobreproducción de este tipo de enzimas (Bruce y Palfreyman, 1998). Los genes de lacasa han sido clonados de una gran diversidad de hongos presentes en la naturaleza, una vez clonados estos genes, pueden ser expresados en forma heteróloga en levaduras y hongos; siendo los mejores sistemas de expresión los hongos, ya que estos pueden incrementar los rendimientos en la proteína heteróloga (Téllez-Jurado y col., 2005).

Por lo anterior, el presente trabajo esta enfocado a determinar la capacidad de producción de lacasas del hongo *Trametes sp.* EUM1 aprovechando la biodiversidad de nuestro país. También esta orientado a la búsqueda y caracterización de isoformas que se presentan en los extractos enzimáticos producidos por el hongo y así evaluar el efecto de la variación en la fuente de nitrógeno con un medio definido. Finalmente, estudiar fragmentos del ADN genómico del hongo e iniciar la búsqueda del gen ó los genes de lacasas termoestables.

Introducción

Una parte importante de este trabajo es el estudio de las isoformas producidas por el hongo *Trametes sp.* EUM1, ya que cada isoforma puede presentar propiedades distintas. Esto se pretende lograr utilizando un medio definido con variación en la fuente de nitrógeno para la producción de isoformas de la enzima lacasa; de igual forma se aprovecha la característica termotolerantes del hongo para identificar la isoforma termoestable.

2. ANTECEDENTES

Las polifenoloxidasas (oxidoreductasas) son un grupo de cuproproteínas que están clasificadas dentro de tres tipos de actividad: cresolasas (EC 1.14.18.1), catecol-oxidasa (EC 1.10.3.1) y lacasas (EC 1.10.3.2) (Suzuki y col., 2003). Estos grupos poseen una gran variedad de funciones, tales como diversidad en su especificidad, reactividad, grado de polimorfismo y otras como sus propiedades catalíticas, fisicoquímicas y biológicas que son importantes en la industria y en algunas aplicaciones médicas (Xu, 2005). Las enzimas pertenecientes a estos grupos, han sido estudiadas rigurosamente y sistemáticamente; también, se han utilizado para los sistemas catalíticos en la industria de la biocatálisis y con ello, han originado un avance y expansión de la biotecnología moderna (Duran y col., 2002). Asimismo, son económicamente viables debido a que en el mercado ocupan una mínima proporción con respecto a otras enzimas comerciales (proteasas, carbohidrasas y esterases) y reducen los costos en los procesos (Zaremski y col., 2005). Las oxidoreductasas comerciales son limitadas con respecto al repertorio que se encuentra en la naturaleza, creando así espacios y un potencial para el desarrollo de oxidoreductasas basadas en la biocatálisis (Xu, 2005).

Recientemente, el grupo que ha sido utilizado con gran amplitud en las aplicaciones biotecnológicas, son las lacasas, las cuales se manejan para eliminar contaminantes en algunos procesos; como por ejemplo, los colorantes derivados de la industria textil y los polifenoles presentes en los licores negros de la industria de la celulosa y el papel (Flinckinger y Drew, 1999). La oxidación de los compuestos en estos procesos se realiza con facilidad usando hipoclorito de sodio, pero esta reacción produce compuestos como los cloro-bencenos que son cancerígenos y por tanto, peores contaminantes. Por otro lado, una alternativa es utilizar lacasas u otras oxidasas que utilicen al oxígeno como aceptor de hidrógenos y así generen peróxidos y superóxidos de cobre en los sitios de esas enzimas (Muñoz y col., 1997). A su vez,

estos superóxidos pueden oxidar compuestos orgánicos como los polifenoles o algunos mediadores, que al elevarse su concentración pueden oxidar compuestos que no son oxidados por el sitio activo de la enzima (Thurston, 1994). De este modo, las polifenoloxodasas se pueden utilizar para reducir la contaminación de los efluentes con compuestos aromáticos, para alcanzar los niveles permitidos cumpliendo las nuevas reglamentaciones ambientales a un menor costo.

2.1. Lacasas

La enzima lacasa fue descubierta por primera vez en el árbol japonés *Rhus vernicifera*, llamado también árbol de la laca, término que dio el nombre de la enzima (Eggert y col., 1998; Antorini y col., 2002). Las enzimas realizan la oxidación a una gran variedad de compuestos como son sustratos orgánicos e inorgánicos, incluyendo monofenoles, difenoles y polifenoles, aminofenoles, metoxifenoles, aminas aromáticas y ascorbato (Galhaup y col., 2002; Kiiskinen y col., 2004).

La reducción del oxígeno a agua por esta enzima, está acompañada por la oxidación típica de un sustrato fenólico, generando un radical libre, que generalmente es inestable. También, puede experimentar una segunda oxidación por catálisis enzimática para formar quinonas, o puede ocurrir una reacción no enzimática tal como una hidratación o desprotonación, y/o podría participar en una reacción de polimerización, dando un compuesto amorfo insoluble como la melanina (Thurston, 1994). Además, pueden oxidar a sustratos no fenólicos en presencia de mediadores apropiados (Amitai y col., 1998). Estas enzimas tienen una amplia especificidad de sustrato así como de mediadores redox (Johannes, 2000). Por otra parte, la lacasa no es específica a un solo sustrato y que la gama de estos puede variar de una lacasa a otra (Villaseñor y col., 2004).

Las reacciones oxidativas que pueden llevar a cabo las lacasas para despolimerizar la lignina incluyen: rompimiento entre enlaces C_{α} - C_{β} , hidroxilación, rompimiento de

estructuras aromáticas y desmetilación (Sariaslani, 1989; Farnet y col., 1999). Este tipo de enzimas se han estudiado desde finales de la década de los 90's (Koroljova-Skorovogat-ko y col., 1998) y son producidas por una gran diversidad de organismos en la naturaleza.

2.2. Organismos productores de lacasas

Según Flickinger y Drew, (1999) las lacasas han sido detectadas en plantas, como el árbol de la laca, mango, algunas variedades de frijol, melocotón, pino, ciruela y sicamoro; en bacterias, como *Azospirillum lipoferum* y algunos géneros de insectos como son: *Bombix*, *Calliphora*, *Diploptera*, *Drosophila*, *Lucilia*, *Manduca*, *Musca*, *Oryctes*, *Papilio*, *Phormia*, *Rhodnius*, *Sarcophaga*, *Schistocerca* y *Tenebrio*. También se encuentran en más de cuarenta diferentes hongos, dentro de los cuales se tienen los géneros *Agaricus*, *Antrodiella*, *Armillaria*, *Aspergillus*, *Bjerkandera*, *Botrytis*, *Ceriporiopsis*, *Cerrena*, *Chaetomium*, *Coprinus*, *Cryphonectria*, *Cryptococcus*, *Curvularia*, *Cyathus*, *Geotrichum*, *Daedalea*, *Fomes*, *Fusarium*, *Halosarpheia*, *Lactarius*, *Lentinus*, *Monocillium*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phellinus*, *Phlebia*, *Pholiota*, *Pleurotus*, *Podospora*, *Pycnoporus*, *Pyricularia*, *Rhizoctonia*, *Rigidoporus*, *Schizophyllum*, *Sclerotium*, *Scytalidium*, *Sporotrichum*, *Stagonospora*, *Thermoascus*, *Trichoderma* y *Trametes*, siendo este último el género del hongo usado en el presente estudio. Esta presencia indica que las lacasas están relacionadas con diversas actividades celulares y microbianas. En las plantas son relacionadas con la síntesis de lignina; mientras que en los hongos juegan un papel en la degradación de la lignina, la esporulación, la producción de cuerpos fructíferos, producción de pigmentos, la patogénesis en plantas (Yaver y col., 1996; Mansur y col., 1997; Yaver y col., 1999) y con la síntesis de las melaninas en hongos (Galhaup y col., 2002).

Las lacasas más estudiadas actualmente, son las concernientes a los hongos basidiomicetes que pertenecen al grupo de los hongos de podredumbre blanca

(Kiiskinen y col., 2004). Son llamados así debido a que degradan la lignina y producen un residuo de color blanco que corresponde a los desechos de celulosa y hemicelulosa que contienen las cortezas (González, 2001). En esta clase de hongos se incluyen a las setas y los hongos, que forman cuerpos fructíferos en forma de repisas sobre la madera; estas características también incluyen producción de esporas sexuales en una célula especial llamada basidio y la reproducción asexual se realiza por conidios o esporas cuando existen estos dos tipos de estructuras (Deacon, 1993). Los basidiomicetos a su vez se dividen en los siguientes ordenes: Auriculariales, Aphyllophorales, Agaricales y Gasteromicetos (Guzmán y col., 1993).

2.2.1. Características del género *Trametes*

Este hongo pertenece al orden de los Aphyllophorales superiores y a la familia Polyporacea. Se encuentran dentro de los macromicetos, y como todos los de su orden gozan de una mala reputación, ya que son considerados como hongos parásitos o patogénicos de los bosques porque crecen atacando a varias especies de árboles. 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. En el género *Trametes* frecuentemente su receptáculo es estacionario, la trama espesa y clara; los tubos huecos son de dimensiones considerables, frecuentemente lameloides, separados por tabiques algo espesos. Sus esporas son hialinas (estructuras parecidas al vidrio) y lisas (Heim, 1957; Zhao y Kwan, 1999).

Se pueden clasificar este género según el color de su trama en el sombrero, es decir pueden ser rojos (*Trametes cinnabarum*), leonados (*Trametes odorata*), pardo-ocre (*Trametes trabea*), blancos (*Trametes hibosa*). Además pueden tener olor anisado (*Trametes odorata*), inodoro (*Trametes trabea*) entre otros. Sus poros pueden ser de colores o simplemente blancos y algunos de forma alargada. También los sombreros tienen una diversidad de formas y colores; dentro de las morfología de los sombreros se encuentran: vellosos, abollados, fomentosos, pubescentes, espesos, planos entre

otros; mientras que el color puede ir desde colores oscuros pasando por colores gris pardo, leonado, gamuza, rojizos, rosas, etc. (Heim, 1957; Herrera y Ulloa, 1990). A continuación se presentan en la figura 1, un ejemplo de este género de hongos.



Figura 1. *Trametes hispida*

Una de las propiedades de los hongos del género *Trametes*, es la degradación de la lignina para facilitar la digestión de la celulosa (Henzkill y col., 1998) y entre las enzimas que emplean estos hongos para ese fin se encuentran las llamadas lacasas, porque tienen la capacidad de oxidar a la lignina por medio de la acción de diversos mediadores (Young y col., 1995). Otro aspecto importante en la degradación de la lignina es la temperatura, ya que se han encontrado grupos de microorganismos mesófilos, termotolerantes y termofílicos que muestran la capacidad de degradarla (Rosenberg, 1978). En el género *Trametes* la gran mayoría de sus especies son mesofílicas, debido a que sus temperaturas óptimas de crecimiento se encuentran entre 20 y 40°C y que muy pocas especies son termotolerantes, es decir que sus temperaturas de crecimiento son de 50°C, aunque también pueden crecer a 20°C

(Madigan y col., 1998; Padilla, Y., 2004). La aplicación de estos microorganismos en los procesos biotecnológicos ofrecen varias ventajas como son: el aumentar la velocidad de formación de producto por la elevada actividad metabólica, eliminar o disminuir los sistemas de enfriamiento durante el cultivo, disminuir la densidad, la tensión superficial y la velocidad del cultivo y bajar la producción de la biomasa pero con altas velocidades de conversión de sustrato a producto. También muchos de estos microorganismos tienen la capacidad de producir lacasas, las cuales presentan diversas propiedades moleculares (Wiegel y Ljungdahl, 1984).

2.3. Propiedades moleculares de las lacasas

En algunos análisis bioquímicos realizados a diversos hongos se ha reportado que una especie individual puede expresar diferente isoformas de lacasas con diversas condiciones para la detección de su actividad como son pH óptimo, especificidad de sustrato, peso molecular, localización celular y algunas condiciones de cultivo como son: las fuentes de nitrógeno, carbono, fósforo, etc (Fernandez-Larrea y Stahl, 1996; Wahleithner y col., 1996). Por lo anterior, se puede mencionar que cada una de las lacasas tiene condiciones de expresión diversas y distintas propiedades moleculares.

En la actualidad se estudian lacasas intracelulares y extracelulares. Las propiedades moleculares que se tienen en estas enzimas son puntos isoeléctricos (pI) estando el intervalo de 3.0 a 7.0 en los hongos; mientras que en las lacasas de plantas el pI es generalmente de 9.0. También, se muestra que en electroforesis PAGE, las lacasas tienen pesos moleculares entre los 60 a 100 kDa y entre el 10 - 50% se le atribuye a la glucosilación. La glucosilación determina diversos factores en la lacasa como son la secreción, la susceptibilidad proteolítica, la actividad, la retención del cobre y termoestabilidad (Slomczynski y col., 1995). El intervalo de pH al que la enzima puede actuar es de 3.0 a 9.0 (Xu y col., 1996; Xu, 1997). En la tabla 1, se presentan algunas propiedades moleculares de las lacasas.

Especies	Peso Molecular (kDa)	pI	Glicosilación (%)
<i>Acer pseudoplatanus</i>	66		40
<i>Agaricus bisporus</i>	65	3.7	15
<i>Armillaria mellea</i> I, II	59	4.1, 3.3	15
<i>Aspergillus nidulan</i>	80		12
<i>Botrytis cinerea</i>	74	4.0	49
<i>Cerrena maxima</i>	67		
<i>Cerrena unicolor</i>	66		
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i> I, II	71, 68	3.4, 4.8	15
<i>Chaetomium thermophile</i>	36		
<i>Cryphonectria parasitica</i>	77		24
<i>Cryptococcus neoformans</i>	75		6
<i>Fomes annosus</i>	73		
<i>Junghuhnia separabilima</i>	58–62	3.5	
<i>Lactarius piperatus</i>	67		
<i>Lentinula edodes</i>	66		
<i>Manduca sexta</i>	70–90		
<i>Monocillium indicum</i>	72		
<i>Myceliophthora thermophila</i>	85	4.2	14
<i>Neurospora crassa</i>	64	6.8	12
<i>Phellinus noxius</i>	70		
<i>Phlebia radiata</i>	64	3.5	2
<i>Phlebia tremellosa</i>	67	3.3	
<i>Pholiota mutabilis</i>	64		
<i>Pinus taeda</i>	90	9	22
<i>Pleurotus ostreatus</i> I, II	64, 59	2.9	13,4
<i>PM1</i>	64	3.6	6.5
<i>Podospora anserina</i>	70–80	4.9	23
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	77	3.7	9
<i>Pycnoporus coccineus</i>	70	3.5	8
<i>Rhizoctonia pratocola</i>	78		
<i>Rhizoctonia solani</i>	66	7.5	11
<i>Rhus vernicifera</i>	110	8.6	45
<i>Rigidoporus lignosus</i> I, II	53, 52	3.8, 3.3	
<i>Schizophyllum commune</i>	64		
<i>Scytalidium thermophilum</i>	80	5.1	20
<i>Trametes anisoporus</i>	58		
<i>Trametes consors</i>	58		
<i>Trametes hirsutus</i>	55		
<i>Trametes sanguinea</i>	62	3.5	9.1
<i>Trametes versicolor</i> I, II	67, 70	3.2, 5.6	14
<i>Trametes villosa</i> I, III	63	3.5, 6.5	0.5
<i>Trichoderma</i>	72		

Tabla 1. Propiedades moleculares de algunas lacasas en plantas y hongos (Flickinger y Drew, 1999).

Algunas enzimas ligninolíticas pueden ser de carácter termoestable, como es el caso de ciertas lacasas producidas por microorganismos termotolerante comparadas con algunas enzimas producidas por los microorganismos mesofílicos (Xu y col., 1996).

2.3.1. Lacasas termoestables

Todos los seres vivos llevan acabo su metabolismo mediante los procesos enzimáticos, y los microorganismos termotolerantes y termofílicos no son la excepción, ya que estos producen enzimas y algunas de ellas resisten temperaturas relativamente altas.

La termoestabilidad es una propiedad buscada en estas nuevas enzimas debido a que presentan las siguientes ventajas en procesos industriales: a) algunas de estas enzimas son estables a altas temperaturas (60°C); b) se almacenan fácilmente; c) tienen un alto número de recambio (k_{cat}), que es estable cuando se aplican altas temperaturas (Weigel y Ljunghdal, 1984); la velocidad de reacción aproximadamente se duplica al incrementar la temperatura 10°C, (Zamost y col., 1991); al incrementar la temperatura se evita la contaminación del sistema y aumenta la resistencia a los agentes desnaturalizantes (Kristjanssons, 1989).

Algunas enzimas lacasa de hongos basidiomicetes muestran una marcada termoestabilidad cercana a los 70°C (Coll y col., 1994); existe ya en el mercado una lacasa que fue patentada y es producida por la industria de Novo Nordisk, esta enzima puede mantener el 100% de su actividad durante 20 minutos a 60°C (Berka y col., 1997). Otra de las lacasas termoestables es la producida por el árbol de la laca, la cual tolera temperaturas cercanas a los 50 °C. También se ha observado que algunas lacasas de hongos pueden ser activadas térmicamente por pre-incubación a temperatura de 60°C (Coll y col., 1993). En 1998, fue aislado el hongo *Chaetomium thermophilium* a partir de composteo. Este hongo presentó actividad lacasa cuando fue crecido a 45°C en medio sólido y medio líquido. La lacasa producida fue estable

a 70°C durante una hora (Chefetz y col., 1998). Recientemente, Kiiskinen y col. (2002) encontraron una lacasa perteneciente al hongo *Melanocarpus albomyces*, la cual presenta el 100% de actividad a 60°C durante 2 h y con ello una buena termoestabilidad. Por otro lado, se ha observado que una de las especies de *Peniophora* es productora de isoformas termoestables de la enzima lacasa, ya que a 70°C la actividad de estas se mantiene durante 15 minutos (Niku-Paavola y col., 2004).

2.3.2. Condiciones de cultivo que afectan la producción de la enzima lacasa

Algunas investigaciones realizadas muestran que el aumento en la actividad lacasa se da cuando los cultivos muestran una baja concentración de carbono (Kwon y Anderson, 2002).

Esto no ocurre con el nitrógeno, ya que las lacasas a una baja concentración de nitrógeno en el medio se ven reducidas, mientras que algunas otras enzimas como la celobiosa, la celulasa y las peroxidasas su actividad es incrementada (Freitag y Morrel, 1992). Por otra parte se ha visto que a través del ayuno del nitrógeno, se produce el estímulo para la degradación de la lignina en los hongos de podredumbre blanca, aunque no siempre es una regla (Leatham y Kirk, 1983). Asimismo la producción de lacasas esta influenciada por la concentración de nitrógeno presente en el medio, ya que se requieren altos niveles de nitrógeno para incrementar la formación de estas enzimas (Galhaup y col., 2002). Garzillo y col. (1998) realizaron trabajos con *Trametes trogii* y observaron que al adicionar una fuente de nitrógeno (extracto de levadura) en el medio de hojuelas de maíz, el hongo excretaba altos niveles de la enzima lacasa. Un claro ejemplo, es la producción de la enzima lacasa por *Trametes gallica*. Este microorganismo se creció usando 20 diferentes medios en condiciones estáticas y de agitación. Los resultados arrojaron que la fuente de nitrógeno orgánico tales como triptona y peptona promovieron fuertemente la producción de las enzimas. También la aplicación de una mezcla de aminoácidos y una preparación de lignina incrementó la producción de estas enzimas, lo cual no

ocurrió con el extracto de papa. Esto se comprobó al someter los extractos a Zimografía, la cual reveló un total de 21 bandas de actividad lacasa diferentes. Por lo que concluyeron que dependiendo de la composición del medio y el modo de incubación fue posible la expresión del gen para distintas isoformas de lacasa (Dong y col., 2005).

Por otro lado, ciertos microorganismos tales como *Pycnoporus cinnabarinus* ó *P. sanguineus* mostraron producción de estas enzimas con un medio limitante en la fuente de nitrógeno (Pointing y col., 2000). Ciertamente aún se tienen algunas controversias con relación a la influencia de la fuente de nitrógeno en el medio para la formación de lacasas. Por esta razón en algunos procesos como la decoloración de efluentes en la industria, se requieren fuentes de nutrientes baratos y efectivos que contengan cantidades altas de nitrógeno para la producción de lacasas para que el efecto inicial de la fuente de nitrógeno sea aumentar la actividad de la enzima lacasa y así iniciar la oxidación de diversos colorantes, compuestos fenólicos y sus derivados (Kwon y Anderson, 2002; Couto y col., 2004).

La producción de lacasas es afectada en los procesos de fermentación por los factores como son: la composición del medio, la relación carbono y nitrógeno (C/N), el pH, la temperatura, la proporción de aire entre otras (Kahraman y Gurdal, 2002; Rodríguez y col., 2002). En hongos se pueden producir lacasas extracelulares, las cuales son originadas en pequeñas cantidades. Las condiciones de producción pueden ser simuladas en presencia de diversas sustancias inductoras como son compuestos fenólicos, aromáticos, la lignina ó derivados de esta tales como el ácido ferúlico, 2,5- xilidina, p-anisidina o alcohol veratrílico (Galhaup y col., 2002).

2.4. Inducción de lacasas

Las lacasas fúngicas pueden ser constitutivas o inducibles y también, intracelulares o extracelulares (Tellez-Tellez y col., 2005). Estas enzimas han sido detectadas y

purificadas de distintas especies de hongos, y se ha observado que se producen múltiples isoenzimas (Palmieri y col., 2000). Varias lacasas encontradas son extracelulares y se asocian al crecimiento, por lo cual, se han controlado las condiciones de crecimiento de las especies de hongos utilizados y después, se ha buscado promover la producción de las enzimas mediante la utilización de inductores. Estos son usualmente compuestos que tienen estructuras muy similares o análogas a los sustratos de la enzima y a los componentes de la lignina, los cuales sirven como una señal celular para que produzcan alguna enzima específica (Crowe y Olsson, 2001).

En la actualidad, se han estudiado compuestos que tienen la capacidad de funcionar como inductores para la síntesis de lacasas en varias especies de hongos. Un ejemplo es el hongo *Coriolus hirsutus*, en el cual se ha inducido la síntesis de lacasas extracelulares usando un sustrato de la enzima que es la siringaldazina a una concentración de 0.11 μ M y teniendo un aumento cercano al 1000%. Con ello, se obtuvieron dos isoformas de la enzima; las cuales son I₁ e I₂ con pesos moleculares de 69 \pm 2 y 67 \pm 2 kDa, los pI de cada isoenzima son 3.5 y 4.2, respectivamente. Estas enzimas mostraron un rango de pH óptimo entre 4.4 – 4.6, a una temperatura óptima de 50°C, siendo así isoenzimas termoestables (Koroljova-Skorovogat'ko y col., 1998; Gorbatova y col., 2000).

Gigi y col. (1980), obtuvieron mejores resultados de producción y excreción máxima de lacasas del hongo *Botritis cinerea*, al adicionarle ácido gálico al medio de cultivo, comparado con la ineficacia de otros inductores reportados. Marbach y col. (1983), encontraron que al adicionarle ácido cumárico al mismo hongo, también se induce la actividad, tal como había sucedido en ácido gálico y el jugo de uva, por lo cual, sugirió que el hongo se adaptó a diferentes medios excretando así distintas lacasas.

En el hongo de podredumbre blanca *Pycnoporus cinnabarium*, ocurrió un efecto de inducción al adicionarle 2,5 xilidina, para una isoenzima que tuvo un PM,

determinada por cromatografía de filtración en gel de aproximadamente de 81 kDa con un contenido de carbohidratos de 9%. El pI fue de 3.7, siendo está enzima típica de este hongo (Eggert y col., 1996).

Los compuestos aromáticos varían en su estructura principalmente por la disposición de los sustituyentes en el anillo aromático como lo menciona González (2001) en su trabajo, quien realizó un estudio con el hongo *Trametes sp.* I-62. Se aplicaron distintos compuestos aromáticos para inducir la síntesis de lacasas por el hongo, obteniendo en sus resultados que los isómeros del alcohol veratrílico (alcohol 3,4 – dimetoxibencílico), el alcohol 2,5- dimetoxibencílico y el alcohol 3,5- dimetoxibencílico (diferentes isómeros de un compuesto) tuvieron diferentes capacidades inductoras de la actividad de las lacasas. Otros dos compuestos, el ácido *p*-metoxifenol y el guayacol, provocan también la inducción, pero esta tiene variaciones en el momento en que ocurre, tanto en la actividad, como en el crecimiento del hongo.

Por otro lado, se ha observado que al adicionar un exceso de cobre al medio de cultivo se provoca aparentemente un efecto de inducción para la producción de lacasas (Hubert y Lerch, 1987). Como ocurrió con el hongo *Phanerochaete chrysosporium*, al cual se le agregó una concentración de 0.4 mM de CuSO₄ en el medio, generando así un aumento en su actividad lacasa a los 2 y 3 días y se obtuvo una lacasa extracelular con un peso aproximado de 100kDa (Dittmer y col., 1997). El cobre en el hongo comestible *Pleurotus ostreatus* promueve la expresión de las isoenzimas *POXA1b*, regulando así el nivel de la transcripción del gen; siendo el transcripto *poxa1b* ARNm el más abundante en la inducción en todos los periodos de crecimiento analizados (Palmieri y col., 2000).

En el 2001, Sonden y Dobson (2001) utilizaron varios compuestos (ácido ferúlico, ácido verátrico, 2,5 xilidina, e hidroxibenzotriazol) como inductores para el hongo *Pleurotus sajor-caju* y con la adición de cobre para la expresión de la secuencia de los genes *Psc lac* 1, 2, 3 y 4. Con el ácido ferúlico y 2,5 xilidina se obtuvo un nivel

alto en la transcripción de los genes *Psc lac 1,2 y 4*, y el *Psc lac 3*, fue expresado constitutivamente. A partir de estos estudios de inducción se encontró una relación con distintos genes que codifican para las enzimas lacasas. Estos datos sirvieron para comprender más la biología del hongo.

En el hongo de *Neurospora crassa* se utilizó como inductor a la D-fenilalanina para producir lacasa, por medio del estudio de su ARNm. Se observó también su regulación de la transcripción. El resultado en los niveles de proteína de la actividad lacasa se incrementaron después de 30 horas, por lo que la D-fenilalanina actuó como inductor (Linden y col., 1991). Las enzimas lacasas al igual que las peroxidasas son codificadas por complejas familias de genes (Cullen, 1997). Una de las primeras descripciones de los genes que codifican para las lacasas fue realizada por Germann y col. (1988), en el hongo ascomiceto *Neurospora crassa*.

Estos estudios confirman la existencia de diversas isoformas de la enzima lacasa que se producen en varios hongos, demuestra también la existencia de múltiples genes de lacasa expresados con diversos inductores. Además, la expresión de estos genes para la producción de enzima depende de las condiciones de cultivo y de sistemas diferenciales de regulación utilizados para su producción y de la cantidad de inductores utilizados para el incremento de la transcripción del gen (Faraco y col., 2003).

2.4.1. Genes de lacasas

Los genes de lacasas tienen secuencias que muestran un patrón común y que codifican polipéptidos de aproximadamente 520-550 residuos de aminoácidos, incluyendo el péptido amino terminal de secreción. Asimismo, poseen cisteínas y residuos de histidinas envolviendo su sitio catalítico a los cuatro átomos de cobre que se encuentran en ese sitio (Sonden y Dobson, 2001). En los últimos años, se han realizado estudios acerca de los genes de lacasas, como se especifica con el trabajo

de Yaver y col. (1996); los cuales aislaron dos genes del hongo *Trametes villosa* (*lcc1* y *lcc2*). Estos fueron aislados, clonados y secuenciados y los resultados de los análisis de la secuencia arrojaron que *lcc1* y *lcc2* tenían 8 y 10 intrones, respectivamente. Además, obtuvieron un 79% de identidad en el nivel de aminoácidos.

Por otro lado, se ha secuenciado un gen específico (*lcc1*) de lacasa del hongo *Trametes sanguinea* M 85-2 por medio de cebadores degenerados y PCR. En el proceso de PCR, se obtuvieron los fragmentos amplificados de las regiones I y IV conservadas de los sitios de cobre correspondientes al gen de lacasa. Con estos fragmentos se realizó la PCR para obtener así la amplificación del ADN genómico del microorganismo de una única banda de 1,600 pb; siendo esta a su vez clonada dentro de un vector y secuenciada. Finalmente, se secuenció el ADNc obtenido, el cual consistía de 518 aminoácidos, correspondiendo a 21 aminoácidos de péptido señal, se observaron también sitios glucosilados y residuos de cisteína. Al alinear el ADN genómico con el ADNc se encontró que este gen tenía 10 intrones. En la actualidad, los autores mencionan que realizan la expresión heteróloga y la medición de algunos parámetros (Hoshida y col., 2001). En el 2003, Colao y colaboradores, aislaron un gen de lacasa del hongo *Trametes trogii* a partir del ADNc. Este gen es el *lcc1*, y transcribe para 517 aminoácidos, incluyendo el péptido señal de 21 pb. Al realizar el análisis de la secuencia muestra que esta enzima esta relacionada a Lac1 del basidiomicete PM1 y *Trametes* C30 con una similitud del 98%.

Varios genes de lacasa tienen similitudes con los obtenidos de *Trametes* como el reportado por Palonen y col. (2003), los cuales realizaron el análisis de la secuencia de dos genes de lacasas (*lcc1* y *lcc2*) correspondientes al ascomicete *Mauginiella* sp. Se encontró que tenían una alta identidad con los genes *lcc1* y *lcc2* del basidiomicete *Trametes versicolor* y *Trametes villosa*, respectivamente. Anteriormente, Eggert y col. (1998), clonaron y analizaron estructuralmente el gen de lacasa *lcc3-1* expresado por

Pycnoporus cinabarinus. Los resultados de este ensayo fueron que el ADNc con respecto al ADN genómico eran idénticos excepto por 10 intrones que corresponde a 50 o 60 pb. Mientras que el análisis indica que el gen contiene un residuo de Phe, el cual tiene influencia en el potencial de oxidoreducción de la enzima en el cobre tipo I. La secuencia tenía un nivel de similitud del 84% con respecto al gen obtenido de *Coriolus hirsutus* y el tamaño del gen fue de 2,390 pb.

Además, de los genes de lacasas obtenidos del género *Trametes*, se han identificado y clonado algunos otros de distintos géneros de microorganismos, como es el caso del gen de lacasa *lcc4* de *Volvariella volvacea* obtenido a partir del ADNc que consiste de 1,689 pb incluyendo un péptido señal de 23 aminoácidos y 540 aminoácidos de proteína. Esta proteína tiene un peso molecular de 58.173 kDa y un pI de 6.1. Contiene 10 residuos de histidina y uno de cisteína, el sitio activo de la proteína se encuentra conservado. Además, tiene un alto grado de identidad con otros genes de lacasa de basidiomicetes (Chen y col., 2004). Asimismo Muñoz y col. (1997), compararon la secuencia del amino terminal de las lacasas de la especie *Pleurotus* y las de otros hongos, observando homología considerable y teniendo diferencia en algunos aminoácidos como la treonina, serina e isoleucina, por lo que, se puede mencionar que son isoenzimas codificadas por diferentes genes. También han realizado comparaciones entre genes de lacasas producidos por el mismo organismo, como es el gen *pox1* que pertenece al hongo *Pleurotus ostreatus* y que tiene un tamaño de 2,592 pb con secuencias interrumpidas por 19 intrones y tiene la región de secuencias consenso CAAT y TATA, las cuales se identificaron en la posición -174 y -84, respectivamente. También se aisló de ADNc el gen *pox2*. Estos dos genes tienen el 84% de similitud y corresponden a dos isoformas de lacasa de *P. ostreatus* (Giardina y col., 1995).

Existen reportes de otros hongos basidiomicetes como *Fomes lignosus*, del cual a partir del ADNc fue rastreado y aislado el gen de lacasa; este gen contiene 1,557 bp y la proteína consiste de 497 aminoácidos precediéndolo un péptido señal de 21

aminoácidos, así mismo el ADN genómico contiene 11 intrones y fue clonado en los vectores pGAPZαA y pGAPZA y expresada en *Pichi pastori* GS115. En presencia de cobre (0.4mM) se obtuvo la actividad óptima, siendo estable la lacasa en el rango de pH de 6.0 a 10.0, con un peso molecular de 66.5 kDa y los valores de K_M y V_{max} son 177 μ M y 23.54 μ mol/min, respectivamente. Por otra parte, al purificar la enzima se obtuvo que el grado de glicosilación es 58.6% (Liu y col., 2003).

También se han aislado genes de hongos y se han expresado en otros microorganismos como son los siguientes. En 1996, se aislaron a partir del ADNc y ADN genómico cuatro genes (*lcc1*, *lcc2*, *lcc3* y *lcc4*) del hongo *Rhizoctonia solani*. Tres de estos genes fueron expresados en *Aspergillus oryzae* de los cuales dos de las proteínas recombinantes *r-lcc1* y *r-lcc4* fueron purificadas y caracterizadas. Los resultados de la purificación mostraron que *lcc4* tenía un peso molecular de 66 kDa; mientras que la proteína *lcc1* tenía un peso entre 50 y 100 kDa. Finalmente, la actividad óptima para *lcc4* se presentó a un pH de 7 y para *lcc1* fue un pH de 6 (Wahleithner y col., 1996). En 1997, se aisló y secuenció el gen de lacasa del hongo termofílico *Miceliophthora thermophila*. El gen *MtL* mostró una gran homología con otros géneros de hongos. El gen fue expresado en forma heteróloga en *Aspergillus oryzae*. La lacasa recombinante obtenida presentó un peso molecular de 85 kDa por medio de electroforesis en gel. El análisis de carbohidratos mostró que tenía del 40 al 60% de glicosilación y por último, se determinó actividad con sirigaldazina como sustrato; los resultados muestran que el pH óptimo para la actividad máxima fue de 6.5 (Berka y col., 1997).

De la misma forma Xu y col. (1998), observaron que las lacasas de *Coprinus cinereus*, son activadas a pH alcalino, la cual puede ser una propiedad muy importante para ser aplicada en procesos biotecnológicos. Para demostrar la diversidad de enzimas, se obtuvieron las secuencias y clonaron tres genes de lacasas del hongo (*lcc1*, *lcc2* y *lcc3*) y se demostró que la proteína *lcc1*, contiene 7 intrones que comparado con los genes de lacasas *lcc2* y *lcc3*, el gen es más

pequeño, debido a que los genes *lcc2* y *lcc3* contienen 13 intrones. En la predicción de las proteínas de los genes *lcc1*, *lcc2* y *lcc3*, muestran que la identidad se encuentra entre el 58 y 80% en el nivel de aminoácidos de las tres proteínas. Por otra parte, se expresó el gen *lcc1* en *Aspergillus oryzae* y fue purificado. Los resultados de la purificación mostraron que la proteína del gen *lcc1* tuvo un peso molecular aparente de 66 kDa por medio de geles de poliacrilamida y su absorción máxima fue a 278 y 614 nm. (Yaver y col. 1999).

En la actualidad, las lacasas se han utilizado en la industria para la degradación de los altos contenidos de compuestos fenólicos en sus efluentes, para la degradación de la lignina o la eliminación de compuestos tóxicos entre otros procesos de degradación (Berka y col., 1997; Temp y Eggert, 1999). Recientemente, se han encontrado sitios de mutagénesis que ejecutan o modulan la actividad y el potencial redox de las lacasas, permitiendo así, que se pueda manipular genéticamente la capacidad catalítica de las lacasas (Koroleva y col., 2001), por lo que esto podría significar el mejoramiento de los procesos de degradación de compuestos en la industria por medio de la utilización de la lacasa.

2.5. Aplicaciones industriales de las lacasas

El interés de la lacasa en la industria enzimática es incrementar su potencial para degradar los compuestos fenólicos altamente tóxicos y la lignina. Algunas aplicaciones de la lacasas en la biocatálisis son la deslignificación y decoloración de lignocelulosa; siendo el tratamiento de igual forma para las aguas residuales de la industria papelera, donde es utilizada la lacasa como agente de bioblanqueo (D'souza y col., 1996; Singh y Kaur, 2001; Tinoco y col., 2001); también es manejada para la polimerización de sacáridos basándose en las propiedades de oxidación de la lignina, ha sido manipulada la lacasa como agente bioaglutinante (Milstein y col., 1993). Además se ha utilizado en la descontaminación y destoxificación de efluentes con compuestos aromáticos contaminantes; así como de suelos contaminados

(Antorini y col., 2002). La lacasa en la biocatálisis, es empleada en la industria textil para el blanqueado en seco de las telas, en especial el algodón; ya que reduce el tiempo, la energía y el agua del proceso. Finalmente la lacasa, se maneja en el cuidado médico y personal, ya que es utilizado para contrarrestar toxinas que producen dermatitis o derivados del catecol, entre otros (Flickinger y Drew, 1999).

La lacasa también es utilizada como biosensor en la detección de fenol, anilina, oxígeno y otras sustancias; estos procesos de localización de compuestos, son basados en el poder de la reoxidación de la lacasas, por el cambio del voltaje en la electrocatálisis y por el cambio fotométrico que es resultado de la oxidación de sustancias (Gardiol y col., 1998). La lacasa es empleada en ensayos enzimáticos e inmunológicos, a través de cambios físicos detectables o de formación de productos de catálisis. Otro uso de la enzima es en la síntesis orgánica y médica; en las cuales producen ó desarrollan compuestos incluyendo polímeros con propiedades mecánicas, eléctricas, ópticas; textiles, pigmentos para cosméticos, agentes médicos complejos, antibióticos como las céfalosporinas entre otros (Cai y col., 1993; Ikeda y col., 1996).

Por ultimo, la enzima lacasa se ha aplicado en tratamientos de bebidas y alimentos, al igual que se han empleado para eliminar compuestos fenólicos formados durante el procesamiento de bebidas, es decir, se utiliza para absorber agentes tóxicos; también puede proveer de aroma, color, sabor y estabilidad a los jugos o otras bebidas. En los alimentos puede eliminar el oxígeno que interfiere en algún proceso y es importante esta enzima para la desulfuración de los combustibles fósiles (Villaseñor y col., 2004).

2.6. *Trametes sp.* EUM1: un potencial microorganismo para la producción de lacasas termoestables

El hongo termotolerante *Trametes sp.* EUM1, fue aislado en Yucatán junto con otros siete hongos silvestres por Medina (2000). Estos fueron obtenidos a partir de desechos ligninocelulósicos de madera, y se crecieron en el laboratorio a 45°C para obtener microorganismos termotolerantes ó termofílicos. Por otro lado, este hongo fue seleccionado debido a que presentaba halos de oxidación con el sustrato ABTS por debajo de la colonia que indicaba la producción de lacasas. Además se observó microscópicamente que se presentaron diferentes características en las conidias, los cuales pertenecían a los géneros *Trametes* y *Penicillium* (Medina, 2000). A partir de estos estudios realizados, se comenzó la búsqueda de lacasas en el hongo termofílico.

Los resultados con *Trametes* permitieron detectar la actividad lacasa en medios de cultivo de Bran Flakes (hojuelas de salvado de trigo) al 3% (650 U/L), que era 35 veces mayor a la actividad producida en medio de extracto de malta. Además, se purificaron 2 isoformas con puntos isoeléctricos de 6 y 4, a los que se les nombró lacasa 1 y lacasa 2, respectivamente. También, se sometieron los extractos a pruebas de pH, siendo su actividad óptima a pH de 4, pero estable en un rango de pH (4 a 10) durante una hora, conservando casi el 100% de actividad. Por otra parte, se obtuvieron los parámetros cinéticos de la lacasa 2, como es la K_M (0.0125mM), V_{MAX} (1.52 U/L) y k_{cat} (4239 min^{-1}) a la temperatura de 40°C. A esta enzima se midió su resistencia a solvente durante una hora y los resultados fueron que la enzima conservó el 52% de su actividad en etanol al 20% y el 30% de su actividad se conservó en acetonitrilo, (Medina, 2003).

Estudios recientes realizados por Márquez (2004) con *Trametes sp.* EUM1 se han vinculado con la inducción al hongo *Trametes sp.* EUM1 para la producción de lacasas y la termoestabilidad de las enzimas. Los resultados mostraron que el hongo tiene actividad de lacasa cuando se agregó al medio ácido ferúlico o ácido verátrico

como inductores; mientras que con ácido tánico y el catecol, se inhibió la producción de las lacasas. En lo que respecta a la termoestabilidad, se sometieron los extractos obtenidos de una fermentación líquida a 60°C durante 1 hora y los resultados fueron que estos extractos conservan el 85% de su actividad después de una hora. Lo que indicó que se tenía al menos una enzima lacasa termoestable a 60°C (Márquez, 2004).

Como ya se ha mencionado que diversos microorganismos son productores de la enzima lacasa. Uno de estos es el género *Trametes*, el cual crece en cultivos puros o mezclas con altas concentraciones de nitrógeno en el medio (26mM) y con ello se aumenta la formación de la enzima lacasa (Buswell y col., 1995). Otra característica de estos hongos de podredumbre blanca, es la producción de un gran número de isoformas de la enzima que son promovidas por una familia de genes (Dong y col., 1997; Collins y Dobson, 1997) que son expresados de forma diferencial dependiendo de las condiciones de crecimiento de los microorganismos (Colao y col., 2003). Además se han buscado microorganismos termotolerantes y termofílicos con la capacidad de crecer a temperaturas altas (45°C) y producir así lacasas termoestables que puedan ser importantes en las aplicaciones industriales (Jordaan y Leudes, 2003).

3. JUSTIFICACIÓN

Las lacasas son de gran importancia en la actualidad, ya que tienen aplicación en varias ramas de la industria para la oxidación de diversos compuestos contaminantes encontrados, tanto en los suelos como los efluentes producidos por las industrias (Suresh y col., 2003). La termoestabilidad en las enzimas permite que se reduzca la cantidad de enzima utilizada durante los procesos (Kristjansson, 1989). En comparación con las lacasas producidas en las plantas; también, las lacasas de los hongos *basidiomicetes* muestran una remarcada termoestabilidad y pueden ser activadas térmicamente por preincubación a temperaturas por encima de los 60°C (Koroleva y col., 2001). Por esta razón, se investiga la manera de producir estas enzimas con propiedades de interés como la termoestabilidad y la resistencia a solventes y en mayor cantidad, teniendo así una mayor aplicación en los procesos industriales y biotecnológicos.

Como ya se sabe que hay una gran diversidad de inductores para diversas isoformas de lacasas y con distintas especies de basidiomicetos, es preciso investigar cual es la mejor fuente de nitrógeno que induzca la isoforma de la enzima lacasa termoestable de *Trametes sp.* EUM1, ya que se ha observado que la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo tiene influencia en el microorganismo para la inducción de las isoformas de la enzima lacasa. Así también se pretende formular medios definidos que faciliten los cultivos bajo condiciones controladas y obtener el perfil de isoformas de lacasas por medio de Zimografía para comenzar el rastreo de los genes que codifiquen para las lacasas en el hongo termotolerante *Trametes sp.* EUM1 y consecutivamente, se puedan expresar en algún vector y así mejorar la producción de estas enzimas.

4. HIPÓTESIS

El tipo de la fuente de nitrógeno tiene un efecto en la expresión de las distintas lacasas del hongo *Trametes sp.* EUM1. Las propiedades de cada extracto crudo con lacasas diferentes pueden estimarse midiendo la estabilidad térmica de las isoformas producidas. Simultáneamente se tendrá la posibilidad de identificar y clonar fragmentos del ADN genómico del hongo que puedan pertenecer al gen o los genes de la enzima lacasa.

5. OBJETIVO GENERAL

Identificación de los perfiles de producción y termoestabilidad de lacasas del hongo *Trametes sp.* EUM1 bajo diferentes condiciones.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluación de la actividad enzimática de las lacasas de *Trametes sp.* EUM1.
- Identificación de las isoformas termoestables de las lacasa en el hongo *Trametes sp.*
- Diseño de cebadores específicos a partir de regiones conservadas de los genes de lacasas.
- Amplificación a través de la PCR y purificación de los fragmentos del gen de una lacasa.
- Construcción de la genoteca de ADNc a partir de los cultivos que expresen lacasas termoestables.
- Secuenciación y análisis de los fragmentos obtenidos.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1. Microorganismos

7.1.1. Hongos. El hongo en estudio para este proyecto fue el basidiomicete *Trametes sp.* EUM1, obtenido de la colección de la Universidad Autónoma – *Iztapalapa* y fue aislado en Mérida, Yucatán por Medina (2003).

7.1.2. Bacterias. El microorganismo utilizado para las clonaciones en el vector pGEM fue la cepa *Escherichia coli* JM109, adquirida a Promega, como parte del sistema pGEM-T Easy Vector Systems II (Referencia A3610). Esta cepa que contiene integrado de forma estable en su cromosoma el gen que codifica para la ARN polimerasa del bacteriófago T7 (gen 1), expresado bajo el promotor *lac* UV5 (inducible por medio de IPTG).

Genotipo *Escherichia coli* JM 109: *endA1, recA1, gyrA96, hsdR17(r_k⁻ m_k⁺), thi relA1, supE44, Δ(lac-proAB) [F' traD36, proAB, lac^qZ ΔM15] λ(DE).*

Para el manejo de la genoteca de ADNc se usó el vector λTriplEx2 y los microorganismos *Escherichia coli* XL1-Blue y BM 25.8 que se utilizaron para la titulación y la conversión del bacteriófago a plásmido, respectivamente. Estos fueron adquiridos de Clontech, como parte del sistema SMART™ cDNA Library Construction Kit con la referencia PT3000-1(PR15738).

Genotipo *Escherichia coli* XL1-Blue: *endA1, gyrA96, hsdR17, lac⁻, recA1, relA1, supE44, thi-1, [F' lac^qZ ΔM15, proAB, Tn 10].* La modificación Tn 10, confiere resistencia a tetraciclina a la cepa.

Genotipo de *Escherichia coli* BM25.8: *supE44*, *thi* Δ (*lac-proAB*) [F' *traD36*, *proAB*⁺, *lacI*^qZ Δ M15] *limm434* (*kan*^R)P1 (*cam*^R) *hsdR* (*r*_{k12}⁻ *m*_{k12}⁻). La cepa es lisogénica para el fago λ y P1, se usa esta cepa para la sub-clonación automática y fue conservada en glicerol al 20% a -80°C.

7.2. Medios de cultivo para bacterias

7.2.1. Medio Luria –Bertani (LB). Utilizado para el crecimiento y mantenimiento de la cepa de *Escherichia coli* (Sambrook y col., 1989).

Reactivo	Cantidad
Bacto-triptona	10.0 g
NaCl	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Agua destilada	Hasta 1L

Se adicionaron 20 gramos de agar bacteriológico para el medio LA. Se ajustó el pH a 7.5 y se esterilizó.

Para el caso de la selección de las transformantes por resistencia a antibióticos, se siguió el protocolo proporcionado por el proveedor (Technical Manual de pGEM-T Easy Vector Systems producido por Promega). En este protocolo se utilizó medio LB adicionado con ampicilina que fue previamente esterilizada por filtración obteniéndose una concentración final de 100 μ g/mL. Además, se empleó IPTG y X-Gal para la selección de transformantes por colonias azul-blanco a concentraciones finales de 0.5 mM y 80 μ g/mL, respectivamente.

7.2.2. Medio NZY/MgSO₄. Utilizado para el crecimiento de *E. coli* XL1-Blue, con el fin de obtener las placas de lisis con el bacteriófago λ TriplEx2 (Sambrook y col., 1989).

Reactivo	Cantidad
NZ Amino	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
NaCl	5.0 g
MgSO ₄	2.0 g
Agua destilada	Hasta 1L

Para el medio NZY sólido, se agregaron 15 gramos de agar para su solidificación y para el medio NZY TOP se agregaron 7.2 gr de agar por litro de medio. El pH se ajustó a 7.5, para cualquiera de los caso.

7.2.3. Medio Terrific Broth (TB). Utilizado para promover el crecimiento de *E. coli*, con el fin de obtener el ADN plásmidico (Sambrook y *col.*, 1989).

Reactivo	Cantidad
Bacto-triptona	24.0 g
NaCl	12.0 g
Glicerol	4.0 mL
Agua destilada	Hasta 900 mL

Una vez conseguido el volumen se esteriliza por medio de autoclave, se añaden 100 mL de una solución estéril de KH₂PO₄ 170 mM y K₂HPO₄ 720 mM para conseguir el volumen final de un litro.

7.3. Medios de cultivo para hongos

7.3.1. Medio Kirk (Kirk et al., 1986). Este es un medio definido, limitado en nitrógeno, el cual contiene:

Medio:

Solución de elementos traza:

Reactivo	Cantidad	Reactivo	Cantidad
		Ácido nitriloacético	1.50 g
		MnSO ₄ * H ₂ O	0.50 g
		NaCl	1.00 g
Glucosa	10.00 g	FeSO ₄ * 7H ₂ O	0.10 g
Tartrato de Amonio*	0.20 g	CoCl ₂	0.10 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.50 g	ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0.10 g
KH ₂ PO ₄	2.00 g	CuSO ₄ * 5H ₂ O	0.01 g
CaCl ₂	0.10 g	AlKSO ₄ * 12H ₂ O	0.01 g
Tiamina . HCl	1.0 mg	H ₃ BO ₃	0.01 g
Sol. de Elementos Traza	10.0 mL	NaMoO ₄ * 2H ₂ O	0.01 g
Agua destilada	Hasta 1L	Agua Destilada	Hasta 1L

Para el medio Kirk sólido, se agregaron 20 gramos de agar bacteriológico.

* Nota: El medio Kirk presenta una relación C/N de 133 y una relación de C/P de 8.8. Por otro lado, el tartrato de amonio fue reemplazado como fuente de nitrógeno por peptona de caseína para el ensayo de fermentación líquida sin agitación.

7.3.2. Medio de Malta. Este es utilizado para la producción de micelio, propagación y conservación del hongo. Contiene Extracto de malta al 2 % (20 g/L). Para el medio sólido se agregan 20 g/L de agar bacteriológico. Se esteriliza por medio de autoclave a 120°C durante 15 minutos (Sambrook y *col.*, 1989).

7.4. Ensayo de fermentación líquida sin agitación

7.4.1. Método. Se realizaron pruebas por duplicado para el medio Kirk con las distintas fuentes de nitrógeno (Tartrato y Peptona); siendo el medio Kirk adicionado con tartrato el testigo. Para ello, se agregaron 100 mL de cada uno de los medios en matraces Erlenmeyer de 500mL. A este medio, se le agregó un pre-inóculo el cual contenía el micelio del hongo *Trametes sp.* EUM1, correspondiente al 10% del volumen total del medio de cultivo. Las condiciones de incubación en las que se mantuvo el ensayo, fueron: a una temperatura de 39°C, sin agitación, durante 30

días (Márquez, 2004). Se tomaron muestras del extracto enzimático de 15 mL durante el desarrollo miceliar cada 5 días para determinar la actividad enzimática de las lacasas en el medio durante la fermentación.

7.4.2. Determinaciones analíticas

7.4.2.1. Actividad Enzimática. Se determinó usando ABTS 5 mM como sustrato con un amortiguador buffer de acetato de sodio 100 mM a pH= 4.5 y temperatura ambiente. La absorbancia fue medida a una longitud de onda de 436 nm, durante 1 minuto. El coeficiente de extinción molar del producto (radical catiónico del ABTS) es $\epsilon_{436\text{nm}} = 2.93 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Wolfenden, 1982); Una unidad enzimática se define, como la cantidad de enzima que forma 1.0 μmol de producto por minuto bajo las condiciones ensayadas.

7.4.2.2. Determinación de la termoestabilidad. Durante el periodo de incubación y de generación del micelio se tomaron muestras de 15 mL cada cinco días de cada uno de los matraces y se filtraron para eliminar el micelio presente. Después se tomó una muestra de 5mL de cada uno de los filtrados y se depositaron en tubos de ensayo con rosca para su incubación en un baño María con temperatura controlada a 60°C, 70°C o 80°C, durante una hora (Márquez, 2004).

Transcurrido el tiempo, las muestras se sacaron las muestras del baño maría y se enfriaron a temperatura ambiente. Por último, se determinó la actividad enzimática, para cada una de las muestras provenientes de los tratamientos térmicos y se calculó el porcentaje de la enzima activa presente en los extractos enzimáticos.

7.4.2.3. Preparación de los extractos enzimáticos y la enzima comercial. La enzima que fue utilizada como control fue obtenida de Novo Nordisk, la cual fue separada por precipitación con acetona fría, a partir de la preparación comercial llamada DeniLite II S según Villaseñor y col. (2004); Esta preparación contiene la

enzima lacasa de *Myceliophthora termophila*, clonada en *Aspergillus oryzae* (EC 1.10.3.2) (Berka y col., 1997). Una vez precipitada la enzima comercial, se disolvió en agua destilada obteniendo una concentración final de proteína de 100 mg/mL, posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm a temperatura ambiente durante 30 min. Finalmente se decantó y el sobrenadante se filtró por una membrana millipore de 0.45 μ m, para finalmente colocarlo en un baño de hielo.

Los extractos enzimáticos fueron colectados cada 5 días a partir de la realización de una cinética con el hongo *Trametes sp.* EUM1 a 39°C desarrollado durante 30 días. Se concentraron a través de membranas de nylon (Sigma) y por medio de una cama de sacarosa. Posteriormente las membranas se lavaron con buffer de acetatos 100 mM a pH 5. Una vez concentradas las muestras obtenidas, se juntaron en una sola fracción y se precipitaron con acetona fría.

7.4.2.4. Precipitación con acetona fría. Esta técnica se realizó agregando, poco a poco y con agitación constante, la acetona previamente enfriada a -80°C en el ultracongelador, hasta alcanzar, un 85% en volumen, concentración a la cual precipita casi la totalidad de la proteína de la enzima lacasa. Se centrifugó a 10,000 rpm a una temperatura de -10°C por 20 min. El precipitado se lavó con acetona fría. Se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones y se recuperó el precipitado evaporando el excedente de acetona.

7.5. Zimogramas

7.5.1. Método. La técnica de zimografía se realizó mediante una electroforesis en condiciones nativas, y se reveló el gel con un sustrato específico para la actividad enzimática en estudio. El sustrato utilizado para revelar los zimogramas de lacasa fue el ABTS (Téllez-Téllez y col., 2005).

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes, en cubetas Mini-Protean (Bio-Rad). La concentración de poliacrilamida fue del 4% en el gel concentrador y del 12% en el separador. Se cargó un volumen de 15µL de las muestras colectadas y concentradas durante el crecimiento de la cepa EUM1, colocando una misma concentración de proteínas en todas las muestras (10µL de proteína/mL) y se aplicó un voltaje constante de 180V, hasta que el frente formado por la migración del azul de bromofenol alcanzó el otro extremo del gel (aproximadamente una hora).

Se utilizó el marcador preteñido para SDS-PAGE de Bio-Rad que comprende un rango de peso molecular de 20,700 a 107,000 daltons. Para realizar el revelado, el gel se equilibró previamente con un amortiguador de acetatos 0.1 M (pH 5.0). Se agitó durante 20 minutos, tras lo cual se añadió ABTS 10 mM diluido en tampón de acetatos 0.1 M (pH 5.0). El gel fue incubado hasta la aparición de las bandas azules características de la actividad lacasa en presencia de este sustrato, y se detuvo la reacción lavando el gel con el mismo amortiguador de acetatos sin ABTS.

7.5.2. Soluciones para la realización de los zimogramas. A continuación se presentan las soluciones utilizadas para el gel de poliacrilamida:

Solución	Reactivo	Cantidad
A	Archilamida/bis (30% T, 2.67% C)	29.5 g
	N, N-bis-metilenacrilamida	0.8 g
	Agua desionizada	Hasta 100 mL

* Se almacena a 4°C durante 30 días máximo.

Solución	Reactivo	Cantidad
B	1.5M Tris-HCl pH 8.8	
	Tris-Base	18.15 g
	Agua desionizada	Hasta 100 mL

* Ajustar pH 8.8 con HCL 6N y almacenar a 4°C.

Solución	Reactivo	Cantidad
C	0.5M Tris-HCl pH 6.8	
	Tris-Base	6 g
	Agua desionizada	Hasta 100 mL

* Ajustar pH 6.8 con HCL 6N y almacenar a 4°C.

Solución	Reactivo	Cantidad
D	Buffer de Muestra	
	0.5M Tris-HCl pH 6.8	5 mL
	Glicerol	4 mL
	1% de azul de bromofenol (0.1g/10mL)	2 mL
	Agua desionizada	Hasta 40 mL

* Diluir la muestra 1:4. Se almacena a 4°C.

Solución	Reactivo	Cantidad
E	Buffer de Corrida 5X pH 8.3	
	Tris-Base	15 g
	Glicina	72 g
	Agua desionizada	Hasta 1 L

* Agregar los reactivos y agitar levemente, almacenar a 4°C. Si ocurre precipitación incubar a temperatura ambiente.

7.5.3. Preparación del gel de separación. A continuación, se presenta las cantidades necesarias para la preparación del gel de separación al 12 %.

Reactivo	12 %
Agua destilada	2.45 mL
1.5M Tris-HCl (pH 8.8)	2.50 mL
Archilamida/bis (30%)	4.00 mL
Persulfato de amonio 10% (Fresco)*	50 µL
TEMED	5 µL
Volumen Total	10 mL

*Para hacer el persulfato de amonio al 10% (disolver 100mg de APS en 1 mL de agua desionizada).

7.5.4. Preparación del gel concentrador. En seguida, se presentan los volúmenes a utilizar de cada uno de los reactivos para la preparación del gel concentrador.

Reactivo	4%
Agua destilada	6.10 mL
0.5M Tris-HCl (pH 6.8)	2.50 mL
Archilamida/bis (30%)	1.34 mL
Persulfato de amonio 10% (Fresco)	50 µL
TEMED	10 µL
Volumen Total	10 mL

7.6. Técnicas de Biología Molecular

7.6.1. Obtención de ADN

7.6.1.1. Obtención de ADN genómico. En primer lugar se creció el hongo durante 20 días y el micelio fue eliminado por filtración. A continuación el micelio fue lavado con agua destilada estéril, se exprimió para eliminar el exceso de agua y se liofilizó, para mantenerlo de esta forma en un desecador hasta su uso.

Para la extracción de ADN, se trituró el micelio liofilizado en un mortero; pesándose después 50 mg y se resuspendieron en 500 μ L de la solución 1 (10 mM de Hepes pH a 6.9, 0.5 mM de sacarosa y 20 mM de EDTA) homogenizándose y agregando 50 μ L de SDS 10 % para su incubación a 65 °C durante 30 minutos. Después de este tiempo se diluyó con 500 μ L de solución 2 (50 mM de Tris-HCl pH 8 y 50 mM de EDTA) y se agitó suavemente durante 1 minuto.

Posteriormente, se agregó 1 mL de la mezcla de fenol: cloroformo: alcohol isoamilico (25:24:1) agitándose durante 3 minutos y se centrifugo durante 15 minutos a 12,000 rpm. La fase superior se colocó en un tubo limpio y se lavó con la solución cloroformo: isoamilico (24:1). Una vez realizado el paso anterior, se mezcló y centrifugó a 12,000 rpm, durante 15 minutos y la fase superior se paso a un tubo limpio, en donde se añadió 1 mL de etanol al 100 % enfriado previamente a -20 °C y se dejó a esta temperatura durante 2 horas, para centrifugarse después a las mismas condiciones. Se decantó el sobrenadante dejando solamente la pastilla formada al fondo del tubo. Se lavó con 1 mL de etanol al 70 % y se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos; pasado ese tiempo se decantó y se dejó secar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Resuspendiéndose después en 500 μ L de agua desionizada estéril. Para la eliminación del ARN se agregó 1 μ L de RNasa (10mg/mL), se incubó a 37 °C durante media hora, adicionando después de este

tiempo 10µL de acetato de sodio 4.0 M pH 3.0, se mezcló suavemente, añadiéndose después 1 mL de etanol al 100 %, centrifugándose después. Por último, se adicionó 1mL de etanol al 70 % y se centrifugó. El pellet fue resuspendido en 30 µL de agua desionizada estéril.

7.6.1.2. Obtención de ADN plásmidico. Se obtuvo mediante la realización de mini-preparaciones, el método que consiste en picar cada colonia con un palillo estéril pasándola a un tubo Eppendorf que contenía 1 mL de medio TB con antibiótico a la concentración requerida. Se incubó a 37°C durante 6 o 7 horas con agitación (250 rpm). Después se centrifugó a 3,000 rpm durante 3 minutos. Se desechó el sobrenadante y se conservó el precipitado que se resuspendió en 350 µL de solución STET (EDTA 50mM pH 8.0, Sacarosa al 8%(p/v), Tris-HCl 10mM pH 8.0 y Tritón X100 al 0.5%(v/v)) y se añadió 10 µL de una solución de lisozima de 10 mg/mL en agua. Se mezcló durante 30 segundos y se sometió a calentamiento con agua hirviente durante 45 segundos. Una vez pasado este tiempo se sacó y se centrifugó durante 10 minutos a 14000 rpm. Terminado el paso anterior, se eliminó con ayuda de un palillo los residuos de proteínas que se encontraban al fondo del tubo. El ADN plásmidico se precipitó con 40 µL de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 600 µL de alcohol isopropílico y se dejó a temperatura ambiente durante 15 minutos; pasados los 15 minutos se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos desechando después el sobrenadante y lavando con etanol al 70 %. Por último, se dejó secar y se resuspendió en agua desionizada estéril. La técnica de mega-preparaciones se utilizó normalmente para aquellos experimentos en los que se requería una gran cantidad de ADN fácilmente digerible.

En las mega preparaciones se inoculan 100 mL de medio TB con la colonia que porta el plásmido que queremos amplificar, de la misma forma descrita para las mini-preparaciones. Tras este tiempo se recogen las células mediante centrifugación a 5,000 rpm durante 3 minutos. El precipitado obtenido se resuspende en 6 mL de STET y la suspensión de bacterias se reparte en alícuotas de 350 µL. Los pasos que

se siguen a continuación son ligeras modificaciones de los realizados en las minipreparaciones. A cada tubo se le añaden 20 μ L de una solución de lisozima preparada a una concentración de 10 mg/mL en agua.

Se mezcla durante 30 segundos y se hierve durante 45 segundos. Las proteínas, restos celulares y el ADN cromosómico bacteriano se precipitan por centrifugación a 14,000 rpm durante 15 minutos y se eliminan con la ayuda de un palillo estéril. El precipitado blando que se obtiene en este caso ocupa gran parte del tubo y es muy importante eliminarlo completamente. El ADN plasmídico se precipita tras añadir 40 μ L de acetato sódico 3M pH 5.2 y 600 μ L de isopropanol, mezclar y mantener a temperatura ambiente durante 15 minutos. Este tiempo puede reducirse debido a la gran cantidad de ADN obtenido por este método.

El ADN se centrifuga a 14,000 rpm durante 5 minutos y el precipitado se lava con etanol a concentración de 70 % (v/v). Posteriormente se seca y el precipitado correspondiente a cada alícuota se resuspende en 100 μ L de TE. Tras la resuspensión del ADN, se reúnen todas las fracciones en un mismo tubo y se limpia la solución de ADN mediante fenolización. Posteriormente se precipitará de acuerdo a los métodos habituales y se resuspenderá en un volumen adecuado de TE (EDTA 1 mM y Tris-HCl 10 mM pH 8.0) (Serrano y col., 1993).

7.6.1.3. Obtención del ADN de bacteriófago. Para la obtención del ADN del bacteriófago se requiere una infección en medio líquido y para ello se mezclan 10^9 células de *E. coli* con un número 100 veces menor de bacteriófago (10^7 pfu), incubándose a 37°C durante 30 minutos sin agitación.

Transcurrido el periodo de incubación se inocula la infección en un matraz de 500 mL de volumen con 100 mL de medio LB con $MgSO_4$ 10 mM y maltosa al 2 % (precalentado a 37°C durante el transcurso de la infección) y se mantiene a 37°C con agitación de 200 rpm y el tiempo necesario para que se produzca la lisis total del

cultivo bacteriano (entre 5 y 6 horas). Es importante parar la incubación cuando el grado de lisis conseguido sea máximo, pues si la incubación continua se producirá la aparición en el cultivo de células de *E. coli* resistentes a la acción de los bacteriófagos.

El lisado obtenido en el paso anterior se incuba a 37 °C durante 30 minutos con 200 µL de la solución A (ARNasa A / ADNasa I proporción 20/1 mg/mL, BSA 0.2 mg/mL, EDTA 10 mM, NaCl 300 mM y Tris-HCl 100 mM pH 7.5).

Se pasa a través de un filtro de nylon de 30 µm de diámetro de poro para eliminar los restos celulares. El filtrado se recoge en un tubo de centrifuga y se añaden 20 mL de la solución B (NaCl 3.0 M y PEG 6,000 al 30 % (p/v)) previamente enfriada. La mezcla se incuba en hielo durante 60 minutos. Se centrifuga a 4 °C y 8,000 rpm, durante 10 minutos para precipitar las partículas de bacteriófago y se desecha el sobrenadante tras el final de la centrifugación.

El precipitado obtenido en el paso anterior, se distribuye a lo largo de la pared del tubo y se resuspende suavemente en 6 mL de la solución C (EDTA 25 mM, NaCl 100 mM y Tris-HCl 100 mM pH 7.5), añadiéndose a continuación 6 mL de la solución D (SDS al 4% (p/v)), se mezcla con cuidado y se incuba a 65°C durante 20 minutos, enfriándose posteriormente la mezcla en un baño de hielo y agua.

El paso siguiente consiste en adicionar 6 mL de la solución E (Acetato potásico 2.55 M pH 4.8). La mezcla se agita vigorosamente y se mantiene en hielo durante 15 minutos. Se centrifuga a 4 °C y 15,000 rpm durante 10 minutos. Se recoge el sobrenadante en un tubo y se precipita el ADN a continuación con 0.7 volúmenes de isopropanol.

Posteriormente se centrifuga a temperatura ambiente a 8,000 rpm durante 20 minutos y el precipitado se lava con etanol al 70% (v/v). Se centrifuga a las mismas

condiciones eliminándose el sobrenadante y se seca el precipitado. Una vez seco, el ADN se resuspende en 50 μ L de TE (EDTA 1 mM y Tris-HCl 10 mM pH 8.0) (Serrano y col., 1993).

7.6.1.4. Cuantificación de ADN. La cuantificación de la concentración del ADN se realizó por espectrofotometría leyendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm con lámpara UV y teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm, equivale a 50 μ g de ADN por mL. Su integridad se verificó en geles de agarosa al 1 % y teñidos con bromuro de etidio (Sambrook y col., 1989).

7.6.2. Obtención de ARN

7.6.2.1. Obtención del ARN total. Para la obtención del ARN total del hongo, se utilizó el sistema FastRNA^R, RED (BIO 101) siguiendo el protocolo sugerido por el proveedor (Referencia Revisión 6030-999-1J05). El ARN total que obtuvo con esta metodología fue purificado y se utilizó para la síntesis del ADNc que formara parte después de la genoteca.

7.6.2.2. Cuantificación de ARN total. La cuantificación de la concentración del ARN total se realizó por espectrofotometría leyendo la absorbancia a 260 nm, 280 nm y 330nm con lámpara UV y teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm, equivale a 40 μ g de ARN por mL. Su integridad se verificó en geles de agarosa 0.8% y teñidos con bromuro de etidio (Sambrook y col., 1989).

7.6.3. Electroforesis

7.6.3.1. Electroforesis en geles de agarosa. Se utilizaron geles de agarosa horizontales para la separación, identificación y purificación de moléculas de ácidos nucleicos. La concentración de la agarosa varió entre 0.5 y 2 % y se utilizó TAE (40 mM Tris-acetato, EDTA 1 mM pH 8.0) o TBE (45 mM Tris-borato, EDTA 1 mM pH

8.0) como amortiguador, ya sea para ADN o ARN respectivamente (Sambrook y col., 1989).

Para la estimación del tamaño de las moléculas de ADN, en base a su movilidad electroforética, se utilizaron los marcadores de peso molecular “100 pb” y 1kb adquiridos en Promega y se adicionaron conforme menciona el proveedor.

7.6.3.2. Purificación de ADN de geles de agarosa. Para la purificación del ADN genómico, fragmentos de ADN y plásmidos digeridos de geles de agarosa se utilizó el Kit GENECLAN^R Turbo (Bio 101) siguiendo el protocolo sugerido por el proveedor.

7.6.4. Diseño de Cebadores y PCR

7.6.4.1. Diseño de cebadores. Para el diseño de los cebadores se realizó el alineamiento de secuencias homólogas de varios genes de lacasas, previamente buscados en las bases de datos NCBI y EMBL. Una vez alineados se localizaron las regiones conservadas en los alineamientos (regiones con similitud mayor al 90 %) y se tomaron en cuenta las siguientes características para los cebadores: composición de los fragmentos con G y C entre 50-60 %, longitud de los fragmentos entre 18-25 nucleótidos (Sambrook y col., 1989).

7.6.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Con el fin de identificar y clonar el gen de interés, se puso a punto el método de PCR. Este método consiste en el proceso natural de la replicación del ADN. Por lo que, en cada paso se tendrá el doble de moléculas de ADN formadas que existían en el paso anterior (Sambrook y col., 1989). En este proceso, se utilizan oligonucleótidos o cebadores que son diseñados para tal efecto.

Para este proceso se utilizaron las condiciones propuestas por D'Souza y col. (1996). A estas se les realizaron algunas modificaciones para nuestros cebadores diseñados. Las condiciones fueron las siguientes: Se preparó en tubos eppendorf de 200 μ L la siguiente mezcla de reacción para la PCR:

Reactivos	Cantidades
Buffer 10X	5.0 μ L
MgCl ₂ (25 mM)	6.0 μ L
dNTP's (0.1 mM)	1.0 μ L
Cebador Lcc3 (20 mM)	1.0 μ L
Cebador Lcc4 (20 mM)	1.0 μ L
ADN molde (50 ng/ μ L)	1.0 μ L
H ₂ O desionizada estéril	34.5 μ L
Taq Polimerasa Promega (2.5 U/ μ L)	0.5 μ L
Volumen Total	50.0 μ L

Las condiciones del termociclador fueron:

Se aplicó un ciclo a:

94°C durante 2 minutos. **Desnaturalización**

54°C durante 1 minuto. **Hibridación**

72°C durante 2 minutos. **Elongación**

Se aplicaron 30 ciclos:

94°C durante 45 segundos. **Desnaturalización**

54°C durante 1 minuto. **Hibridación**

72°C durante 1 minuto. **Elongación**

Por último, se aplicó un ciclo a:

72°C durante 5 minutos. **Elongación**

Para la identificación de estos productos se utilizaron geles de agarosa al 2 % y se corrieron con un voltaje de entre 80 y 100 V para la identificación de las bandas menores de 1kb.

7.6.4.3. Clonación de productos de PCR. Para el clonaje se utilizó el plásmido pGEM easy vector systems (Promega) (Fig. 2). Este es empleado como vector de clonación de productos de PCR, para la producción de ADNss con un tamaño de 3015 pb y formado por las siguientes inserciones.

El gen de β -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina. Un fragmento del operon *lac* de *E. coli*, que contiene el promotor y una porción del gen *lacZ* que puede complementar la mutación *lacZ*. Una secuencia de clonación múltiple (“polylinker”) con 19 sitios únicos para diferentes enzimas de restricción y promotores reconocidos por la ARN polimerasa de los fagos T7 y SP6, flanqueando la secuencia de clonación múltiple.

Para la ligación y transformación de los fragmentos se realizaron los procedimientos proporcionados por el proveedor en el manual técnico número 042.

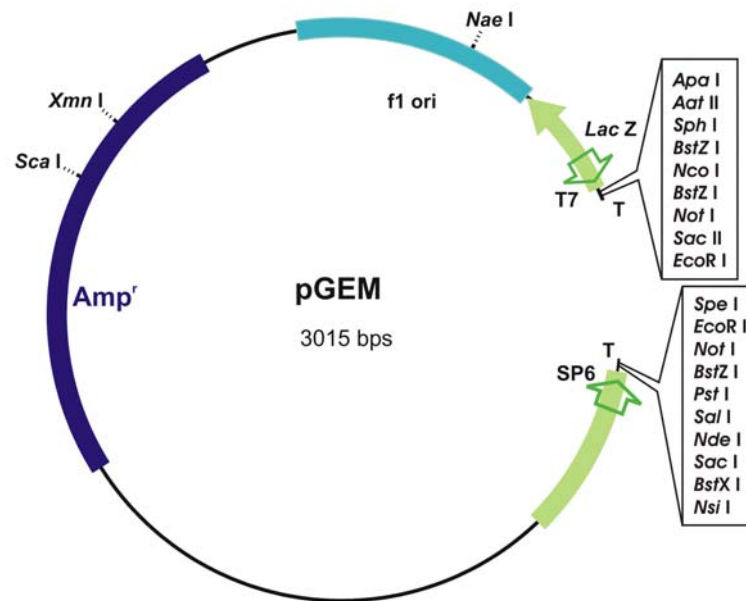


Figura 2. Vector pGEM easy systems

7.6.5. Digestión con enzimas de restricción

7.6.5.1. Digestión del ADN plásmidico con enzimas de restricción. Las digestiones del ADN se realizaron siguiendo las especificaciones indicadas por los proveedores (Promega) ó las descritas por Sambrook y col. (1989). A continuación se muestran las cantidades de los reactivos utilizados:

7.6.6. Genoteca de ADNc

7.6.6.1. Construcción de la genoteca de ADNc. Para la construcción de la genoteca de ADNc se siguió el protocolo SMART™ cDNA Library Construction Kit (PT3000-1(PR15738)) sugerido por el proveedor (CLONTECH). El vector utilizado en este sistema es λTriplEx2 (fig. 3). Este vector provee una librería con alta titulación, escaneo de recombinates azules y blancos, regulación de la expresión de los

insertos clonados y facilita la conversión de clones de fago a un vector plásmidico vía subclonación mediador-Cre-*lox*.

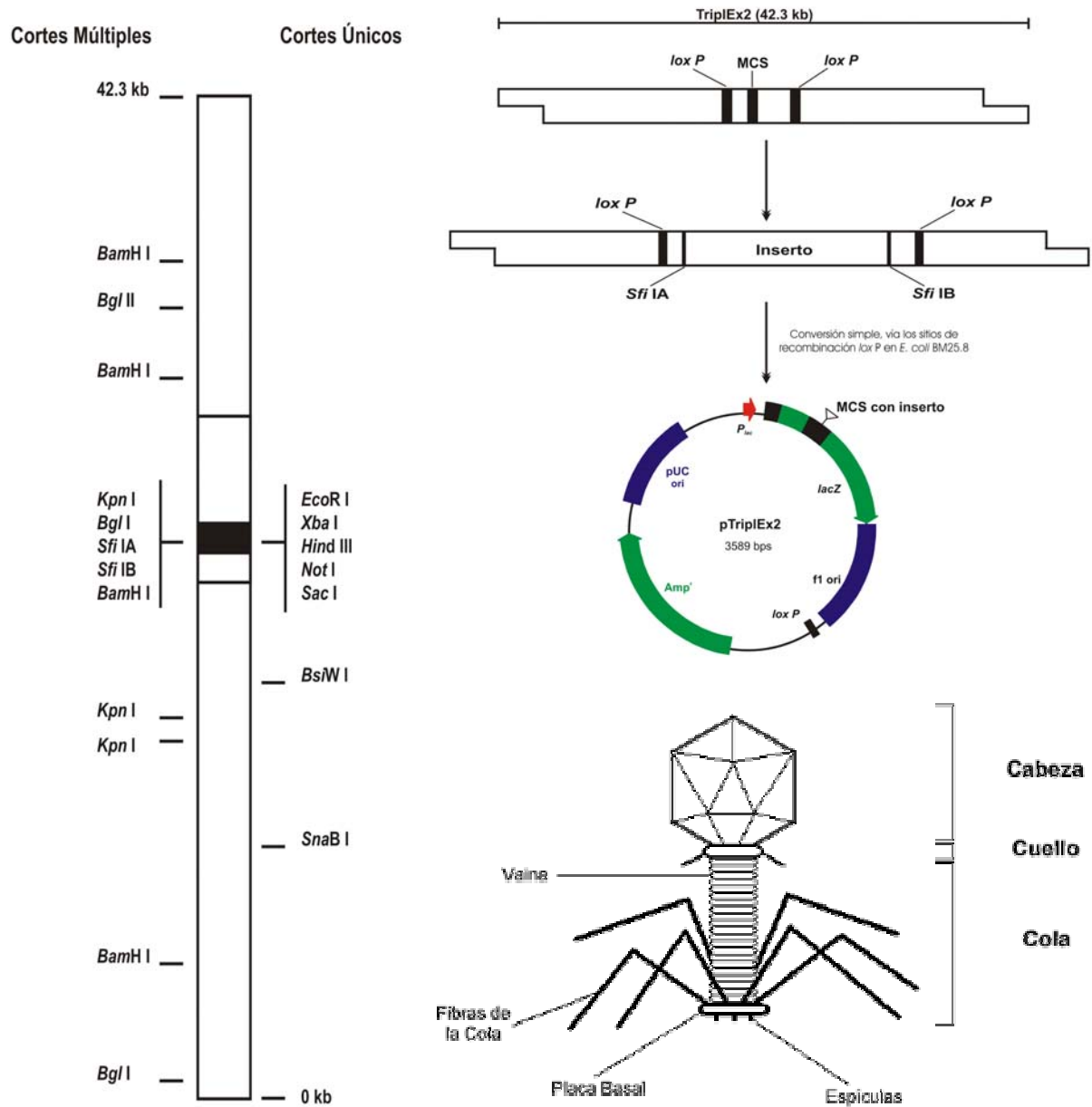


Figura 3. Vector λ TriplEx2

Para la síntesis de la genoteca, fue necesario extraer del ARN total del hongo; después se purificó y cuantificó (para tener una cantidad de entre 0.025 a 0.5 µg de ARN). Una vez cuantificado, se realizó la síntesis de la primera hebra de ADNc utilizando los cebadores SMART IV y CDS III/3, por medio de PCR y la mezcla de la transcriptasa reversa PowerScript. Una vez sintetizada la hebra, se amplificó nuestro ADNc mediante el Advantage 2 PCR kit, el cual utiliza los cebadores 5' PCR y el CDS III/3' PCR. Terminada la amplificación del ADNc se realiza la digestión con la proteinasa K, esta enzima digiere las proteínas que se encuentran interfiriendo en nuestra muestra de ADNc amplificada.

El siguiente paso de la síntesis es la digestión con la enzima de restricción *sfi* I; enzima que reconoce los sitios 5'-ATTAC-3'/3'-TAATG-5' ó 5'-GCCTC-3'/3'-CGGAG-5' dentro de los fragmentos de ADNc y realiza los corte correspondientes. Realizada la digestión, se pasó nuestro ADNc por la columna CHROMA SPIN-400, la cual efectuó el fraccionamiento del ADNc dependiendo del tamaño de los fragmentos y son seleccionadas las fracciones que contengan fragmentos mayores a 600 pares de bases. Después del fraccionamiento, se realizó la ligación y el empaquetamiento de nuestro ADNc al bacteriófago λTriplEx2. Posteriormente, se realizó la titulación de la genoteca no amplificada y después a la genoteca amplificada.

Finalmente, se efectuó la extracción del ADN de bacteriófago y por medio de PCR utilizando los cebadores 5' Primer y PCR CDS III/3' proporcionados por el Advantages 2 PCR kit para verificar el tamaño de los fragmentos contenidos dentro del bacteriófago de nuestra genoteca. Los cebadores mencionados en la metodología son sintetizados y proporcionados por el proveedor, al igual que cada uno de los kits mencionados. A continuación, se presenta el diagrama donde se resume la metodología utilizada para la síntesis de la genoteca.

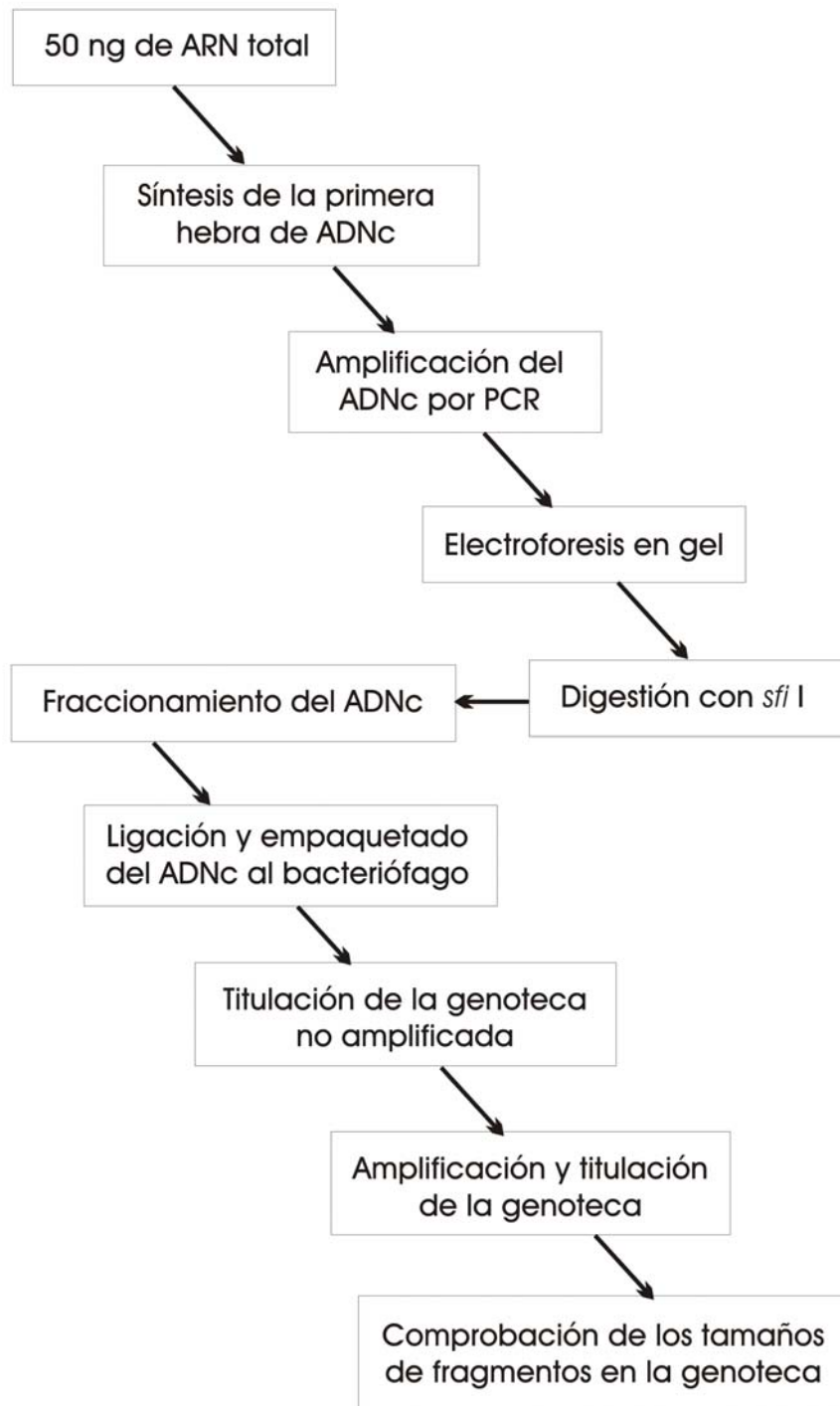


Diagrama 1. Procedimiento de la síntesis de la genoteca de ADNc (SMART™ cDNA Library Construction Kit).

7.6.6.2. Conversión de ADN del fago λ TriplEx2 al plásmido pTriplEx2. Para esta técnica se utilizó la cepa de *E. coli* BM 25.8, crecida en placas de medio LB y se incubó a 31 °C durante 6 horas. Después, se tomó una colonia y se inoculó un tubo de ensayo con 10mL de medio LB, incubándose este a 31 °C a 150 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 0.6 a una longitud de onda de 595 nm. Realizado el procedimiento anterior, se agregó al cultivo de células el volumen adecuado de la solución de $MgCl_2$ 1 M para tener al final una concentración de 10 mM de $MgCl_2$ en el cultivo. A continuación se realizó la mezcla de infección, la cual consistió en agregar 100 μ L de cultivo de células y 100 μ L de bacteriófago suspendido en buffer SM (50 mM Tris HCl, 0.1 M NaCl, 8 mM $MgSO_4$, 0.1% gelatina a pH 7.5) y se incubó a 31 °C durante 30 minutos sin agitación. Después de este tiempo se adicionaron 300 μ L de medio LB y se incubó una hora a 31 °C con agitación a 200 rpm. Finalmente, se agregaron 100 μ L de esta mezcla a las placas que contenían medio LB/antibiótico (ampicilina 200 μ g/mL). Se distribuyó uniformemente sobre la placa y se incubó a 31 °C hasta la aparición de las colonias bacterianas.

7.6.7. Hibridación con sondas

7.6.7.1. Realización de las placas de lisis. Para esta metodología se prepararon las células *E. coli* XL1-blue. Esta cepa se creció en medio LB en placa para su reactivación y una vez obtenido su crecimiento en la placa, se picó una colonia y se creció en 10 mL de medio LB. Para realizar el preinóculo, se incubó a 37 °C con buena aireación durante al menos 6 horas. Después, se agregaron 100 μ L de preinóculo a un tubo de ensayo que contenía 10 mL de medio NZY/ $MgSO_4$ líquido suplementado con maltosa al 2 %, el cual se incubó a 37 °C a 150 rpm, hasta obtener una densidad óptica entre 0.5-0.6 a 595 nm. Realizado este procedimiento, se infectaron las células en una mezcla que contenía 100 μ L de *E. coli* y 100 μ L de fagos suspendidos en medio SM (50 mM Tris HCl, 0.1 M NaCl, 8 mM $MgSO_4$, 0.1 % gelatina a pH 7.5) que se incubó durante 30 minutos sin agitación. Pasado ese

tiempo, se sacaron las muestras y se agregó medio NZY TOP, se mezcló homogéneamente y se vertió en las placas de medio NZY/MgSO₄ dejándose enfriar el medio para su solidificación y se incubó a 37 °C durante al menos 4 horas hasta la aparición de las placas de lisis. Por último, se dejó enfriar a 4 °C y a continuación se realizó la transferencia a las membranas de nylon (Yaver y col., 1996).

7.6.7.2. Transferencia de las placas de lisis a membranas de nylon. En esta metodología, se utilizaron las membranas de nylon cortadas al tamaño de las cajas Petri y se marcaron las membranas con tres pequeños cortes triangulares. Se sacaron las placas de lisis del refrigerador y se comenzó la transferencia colocando las membranas por arriba de las placas teniendo cuidado de que no se formaran burbujas o se movieran y se dejó durante minuto marcando los pequeños cortes en la caja Petri para tener la referencia de la membrana (la manipulación de los filtros se realizó con guantes). Después de terminado el tiempo, se sumergieron las membranas en solución desnaturizante (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) durante 5 minutos. Luego a la solución neutralizante (1.5 M NaCl, 1 M Tris HCl a pH 7.4) durante 5 minutos y por último a la solución 2x SSC (se preparó solución 20x SSC, la cual consiste en: 0.3 M citrato sódico, 3 M NaCl a pH 7.0, a partir de esta solución se realizaron las diluciones correspondientes) durante 5 minutos. Pasado este tratamiento se dejaron secar los filtros y una vez secos se colocaron durante 4 minutos en la lámpara de UV para la fijación del ADN a la membrana.

7.6.7.3. Transferencia de los geles de agarosa a membranas de nylon (Southern). Se realizó la electroforesis utilizando un gel de agarosa al 1.5 %. En este gel, se colocaron las diversas muestras de ADN digeridos con las enzimas de restricción correspondientes, se corrió el gel a 90 V durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, se fotografió y se colocó el gel en una bandeja en donde se puso en contacto con la solución de desnaturización durante 45 minutos con agitación suave. Pasado este tiempo, se enjuagó con agua destilada. Luego, se neutralizó con el tampón de neutralización, incubándose durante 30 minutos con agitación suave (se realizaron

dos lavados). Terminando con el lavado con la solución neutralizante se cortaron las membranas de nylon al tamaño del gel. Las membranas fueron hidratadas con solución 10x SSC.

Se montó la transferencia, colocando primero la mecha (papel filtro) y encima el gel con la cara inferior hacia arriba. A continuación se colocó la membrana encima del gel. Se humedecieron dos piezas de papel filtro en solución 10x SSC y se colocaron encima de la membrana de nylon (en todo momento se deben evitar las burbujas). Finalmente se colocó una pila de papel absorbente y un peso encima dejándose transferir por 24 horas. Transcurrido el tiempo se levantaron los filtros y el papel absorbente y se marcaron los pocillos con un lápiz. Se extrajo la membrana y se observó el gel a luz UV para comprobar la transferencia total del ADN a la membrana. Por último, se lavó la membrana con solución 6x SSC durante 5 minutos; después de este tiempo se dejó secar la membrana y se colocó en la lámpara UV durante 4 minutos para fijar el ADN a la membrana.

Para la realización de la hibridación se realizaron dos metodologías, la hibridación radioactiva (^{32}P) y la no radioactiva (digoxigenina) para comprobar con estas técnicas la fidelidad de marcaje de nuestra sonda con las placas de lisis o el Southern blot. Por esta razón, se describen a continuación las dos técnicas de hibridación

7.6.7.4. Marcaje de sonda con ^{32}P . Para el marcaje de la sonda se utilizó el procedimiento propuesto en el manual de Métodos de Bioquímica y Biología Molecular (Serrano y col., 1993). Se adicionan los siguientes reactivos:

Reactivo	Cantidades
ADN de 40 a 80 ng (fragmento a marcar)	20.0 μ L
dNTP's (0.2 mM)	5.0 μ L
Mezcla (ADN polimerasa)	5.0 μ L
dCTP (Nucleótido con ³² P)	2.0 μ L
Agua Desionizada estéril	28.0 μ L
Volumen Total	50.0 μ L

Una vez preparada la mezcla se incubó a temperatura de 15 °C durante 60 minutos. Después de ese tiempo se paró la reacción con la solución STOP 2x (EDTA 10 mM pH 8 y SDS al 1 %).

La sonda marcada se purificó, adicionando 1mL de resina, y colocándose dentro de la columna de purificación montada en un tubo Eppendorf y se centrifugó a 12,000 rpm durante 30 segundos. Pasado el tiempo, se lavó la membrana de la columna con 1 mL de isopropanol al 80 % y se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 minuto. Se cambió el tubo Eppendorf por uno nuevo. Ya montado el tubo a la columna se agregó dentro de la columna 100 μ L de agua a 80 °C y se dejó reposar 20 minutos. Después de este tiempo se colocó en agua en ebullición durante 10 minutos. Por último, se sumergió el tubo en baño de hielo durante 10 minutos. Obteniéndose así la sonda marcada con ³²P.

7.6.7.5. Método de la hibridación radioactiva. La prehibridación se realizó colocando los filtros dentro del vial de hibridación y agregando el amortiguador de prehibridación PSE (1 M fosfato sódico, 10 % SDS, 0.5 M EDTA a pH 7.2) e incubarlo a 42 °C durante al menos 1 hora (no dejar secar los filtros entre prehibridación e hibridación). Terminado el tiempo, se eliminó el amortiguador y se añadió la sonda (previamente desnaturalizada por calor) junto con tampón de prehibridación (solución precalentada a 42 °C). Se colocó en el horno de hibridación a 42 °C e incubó toda la noche (aproximadamente de 18-24 horas). Transcurrido el

tiempo, se retiró la sonda y se guardó a -20 °C, ya que puede ser reutilizada varias veces. La membrana fue lavada dos veces durante 10 minutos cada repetición con al menos 50 mL de la solución 2x SSC y 0.1 % SDS. Por último, se lavó con al menos 50 mL de la solución 0.1x SSC y 0.1 % SDS durante 15 minutos a 42 °C, este lavado fue por duplicado. Terminado el proceso de hibridación se realizó la detección (Serrano y col., 1993).

7.6.7.6. Detección radioactiva. Una vez lavada las membranas se secaron, se envolvieron en plástico y se fijaron al casete de exposición, exponiendo la película a las membranas durante 1 día a -20 °C y se revelaron a temperatura ambiente.

7.6.7.7. Marcaje de sonda con digoxigenina. Para este procedimiento se utilizó la metodología propuesta por los proveedores (DIG DNA Labeling kit, Roche), la cual fue:

Se tomó 1µL de ADN (10-100 ng) a marcar (linearizado o no) y se completó hasta un volumen de 15µL. Después se desnaturalizó el ADN calentando en agua hirviendo (95 °C) durante 10 minutos y una vez transcurrido el tiempo se paso rápidamente a hielo durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo, se añadió a la muestra los siguientes reactivos del kit:

Reactivo	Cantidad
Mezcla de hexanucleotidos, 10x (vial 5)	2.0 µL
Mezcla de dNTP's marcados (vial 6)	2.0 µL
Reactivo Klenow (vial 7)	1.0 µL

Realizada esta mezcla se centrifugó a 12,000 rpm (spin) y se incubó de 18 a 24 horas a 37 °C en termomixer sin agitación. Por último, pueden añadir 2 µL de EDTA 0.2 M (pH 8.0) o calentarse a 65 °C durante 10 minutos para parar la reacción y se guardó la sonda a -20 °C.

7.6.7.8. Método de la hibridación no radioactiva. La prehibridación se realizó colocando los filtros dentro del vial de hibridación y agregando el amortiguador de prehibridación (solución de bloqueo al 2% (reactivo Blocking reagent de Roche), 5x SSC, 0.02% SDS) y se incubaron a 65°C durante al menos 1 hora (no dejar secar los filtros entre prehibridación e hibridación). Terminado el tiempo, se eliminó el amortiguador y se añadió la sonda (previamente desnaturalizada por calor) junto con amortiguador de prehibridación (precalentada a 100°C y recién preparada). Rápidamente se colocó en el horno de hibridación a 68°C e incubó de 18 a 24 horas. Transcurrido el tiempo, se retiró la sonda y se almacenó a -20°C, ya que puede ser reutilizada varias veces. La membrana fue lavada dos veces con 50 mL de la solución 2x SSC y 0.1 % SDS y otras dos veces con 50 mL de la solución 0.1x SSC y 0.1 % SDS durante 15 minutos a 68°C. Terminado el proceso de hibridación se realizó la detección por quimioluminiscencia

7.6.7.9. Detección quimioluminiscente de ADN marcado con digoxigenina. Una vez lavada la membrana se pasó a un recipiente el cual contenía tampón M o de lavado (0.1 M ácido maleico, 0.15 M NaCl a pH 7.5) durante 5 minutos. Después se incubó durante 30 minutos con un volumen adecuado de solución de bloqueo al 1%. Luego de pasado el tiempo se diluyó en la solución de bloqueo el anticuerpo anti-DIG-AP (Roche) en una proporción de 1:10,000 y se incubó durante 30 minutos con agitación suave. Se eliminó el anticuerpo y se lavó dos veces con 100 mL de tampón M durante 15 minutos. Terminados los lavados, se equilibraron las membranas unos segundos con el tampón AP (0.1 Tris HCl, 0.1 M NaCl, 5 mM MgCl₂ a pH 9.5, donde se diluyó el reactivo CDP-Start (Roche) en una proporción 1:100 y se incubó durante 5 minutos con agitación. Después, se sacaron las membranas (sin que se sequen totalmente), se envolvieron en plástico y se fijaron al casete de exposición, exponiendo la película a las membranas durante 10 segundos. Finalmente, se relevó la película introduciéndola durante 3 minutos en la solución de revelado, 2 minutos

en agua, 5 minutos de la solución de fijación, 15 minutos en agua corriente y después este proceso, se dejó secar la película a temperatura ambiente.

7.6.8. Secuenciación de nucleótidos

7.6.8.1. Secuenciación automática de ADN. La secuenciación del ADN se realizó en el Servicio de Secuenciación de ADN de la Universidad Nacional Autónoma de México.

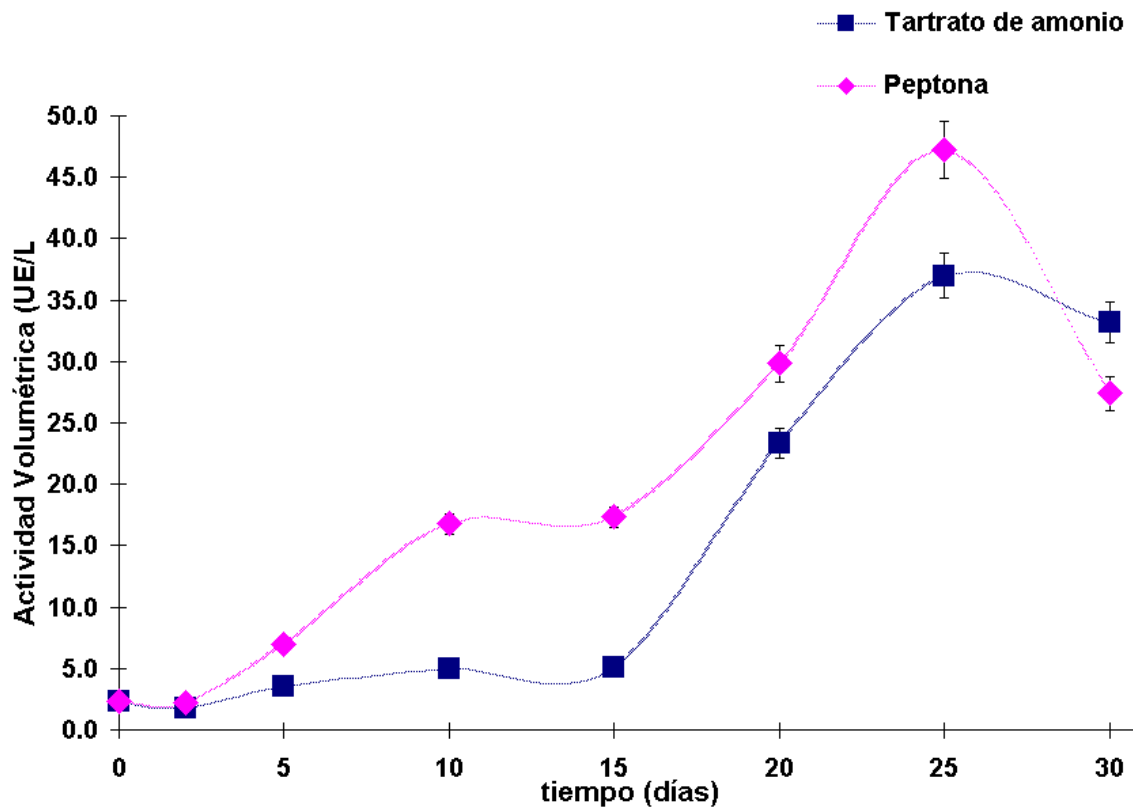
Las secuencias fueron obtenidas desde uno de los dos extremos utilizando como molde directamente el ADN plásmidico, a partir del clonaje de productos de PCR en las células de *E. coli* y utilizando los “cebadores universales” T7 y SP6 reverso, contenidos en el plásmido pGEM.

7.6.8.2. Análisis de las secuencias de ADN. El análisis informático se realizó con la base de datos proporcionada por BLAST y también se utilizó el programa Clone Manager 5 para el análisis de las secuencias obtenidas. La consulta de las secuencias publicadas en las bases de datos GeneBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA) y EMBL (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Alemania) se realizó a través de los servidores (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> y <http://www.ebi.ac.uk>).

8. RESULTADOS Y DISCUSIONES

8.1. Estudios cinéticos

8.1.1. Actividad y termoestabilidad de las lacasas. Al realizar la cinética en la fermentación líquida con los medios Kirk con tartrato de amonio y el medio Kirk con peptona de caseína, se observó que al sustituir la fuente de nitrógeno (peptona por tartrato), se produjo una mayor actividad enzimática en el medio adicionado con peptona esto se puede observar en la gráfica 1, en la cual, se presentan las curvas de actividad de los medios antes mencionados.



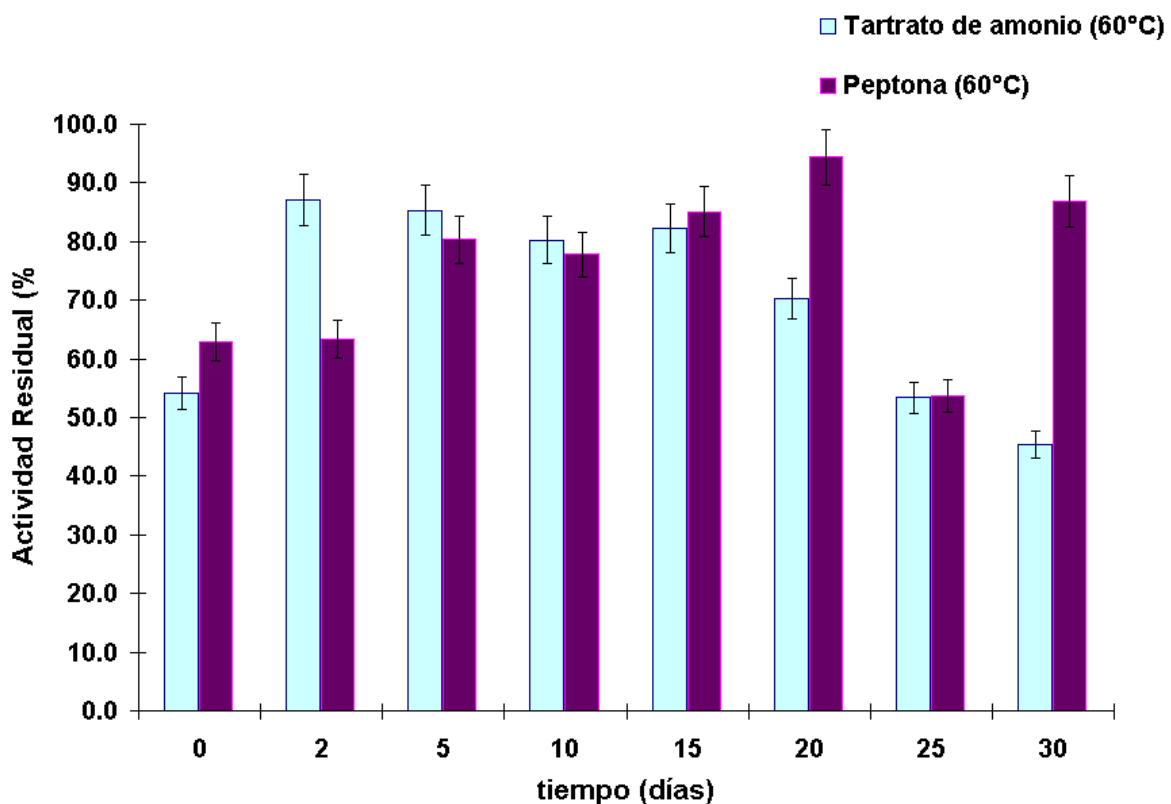
Gráfica 1. Perfiles de actividades volumétricas de lacasas en fermentación líquida del hongo *Trametes sp.* EUM1 a 39°C.

Estos datos obtenidos son comparados con los realizado para este mismo hongo, pero en condiciones de inducción (Márquez, 2004). En estos ensayos se creció el hongo *Trametes sp.* EUM1 en medio Kirk y se adicionaron los inductores (ácido ferúlico y ácido verátrico) incubándose a 39°C. Los resultados muestran que el ácido ferúlico tuvo un mayor efecto en la inducción de lacasas con respecto al medio con ácido verátrico y al control (medio Kirk sin inductor). Por esta razón, se compararon las cinéticas realizadas con el medio Kirk adicionado con ácido ferúlico (MKAF) y el medio Kirk adicionado con peptona (MKP) en el día 25 de cada una de las cinéticas, ya que este día presentó la máxima actividad en ambos casos. En el medio MKAF se tuvo una actividad volumétrica de 15 mUE/mL; mientras que en el medio MKP se consiguió una actividad volumétrica de 47 mUE/mL.

Con estos resultados, se puede mencionar que la peptona sirvió para incrementar la producción de lacasas, ya que la actividad volumétrica se aumentó al triple. Estos resultados concuerdan, con algunos autores que mencionan que el nitrógeno afecta de cierta manera la producción de lacasas en los hongos, como por ejemplo, Galhaup y col. (2002), los cuales trabajaron con *Trametes pubescens* y utilizaron un medio adicionado con 10 g/L de peptona como fuente de nitrógeno para su crecimiento; la cantidad de peptona utilizada fue considerablemente alta, con respecto a la concentración que se adiciona para la producción de lacasas en nuestro hongo, que fue de 0.2 g/L de peptona. Estas diferencias en la concentración de nitrógeno se reflejaron en la actividad lacasa producida por los hongos, ya que en *Trametes pubescens* se obtiene una actividad máxima de 330 UE/mL al día 16 de crecimiento, mientras que en *Trametes sp.* EUM1, la actividad máxima se alcanza en el día 25 de la cinética y es de 48 mUE/mL. Por esta razón se confirman que la fuente de nitrógeno y los altos niveles de nitrógeno son indispensables para la producción de lacasas, aunque hay controversia con algunos otros autores que mencionan que la actividad lacasa se incrementa bajo las condiciones limitantes del nitrógeno (Eggert y col., 1996; Pointing y col., 2000).

Resultados y Discusiones

Después de haber comparado las actividades producidas en los medios de cultivo a 39°C, se utilizan los extractos enzimáticos para realizarles el ensayo de termoestabilidad a 60, 70 y 80°C. Los resultados se muestran en las gráficas 2 y 3 que se refieren a las actividades residuales después de haber sometido el extracto a 60 y 70 durante 1 hora. En la gráfica 2, se observa la actividad residual a 60°C y muestra que el medio adicionado con peptona conserva su actividad en un 95% en el día 20. Pero esto no ocurre a 70°C, ya que su actividad residual máxima se presenta en el día 5, después de haber comenzado la cinética y esta corresponde al 35% (Gráfica 3). En el ensayo a 80°C no se tuvo un resultado y esto arrojó que nuestro hongo no produce enzimas lacasas termoestables a esta temperatura.



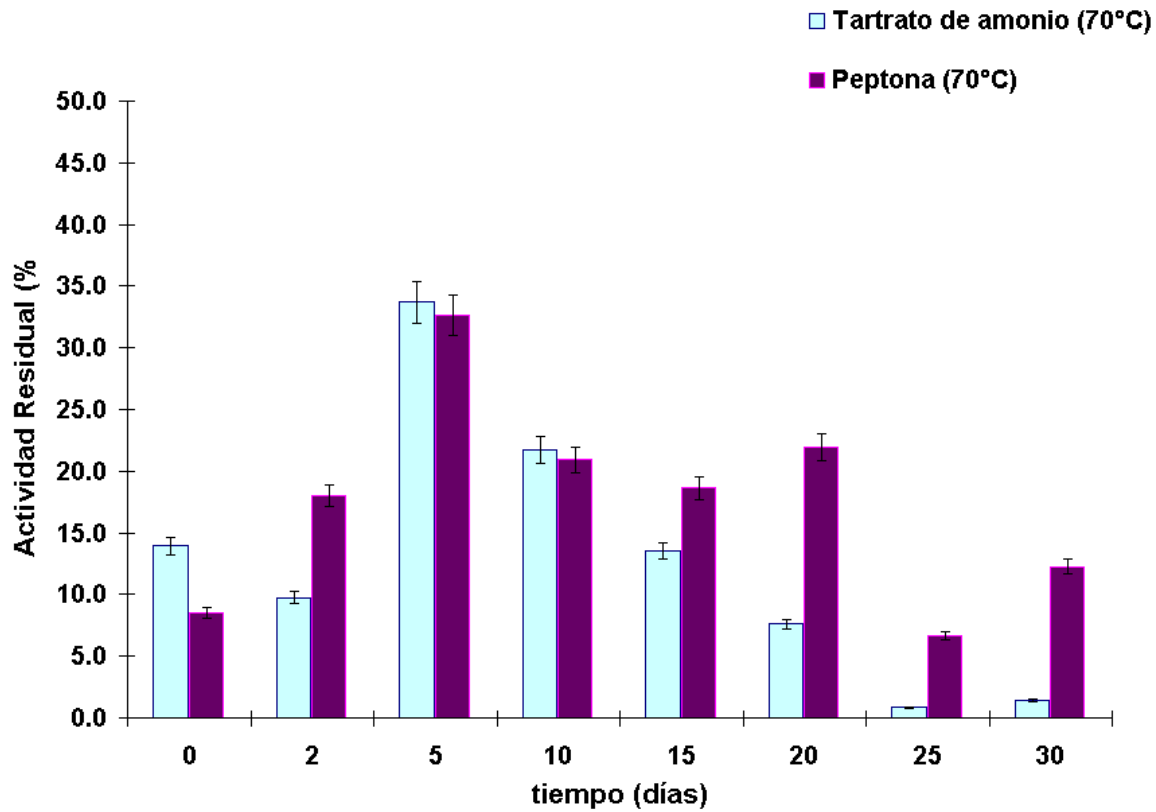
Gráfica 2. Actividad residual obtenida en la fermentación líquida en los medios utilizados para la prueba de termoestabilidad a 60°C.

Resultados y Discusiones

Por lo anterior, como se muestra en la gráfica 2, la actividad residual a 60°C al inicio del medio adicionado con peptona, no tiene una diferencia marcada con respecto al medio adicionado con tartrato de amonio (55% y 62%, respectivamente); mientras que al finalizar la cinética (día 30), el medio adicionado con peptona tiene una diferencia notable de casi el doble de la actividad residual con respecto al medio con tartrato de amonio.

Estos resultados obtenidos a 60°C, son comparados con los obtenidos en Márquez y col. (2004), en donde se determina la termoestabilidad a 60°C de los extractos producidos en fermentación líquida. Para estas fermentaciones los medios utilizados fueron: medio Kirk (Tartrato de amonio) y medio Kirk adicionado con ácido férulico (inductor). Se realizó para determinar si el ácido férulico tenía efecto inductor sobre el hongo para la producción de enzimas lacasas termoestables.

Comparando nuestro trabajo con el antes citado, se muestra que el medio adicionado con peptona de caseína mantiene una actividad residual similar a los extractos enzimáticos termoestables a 60°C producidos por el hongo con el medio Kirk con ácido férulico (en los dos casos, se conservó la actividad residual entre el 80 y 90% en los días 5, 15 y 30 de la fermentación). Demostrando así que se pueden producir lacasas termoestables.



Gráfica 3. Actividad residual obtenida en la fermentación líquida en los medios utilizados para la prueba de termoestabilidad a 70°C.

En la gráfica 3, se muestran los perfiles de la actividad residual a 70°C de los extractos enzimáticos, los cuales son variables, ya que conforme transcurre la fermentación líquida, el medio con peptona tiene una mayor actividad residual en sus extractos con respecto a los producidos con el medio con tartrato de amonio como fuente de nitrógeno (13% y 2%, respectivamente) en el último día de la cinética.

Por lo tanto, los extractos enzimáticos son termoestables a 60 y 70°C en los dos medios utilizados para la fermentación líquida. No ocurrió así para el ensayo de termoestabilidad a 80°C, ya que a esta temperatura no se tuvo actividad alguna. Pero se consiguió a 70°C un perfil de termoestabilidad menor que el observado a 60°C, ya que a 70°C la actividad residual no es mayor a 35% durante toda la fermentación; mientras que a 60°C, la actividad se conserva por arriba del 40% durante toda la

Resultados y Discusiones

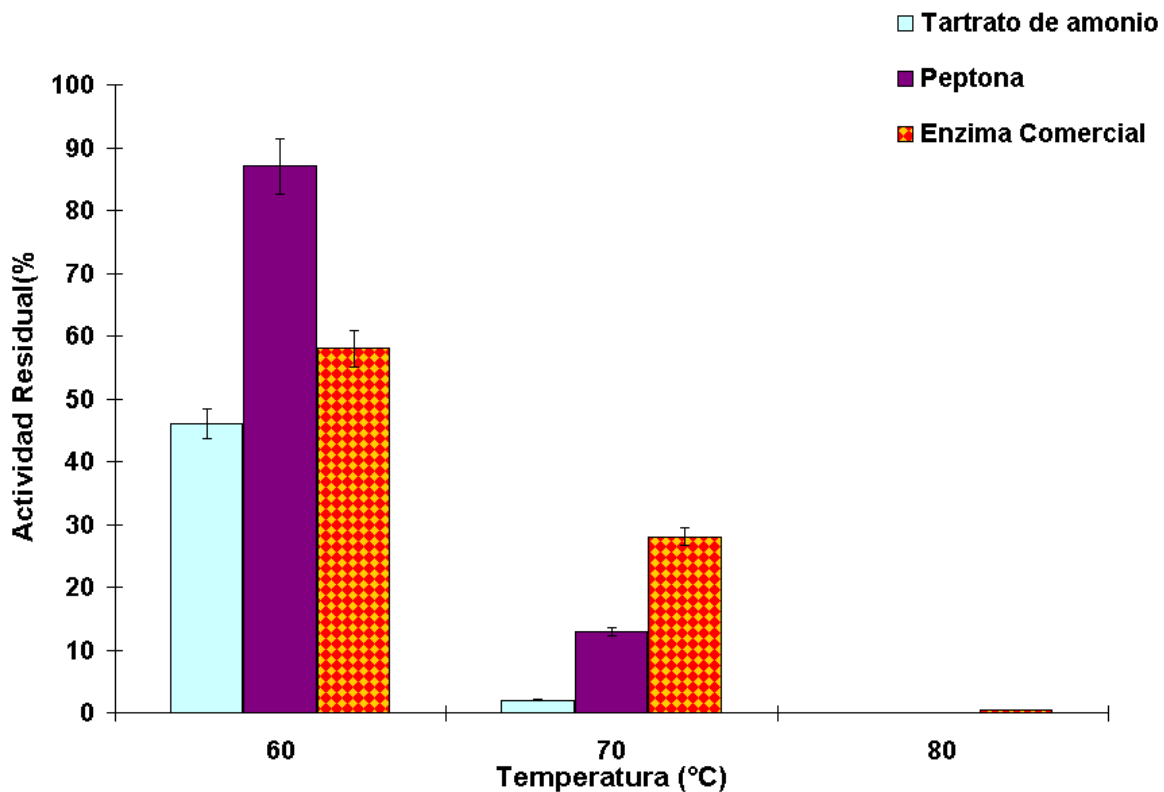
fermentación y alcanza hasta un 95% de la actividad residual en los extractos enzimáticos en el día 20 de la cinética. No ocurre así con algunas otras enzimas, como es el caso de Palonen y col. (2003), los cuales sometieron a la enzima lacasa purificada del microorganismo *Mauginiella* y suspendida en buffer de citratos (60 mM) a diferentes temperaturas (40, 50, 60 y 70°C) y obtuvieron 40% y 0% a 60°C y 70°C después de una hora, respectivamente; siendo bajos con respecto a los obtenidos con los extractos del hongo *Trametes sp.* EUM1.

Realizada la prueba de termoestabilidad con los extractos enzimáticos se compararon estos con la enzima comercial (Novo). La comparación se realizó, ya que en la actualidad las lacasas son de gran importancia para la industria. También, se efectuó debido a que la única lacasa termoestable que esta presente en el mercado, es la producida por Novo Nordisk (DeniLite II S) y la cual, es el punto de partida para la búsqueda de nuevas lacasas que presenten propiedades con ventajas para su aplicación biotecnológica; como es el caso de la termoestabilidad, la cual aumenta la actividad catalítica de la enzima al existir un incremento en la temperatura reduciendo así la cantidad de enzima utilizada en los procesos (Kristjansson, 1989) y además de poder extender el mercado de las enzimas industriales.

En esta prueba se sometió la enzima comercial al ensayo de termoestabilidad a 60, 70 y 80°C. Se utilizó una concentración similar de proteína (0.5 g/L) para que no existiera una fuente de variación adicional en el experimento y así se observaran los perfiles de actividad residual de las isoformas activas presentes en los extractos enzimáticos después del ensayo de termoestabilidad. Para la prueba, se manejó la muestra de los extractos de nuestro hongo del último día de la fermentación líquida anterior (día 30 de la fermentación) debido a que contenía la concentración adecuada de proteína para la prueba.

Como se muestra en la gráfica 4, los extractos enzimáticos producidos con peptona, contienen enzimas termoestables que superan la actividad residual con respecto a la comercial luego de 1 hora a 60°C (88% y 58%, respectivamente). Sin embargo, luego

de 1 hora a 70°C, los extractos enzimáticos producidos por *Trametes sp.* EUM1 conserva el 13% de su actividad, mientras que la enzima comercial conservó el 28%. En consecuencia, los extractos enzimáticos procedentes del hongo producen enzimas lacasas termoestables que pueden ser comparables con las comerciales (Novo), es decir, comparable con la enzima termoestable producida por el hongo *Myceliophthora thermophila* (Berka y col., 1997). Lo que si es un hecho, es que en la naturaleza hay enzimas lacasas producidas por diversos organismos que sean termoestables a temperaturas mayores de 60°C pero que no han sido estudiadas a fondo.



Gráfica 4. Comparación de la actividad residual de los extractos enzimáticos del hongo *Trametes sp.* EUM1 con la enzima comercial (Novo) en la prueba de termoestabilidad.

Efectuada la prueba de termoestabilidad, se realizaron zimogramas de los extractos enzimáticos en geles de poliacrilamida para verificar si se producen isoformas de lacasas y obtener los pesos moleculares aproximados de estas lacasas y en caso de tener varias isoformas, cuál o cuáles son las termoestables.

8.1.2. Zimogramas. Una vez comprobado que al someter los extractos a distintas temperaturas existía la posibilidad de tener enzimas lacasas termoestables, se realizaron zimogramas de la actividad lacasa para demostrar lo mencionado por Medina (2003); quien encontró, que después de someter las enzimas purificadas del hongo *Trametes sp.* EUM1 a diferentes temperaturas (durante 1 hora a 50°C y 60°C), aparecieron dos bandas al ser oxidado el ABTS, encontrando así dos posibles isoformas de lacasas, que mantuvieron su actividad lacasas después de someterlos a estas condiciones extremas.

Se realizaron los geles de poliacrilamida al 12% en condiciones no desnaturizantes como se menciona en la metodología para los extractos enzimáticos producidos en el medio Kirk adicionado con peptona. Para esta prueba, la concentración de proteínas de cada una de las muestras y el control eran igual (10.7µg de proteína/mL), los resultados obtenidos después de la realización de los zimogramas se muestran en la figura siguiente:

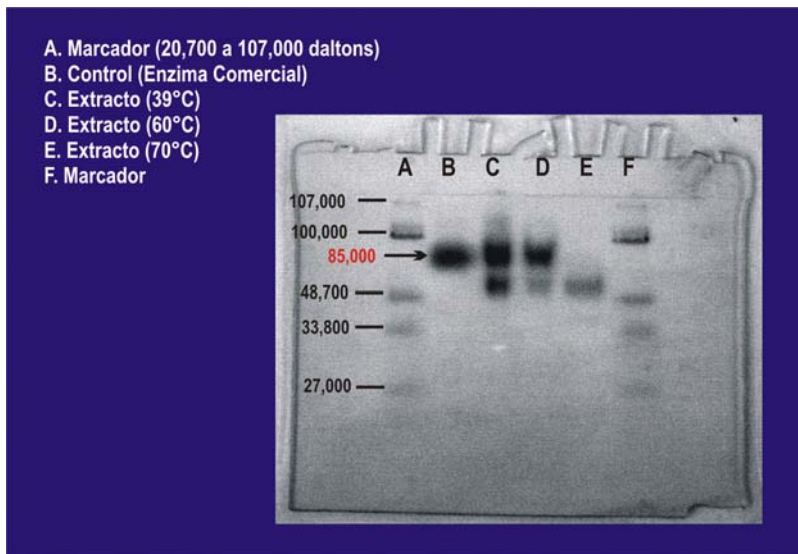


Figura 4. Gel de poliacrilamida al 12% en condiciones nativas para la detección de la actividad lacasa en los extractos enzimáticos de *Trametes sp.* EUM1, los cuales fueron sometidos a una hora a diferentes temperaturas.

Los resultados mostraron que el hongo *Trametes sp.* EUM1 produce al menos dos isoformas de la enzima lacasa y ambas son termoestables. Siendo la isoforma con menor peso molecular (con un peso aproximado de 50 kDa) la tolerante a 70°C y la lacasa de peso molecular mayor (con un peso aproximado de 85 kDa) estable a 60°C y su peso es muy cercano al peso de la enzima comercial (Novo). En la actualidad, se tiene conocimiento de una gran diversidad en sus pesos moleculares, ya que pueden ir desde los 55kDa de *Coriolus hirsutus* (Koroljova-Skobogat'ko y col., 1998) hasta los 94kDa de *Pheronochaete Flavio-alba* (Pérez y col., 1998), estos pesos se han determinado por medio de diversas técnicas como son: geles de poliacrilamida SDS-PAGE, cromatografía FLPC, espectro de masas MALDI, entre otros. El peso de la enzima termoestable a 70°C, puede ser cercana al peso que se tiene de algunas lacasas del género *Trametes*, como son los casos de *Trametes sp.* AH28-2 y *Trametes villosa*, siendo estos de 62 kDa y 63 kDa, respectivamente, las cuales no son termoestables a altas temperaturas (Yaver y col., 1996; Li y col., 1999; Xiao y col., 2003).

Existiendo así otras proteínas pertenecientes a distintos microorganismos con similitud en el peso molecular (aproximadamente de 66 kDa) y que nuestra proteína pudiese acercarse a estos pesos (Wahlethner y col., 1996; Kanunfre y Zacan, 1998;

Yaver y col., 1999; Saparrat y col., 2002; Liu y col., 2003). Aun así, no pueden ser comparados nuestros pesos moleculares obtenidos con los presentados para otras lacasas debido a que el zimograma realizado para los extractos enzimáticos de *Trametes sp.* EUM1 fue en condiciones nativas, mientras que para las otras lacasas se utilizaron zimogramas en condiciones desnaturalizantes y por métodos cromatográficos. A partir de estos resultados se comenzó a realizar la búsqueda de un gen de la enzima lacasa termoestable.

Es interesante resaltar que la fuente de nitrógeno, puede determinar además el tipo de isoenzima, ya que, por ejemplo, al día 30 de la fermentación no hay diferencias sustanciales en la actividad total, pero sí se observan diferencias notables en los perfiles de termoestabilidad en los extractos producidos con tartrato de amonio o peptona. Por lo que podría ser interesante, realizar el zimograma con las dos fuentes de nitrógeno a partir de los resultados anteriores. Por otro lado, se comenzó a realizar la búsqueda de un gen de la enzima lacasa termoestable y para ello, se inició la extracción del ADN genómico para encontrar fragmentos pertenecientes al gen de lacasa.

8.2. Estudios de biología molecular

8.2.1. Obtención de la sonda. Por otra parte, se realizó el diseño de los cebadores por medio de las regiones conservadas de los genes de lacasas. Las regiones que más se conservan en estos genes, son los correspondientes las uniones de cobre (regiones I y II) presentes en la enzima lacasa (D'souza y col., 1996), y con ayuda de alineamientos en GENE DATABANK se obtuvieron los siguientes cebadores específicos para lacasas:

Cebadores diseñados	Temperatura de anillamiento (°C)
Lcc3: 5'- GCACCCGTTCCATCTCCACGG – 3'	68
Lcc4: 5' – GAAGGTCCGATGTGGCAGTGG – 3'	67

Con estos cebadores, se realizó la búsqueda de fragmentos en el ADN genómico del hongo *Trametes sp.* EUM1 por medio de la PCR y diferentes condiciones. Las condiciones para las PCR's fueron: el aumento de la cantidad de ADN genómico de 1 μ L (carril 5) a 2 μ L (carril 6), a una concentración de 508 ng/ μ L; también se realizó la variación en la concentración de cebadores, la cual fue de 1 μ L (carril 5) a 0.5 μ L (carril 7) a una concentración de los cebadores de 0.2 μ moles y además, se realizó la variación en la concentración de cloruro de magnesio siendo una disminución de 8 μ L (carril 5) a 6 μ L (carril 8); del mismo modo, se colocó una muestra control al cual no se le agregó ADN genómico, con modificaciones (sin cebadores y sin Taq Polimerasa). La temperatura de anillamiento para las PCR's fue de 54°C. Todas estas modificaciones se realizaron para hacer más específica la amplificación por PCR de los fragmentos con los cebadores diseñados.

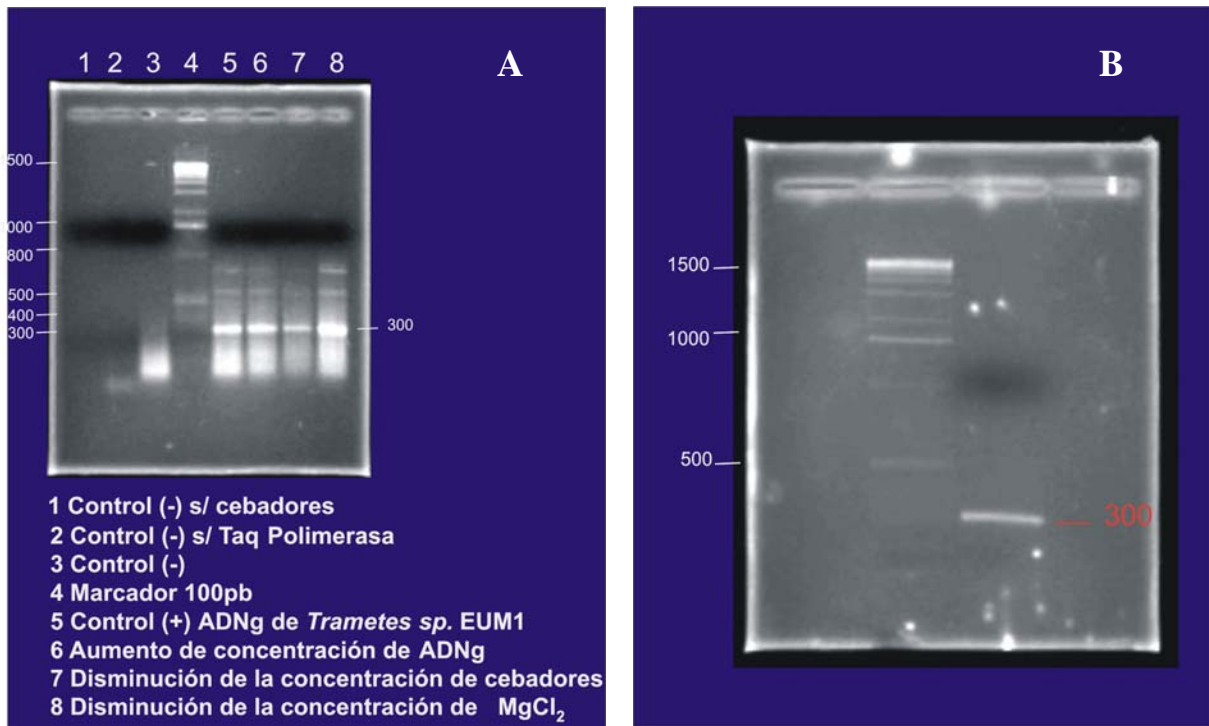


Figura 5. Representación de geles de agarosa en los cuales se presenta 5 A) La PCR utilizando cebadores específicos y distintas condiciones y 5 B) fragmento de 300pb purificado.

Una vez realizada la PCR a distintas condiciones se observan tres bandas con tamaños de 300, 500 y 700 pb (Fig. 5A), se eligió la banda de 300 pb, ya que es el tamaño más cercano al esperado según el diseño de los cebadores y por otro lado, se eligió debido a que D'souza y col. (1996), menciona un fragmento de 246 y 123 pb, que fue obtenido a partir de cebadores específicos de lacasas mediante amplificación por PCR. Además se eligió este fragmento porque mostró una mayor amplificación por PCR. Además se eligió este fragmento porque mostró una mayor amplificación en las PCR's con las distintas condiciones; mientras que con las otras dos bandas no ocurrió lo mismo, ya que en la PCR donde se disminuyó la cantidad de cebadores de $1\mu L$ a $0.5\mu L$, las bandas no tienen una amplificación adecuada, siendo los cebadores más inespecíficos para estos fragmentos. Por lo tanto, los cebadores fueron más específicos para la banda amplificada de 300 pb. Una vez

extraído este fragmento, se purificó por medio del kit GENCLEAN y se corrió nuevamente un gel para verificar su pureza la cual se observa en la figura 5B, en el carril 3.

A continuación se realizó la clonación del fragmento en pGEM; una vez realizada la clonación, al plásmido obtenido se le llamó pEMO1 (pGEM con la inserción del fragmento de 300 pb) y la digestión de este plásmido se realizó con la enzima de restricción *EcoR* I. Se utilizó *EcoR* I debido a que en el vector pGEM, se encuentra presente esta enzima en los dos extremos del poli-linker (ver figura 4, en materiales y métodos). Por otra parte se utilizó esta enzima, ya que se buscó una enzima que no cortara a nuestro fragmento. Para ello, se analizaron varias secuencias de genes de lacasas de otros hongos; además, algunos autores también la mencionan para las digestiones del ADN genómico porque no cortan al gen de lacasa (Yaver y col., 1996; Xiao y col., 2003). Las colonias fueron seleccionadas mediante su coloración; tomando solo las colonias azules como colonia control y las colonias blancas como las colonias que tenían nuestro fragmento. A estas se les extrajo su ADN plásmidico al que posteriormente se realizó una digestión con la enzima de restricción antes mencionada. Se corrió un gel de agarosa al 2 % y se verificó que en realidad se tenía un fragmento de aproximadamente 300 pb, que correspondía al fragmento insertado en el plásmido, como se muestra en carril 3 y 7 de la figura 6.

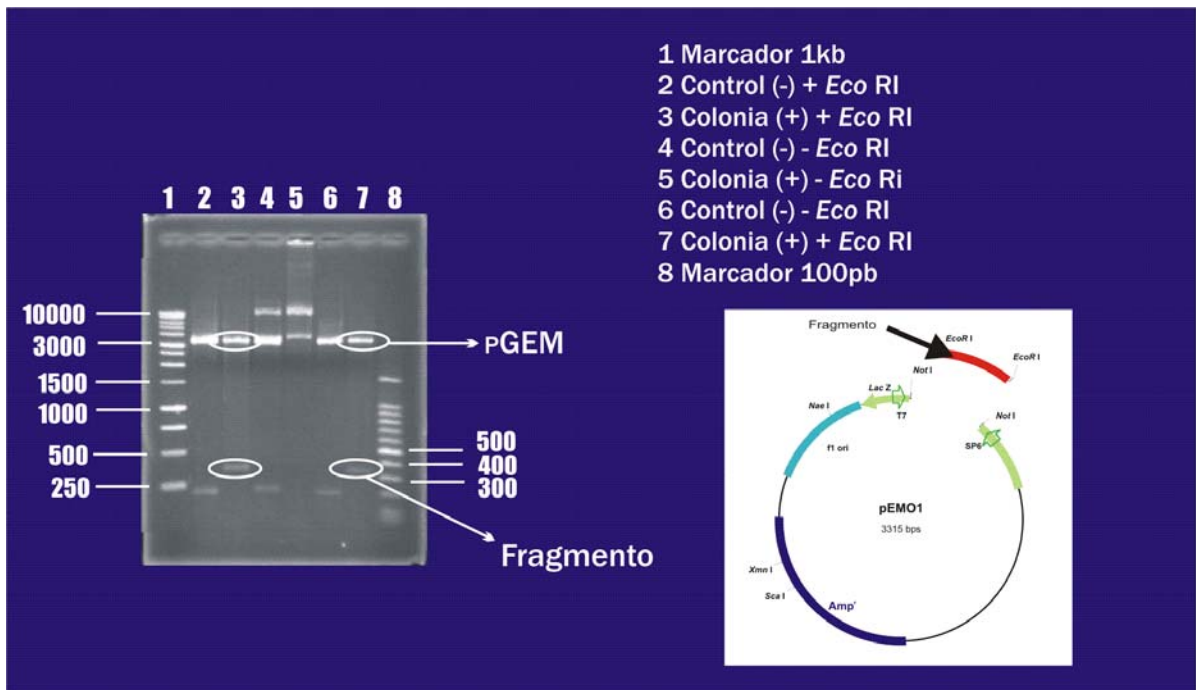
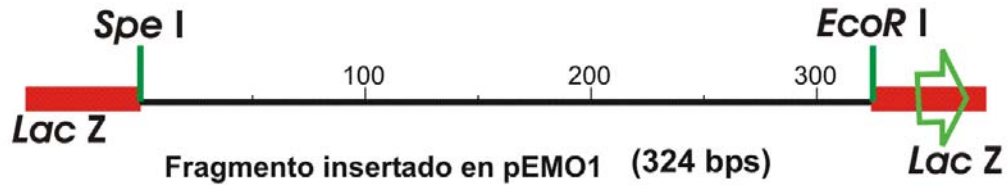


Figura 6. Gel de agarosa al 2 % en donde se muestra la digestión del plásmido pEMO1 con la enzima de restricción *Eco* RI (“- *Eco* RI”= sin digerir y “+ *Eco* RI” = digerido por la enzima), tanto para la colonia blanca (Colonia (+)), como para la colonia azul (Control (-)) y a diferentes concentraciones de ADN plásmidico (1 μ L: carril 6 y 7; 2 μ L: carril 2 y 3).

Por lo que, podemos mencionar que nuestra colonia contiene el plásmido con nuestro fragmento elegido. Una vez realizada la comprobación se efectuaron las “minipreps” de las colonias seleccionadas con nuestro plásmido para obtener el ADN plásmidico y purificarlo para su secuenciación. Para este proceso se utilizaron los cebadores universales T7 y SP6, correspondientes con el terminador y el promotor, respectivamente. Estos se encuentran ubicados dentro de la secuencia de pGEM como se muestra en la figura 2 de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos de nuestra secuenciación fueron positivos, ya que se encontraron mediante el buscador BLAST, secuencias homólogas de otros genes de lacasa de géneros y especies de hongos distintos al nuestro como se muestra en la figura 10. Además mediante programas especializados de biología molecular (Clone Manager 5), se introdujo nuestra secuencia del fragmento y se cortó con las enzimas de restricción presentes en el poli-linker (*Eco*RI y *Spe*I) en cada uno de los extremos del vector pEMO1 y los

resultados de este proceso fue que nuestro fragmento secuenciado tenia un tamaño de 324 pares de bases (ver figura 7).

A



B

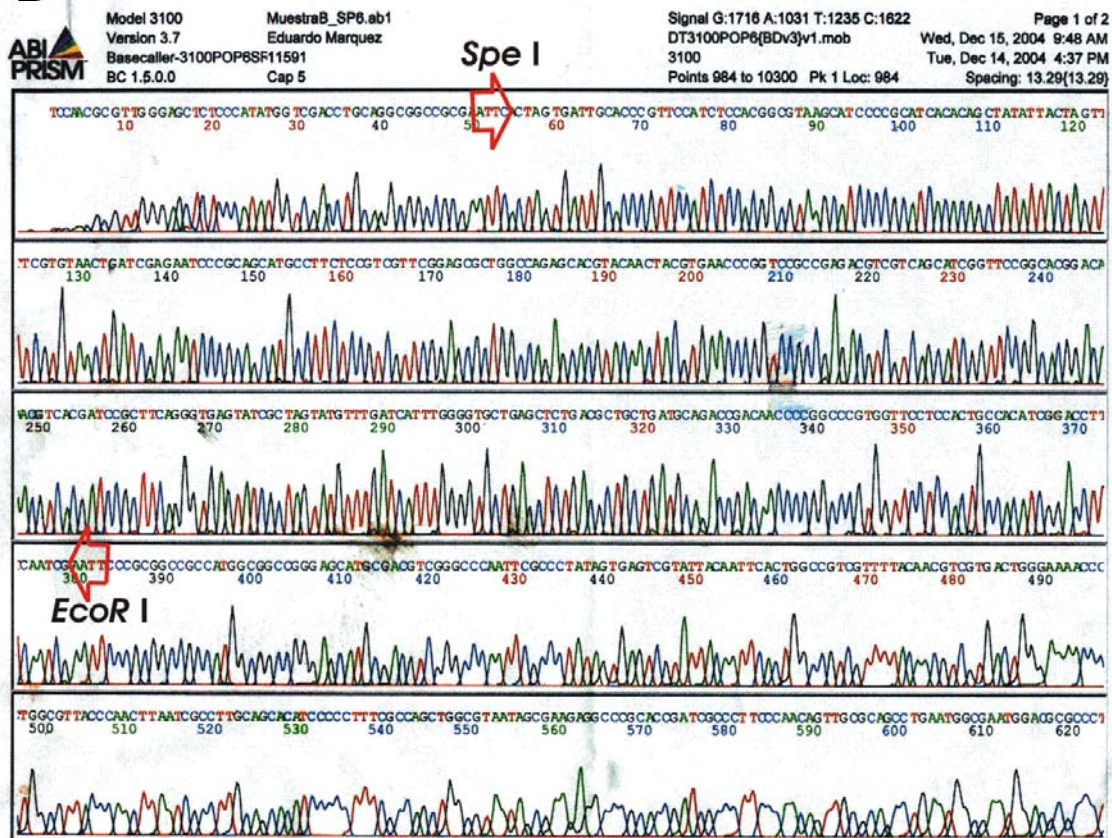


Figura 7. 7 A) Fragmento obtenido a partir del programa Clone Manager 5, utilizando las enzimas *Spe I* y *EcoR I* para los cortes de los extremos. 7 B) Secuencia del fragmento insertado en el plásmido pGEM.

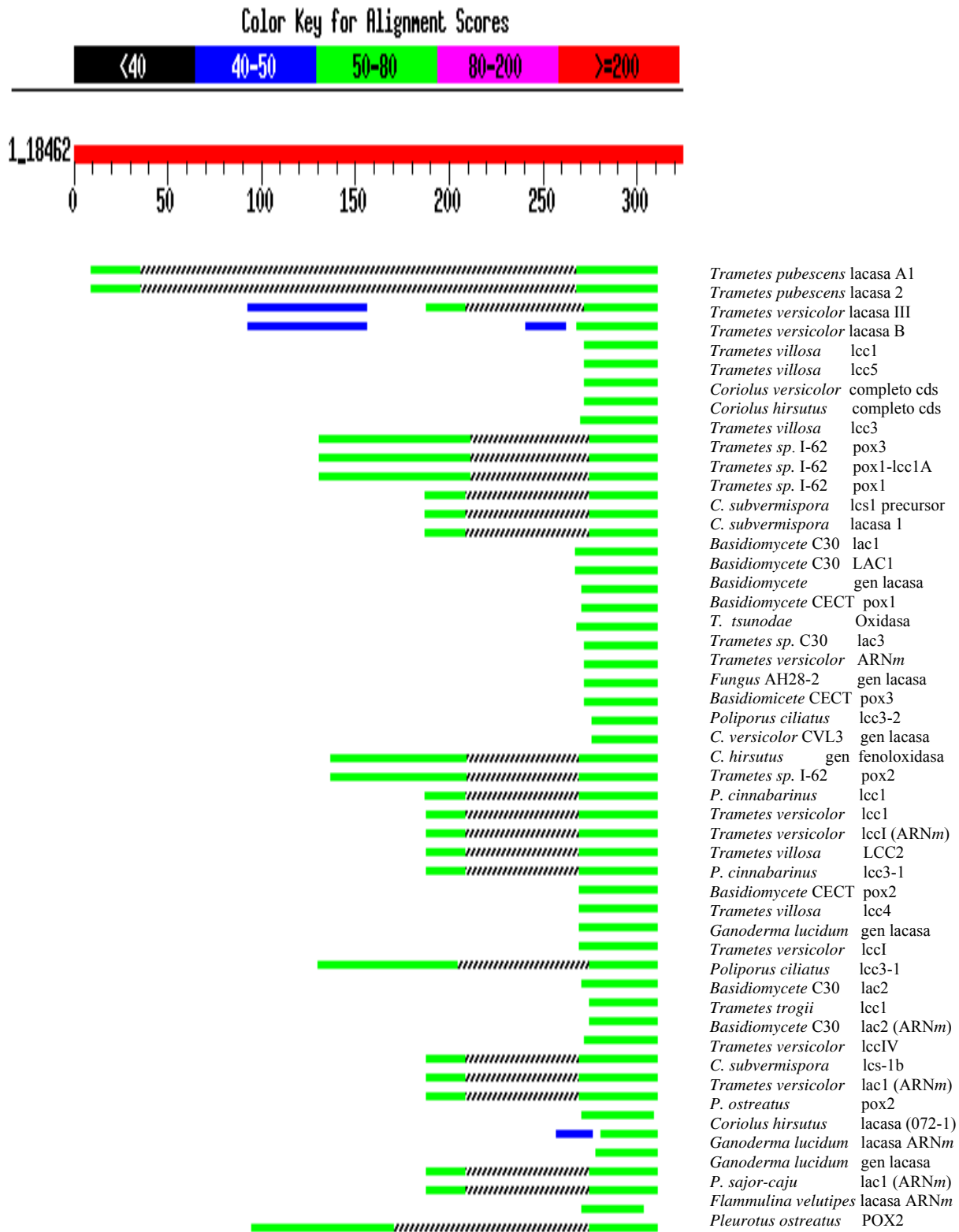


Figura 8. Alineamiento del fragmento en el buscador BLAST y los microorganismos de los genes con los que se alineó el fragmento secuenciado (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Por otro lado, se puede especular que la enzima lacasa de nuestra especie de *Trametes* probablemente sea similar a las especies de "*Trametes sp. I-62, villosa o trogii*", ya que en el estudio de ITS (Internal Transcribed Spacer) del hongo *Trametes sp. EUM1* (Márquez y col., 2004), el árbol muestra que nuestro hongo pertenece al grupo II de *Trametes*, donde se hallan las especies mencionadas y la secuencia del fragmento se evidencia en la figura 10; mientras que *Trametes versicolor* y *pubescens* corresponden en este árbol de ITS al grupo I, por lo cual nuestro fragmento no podría pertenecer a estas especies.

Una vez efectuada esta comprobación de nuestro fragmento en el buscador y afirmar que se trataba de un fragmento de lacasa, se marcó el fragmento con ^{32}P (Alternativamente se realizó el marcaje del fragmento con digoxigenina para la comprobación de los resultados obtenidos con ^{32}P) para poderlo utilizar como sonda en el proceso de hibridación.

Realizados los ensayos de las cinéticas anteriores, se eligió el medio Kirk sustituido con peptona con las condiciones de crecimiento mencionadas en la metodología para la extracción de ARN total y así la realización de la genoteca de ADNc, debido a que se observó por medio de las determinaciones de termoestabilidad y la zimografía que se producen isoformas de lacasa que son termoestables a 70°C.

8.2.2. Genoteca de ADNc. Para la extracción del ARN total, se tomaron muestras del micelio en los días 5, 6, 7 de la cinética, ya que en estos días como se muestra en la gráfica 3, se tiene una actividad residual de casi el 35% y por lo tanto, un incremento en la producción de la enzima termoestable a 70°C; asimismo, se tendría una cantidad mayor del ARN que codifica para ésta proteína y con ello, asegurarse de que la genoteca contuviera fragmentos del gen de la lacasa termoestable. De estos días, solo se reveló una buena calidad de ARN total en las muestras del día 6 y 7 como se observa en la (figura 9 A). Una vez obtenido el ARN total se trató con DNasa I (figura 9 B) para la eliminación de ADN que estuviese contaminando la muestra.

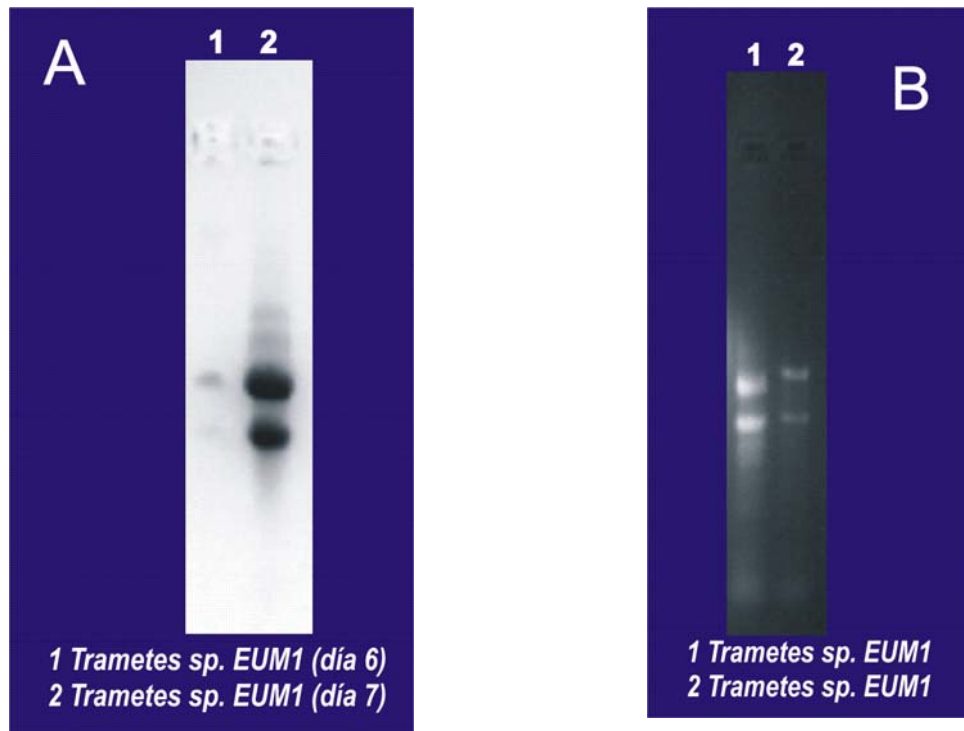


Figura 9. Representación de geles de agarosa en los cuales se presenta el ARN total del hongo *Trametes sp. EUM1*. 9 A) ARN total extraído y 9 B) ARN total tratado con Dnasa I.

Comprobada la calidad de nuestro ARN total se realizó la síntesis de la biblioteca de ADNc, obteniendo resultados en la amplificación y fraccionamiento de la biblioteca favorables como se muestra en la figura 10.

Al comparar nuestro ADNc con el control (fig. 10 A) se observó que se tenía un barrido claro, por lo que nuestra biblioteca se amplificó en su totalidad. Luego de la amplificación, se realizó su fraccionamiento tomando en cuenta que solo se recolectaran las fracciones que tengan más de 600 pb para asegurarnos que en nuestra genoteca se encontrara fragmentos grandes ligados al fago y de tener genes completos y no solo fragmentos de genes; esta selección de fragmentos se muestra en la figura 10 B, donde sólo se recolectaron las fracciones 7, 8, 9, 10 y 11.

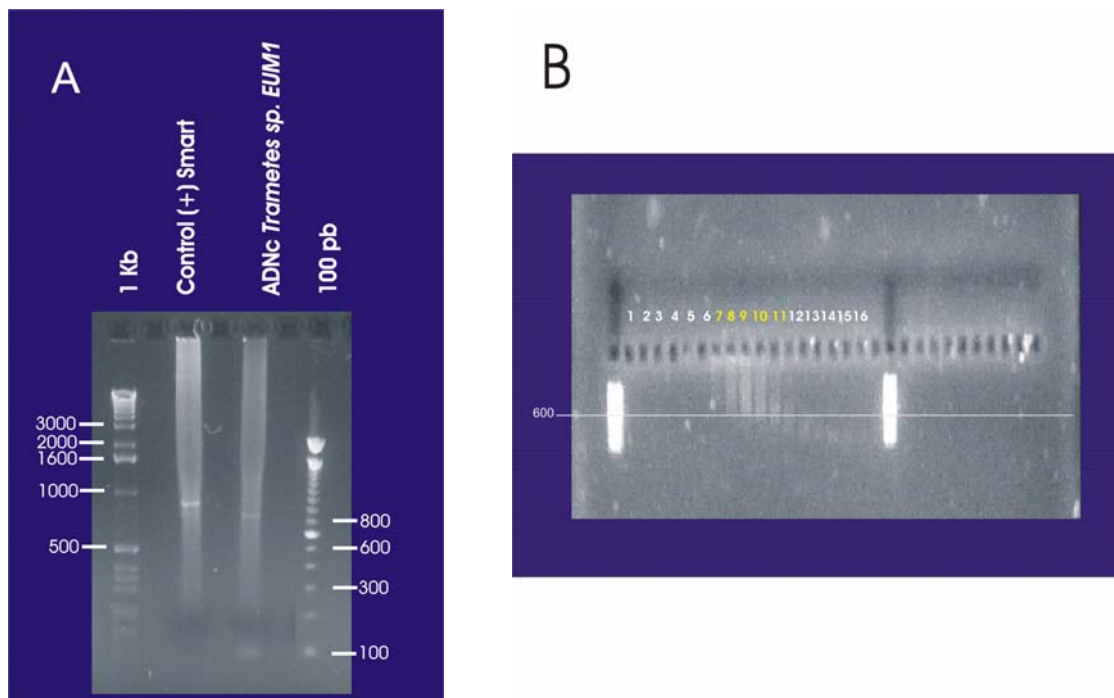


Figura 10. Representación de geles de agarosa en los cuales se presenta 10 A) el ADNc amplificado y 10 B) el fraccionamiento de este mismo.

Recolectadas las fracciones, se ligó y empaquetó al bacteriófago λ TriplEx2 y se realizó su amplificación para después calcular su titulación; la cual correspondió a 9.2×10^7 pfu/mL, siendo esta la titulación requerida para la búsqueda de los genes debido a que en Sambrook y *col.* (1989), mencionan que la titulación de una biblioteca debe estar entre el rango de 1×10^6 a 1×10^8 pfu/mL para que esta contenga todos los fragmentos requeridos para la búsqueda de genes.

Una vez titulada la genoteca se realizó la comprobación de su calidad. Se obtuvo el ADN del fago utilizando los cebadores 5' Primer y PCR CDS III/3' manejados para la amplificación del ADN del bacteriófago. Los cebadores utilizados para esta amplificación fueron diseñados por Clontech y son proporcionados por el kit Advantages 2 PCR para generar extensiones dentro de la síntesis del ADNc. Es decir, la secuencia del SMART IV tiene un grupo de Guaninas para crear una extensión del cebador y así ayudar a que los cebadores continúen la replicación

hasta el final de la cadena de cada uno de nuestros fragmentos de ADNc empaquetados en el bacteriófago. Mientras que, la PCR CDS III/3' contiene la cola de poli A 3' que identifica el sitio poli T del ARN y se realiza la transcripción. Por ultimo, el cebador PCR 5' fue obtenido por el proveedor (Clontech) a partir de la secuencia de nucleótidos del cebador SMART IV. Los resultados obtenidos se observan en la figura 11.

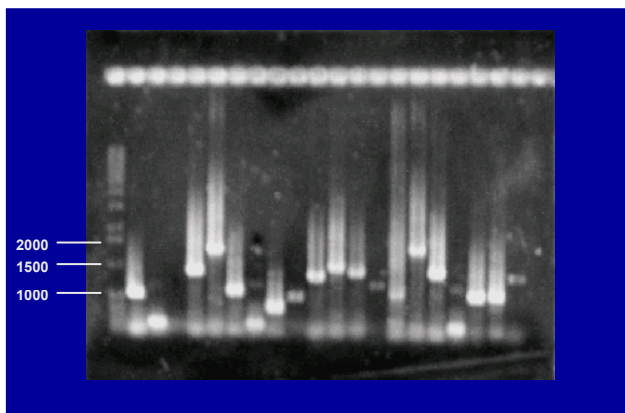


Figura 11. Gel de agarosa que muestra 20 colonias de lisis de ADNc contenidos en el λ TriplEx y que fueron obtenidos por PCR.

Como se observa en la figura anterior, los fragmentos son mayores a 800 pb, por lo cual nuestra genoteca tiene fragmentos grandes que pueden ser genes completos del hongo *Trametes sp.* EUM1 y no solo fragmentos de ADNc.

8.2.3. Rastreo de la genoteca. Los resultados obtenidos en nuestra hibridación por medio de ^{32}P produjeron 20 colonias positivas, a partir de una placa de lisis que se escogió previamente. En la figura siguiente se muestra la autografía de la membrana de nylon y nuestra caja; donde se comparan las colonias seleccionadas.

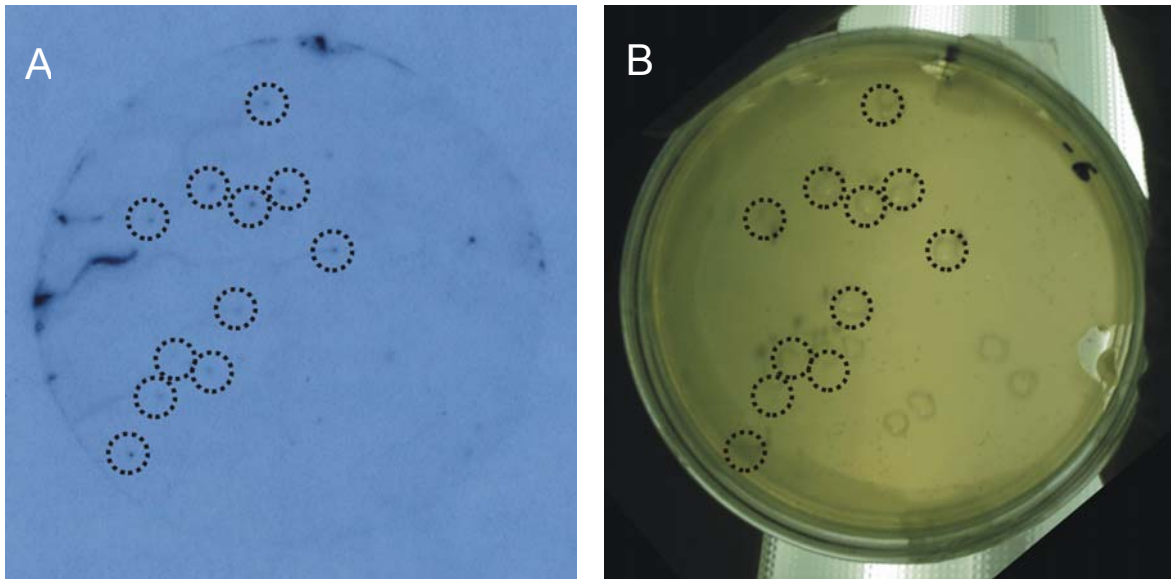


Figura 12. Se muestra en: 12 A) la autografía con las colonias seleccionadas por estar marcadas con nuestra sondas; mientras que en 12 B) se encuentra nuestra placa de lisis donde se señalan las colonias encontradas por medio de hibridación.

Debido a la falta de un control positivo, una vez seleccionadas las colonias se extrajeron de la placa de lisis y se sometieron a una nueva hibridación pero ahora la sonda marcada con digoxigenina y así comprobar que se encontraran fragmentos de nuestros genes de lacasa en estas colonias. Los resultados se presentan en la siguiente figura:

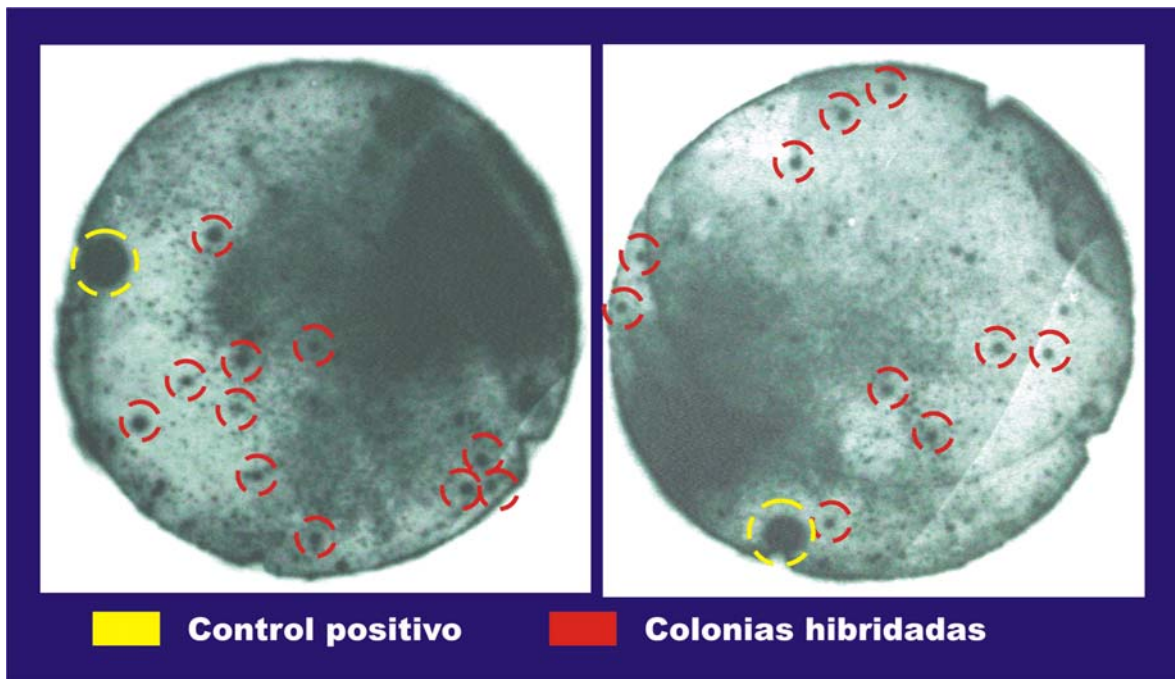


Figura 13. Autografía de la hibridación con digoxigenina de dos colonias de bacteriófagos aisladas de la prueba anterior de hibridación con fósforo.

Con esta autografía (Figura 13), se comprueba que la hibridación es la correspondiente con la sonda utilizada, ya que así lo demuestra el control positivo (fragmento de 324 pb, sin marcaje) adicionado a la membrana de nylon antes de la realización de la hibridación a las colonias seleccionadas; el cual, fue hibridado con nuestra sonda marcada (fragmento de 324 pb, marcado con ^{32}P ó digoxigenina).

Una vez realizada la comprobación y selección de nuestras colonias por hibridación, se efectuó la conversión de nuestro ADN de los bacteriófagos λ a ADN plásmidico, el cual se amplificó la cepa de *Escherichia coli* BM 25.8. Se utilizó esta cepa porque tiene característica lisogénica para el bacteriófago λ y puede realizar la sub-clonación automáticamente.

8.2.4. Conversión de ADN de bacteriófago λ a ADN plásmidico. Una vez que nuestro bacteriófago es convertido a plásmido dentro del huésped, se expresó por el mismo, ya que reconoce el sitio de recombinación Cre. Los resultados de este procedimiento fueron satisfactorios, ya que se logró convertir todo el ADN del bacteriófago a plásmido. Los resultados se muestran en la figura 14.

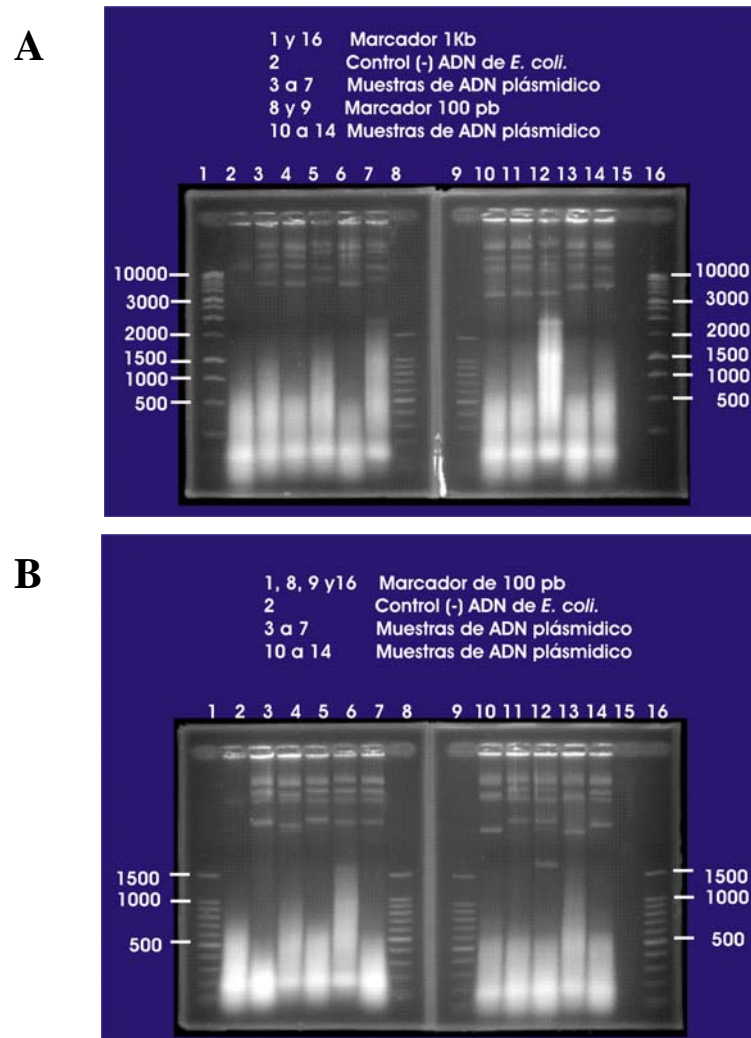


Figura 14. En A y B se presenta el ADN plásmidico obtenido después de la conversión del ADN de bacteriófago.

Como se puede observar, ocurrió la transformación de nuestros ADN de bacteriófago al ADN plásmidico de cada una de las colonias seleccionadas a través de hibridación. También se puede observar que nuestro ADN de *E. coli* no interfirió con el ADN plásmidico de cada una de las colonias, como se observa en el carril dos, de la figura 14.

Realizada la comprobación de la integridad de nuestro ADN plásmidico, se llevó a la digestión con *Kpn* I y *Xba* I. Se utilizaron estas enzimas debido a que nuestro plásmido, el pTriplEx2, tiene sitios de corte para estas dos enzimas. Por otra parte, estas enzimas de restricción fueron revisadas con otros genes de lacasas (*Trametes versicolor*, *Trametes villosa*, *Trametes sp. I-62*, *Trametes pubescens*), que se obtuvieron de las bases de datos (Clone Manager 5) y fueron las que mostraron menos sitios de corte dentro de los genes (entre cero y dos sitios de corte) que algunas otra enzimas.

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 15 (A y B). En ésta, se encuentran el ADN plásmidico digerido con las enzimas antes dichas y sus respectivos controles. Analizando nuestros resultados, se tiene que el ADN muestra diferentes patrones de corte con las enzimas y algunos de ellos con patrones muy similares. También, en algunas colonias se tienen hasta más de un corte causado por nuestras enzimas. Realizada y comprobada la digestión por medio de los geles de agarosa, se llevó a cabo la hibridación de los ADN plásmidicos (Southern blot) con el fin de localizar los fragmentos que pertenecieran a un gen de lacasa.

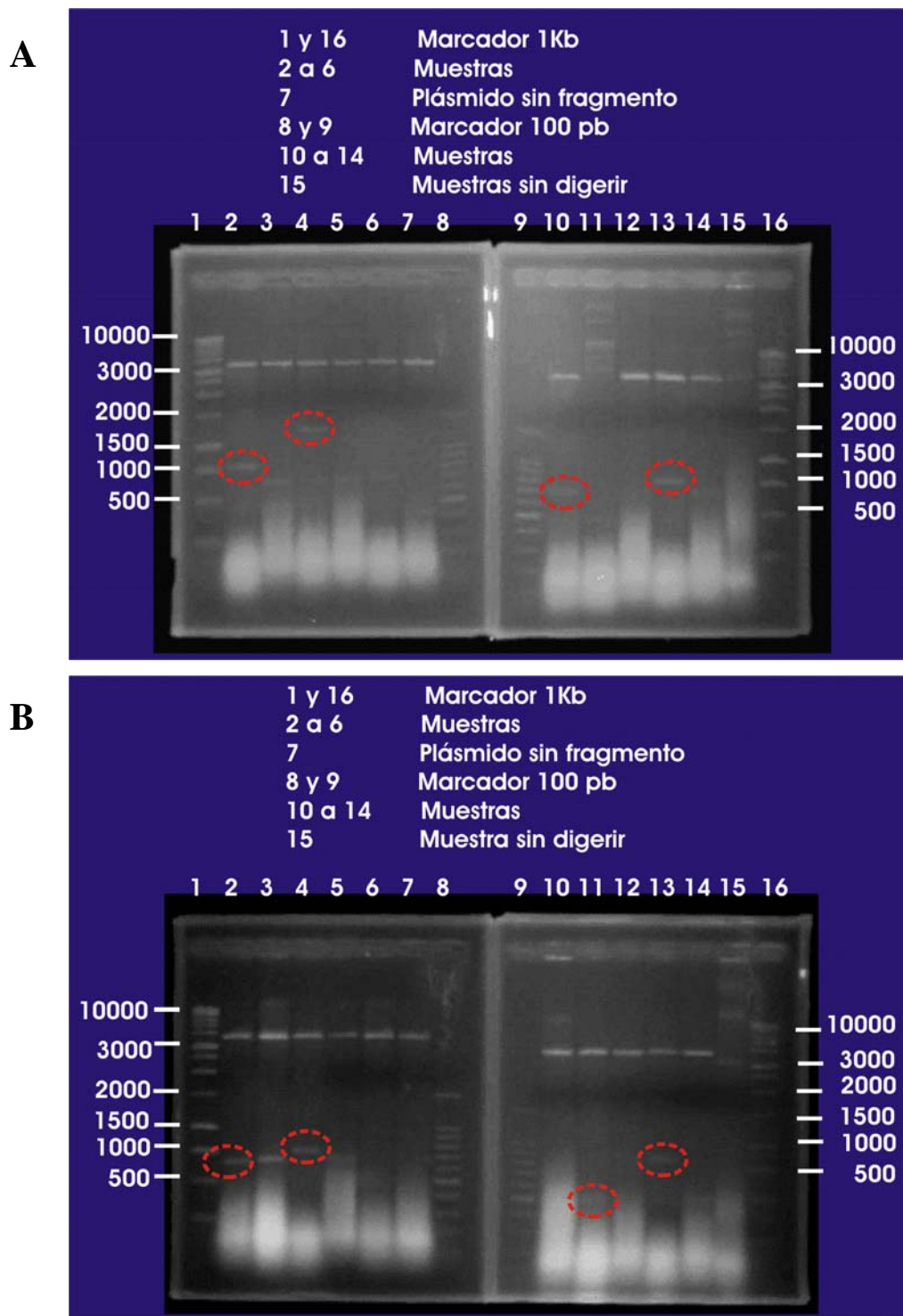


Figura 15. En A y B se presenta el ADN plásmidico de cada una de las colonias y digerido por las enzimas de restricción *Kpn* I y *Xba* I. El círculo muestra algunos fragmentos obtenidos apartir de la digestión del plásmido.

Resultados y Discusiones

Los geles fueron efectuados con las muestras de los ADN's de cada una de las colonias seleccionadas (20 colonias) y los respectivos controles que consistieron en colocar ADN de *E. coli* (control negativo), el fragmento de 324 pb que corresponde a el gen de lacasa, pero sin marcar con la digoxigenina (Control positivo) y adicionalmente se colocó un fragmento del gene de lacasa de *T. versicolor* (Téllez-Jurado y col., 2005).

Se realizó así la hibridación y se obtuvo, que el marcaje de nuestras muestras con la sonda fue deficiente, lo que también ocurrió con la hibridación del gen de *Trametes versicolor* con la sonda. Solamente ocurrió el marcaje del fragmento de 324 pb con la sonda. Los resultados no fueron los esperados y eso pudo ser por diversas razones dentro estas se encuentran, la cantidad de muestra colocada en el gel para la transferencia, el tamaño de la sonda, ya que puede ser que sea muy pequeña y eso le de un grado de especificidad muy bajo.

Debido al fallo en la hibridación, se buscó otra forma de seleccionar el ADN obtenidos de las 20 colonias y esa fue comparando cada una de los ADN digeridos con las enzimas *Kpn I* y *Xba I* y ver cuales colonias tenían fragmentos similares y solo escoger uno de cada fragmento similar. Una vez, realizada la selección de las colonias, se obtuvieron 8 colonias distintas, las cuales se enviaron a secuenciar para después analizarlas en la base de datos. Realizada la secuenciación, se analizaron en la base de datos BLAST y los resultados fueron negativos, es decir, no se encontró una secuencia que fuese parecida a la de la enzima lacasa.

Además, podemos indicar que otros autores han utilizado las técnicas de hibridación similares para el marcaje de las sondas (^{32}P ó digoxigenina), teniendo resultados parecidos a los logrados en esta investigación (Giardina y col., 1995; Mansur y col., 1997; Eggert y col., 1998; Yaver y col., 1999; Palmieri y col., 2000). Asimismo, el kit de construcción de genotecas, había sido utilizado con anterioridad por Kim y col. (2001) para la búsqueda del gen de lacasa del microorganismo *Coprinus congregatus*. Estos autores utilizaron esta técnica para ligar y empaquetar el ADN

Resultados y Discusiones

genómico del microorganismo. Las investigaciones que realizaron los llevaron a la localización de un fragmento de 1817 pb, de las cuales solo 1086 pb codificaban para 362 aminoácidos y este fragmento pertenece a un gen de lacasa. Por esta razón podemos mencionar que la técnica utilizada para nuestra investigación, esta fortalecida para la búsqueda del gen de lacasa y el problema tal vez radicó en la muestra de extractos tomada para la extracción del ARN, debido a que casi no se tenía actividad en esos días (día 6 y 7 de la cinética).

Los resultados hasta ahora obtenidos no han permitido la obtención clara de ADNc de *Trametes sp.* EUM1 que corresponde a un gen de la enzima lacasa. Pero si han permitido la aplicación de las técnicas de biología molecular que servirán para este fin. De manera muy especial, se ha creado una genoteca de ADNc, clonado en *E. coli*. Este avance, quizás con muestras de ADNc obtenido en distintas fases del cultivo de *Trametes sp.* EUM1, posiblemente permita alcanzar el objetivo deseado.

9. RESUMEN DE RESULTADOS

La fuente de nitrógeno tiene efecto en la actividad lacasa y en algunas isoenzimas que se expresan; además se han identificado las condiciones de expresión de una lacasa termoestable en el hongo *Trametes sp.* EUM1.

El hongo *Trametes sp.* EUM1 produce al menos una lacasa termoestable a 70°C, la cual manifiesta la actividad residual de hasta 35%, después de incubar el extracto enzimático por una hora.

Por medio de zimogramas se comprueba que el hongo *Trametes sp.* EUM1 produce al menos dos isoformas de lacasa.

Se tiene un fragmento de 324 pb que corresponde a un segmento del gen de lacasa y que fue obtenido a partir de la amplificación por PCR del ADN genómico con los cebadores específicos de lacasa.

A partir del ARN_T asilado se sintetizó la genoteca de ADNc.

La genoteca es aceptable (1.5µL de ADNc = 9.20×10^7 pfu/mL) para realizar la búsqueda del gene de lacasa termoestable y tiene una calidad alta debido a que contiene fragmentos mayores a 800 pb.

Por hibridación se pudieron seleccionar y aislar 20 colonias de bacteriófago que contenían fragmentos de la genoteca

Resumen de resultados

El ADN de bacteriófago de las 20 colonias fue convertido en ADN plásmidico, de estos solo se seleccionaron 8 colonias de ADN plásmidicos para su secuenciación, desafortunadamente ninguna de las secuencias fue tan clara como para asegurar que algún fragmento insertado en el ADN plásmidico de las colonias pertenecía a un gen de lacasa.

10. CONCLUSIONES

Por lo anterior podemos concluir, que para la cepa estudiada el nitrógeno tiene efecto sobre la producción y expresión de las isoformas de lacasas y que al menos una es termoestable a 70°C, ya que se conserva hasta un 35% de su actividad después de una hora. Además, el peso molecular de esta enzima termoestable en condiciones nativas es aproximadamente de 50 kDa. Asimismo, se identificó por medio de técnicas de biología molecular un fragmento de 324 pb que corresponde a un gen de lacasa y se sintetizó a partir del ARN total producido por el hongo termotolerante *Trametes sp.* EUM1 la genoteca de ADNc, la cual podría servir como antecedente metodológico para continuar la búsqueda del gen o genes de lacasas.

11. BIBLIOGRAFÍA

Antorini, M., Herpoël-Gimbert, I., Choinowski, T., Sigoillot, J. C., Esther, M., Winterhalter, K. y Piontek, K. 2002. Purification, crystallization and X-ray diffraction study of fully functional laccase from ligninolytic fungi. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1594. pp 109-114.

Amitai, G., Adani, R., Sod-Moriah, G., Rabinovitz, I., Vincze, A., Leader, H., B. Chefetz, B., Leibovitz-Persky, L., Friesem, D. y Hadar, Y. 1998. Oxidative biodegradation of phosphorothiolates by fungal laccase. *FEBS*. 438. pp. 195-200.

Arana, A., Téllez, A., González, T. y González, A. 2003. Aspectos generales de la biodegradación de la madera: aplicaciones industriales de las lacasas. *Biotecnología*. México. 7. pp. 40-55.

Arias, M. E., Arenas, M., Rodríguez, J., Soliveri, J., Ball, A. S. y Hernández, M. 2003. Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Applied and Environmental Microbiology*. 69. pp. 156-162.

Berka, R. M., Schneider, P., Golightly, E. J., Brown, S. H., Madden, M., Brown, K. M., Halkier, T., Mondorf, K. and Xu, F. 1997. Characterization of the gene encoding and extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63. pp. 3151-3157.

Bruce, A. y Palfreyman, J. W. 1988. En Forest products biotechnology. *Taylor and Francis*. Londres, Gran Bretaña. pp.15-29.

Bibliografía

Buswell, J. A., Cai, Y. J. y Chang, S. T. 1995. Effect of nutrient and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (lentinus) edodes*. *FEMS Microbiology Letters*. 128(1). pp. 81-87.

Cai, W., Martin, R., Lemaure, B., Leuba, J. y Petiard, V. 1993. Hydroxindoles: a new class of laccase substrates. *Plant Physiology and Biochemistry*. 31. pp. 441-445.

Chefetz, B., Kerem, Z., Chen, Y. y Hadar, Y. 1998. Isolation and partial characterization of laccase from a thermophilic composted municipal solid waste. *Soil Biology and Biochemistry*. 30(8-9). pp. 1091-1098.

Chen, Sh., Ge, W. y Buswell, J. A. 2004. Molecular cloning of the new laccase from the edible straw mushroom *Volvariella volvacea*: possible involvement in fruit body development. *FEMS Microbiology Letters*. 230(2). pp. 171-176.

Colao, M. C., Garzillo, A. M., Buonocore, V., Schiesser, A. y Ruzzi, M. 2003. Primary structure and transcription analysis of a laccase-encoding gene from the basidiomycete *Trametes trogii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 63 pp. 153-158.

Coll, P. M., Fernandez-Avalos, J. M., Villanueva, J. M., Santamaria, R. y Perez, P. 1993. Purification and characterization of a phenoloxidase (laccase) from the lignin-degrading basidiomycete PM1 (CECT 2971). *Applied and Environmental Microbiology*. 59. pp. 2607-2613.

Coll, P. M., Perez, P., Villar, E. y Shnyrov, V. L. 1994. Domain structure of laccase I from the lignin-degrading basidiomycete PM1 revealed by differential scanning microcalorimetry. *Biochemical and Molecular Biology. Int.* 34. pp. 1091-1098.

Collins, P. J. y Dobson, A. D. W. 2002. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(9). pp. 3444-3450.

Couto, S. R., Sanroman, M. A., Hofer, D. y Gubitz G. M. 2004. Production of laccase by *Trametes hirsuta* grown in an immersion bioreactor and its application in the decolorization of dyes from a leather factory. *Engineering in Life Sciences*. 4(3). pp. 233-238.

Crowe, J. y Olsson, S. 2001. Induction of laccase activity in *Rhizoctonia solani* by antagonistic *Pseudomonas fluorescens* strains and a range of chemical treatments. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(5). pp. 2088-2094.

Cullen, D. 1997. Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. *Journal Biotechnology*. 53. pp. 273-289.

Deacon, J. W. 1993. En: Introducción a la Micología Moderna. *Editorial Limusa*. Primera edición. México, D.F. pp. 13-41.

Dittmer, J. K., Patel, N. J., Dhawale, S. W. y Dhawale, S. S. 1997. Production of multiple laccase isoforms by *Phanerochaete chrysosporum* grown under nutrient sufficiency. *FEMS Microbiology Letters*. 149. pp. 65-70.

Dong, J. L., Zhang, Y. W., Zhang, R. H., Huang, W.Z. y Zhang Y.Z. 2005. Influence of culture conditions on laccase production and isozyme patterns in the white-rot fungus *Trametes gallica*. *Journal of Basic Microbiology*. 45(3). pp.190-198.

D'Souza, T. M., Boominathan, K. y Reddy, C. A. 1996. Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 62. pp. 3739-3744.

Duran, N. Rosa, M. A., D'Annibate, A. y Gianfreda, L. 2002. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology*. 31. pp. 907-931.

Eggert, C., Temp, U., Dean, J. F. D. y Eriksson, K. E. L. 1996. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structure and synthetic lignin by laccase. *FEBS Letters*. 391. pp. 144-148.

Eggert, C., Lafayette, P. R., Temp, U., Eriksson, K. L. y Dean, J. 1998. Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(5) pp. 1766-1772.

Fabrini, M., Galli, C., Gentili, P. y Machitella, D. 2001. An oxidation of alcohols by oxygen with the enzyme laccase and mediation by TEMPO. *Tetrahedron Letters*. 42. pp. 7551-7553.

Fahraeus, G. y Reinhammar, B. 1967. Large-scale production and purification of laccase from cultures of *Polyporus versicolor* and some properties of laccase A. *Acta Chemica Scandinavica*. 21. pp. 2367-2378.

Faraco, V., Giardina, P. y Sannia, G. 2003. Metal-responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters. *Microbiology*. 149. pp. 2155-2162.

Farnet, A. M., Tagger, S. y Le petit, J. 1999. Effects of copper and aromatic inducers on the laccase of the white-rot fungus *Marasmius quercophilus*. *Life Sciences*. 322. pp. 499-503.

Fernandez-Larrea, J. y Stahl, U. 1996. Isolation and characterization of a laccase gene from *Podospora anserina*. *Molecular Genetics and Genomics*. 252. pp. 539-551.

Flinckinger, M. C. y Drew, S. W. 1999. Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation vol. 1-5. *John Wiley and Sons, inc.* U.S.A. pp. 1545-1551.

Freitag, M. y Morrell, J. J. 1992. Changes in selected enzyme-activities during growth of pure and mixed cultures of the white-rot decay fungus *Trametes versicolor* and the potential biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*. 38(4). Pp. 317-323.

Galhaup, C., Wagner, H., Hinterstoisser, B. y Haltrich, D. 2002. Increased production of laccase by the *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology*. 30. pp. 529-536.

Gardioli, A. E., Hernández, R. J. y Harte, B. R. 1998. Device for detecting oxygen with oxidase *United States Patent* 5,804,401.

Garzillo, A. M. V., Colao, M. C., Caruso, C., Caporale, C., Celletti, D. y Buonocore, V. (1998). Laccase from the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 49. pp. 545-551.

Germann, U. A., Müller, G., Hunziker, P. E. y Lerch, K. 1988. Characterization of two allelic forms of *Neurospora crassa* laccase. *Journal of Biological Chemistry*. 263. pp. 885-896.

Gianfreda, L., Sannino, F., Filazzola, M. T. y Leonowcs, A. 1998. Catalytic behavior and detoxifying ability of a laccase from the fungal strain *Cerrena unicolor*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 4. pp. 13-23.

Bibliografía

Giardina, P., Cannio, R., Martirani, L., Marzullo, L., Palmieri, G. y Sannia, G. 1995. Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(6). pp. 2408-2413.

Gigi, O., Marbach, I. y Mayer, A. M. 1980. Induction of laccase formation in *Botrytis*. *Phytochemistry*. 19(11). pp. 2273-2275.

González, T. 2001. Aspectos fisiológicos y moleculares de la decoloración enzimática de efluentes de destilería con el basidiomiceto *Trametes sp.* I-62. Tesis Doctoral. *Departamento de Microbiología, Universidad de Alcalá*. España.

Gorbatova, O. N., Stepanova, E. U., Koroleva, O. V. 2000. Certain Biochemical and physicochemical properties of the inducible form of extracellular laccase from basidiomycetes *Coriolus hirsutus*. *Paia Biokhimiia i Mikrobiologiia*. 36. pp. 272-277.

Guzman, G., Mata, G., Salmones, D., Soto-Velasco, C. y Guzmán-Dávalos, L. 1993. El cultivo de los hongos comestibles. *Editorial IPN-SEP*. Primera edición. México.

Heim, R. 1957. Les Champignons d'Europe. Tome II: Partie descriptive: Basidiomycètes. *Éditions N. Boubée y Cie*. pp. 66-80.

Heinzkill, M., Bech, L., Halkier, T., Schneider, P. y Anke, T. 1998. Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi: (family *Coprinaceae*). *Applied and Environmental Microbiology*. 64. pp. 1601-1606.

Herrera, T y Ulloa, M. 1990. El reino de los hongos: micología básica y aplicada. *UNAM y Fondo de Cultura Económica*. México, D.F.

Hoshida, H., Nakao, M., Kanazawa, H., Kubo, K., Hakukawa, T., Morisama, K., Akada, R. y Nishizawa, Y. 2001. Isolation, of five laccase gene sequence from the

Bibliografía

white rot fungus *Trametes sanguines* by PCR, and cloning, characterization and expression of the laccase cDNA in yeast. *FEMS Microbiology Letters*. 199(2). pp. 207-213.

Huber, M. y Lerch, K. 1987. The influence of copper on the induction of tyrosinase and laccase in *Neurospora crassa*. *FEBS Letters*. 219 (2). pp. 335-338.

Ikeda, R., Uyama, H. y Kobayashi, S. 1996. Novel Synthetic Pathway to a Poly(phenylene oxide). Laccase-Catalyzed Oxidative Polymerization of Syringic Acid. *Macromolecules*. 29. pp. 3053-3054.

Jennings, D. H. y Lysek, G. 1996. Fungal biology: understanding the fungal lifestyle. *Bios Scientific Publishers Limited*. Primera edición. Gran Bretaña.

Johannes, C. 2000. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(2). pp. 524-528.

Jordaan, J. y Leukes, W. D. 2003. Isolation of a thermostable laccase with DMAB and MBTH oxidative coupling activity from mesophilic white-rot fungus. *Enzyme and Microbial Technology*. 33(2-3). pp. 212-219.

Kaharaman, S. S. y Gordal, I. H. 2002. Effect of synthetic and natural cultura media on laccase production by white rot fungi. *Bioresource Technology*. 82. pp. 215-217.

Kanunfre, C. C. y Zancan, G. T. 1998. Physiology of exolaccase production by *Thelephora terrestres*. *FEMS Microbiology Letters*. 161. pp. 151-156.

- Kersten, P. 1990. Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: its characterization and activation by lignin peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Science*. USA. 87. pp. 2936-2940.
- Kiiskinen, L., Viikari, L. y Kruus, K. 2002. Purification, characterization of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59(2-3). pp. 198-204.
- Kiiskinen, L., Kruus, K., Bailey, M., Ylösmäki, E., Siika-aho, M. y Saloheimo, M. 2004. Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme. *Microbiology*. 150. pp. 3065-3074.
- Kim, S., Leem, Y., Kim, K. y Choi, H. T. 2001. Cloning of an acidic laccase gene (*clac2*) from *Coprinus congregatus* and its expression by external pH. *FEMS Microbiology Letters*. 195. pp. 151-156.
- Kirk, K. T. y Fenn, P. 1982. Formation and action of ligninolytic system in basidiomycetes, British Mycological Society Symposium 4. *Cambridge University Press*. pp. 67-70.
- Kirk, K. T., Croan, S., Tien, M., Murtagh, K. E. y Farrell, R. L. 1986. Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. *Enzyme and Microbial Technology*. 8. pp. 27-32.
- Koroleva, O. V., Stepanova, E. V., Binucov, V. I., Timofeev, V. P. y Pfeil, W. 2001. Temperature-induced changes in copper centers and protein conformation of two fungal laccases from *Coriolus hirsutus* and *Coriolus zonatus*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 4. pp. 397-407.

Koroljova-Skorovogat-ko, O., Stepanova, E. V., Gavrilova, V. P. y Morozova, O. V. 1998. Purification and characterization of the constitutive form of laccase from the basidiomycetes *Coriolus hirsutus* and effect inducer laccase synthesis. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 28. pp. 47- 54.

Kristjansson, S. 1989. Thermophilic organisms as sources of thermostable enzymes. *Tibtechonology*. 7. pp. 349-353.

Kwon, S. I. y Anderson, A. J. 2002. Genes for multicopper proteins and laccase activity: common features in plant-associated *Fusarium* isolate. *Canadian Journal of Botany*. 80(5). pp. 563-570.

Leatham, G. y Kirk, T. K. 1983. Regulation of ligninolytic activity by nutrient nitrogen in white-rot basidiomycetes. *FEMS Microbiology Letters*. 16. pp. 65-67.

Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D, Wojtas-Wasilewska, M., Cho, N-S., Hofrichter, M. and Rogalski, J. 1999. Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 27. pp. 175-185.

Li, K., Xu, F. y Erikson, K-E. L.1999. Comparison of fangal laccase and redox mediator in oxidation of a nonphelolics lignin model compound. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(6). pp. 2654-2660.

Linden, R. M., Schilling, B. C., Germann, U. y Lerch, K. 1991. Regulation of laccase synthesis in induced *Neurospora crassa* cultures. *Current Genetics*. 19. pp. 375-381.

Liu, W., Chao, Y., Liu, S., Bao, H. y Qian, S. 2003. Molecular cloning and characterization of a laccase gene from the basidiomycete *Fomes lignosus* and expression in *Pichia pastori*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63. pp. 174-181.

Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J. 1998. Biología de los microorganismos. *Prentice Hall Internacional*. 8ª edición. México, D.F.

Mansur, M., Suárez, T., Fernandez-Larrea, J. B., Brizuela, M. A. y González, A. E. 1997. Identification of a laccase gene family in the new lignin-degrading basidiomycete CECT 2097. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(7). pp. 2637-2646.

Marbach, I., Harel, E. y Mayer, A. M. 1983. Inducer and culture medium dependent properties of extracellular laccase from *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*. 22 (7). pp. 1535-1538.

Márquez, A. E. 2004. Determinación de patrones de inducción de lacasas en el hongo *Trametes sp.* EUM1. Tesis de Especialización. *Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa*. México, D.F.

Márquez, A. E., Arana, A., Viniegra-González, G. y Loera, O. 2004. Identification of a termotolerant fungal strain and inducing pattern of its laccase. 7th *European Conference on Fungal Genetics Copenhagen*. VIIIp-15. pp. 194.

Martins, L. O., Soares, C. M., Pereira, M. M., Teixeira, M., Costa, T., Jones, G. H. y Henriques, A. O. 2002. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *Journal of Biology Chemistry*. 277. pp. 18849-48859.

Medina, E., 2000. Aislamiento y selección de hongos termofílicos productores de lacasas a partir de desechos de madera. Tesis de Licenciatura. *Instituto Tecnológico de Mérida, Yucatán*. México.

Bibliografía

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.

Milstein, O., Huttermann, A., Majcherczyk, A., Schulse, K., Frund, R. y Ludemanna, H. D. 1993. Transformation of lignin-related compounds with laccase in organic-solvent. *Journal Biotechnology*. 30. pp. 37-47.

Min, K. L., Kim, Y.H., Kim, Y. W., Jung, H. S. y Hah, Y. Ch. 2001. Characterization of a novel laccase produced by the Wood-rotting fungus *Phellinus ribis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 392(2). Pp. 279-286.

Muñoz, C., Guillen, F., Martínez, A. T. y Martínez, M. J. 1997. Characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(6). pp. 2166-2174.

Muñoz, C., Guillen, F., Martínez, A. T. y Martínez, M. J. 1997. Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Current Microbiology*. 34. pp. 1-5.

Niku-Paavola, M. L., Karhunen, E., Salola, P. y Raunio, V. 1988. Ligninolytic enzymes of the white rot fungus *Phlebia radiata*. *Biochemistry Journal*. 254. pp. 877-884.

Niku-Paavola, M. L., Fagerstrom, R., Kruus, K. y Viikari. 2004. Thermostable laccases produced by a white-rot fungus from *Peniophora* species. *Enzyme and Microbial Technology*. 35(1). pp. 100-102.

Padilla, Y. 2004. Presencia de hongos miceliales termotolerantes y termofílicos en el vertedero de lajas, Puerto Rico, prestando especial interés a *Aspergillus fumigatus*.

Tesis de Maestría. *Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez*. Puerto Rico.

Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B. y Sannia, G. 2000. Copper Induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66. pp. 920-924.

Palonen, H., Saloheimo, M., Viikari, L. y Kruus, K. 2003. Purification, characterization and sequence analysis of a laccase from the ascomycete *Mauguiniella sp.* *Enzyme and Microbial Technology*. 33. pp. 854-862.

Pérez, J., De La Rubia, T., Ben Hamman, O. y Martínez, J. 1998. *Phanerochaete flavido-alba* laccase induction and modification of manganese peroxidase isoenzyme pattern in decolorized olive oil mill wastewaters. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(7). pp. 2726-2729.

Pointing, S. B., Jones, E. B. G. y Vrijmoed, L. L. P. 2000. Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture. *Mycologia*. 92. pp. 139-144.

Rodriguez, S., Gudín, M., Lorenzo, M. y Angeles-Sanromán, M. 2002. Screening of supports and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions. *Process Biochemistry*. pp. 1-7.

Rosenberg, S.L. 1978. Cellulose and Lignocellulose degradation by thermophilic and thermotolerant fungi. *Mycologia*. 70. pp. 1-13.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: A laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*. New York. Second Edition.

Bibliografía

Saparrat, M. C. N., Guillén, F., Arambarri, A. M., Martínez, A. T. y Mantínez, M. J. 2002. Induction, isolation and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Corioloopsis rigida*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(4). pp. 1534-1540.

Sariaslani, F. S. 1989. Microbial enzymes for oxidation of organic molecules. *Critical Reviews in Biotechnology*. 9. pp. 171-257.

Serrano, R., Cid, A., Caldeira, M. T., Eraso, P., De Larrinoga, I. F., Ferrando, A., Frias, I., Glaxiola, R., Glaser, H. U., Ibarz, E., Márquez, J. A., Miralles, V., Monk, B. C., Montesinos, C., Montrichard, F., Palmaren, M. G., Pardo, J. M., Portillo, F., Roldán, M., Vallejo, C. G. y Villalba, J. M. 1993. Métodos de bioquímica y biología molecular. *European Molecular Biology Laboratory y Departamento de Biotecnología, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Universidad Politécnica*. Heidelberg, Alemania y Valencia, España. Primera Edición al español.

Singer, R. y Harris, B. 1987. Soluble and immobilized laccase as catalysts for transformation of substituted phenol. *Enzyme and Microbial Technology*. 8. pp. 171-177.

Singh, D. y Kaur, P. 2001. Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. *Bioresource Technology*. 77. pp. 89-91

Slomczynski, D. J., Nakas, J. P. y Tanenbaum, S. W. 1995. Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62. pp. 907-912.

Soden, D. M. y Dobson, A. D. 2001. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-cajn*. *Microbiology (Reading England)*. pp. 1755-1763.

Bibliografía

Suresh, S. V., Phale, P. S., Durani, S. y Wangikar, P. P. 2003. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnology and Bioengineering*. 83(4). pp. 386-394.

Suzuki, T., Endo, K., Ito, M., Tsujibo, H., Miyamoto, K. y Inamori, Y. 2003. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence and expression. *Bioscience and Biotechnology Biochemical*. 67(10). pp. 2167-2175

Téllez-Jurado, A., Arana-Cuenca, A., González, A., Viniegra-González, G. y Loera O. 2005. Expresión of a heterologous laccase by *Aspergillus niger* cultured by solid-state and submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. Artículo en impresión.

Téllez-Téllez, M., Sánchez, C., Loera, O. y Díaz-Godinez, G. 2005. Diferencial patterns of constitutive intracellular laccase of the vegetative phase of *Pleurotus* species. *Biotechnology Letters*. 27. pp. 1391-1394.

Temp, U. y Eggert, C. 1999. Novel Interaction between fungal laccase and cellobiose Dehydrogenase during Pigment Synthesis in the white rot fungus *Pleurotus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(2). pp. 389-395.

Thurston, C. F. 1994. The structure and function of fungal laccase. *Microbiology*. 140. pp. 19-26.

Tinoco, R., Pickard, M. A. y Vázquez-Duhalt, R. 2001. Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strain. *Letters in Applied Microbiology*. 32. pp. 331-335.

Villaseñor, F., Loera, O., Campero, A. y Viniegra-González. 2004. Oxidation of dibenzothiophene by laccase or hydrogen peroxide and deep desulfurization of diesel fuel by the later. *Fuel Processing Technology*. 86(1). pp. 49-59.

Wahleithner, J. A., Xu, F., Brown, K. M., Brown, S.H. y Golightly, E. J. 1996. The identification and characterization of four laccase from the plant pathogenic fungus *Rhizoctoni solani*. *Current Genetics*. 29. pp. 395-403.

Wiegel, J. y Ljungdahl, L. G. 1984. The importance of thermophilic bacteria in biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*. 3. pp. 39-108.

Wolfenden, R. S. y Wilson, D. L. 1982. Radical cation as reference chromogens in the kinetic studies of one electron transfer reaction. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions*. 2. pp. 605-812.

Xiao, Y. Z., Tu, X. M., Wang, J., Zhang, M., Cheng, Q., Zeng, W. Y. y Shi, Y. Y. 2003. Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from basidiomycete *Trametes sp.* Strain AH28-2. *Applied Microbiology and Biotechnoogy*. 60. pp. 700-707.

Xu, F. 1996. Site directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. *Biochemistry Journal*. 334. pp. 63-70.

Xu, F. 1997. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of gungal laccases. *Journal of Biology Chemistry*. 272. pp. 924-928.

Xu, F., Berka, R. M., Wahleithner, J. A., Nelson, B. A., Shuster, J. R., Brown, S. H., Palmer, A. E. y Solomon, E. I. 1998. Site-directed mutations in fungal laccase: Effetc on redox potential, activity and pH profile. *Biochemistry Journal*. 334. pp. 63-70.

Xu, F. 2005. Applications of oxidoreductases: recent progress. *Industrial Biotechnology*. 1(1). pp. 38-50.

Yaver, D. S., Xu, F., Golightly, E. J., Brown, K. M., Brown, S. H., Rey, M. W., Schneider, P., Halkier, T. y Dalboge, H. 1996. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62. pp. 834-841.

Yaver, D. S., Overjero, M. C., Xu, F., Nelson, B. T., Brown, K. M., Halkier, T., Bernauer, S., Brown, K. M. y Kauppinen, S. 1999. Molecular characterization of genes from the basidiomycete *Coprinus cinereus* and heterologous expression of the laccase Lcc1. *Applied an Environmental Microbiology*. 65(11). pp. 4943-4948.

Young, H. D., Kim, K. J., Maeng, J. S., Han, Y. H., Jeong, I. B., Jeong, G., Kang, S. O. and Hah, Y. C. 1995. Single electron transfer by an extracellular laccase from the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Microbiology*. 141. pp. 393-398.

Zhao, J. y Kwan, H.S. 1999. Characterization, molecular cloning and differential expression analysis laccase genes from the edible muchroom *Lentinula edodes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(11). pp. 4908-4913.

Zamost, B. L., Nielsen, H. K. y Starnes, R. L. 1991. Thermostable enzymes for industrial applications. *Journal of Industrial Microbiology*. 8. pp. 71-82.

Zaremski, A., Ducousso, M., Domergue, O., Fardoux, J., Rangin, C., Fouquet, D., Joly, H., Sales, C., Dreyfus, B. y Prin, Y. 2005. In situ molecular detedtion of some white-rot and brown-rot basidiomycetes infecting temperate and tropical woods. *Canadian Journal of Forest Research*. 35(5). Pp. 1256-1260.