



Universidad Autónoma de Tlaxcala

División de Ciencias Biológicas

Maestría en Ciencias Biológicas

Evaluación de la actividad intracelular y extracelular de
lacasas en cepas del género *Pleurotus*

T e s i s
para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Biológicas
P r e s e n t a
Biol. Maura Téllez Téllez

Director de tesis
Dr. Gerardo Díaz Godínez

Tutores
Dra. Ma. Del Carmen Sánchez Hernández
Dr. Octavio Loera Corral

Tlaxcala, Tlax.

Febrero de 2005

ÍNDICE GENERAL

| | Pág |
|--|-----|
| Financiamiento | i |
| Autorización de impresión de tesis | ii |
| Agradecimientos | iii |
| Dedicatorias | iv |
| Resumen | v |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1. Enzimas ligninolíticas de hongos..... | 2 |
| 1.1.1. Lacasas..... | 2 |
| 1.1.2. Lignin peroxidadas..... | 4 |
| 1.1.3. Manganeso peroxidadas..... | 5 |
| 1.2. Lignina..... | 6 |
| 1.3. Hongos de pudrición..... | 9 |
| 1.3.1. Hongos de pudrición blanda..... | 9 |
| 1.3.2. Hongos de pudrición oscura..... | 9 |
| 1.3.3. Hongos de pudrición blanca..... | 10 |
| 1.3.1.1. Descripción del género <i>Pleurotus</i> | 11 |
| 1.3.4. Producción de hongos en México..... | 13 |
| 1.4. Técnicas de electroforesis..... | 14 |
| 1.4.1. Sistema de electroforesis no desnaturalizante..... | 17 |
| 1.4.2. Sistema de electroforesis desnaturalizante..... | 18 |
| 2. ANTECEDENTES..... | 20 |
| 3. JUSTIFICACIÓN..... | 25 |
| 4. HIPÓTESIS..... | 26 |
| 5. OBJETIVOS..... | 27 |
| 5.1. General..... | 27 |
| 5.2. Particulares..... | 27 |
| 6. METODOLOGÍA..... | 28 |
| 6.1. Cepas de <i>Pleurotus</i> | 29 |
| 6.2. Obtención del inóculo..... | 29 |
| 6.3. Medio de cultivo y desarrollo micelial..... | 30 |
| 6.4. Obtención de extractos enzimáticos..... | 30 |
| 6.5. Temperaturas y tiempo de incubación óptimas para los ensayos enzimáticos..... | 30 |
| 6.6. Determinación de la actividad intracelulares y extracelular lacasas..... | 31 |
| 6.7. Identificación del número de isoformas con actividad de lacasas por zimografía..... | 32 |
| 6.8. Análisis estadístico..... | 33 |
| 7. RESULTADOS..... | 34 |
| 7.1. Determinación de las temperaturas y tiempos de incubación..... | 34 |
| 7.2. Evaluación de la actividad intracelular y extracelular de lacasas..... | 36 |
| 7.2.1. Actividad de lacasas con 2,6-dimetoxifenol como sustrato..... | 36 |
| 7.2.2. Actividad de lacasas con ABTS como sustrato..... | 37 |
| 7.2.3. Actividad de lacasas con siringaldazina como sustrato..... | 38 |
| 7.2.4. Actividad de lacasas con p-anisidina como sustrato..... | 39 |
| 7.2.5. Actividad de lacasas con o-tolidina como sustrato..... | 40 |
| 7.3. Patrones zimográficos de lacasa intra-y extracelular..... | 42 |

| | |
|---|----|
| 8. DISCUSIONES..... | 48 |
| 8.1. Evaluación de la actividad intracelular y extracelular de lacasas..... | 48 |
| 8.2. Patrones zimográfico de lacasa intra-y extracelular..... | 49 |
| 9. CONCLUSIONES..... | 52 |
| 10. PERSPECTIVAS..... | 53 |
| 11. REFERENCIAS..... | 54 |
| 12. LISTA DE ABREVIATURAS | 60 |
| 13. PUBLICACIONES..... | 61 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Pág |
|--|-----|
| Figura 1. Oxidación de compuestos fenólicos de lignina por acción de lacasas..... | 4 |
| Figura 2. Reacción catalítica de lignin peroxidasas y manganeso peroxidasas..... | 6 |
| Figura 3. Estructura química de la lignina..... | 8 |
| Figura 4. Ciclo de vida del género <i>Pleurotus</i> | 13 |
| Figura 5. Reacción química de la polimerización de la acrilamida con bis-acrilamida..... | 16 |
| Figura 6. Efecto del pH en la carga de aminoácidos y proteínas..... | 18 |
| Figura 7. Diagrama de flujo de la metodología..... | 28 |
| Figura 8. Evaluación de diferentes temperaturas sobre la actividad de lacasas utilizando siringaldazina, <i>p</i> -anisidina y DMP como sustratos | 35 |
| Figura 9. Evaluación de tiempo de incubación de la actividad de lacasas sobre o-tolidina y ABTS..... | 35 |
| Figura 10. Evaluación de tiempo de incubación de la actividad de lacasas sobre los cinco sustratos..... | 36 |
| Figura 11. Actividad enzimática intracelular y extracelular de lacasas de 10 cepas del género <i>Pleurotus</i> utilizando DMP como sustrato..... | 37 |
| Figura 12. Actividad enzimática intracelular y extracelular de lacasas de 10 cepas del género <i>Pleurotus</i> utilizando ABTS como sustrato..... | 38 |
| Figura 13. Actividad enzimática intracelular y extracelular de lacasas de 10 cepas del género <i>Pleurotus</i> utilizando siringaldazina como sustrato..... | 39 |
| Figura 14. Actividad enzimática intracelular y extracelular de lacasas de 10 cepas del género <i>Pleurotus</i> utilizando <i>p</i> -anisidina como sustrato..... | 40 |
| Figura 15. Actividad enzimática intracelular y extracelular de lacasas de 10 cepas del género <i>Pleurotus</i> utilizando o-tolidina como sustrato..... | 41 |
| Figura 16. Zimograma de extractos intracelulares de las cepas del género <i>Pleurotus</i> utilizando DMP como sustrato..... | 43 |
| Figura 17. Zimograma de extractos extracelular de las cepas del género <i>Pleurotus</i> utilizando DMP como sustrato..... | 44 |
| Figura 18. Zimograma de extractos intracelulares de las cepas del género <i>Pleurotus</i> utilizando <i>p</i> -anisidina como sustrato..... | 45 |
| Figura 19. Zimograma de extractos extracelulares de las cepas del género <i>Pleurotus</i> utilizando <i>p</i> -anisidina como sustrato..... | 46 |
| Figura 20. Zimograma de extractos intracelulares de las cepas del género <i>Pleurotus</i> utilizando o-tolidina como sustrato..... | 46 |
| Figura 21. Zimograma de extractos extracelulares de las cepas del género <i>Pleurotus</i> utilizando o-tolidina como sustrato..... | 47 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Pág |
|---|-----|
| Tabla 1. Cepas empleadas en el estudio..... | 29 |
| Tabla 2. Actividad intracelular de lacasas de 10 cepas del género <i>Pleurotus</i> sobre cinco sustratos..... | 41 |
| Tabla 3. Actividad extracelular de lacasas de 10 cepas del género <i>Pleurotus</i> sobre cinco sustratos..... | 42 |

HOJA DE FINANCIAMIENTO

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de biotecnología del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, apoyado por el proyecto financiado por PROMEP dentro del marco de incorporación de exbecarios PROMEP del Dr. Gerardo Díaz Godínez, así como también al apoyo recibido por el CONACyT dentro del programa de PIFOP. Por otro lado, Maura Téllez Téllez recibió una beca para estudios de maestría por CONACyT con el No. de registro 177867.

Cabe mencionar que el programa de Maestría en Ciencias Biológicas de la UAT está registrado en el Padrón del Programa Institucional de Fortalecimiento del Posgrado de SEP-CONACyT (PIFOP-UAT-2000-30-03).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
Secretaría de Investigación Científica y de Posgrado
Coordinación de la División de Ciencias Biológicas
Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Maestría en Ciencias Biológicas

Tlaxcala, Tlax., a 18 de Diciembre de 2004

DRA. MARGARITA MARTÍNEZ GÓMEZ
COORDINADORA DE LA MAESTRÍA
Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Universidad Autónoma de Tlaxcala
Presente

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que la **C. BIÓL. MAURA TÉLLEZ TÉLLEZ.** realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen profesional correspondiente. El título que llevará es: **“Evaluación de la actividad intracelular y extracelular de enzimas lacasas en cepas del género *Pleurotus*”.**

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Dr. Gerardo Díaz Godínez

Dr. Arturo Estrada Torres

Dr. Octavio Loera Corral

Dr. Daniel Martínez Carrera

Dr. Gerardo Mata Montes de Oca

Dra. Maria del Carmen Sánchez Hernández

AGRADECIMIENTOS

DEDICATORIAS

RESUMEN

Se evaluó la actividad de lacasas intracelular y extracelular de 10 cepas del género *Pleurotus*, sobre cinco diferentes sustratos, determinando los patrones zimográficos de estas enzimas. Las cepas se desarrollaron en un medio no inductor de lacasas. El extracto enzimático intracelular se obtuvo por lisis celular de las hifas de cada cepa y el extracto enzimático extracelular por lixiviación del agar sin micelio. La actividad de lacasas se determinó *in vitro* utilizando 2,6-dimetoxifenol (DMP), ABTS, siringaldazina, ρ -anisidina y *o*-tolidina como sustratos; se consideró a una unidad de actividad enzimática (U) como la cantidad de enzima que provocó un incremento en una unidad de absorbancia por min, y se reportó por gramos de biomasa seca (U/gX). Los zimogramas se revelaron con DMP, ρ -anisidina y *o*-tolidina. Los resultados obtenidos muestran que los hongos del género *Pleurotus* son importantes productores de enzimas lacasas, ya que todas las cepas presentaron actividad sobre todos los sustratos, pero tuvieron grandes diferencias entre cepas, siendo en general, las cepas de *P. cornucopiae* y *P. ostreatus* las que presentaron más actividad intracelular y extracelular. Los patrones zimográficos de lacasas mostraron diferente número de isoformas intracelulares con respecto a las extracelulares. Estos resultados fueron iguales en todos los sustratos utilizados, lo que muestra que todas las isoformas, tanto intracelulares como extracelulares, tienen la misma capacidad de oxidar a los tres sustratos. Los patrones zimográficos intracelulares de las seis cepas de *P. ostreatus* presentaron dos isoenzimas de lacasas en la misma posición sobre el gel. Pero las isoformas de lacasas de las cepas de *P. pulmonarius* fueron diferentes (menor peso molecular) a las de *P. ostreatus*, al igual que la banda de actividad presente en *P. cornucopiae*, lo cual sugiere que el perfil de lacasas, tanto intracelular y extracelular, es particular de cada especie, aún tratándose de cepas del mismo género. Estos resultados muestran diferencias en cantidad y número de isoformas entre las cepas, posiblemente, debido a que se trata de especies diferentes, lo cual sugiere que la zimografía de lacasas podría ser utilizado como marcador taxonómico para la diferenciación de especies de *Pleurotus*. Por otro lado, estos mismos resultados permitieron detectar las cepas que producen mayor cantidad de enzimas lacasas, las cuales se podrían utilizar (*P. cornucopiae* y *P. ostreatus*) para producir estas enzimas por fermentación.

1. INTRODUCCIÓN

Las lacasas son de las pocas enzimas que han sido estudiadas desde el siglo XIX. Inicialmente se obtuvieron del exudado del árbol Japanese lacquer (*Rhus vernicifera*) y descritas por Yoshida en 1883. Posteriormente Bertrand (1896) y Laborde (1896) demostraron por primera vez la actividad de lacasas en hongos, estas enzimas requieren cobre y oxígeno para oxidar fenoles, polifenoles, aminas aromáticas y diferentes sustratos no fenólicos mediante la transferencia de un electrón resultando la formación de radicales libres (Claus 2003) lo que permite que se lleve a cabo la polimerización, dipolimerización, metilación y/o dimetilación de compuestos fenólicos (Edens y col. 1999). La función fisiológica de estas enzimas no ha sido comprendida totalmente; se ha reportado que en plantas, las lacasas participan en la lignificación y en hongos en la morfogénesis (formación de esporas, de pigmentos de los cuerpos fructíferos), patogénesis, virulencia y degradación de lignina, pero también se ha reportado actividad de lacasas en algunos insectos y bacterias, en los cuales todavía no es clara su función (Galhaup y col. 2002), aunque pocas de estas funciones han sido demostradas experimentalmente (Eggert y col. 1998). La estructura molecular de las lacasas se ha establecido a partir de las enzimas aisladas de hongos, las que junto con la lignina peroxidasa y la manganeso peroxidasa forman un sistema que degrada lignina, presente los hongos de pudrición blanca. Las lacasas fúngicas no tienen un sustrato específico, por lo que pueden transformar y algunas veces mineralizar por completo gran variedad de contaminantes ambientales (Wilkołazka y col. 2002), así como degradar compuestos no fenólicos en presencia de mediadores redox apropiados (Li y col. 1999). Las lacasas tienen muchas aplicaciones como son: clarificación del vino (remueve compuestos fenólicos), análisis de drogas (distinguir morfina de codeína), delignificación y procesos de biorremediación (decoloración de efluentes, blanqueamiento de la pulpa de papel, degradación de herbicidas, etc.). Por lo tanto, se debe contar con una fuente altamente productora de enzimas con una amplia capacidad de oxidación de diferentes compuestos. Las especies del género *Pleurotus* son organismos de gran interés para la obtención de estas enzimas, debido a que pertenecen a los hongos de pudrición blanca y a la importancia económica que representan por su

producción mundial como alimento. Estos hongos producen diferentes isoformas de lacasas, al igual que muchos otros hongos de pudrición blanca y se pueden expresar constitutivamente y pueden ser inducibles (Galhaup y col. 2002).

1.1. Enzimas ligninolíticas de hongos

Los hongos de pudrición blanca producen cambios en la lignina (polímero estereoirregular) mediante mecanismos oxidativos. El sistema enzimático ligninolítico es poco específico, ya que las peroxidasas y oxidasas actúan al azar sobre la molécula de lignina, generando radicales libres que son inestables y tienden a polimerizarse. Las principales enzimas que actúan directa o indirectamente sobre la lignina son: lignina peroxidasas (LiP), manganeso peroxidasas (MnP) y lacasas. Ciertos hongos de pudrición blanca producen las tres enzimas, algunos sólo dos y pocos producen una (Kirk y Cullen 1998). *Pleurotus ostreatus* produce lacasas, manganeso peroxidasas y veratril alcohol oxidasas, pero no produce lignina peroxidasas (Palmieri y col. 1997).

1.1.1. Lacasas

Las enzimas lacasas forman parte de las enzimas ligninolíticas que presentan los hongos de pudrición blanca para degradar a la lignina. Estas enzimas se han empleado para blanquear y delignificar la pulpa de papel (Moreira y col. 1999). Estas enzimas están ampliamente distribuidas en la naturaleza, se encuentran en plantas (árboles, col, remolacha, manzanas, papas, peras, entre otros), en hongos, así como en bacterias y en algunos insectos (Palonen y col. 2003). Sin embargo, han sido más estudiadas las lacasas de los hongos (Maller y col. 1993). Estas enzimas son secretadas en múltiples isoformas dependiendo de la especie de hongo y de las condiciones de desarrollo (Giardina y col. 1999).

La función biológica de las lacasas no es del todo clara y al parecer varía dependiendo del tipo de organismo. En plantas están involucradas en la síntesis de lignina y en los hongos en procesos celulares, morfogénesis, producción de pigmentos, patogénesis, virulencia, degradación de la lignina o eliminación de fenoles tóxicos que surgen durante esta degradación (Mansur y col. 1997), aunque pocas de estas funciones han sido demostradas experimentalmente (Eggert y col. 1998).

Las lacasas (ρ -difenoil: oxígeno oxido-reductasas E.C. 1.10.3.2) catalizan la oxidación de ρ -difenoles acoplada con la reducción del oxígeno en agua, tienen un amplio número de sustratos que varía con el origen de las enzimas (Eggert y col. 1998). Son glicoproteínas que utilizan al cobre como cofactor, tienen un peso molecular entre 60-80 KDa (Heinzkill y col. 1998), su punto isoelectrico (pI) y su pH óptimo son ácidos (Kirk y Cullen 1998). Se han clasificado dentro del grupo de enzimas denominadas azul cobre oxidasas. Catalizan la remoción de un átomo de hidrógeno para el grupo hidroxil de *ortho* y *para* sustituyendo sustratos monofenólicos, polifenólicos y aminas aromáticas por abstracción de un electrón para formar radicales libres capaces de depolimerizarse, repolimerizarse, metilarse o formar quinonas (Abadulla y col. 2000).

En la oxidación del sustrato reacciona un electrón generando radicales libres, la oxidación de un electrón del sustrato se acopla a la reducción de cuatro electrones de oxígeno. El producto inicial es inestable y puede sufrir una segunda oxidación enzimática o de lo contrario una reacción no enzimática tal como la hidratación o polimerización. El enlace del sustrato natural (lignina) se rompe por la acción de las lacasas, incluyendo la oxidación del C_{α} , la separación del C_{α} - C_{β} y el aril-alkil (Archibald y col. 1997) (figura 1).

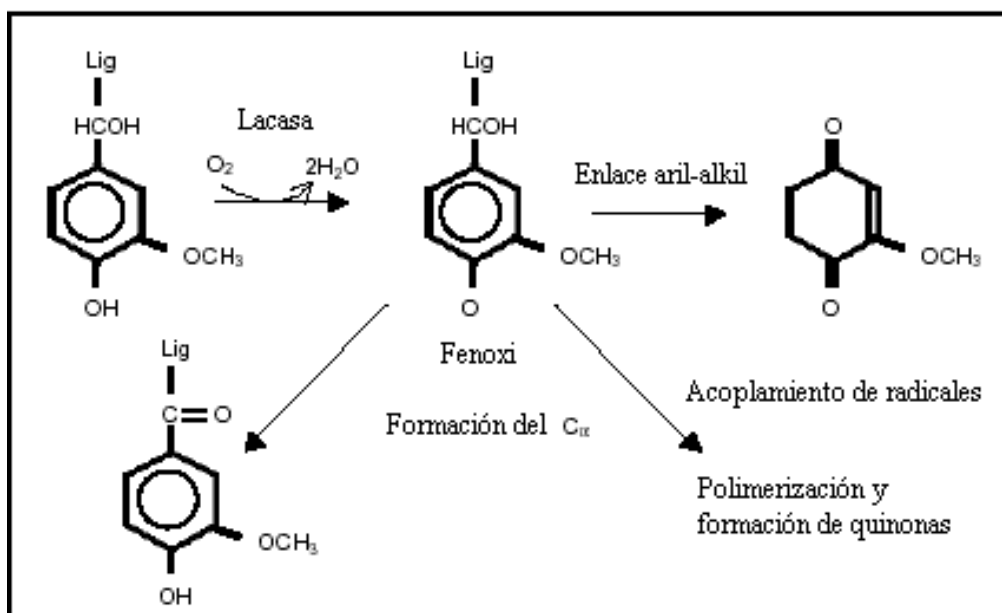


Figura 1. Oxidación de compuestos fenólicos de lignina por acción de lacasas (Tomado de Archibald y col. 1997).

1.1.2. Lignina peroxidadasas

La LiP (EC 1.11.1.14) se ha aislado de varios hongos de pudrición blanca. Esta enzima cataliza la oxidación de la lignina como sustrato, pero en presencia de H₂O₂. La masa molecular de LiP es de aproximadamente 40 KDa, es glucosilada y su pI y pH óptimos son ácidos. La oxidación de LiP inicia con la abstracción de un electrón del anillo aromático del sustrato donador (lignina), resultando un catión radical aril que entonces reacciona como radical y como catión, formando una amplia variedad de fragmentos degradados (figura 2) (Kirk y Cullen 1998).

La LiP no entra por los poros de la pared celular por lo que actuar directamente sobre el polímero de la lignina, por lo que actúa sobre la porción expuesta de la superficie del lumen. A este tipo de degradación se le denomina pudrición simultánea, pero este modelo no se aplica a los degradadores selectivos de lignina. En el modelo selectivo los hongos remueven la lignina del interior de la pared celular, pero antes ya la han degradado lo suficiente para que las

enzimas puedan penetrar. Se ha propuesto que LiP podría actuar indirectamente por oxidación de sustratos de bajo peso molecular, que a su vez penetra a la pared y oxida el polímero (Kirk y Cullen 1998).

1.1.3. Manganeso peroxidasas

La MnP (EC 1.11.1. 13) cataliza la oxidación de la lignina y provee de oxidantes de bajo peso molecular. Estas enzimas son de mayor peso molecular (50-60 kDa), son glicosiladas, su pI y pH óptimos son ácidos. Tienen un ciclo catalítico de peroxidasas convencional, pero con Mn (II) como cofactor. La MnP no está presente en muchos hongos de pudrición blanca, actúa sobre unidades fenólicas de lignina transformándolas a radicales fenólicos y puede producir una depolimerización extensa. Los hongos de pudrición blanca que no producen LiP, pero presentan a la MnP pueden degradar estructuras no fenólicas de lignina. Se ha mostrado que la producción de oxirradicales formados por MnP puede ocurrir por otros mecanismos de la vía de quelatos de Mn (III). En la presencia de Mn (II), MnP promueve la peroxidación de lípidos insaturados, generando lipo-radicales transitorios intermediarios: esto se ha mostrado en un modelo de oxidación de compuestos no fenólicos de lignina. La MnP y el sistema de peroxidación de lípidos (figura 2) depolimeriza compuestos fenólicos y fenoles metilados en lignina sintética, lo que indica que este sistema podría ser el que se presenta en la depolimerización de lignina *in vivo*. Sin embargo, falta mucho por investigar al respecto (Kirk y Cullen 1998).

Aún no es clara la relación entre la distribución de enzimas ligninolíticas y la degradación de la lignina, puesto que los hongos de pudrición blanca con una de estas enzimas tienen la capacidad de degradar lignina al igual que los hongos que presentan una combinación de dos y los de tres enzimas ligninolíticas (Dedeyan y col. 2000).

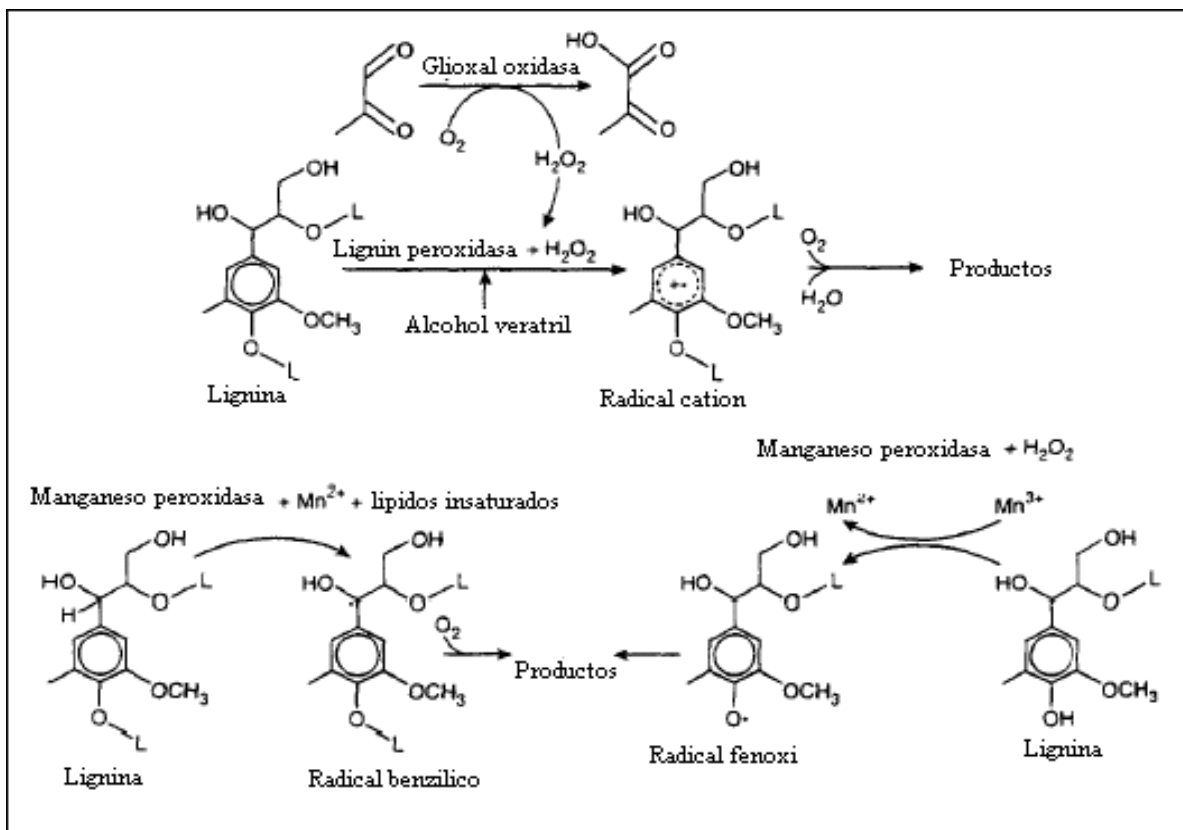


Figura 2. Reacción catalítica de lignin peroxidasas y manganeso peroxidasas (Tomado de Kirk y Cullen 1998).

1.2. Lignina

El término lignina se deriva de la palabra latina “lignum” que significa madera. Fue introducido por Anselme Payen en dos publicaciones en 1838 para representar las incrustaciones de celulosa en la pared celular de plantas (Leonowicz y col. 1999). Es un heteropolímero aromático complejo que se deriva del metabolismo de fenilpropanoides. Representa el 30% de la madera y se considera que ha tenido un papel crucial en la adaptación de las plantas en el hábitat terrestre (Ranocha y col. 1999).

La lignina es el principal componente del tejido vascular de las plantas leñosas, donde está entremezclada con la hemicelulosa y celulosa para formar la ligninocelulosa. Tiene peso

molecular elevado, por su estructura confiere rigidez a la planta y permite la unión entre sus células. La función principal de la lignina consiste en proteger a los polisacáridos vegetales contra el ataque microbiano, en la madera le confiere una protección física a la celulosa y hemicelulosa contra el ataque enzimático, por tal motivo limita la utilización de la celulosa y hemicelulosa (Leonowicz y col. 1999).

Por otra parte, es responsable del almacenamiento del alrededor del 40% de la energía solar captada por las plantas. Presenta grupos hidroxilos y un 15-20% de grupos metilados (Eggert y col. 1996). Es recalcitrante y se mineraliza en un proceso oxidativo aerobio. La degradación de la lignina no provee de una fuente primaria de carbono y energía para el desarrollo del hongo, pero es un paso necesario probablemente en la utilización de los polisacáridos de la pared celular de las plantas (Griffin 1994).

La lignina está compuesta de subunidades de fenilpropano interconectadas por diferentes enlaces carbono-carbono y carbono-oxígeno-carbono (Pointing 2001). El principal enlace de la estructura de la lignina es el éter arilglicerol- β -aril, enlace que comprende la mitad de los enlaces de la estructura. En la figura 3 se muestra el enlace de las unidades de fenilpropano de la lignina de la madera blanda, con un ejemplo del principal enlace (círculo sobre la estructura). La lignina de la madera dura es similar, pero depende de las unidades de fenilpropano, ya que contiene dos grupo o-metoxil en lugar de un ρ -oxígeno (Kirk y Cullen 1998).

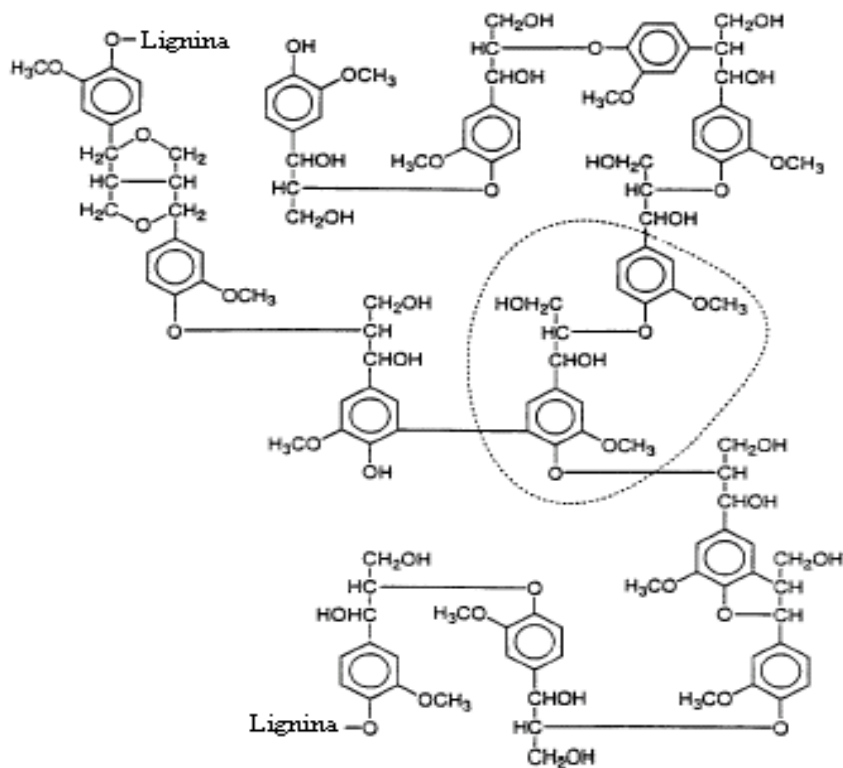


Figura 3. Estructura química de la lignina, mostrando en un círculo el principal enlace de la estructura de la lignina el éter arilglicerol-β-aril (Tomado de Kirk y Cullen 1998).

La presencia de la lignina es un inconveniente para la utilización de celulosa y hemicelulosa en los procesos industriales y biotecnológicos, por lo que el estudio de su biodegradación tiene gran importancia. Existen una gran cantidad de organismos (bacterias y hongos) con las enzimas hidrolíticas necesarias para degradar la celulosa y hemicelulosa, pero en lo referente al ataque y mineralización de lignina el número de organismos es limitado. Los organismos descritos con la capacidad de degradar y mineralizar a la lignina son un grupo de hongos denominados de pudrición blanca (Dedeyan y col. 2000).

1.3. Hongos de pudrición de la madera

Los hongos presentan gran variedad de formas de vida, entre las que se encuentran los de pudrición, que se dividen dependiendo de los cambios químicos y estructurales que ocasionan a la madera. Se han distinguido tres grupos: de pudrición blanda, de pudrición oscura y de pudrición blanca (Schwarze y col. 2000).

1.3.1. Hongos de pudrición blanda

El nombre de pudrición blanda es usado por la consistencia suave de la madera después de su degradación por Ascomicetes y Deuteromicetes. Hay también algunos que hacen a la madera quebradiza, como es el caso de *Ustulina deusta*. Las hifas involucradas en la pudrición blanda crecen dentro de la pared celular en dirección a las microfibrillas de celulosa. La destrucción de la pared celular siempre es en lugares cercanos a la hifa, lo que ocasiona la formación de cavidades sin la pared celular, la cual en una sección transversal aparece como un pequeño círculo, formando hoyos ovalados en la pared secundaria (Schwarze y col. 2000).

Estos causan dos tipos de degradación: el tipo 1 se caracteriza por la formación de una serie de cavidades sucesivas de forma cónica, después de un periodo de incremento longitudinal de la hifa, el crecimiento se detiene y forma una cavidad alrededor de la hifa. Este mecanismo degradativo podría ser una forma de suministro de nutrimentos. En el tipo 2 la degradación se lleva a cabo en el exterior del lumen, formando pequeñas erosiones en V. Tienen importancia en el ecosistema porque quizá acelera la caída natural de las ramas en árboles vivos (Schwarze y col. 2000).

1.3.2. Hongos de pudrición oscura

Sólo el 6% de todos los hongos de pudrición conocidos actualmente ocasionan la pudrición oscura. La pudrición oscura es causada por hongos Basidiomicetes principalmente, lleva este nombre porque al degradar los carbohidratos y polímeros (celulosa y hemicelulosa) presentes en la madera, está adquiere un color oscuro y una consistencia quebradiza. Para la degradación

de celulosa y hemicelulosa se debe asumir que el peróxido de hidrógeno es formado tal vez en una fase pre-celulolítica y que fácilmente penetra a la pared celular (para que puedan actuar las enzimas dependientes de peróxido) y junto con iones de hierro degraden la matriz de lignocelulosa por depolimerización oxidativa. Esta suposición parece necesaria, puesto que las enzimas que descomponen la celulosa son proteínas largas para penetrar en los pequeños capilares de la pared celular, por lo que la hemicelulosa cercana a la celulosa es oxidada y la celulosa se hace accesible para las enzimas que degradan este polímero (celulosas). La degradación preferencial de estos hongos por la celulosa y hemicelulosa esta estrechamente asociada con la pérdida de firmeza de la madera después de un corto periodo de degradación (Schwarze y col. 2000).

Otra característica importante de estos hongos es que se asocian principalmente con coníferas, la razón de esto es probablemente a que estos hongos están adaptados a la estructura de la madera blanda de las coníferas, están restringidos en su habilidad de degradar lignina, por lo que se han considerado como hongos muy específicos comparados con los hongos de pudrición blanca, los cuales se pueden encontrar en una gran variedad de árboles (Schwarze y col. 2000).

1.3.3. Hongos de pudrición blanca

La pudrición blanca es ocasionada principalmente por basidiomicetes y ascomicetes. El nombre de pudrición blanca se deriva de la apariencia blanquecina en la madera al remover la lignina, celulosa y hemicelulosa (Schwarze y col. 2000). Estos son aerobios obligados, su nutrición es por medio de la combustión biológica de la madera y materiales asociados, usando oxígeno molecular como aceptor terminal de electrones. La vía metabólica de producción de energía interna es la misma que la mayoría de los organismos aeróbicos (Kirk y Cullens 1998).

Las hifas invaden rápidamente las células de la madera y permanecen en la pared del lumen, secretan enzimas y metabolitos que provocan la depolimerización de la hemicelulosa, celulosa

y la fragmentación de la lignina. Presentan dos patrones de descomposición, la pudrición simultánea donde la celulosa, hemicelulosa y lignina, son removidas simultáneamente y la delignificación, en la cual la lignina es removida antes de la hemicelulosa y celulosa. Los hongos de pudrición blanca rompen la lignina por un proceso oxidativo por medio de fenoloxidasas que son formadas y liberadas por la hifa, tales como las lacasas, MnP, LiP, tirosinasas y peroxidasas (Schwarze y col. 2000).

Algunos hongos pueden causar pudrición simultánea en alguna parte de la madera y en otra parte se lleva a cabo la delignificación. El factor responsable de la ocurrencia de uno u otro tipo de pudrición todavía es incierto (Kirk y Cullen 1998). La degradación de la lignina con respecto a otros componentes depende mucho de las condiciones ambientales (pH, temperatura, grado de humedad) y de la especie de hongo involucrado (Palmieri y col. 1997). Los hongos de pudrición blanca producen varias isoformas de oxidasas y peroxidasas, involucradas en la degradación de la lignina en su hábitat natural (Palmieri y col. 2000). Estos hongos son de gran interés en procesos de biodegradación, como productores de enzimas de aplicación industrial y algunos como alimento como es el caso del género *Pleurotus* (Pointing 2001).

1.3.1.1. Descripción del género *Pleurotus*

El género *Pleurotus* comprende especies generalmente de color blanco, amarillento o rosado a veces grisáceo o de color oscuro. Su forma puede ser de embudo, pétalo de flor o concha de ostra. Con relación al estípite puede carecer de éste o puede ser lateral o excéntrico y puede ser corto, mediano o largo. Las laminillas son longitudinalmente decurrentes sobre la base del estípite, con frecuencia anastomosadas transversalmente al nivel de la inserción del pie. Las esporas son de color blanco, crema o lila pálido, presentan una forma cilíndrica (raramente elipsoides) y son lisas. El género es cosmopolita, está distribuido en Europa, Asia, África, Australia, Estados Unidos, Canadá y Latinoamérica (Guinberteau 1990). Es un hongo saprófito, crece sobre troncos, ramas o árboles muertos y algunas veces se encuentra en el

suelo sobre raíces podridas. La temperatura óptima de desarrollo de las especies de este género variable, *P. ostreatus* se desarrolla en climas templados, con una temperatura óptima de crecimiento de 25°C, mientras que *P. pulmonarius* se desarrolla en climas semi-tropicales (15-28°C).

En los basidiomicetes existen dos modelos sexuales: 1) En el homotalismo los hongos son autocompatibles, es decir la unión sexual puede efectuarse entre elementos de un mismo micelio y 2) el heterotalismo en el que son necesarios dos micelios para llevar a cabo la reproducción. El género *Pleurotus* está dentro de este último modelo. En éste las basidiosporas con un núcleo germinan (micelio primario monocariótico) (**A**) y se fusionan dos micelios primarios compatibles, en los cuales hay un intercambio nucleico recíproco (plasmogamia) (**B**) formando el micelio secundario dicariótico con la presencia de hifas (**C**), la fusión nuclear (cariogamia) ocurre en los basidios que se encuentran en las laminillas del cuerpo fructífero (**D**), posteriormente ocurre la meiosis, dando origen a células haploides (basidiosporas) que son expulsadas hacia el ambiente (**E**) (figura 4).

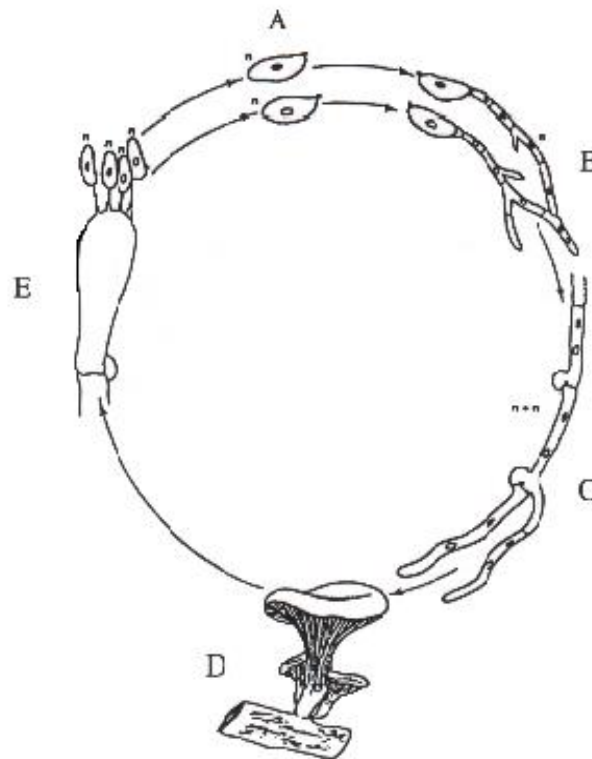


Figura 4. Ciclo de vida del género *Pleurotus* (Tomado de Guinberteau, 1990)

1.4. Producción de hongos en México

En la naturaleza se considera que existen más de 2000 especies de hongos comestibles, sin embargo sólo alrededor de 25 especies se consumen. Los principales hongos cultivados en el mundo son: champiñón (*Agaricus bisporus*) con el 56% de la producción total; el hongo negro del bosque o shiitake (*Lentinus edodes*) 14%, hongo de la paja (*Volvariella volvacea*) 8%, hongo ostra (*Pleurotus* spp) 8%; hongo oreja de la madera (*Auricularia* spp) 6%, pata de terciopelo (*Flammulina velutipes*) y otras especies, 3% (Chang y Miles 1987). Durante los últimos años, el cultivo de *Pleurotus* spp. ha tomado mayor importancia (Rajaratham y Bano 1989), ocupando en 1986 el cuarto lugar en la producción mundial, estimada en 176 mil toneladas (Breene 1990).

En México se han reportado muchas especies de hongos comestibles y algunos son consumidos desde tiempos prehispánicos. Sin embargo, los principales hongos cultivados en México son el champiñón (*Agaricus* spp.) y la "seta" (*Pleurotus* spp.), este último crece en forma natural en diversos lugares del país, principalmente en los estados de clima semitropical o tropical. El cultivo de *Pleurotus ostreatus* en México representa alternativas ecológicas, nutricionales y económicas. El cultivo del *Pleurotus* spp. puede extenderse a diferentes regiones del país como una actividad económica, ya que cuenta con factores que favorecen su cultivo; entre los más importantes se encuentran: el clima, la materia prima disponible e infraestructura (servicios, carreteras, etc.) y un amplio mercado, tanto nacional como internacional, principalmente en E. U. y Canadá (Martínez y col., 1991).

La demanda nacional supera la oferta. Los estados con potencial para el desarrollo de una industria de *Pleurotus ostreatus* son: Jalisco, México, Chiapas, Guanajuato, Michoacán, Veracruz, Puebla, Oaxaca y Tlaxcala ya que disponen de la materia prima y un clima adecuado. Los principales desechos que se producen en estos estados son: maíz, frijol, sorgo, trigo, pulpa de café, bagazo de caña de azúcar, algodón, arroz, ajonjolí, cártamo, cebada, bagazo de henequén y residuos del maguey tequilero.

1.5. Técnicas de electroforesis

La electroforesis fue desarrollada por primera vez por el químico sueco Arne Tiselius, merecedor del Premio Nobel en 1948. Es una técnica analítica de separación basada en el movimiento o migración de las macromoléculas disueltas en un determinado medio a través de una matriz o soporte reticulado como resultado de la acción de un campo eléctrico. Muchas moléculas importantes biológicamente (aminoácidos, péptidos, proteínas y ácidos nucleicos) poseen grupos ionizables y por esto se puede hacer que existan en solución como especies cargadas eléctricamente, como cationes (+) y aniones (-). Las moléculas con una carga similar tienen diferentes radios carga/masa debido a las diferencias innatas en su peso molecular, esto es suficiente para que se forme una migración diferencial cuando los iones en la solución son

los expuestos a un campo eléctrico. Este es el principio de la electroforesis (Bryan y Wilson 1976).

El principio de la electroforesis se basa en que cada proteína tiene ciertas características de carga que están determinadas por el número y la naturaleza de los aminoácidos que la conforman. Las proteínas son compuestos anfotéricos, contienen tanto residuos ácidos como básicos; su carga neta es determinada por el pH del medio en el que se encuentran. Hay un pH en el cual la proteína no presenta carga neta, éste se denomina punto isoeléctrico (pI). En una solución con pH arriba del pI, la proteína tendrá una carga negativa y migrará hacia el ánodo (+) y por debajo del pI la proteína tiene carga positiva y migrará hacia el cátodo. Por tal motivo la electroforesis deberá permanecer constante para mantener la carga y por lo tanto la movilidad de la proteína (Bohinski 1991).

Los cationes migran a hacia el cátodo y los aniones hacia el ánodo, dependiendo del balance entre la fuerza de impulso del campo eléctrico sobre los iones cargados de la muestra y la fuerza de retraso entre las moléculas migratorias y el medio circundante, el cual es friccional y electrostático principalmente. La muestra puede estar disuelta o suspendida en buffer para electroforesis y el medio de soporte también debe saturarse con el buffer para dirigir la corriente. La corriente entre los electrodos se dirige por la muestra y los iones del buffer en solución, considerando que la corriente se mantiene a lo largo del circuito y es conducida por los electrones. Cuanto mayor es la relación carga/tamaño más rápido migra un ión en el seno del campo eléctrico (Bryan y Wilson 1976).

La versatilidad de la electroforesis para separar pequeños iones inorgánicos hasta grandes moléculas depende del medio de soporte. Hay diferentes tipos de soporte disponibles, tales como hojas de papel absorbente o acetato de celulosa, delgadas capas de sílica, geles de almidón, agar o poliacrilamida. El medio de soporte se utiliza saturado en buffer y cada uno puede ofrecer algunas ventajas sobre los otros en una separación particular. Una característica común en el uso de todos los medios de soporte es que las sustancias migran en zonas distintas que al final del análisis pueden descubrirse por técnicas analíticas convenientes (tinciones).

Los geles son tridimensionales ramificados que tienen los espacios entre ramificación rellenos de líquido. Las redes formadas en el gel no sólo reprimen la convección, sino que también actúan como cribas que pueden retardar y hasta bloquear la migración de las moléculas más grandes. En cambio, los iones pequeños pueden moverse libremente a través de la estructura porosa del gel. Los geles más comunes son agarosa y poliacrilamida, ambos adquieren la misma forma y están prácticamente libres de cargas iónicas. Esto es importante para evitar que la disolución buffer se desplace por el gel cuando se active el campo eléctrico. Los geles de poliacrilamida (figura 5) son el producto de la polimerización del monómero de acrilamida y un co-monómero entrecruzador (N,N-metilen-bis-acrilamida). La metilen-bis-acrilamida forma enlaces cruzados entre los polímeros de acrilamida (Bryan y Wilson 1976).

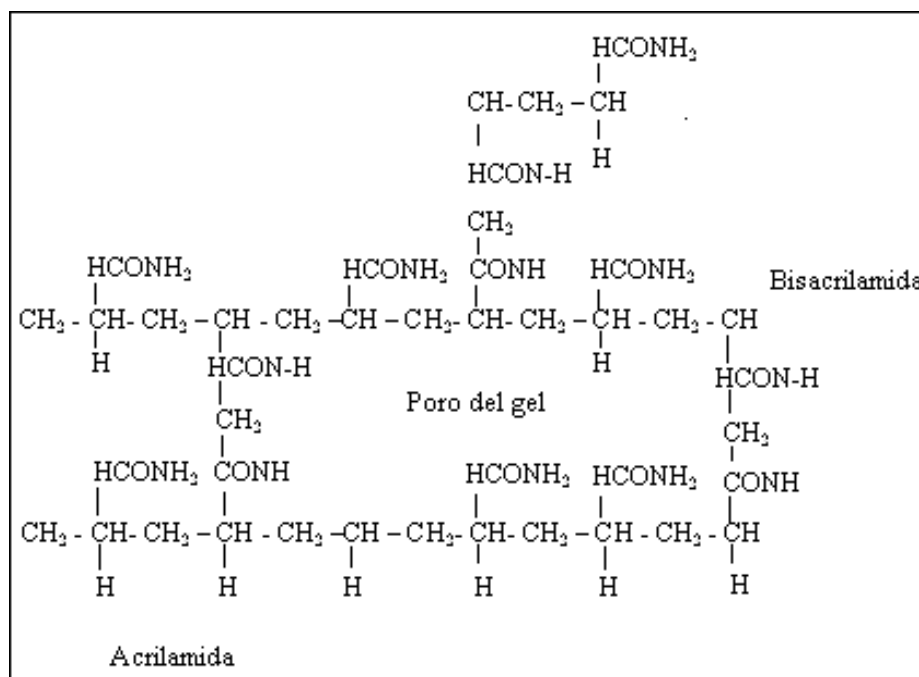


Figura 5. Reacción química de la polimerización de la acrilamida con bis-acrilamida (Tomado de Bryan y Wilson 1976).

El tamaño del poro en un gel de poliacrilamida puede determinarse ajustando el porcentaje total de acrilamida (suma de los pesos del monómero acrilamida y el entrecruzador), mientras

que el porcentaje de acrilamida se incrementa, el tamaño de poro decrece. La polimerización del gel se lleva a cabo por métodos químicos o fotoquímicos. En el método químico se emplea como iniciador de la reacción el persulfato de amonio o persulfato de potasio, siendo el primero el más utilizado y un catalizador, el usado es la amina cuaternaria N, N, N', N'-tetrametilendiamina (TEMED). En el método fotoquímico se utiliza riboflavina y TEMED. La polimerización se inicia cuando se expone a la luz ultravioleta, se ha reportado que se requiere al menos de ocho horas para lograr un 95% de conversión del monómero al polímero. La polimerización puede inhibirse con la presencia de algún radical libre que interfiera en la reacción o por la presencia de oxígeno en cantidades excesivas (Bryan y Wilson 1976).

1.5.1. Sistema de electroforesis no desnaturizante

Al gel de electroforesis no desnaturizante también se le llama gel de electroforesis nativo, separa las proteínas por su tamaño y carga eléctrica. El poro formado por la acrilamida sirve como criba para separar las moléculas de diferente tamaño. Este método es capaz de separar moléculas, las cuales difieren por una unidad en su carga. Las condiciones no desnaturizantes del gel de electroforesis minimizan la desnaturización de la proteína. En la electroforesis no desnaturizante se utilizan buffer con pH altos (pH 8.8), con este pH las proteínas adquieren una carga negativa (figura 6) y migran hacia el ánodo.

En proteínas que tienen el mismo tamaño pero diferente carga, migra más rápido la más cargada y cuando las proteínas tienen las mismas cargas pero diferente tamaño migra más la de menor tamaño. Separar las proteínas en estas condiciones permite separarlas en estado nativo por lo que siguen siendo funcionales y permiten separar complejos proteicos o proteínas multiméricas como una unidad. Pero algunos inconvenientes son que muchas proteínas no migran por no tener carga neta o poseer carga neta positiva, el proceso de separación es muy lento debido a la debilidad de la carga neta de las proteínas y el proceso de separación no sólo está afectado por el tamaño sino también por la forma de la proteína (Bryan y Wilson 1976).

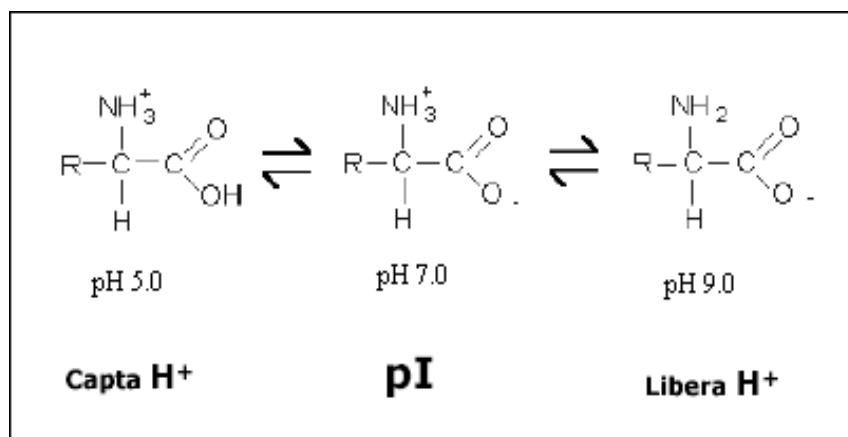


Figura 6. Efecto del pH en la carga de los aminoácidos y proteínas.

1.5.2. Sistema de electroforesis desnaturizante

El gel de poliacrilamida (PAGE) en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) es un método rápido para cuantificar, comparar y caracterizar proteínas. Este método separa las proteínas basándose principalmente en el peso molecular. El SDS desnaturiza la proteína, uniéndose a lo largo de la cadena del polipéptido confiriéndole carga negativa, la longitud de la proteína con el SDS es proporcional a su peso molecular. En la electroforesis desnaturizante se emplean el SDS (detergente aniónico) y un agente reductor de puentes disulfuros (-S-S-), generalmente β-mercaptoetanol o DiTioTreitol (DTT). El β-mercaptoetanol rompe los enlaces -S-S- intermoleculares e intramoleculares mediante una reacción redox. El SDS se une a las proteínas dotándolas de una alta carga eléctrica negativa, la cual por repulsión va a provocar el desplegamiento de éstas.

Las proteínas multiméricas migran separándose en sus respectivos monómeros. Las ventajas que tiene este sistema es que separa rápidamente las proteínas y se puede estimar su peso molecular, aunque las proteínas separadas están desnaturizadas y no son funcionales (Bryan y Wilson 1976).

En estos dos sistemas de electroforesis se pueden emplear dos tipos de sistemas buffer: 1) el continuo donde todo el gel presenta la misma concentración de acrilamida y el mismo pH de la solución buffer y 2) el discontinuo donde hay dos tipos de geles: el de empaque, el cual es de menor concentración de acrilamida, el tamaño de poro mayor y el pH es ácido-neutro, cuya función es acumular las proteínas a la entrada del gel de separación para que salgan al mismo tiempo; el gel de separación es de mayor concentración de acrilamida, el tamaño de poro menor y el pH es alcalino, su función es separar las proteínas (Bryan y Wilson 1976).

Las proteínas solubles se pueden localizar en geles de poliacrilamida después del análisis de electroforesis, el gel se puede teñir con azul brillante coomasie o con plata, pero si el interés es separar proteínas principalmente hacia la localización de enzimas específicas, se puede utilizar geles de electroforesis para visualizar las enzimas, colocando los geles en el sustrato específico de la enzima de interés, las cuales se visualizan en el gel debido a que marcan su localización al reaccionar con el sustrato para formar el producto. A los geles así marcados se les llama zimogramas y se ha incrementado el número de enzimas que son separadas de otras enzimas y localizadas por este proceso.

2. ANTECEDENTES

El estudio de las lacasas se ha realizado para conocer a los organismos productores, el número de isoformas intra- y extracelulares, sus propiedades fisicoquímicas, con fines de caracterización, para utilizarlas en procesos de biorremediación. Edens y col. (1999) evaluaron la catálisis sobre varios sustratos de las lacasas puras de un ascomicete patógeno denominado *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* que causa varias infecciones en la raíz del trigo y la cebada. El sustrato que presentó la menor K_m fue el 2,6-dimetoxifenol (DMP) (K_m de $3.1 \cdot 10^{-4}$ M) y la K_m más alta fue de $5.1 \cdot 10^{-4}$ M al oxidar guayacol, por lo que la enzima presentó más afinidad por el DMP. Kiiskinen y col. (2002) mostraron que la actividad de *Melanocarpus albomyces* fue más grande en presencia de 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) (836 nkat/mg) como ha sido reportado para muchas lacasas de hongos, seguido de siringaldazina (382 nkat/mg), DMP (290 nkat/mg) y guayacol (90 nkat/mg). Palonen y col. (2003) reportaron la actividad específica de lacasas de *Mauginiella* sp., la cual fue más alta con ABTS como sustrato, con 2870 nkat/mg, posteriormente guayacol (440 nkat/mg), DMP (360 nkat/mg) y siringaldazina (283 nkat/mg).

Cabe mencionar que las lacasas de basidiomicetes han sido muy estudiadas, como es el caso de *Ceriporiopsis subvermispota* (hongo de pudrición blanca) que presentó dos isoenzimas, L1 y L2 con una masa molecular de 71 y 68 KDa respectivamente. Este estudio mostró evidencias de que la afinidad de las isoformas y el pH óptimo de actividad es dependiente del tipo de sustrato utilizado; con ABTS como sustrato la K_m de ambas isoenzimas fue la más baja (0.03 y 0.02 mM), con DMP presentaron una K_m de 2.9 y 7.7, pero los valores más altos de la K_m (6.3 y 9.0) se obtuvieron al utilizar vanillina (Fukushima y Kirk 1995). Sethuraman y col. (1999) evaluaron la actividad de las lacasas de *Cyathus stercoreus* con diferentes sustratos, obteniendo la mayor actividad con ABTS (3.5 U/ml), DMP (3.06 U/ml) en tanto la menor actividad se mostró con pirogallol (0.36 U/ml). Klonowska y col. (2002) compararon dos isoenzimas de lacasas (LAC1 y LAC2) que produce el hongo C30, el cual es un hongo de pudrición blanca que coloniza las hojas perennes del roble (*Quercus ilex*), donde encontraron claras diferencias entre las dos isoformas en los parámetros cinéticos utilizando como sustratos

compuestos fenólicos (siringaldazina y guayacol) y el ABTS (no fenólico), aunque la afinidad de las enzimas por los tres sustratos es baja como lo reflejan los grandes valores de K_m . LAC2 mostró ser más eficiente en la oxidación de los sustratos. Las diferencias observadas en la cinética pueden ser consecuencia de la variabilidad de ciertos aminoácidos involucrados en la especificidad de la enzima, dependiendo del sustrato. También *Trametes pubescens* secreta varias isoformas de lacasas, pero Galhaup y col. (2002) sólo caracterizaron una, la cual presentó una masa molecular de 65 kDa. De esta enzima se determinó el valor de K_m sobre diferentes sustratos. Con siringaldazina la K_m fue de 6.0 μM (valor más bajo), posteriormente con ABTS la K_m fue de 43 μM a un pH de 4.5, con DMP presentó una K_m de 72 μM , con guayacol la K_m fue de 360 μM y con ρ -anisidina la K_m fue de 1600 μM que fue el valor más alto. El valor bajo de la K_m en presencia de siringaldazina también ha sido reportado para otras lacasas de hongos en un hongo de la familia Chaetomiaceae, el valor de la K_m fue de 9 μM comparado con 10000 μM al utilizar como sustrato un contaminante con actividad estrogénica. Las lacasas del hongo *Chaetomium thermophilum* presentó un valor de K_m fue de 34 μM , en tanto en *Rigidoporus lignosus* fue de 40 μM y en *Coriolus hirsutus* de 142.7 μM (Saito y col. 2003).

Se han realizado trabajos de purificación de lacasas provenientes de hongos comestibles, en los cuales sus enzimas son más seguras para ser utilizadas por los humanos. En el caso de *Lentinula edodes* (shiitake), el segundo hongo comestible más importante a nivel mundial, Nagai y col. (2002) aislaron una enzima lacasa con una masa molecular de 72.2 kDa, y determinaron su sustrato específico, utilizando ABTS, pirogallol, guayacol, ácido ferúlico, DMP y catecol. La lacasa de este hongo presentó más afinidad por ABTS (K_m 0.108 mM) en comparación con DMP donde la K_m fue de 0.557 mM. Savoie y Mata (2003) reportaron que *Lentinula* y *Pleurotus* presentan una sobreproducción de enzimas lacasas al estar en contacto con un organismo antagonista como es el caso de *Trichoderma*. Sin embargo Mata y col. (2004) reportan que la presencia del antagonista induce la sobre producción de las enzimas oxidasas, no sólo de lacasas en *Pleurotus*, y pero se observa que no induce isoformas al analizar los zimogramas.

Las cepas de *Pleurotus ostreatus* que han sido estudiadas han mostrado que este organismo produce varias isoformas de lacasa. Palmieri y col. (1997) caracterizaron dos isoenzimas de este hongo, POXA1 y POXA2, con masas moleculares de 61 y 67 kDa; estas isoformas las compararon con POXC, la cual es producida abundantemente en todas las condiciones de desarrollo. Ambas isoenzimas oxidan siringaldazina, aunque POXA1 presenta la K_m más baja con este sustrato (1.3 mM), en tanto con DMP la K_m fue de 2.1 mM y con ABTS fue de K_m $9.0 \cdot 10^{-2}$. La isoenzima POXA2 fue la que presentó el valor más bajo ($K_m=1.2 \cdot 10^{-1}$ mM) con ABTS, seguida de siringaldazina donde la K_m fue de $1.4 \cdot 10^{-1}$ mM. La POXC presentó más afinidad por siringaldazina ($K_m= 2.0 \cdot 10^{-2}$ mM), seguida de DMP ($K_m= 2.3 \cdot 10^{-1}$ mM) y la K_m en presencia de ABTS fue de $2.8 \cdot 10^{-1}$ mM.

Al agregarle CuSO_4 al medio de cultivo de *P. ostreatus*, Giardina y col. (1999) indujeron otra isoforma de lacasas a la cual denominaron POXA1b, que es casi idéntica a POXA1. La oxidación de POXA1b, usando los sustratos comunes para lacasas, ABTS, siringaldazina y DMP, presentó la K_m más baja en presencia de siringaldazina (0.22 mM), seguida de DMP (0.26 mM) y el valor más alto fue en presencia de ABTS (0.37 mM). A l igual que las otras isoenzimas identificadas en este hongo, POXA1 fue incapaz de oxidar guayacol, sustrato muy común para las lacasas, por lo que estas isoenzimas tienen una peculiaridad con respecto a la especificidad del sustrato con respecto a otras lacasas caracterizadas. Palmieri y col. (2003) purificaron y caracterizaron otras dos isoenzimas de *P. ostreatus*, las cuales presentaron la misma característica que las anteriores: no detectaron actividad al utilizar guayacol como sustrato. No se observaron diferencias entre POXA3a y POXA3b en los parámetros cinéticos, con ABTS y DMP como sustratos presentó mayor afinidad POXA3a, pero con siringaldazina fue la POXA3b.

Das y col. (1997) en *Pleurotus ostreatus* (cepa *florida*) hallaron dos lacasas L_1 y L_2 . Utilizaron diferentes sustratos para determinar la afinidad de ambas isoenzimas. Para L_1 la K_m fue de 28.5 mM con guayacol y para L_2 fue de 3.13 mM, con o-dianisidina para la isoforma L_1 los resultados fueron $K_m= 0.33$ mM y L_2 $K_m= 0.29$ mM. La catálisis sobre guayacol fue más eficiente en la L_2 que en la L_1 . Muñoz y col. (1997) encontraron dos isoenzimas de lacasas I y

II en el medio de cultivo de *Pleurotus eryngii*. La afinidad de ambas isoenzimas por los sustratos utilizados fue similar excepto para DMP, ρ -hidroquinona (QH₂) y metil- ρ -hidroquinona (MeQH₂), con los cuales presentó alta afinidad la lacasa II y catecol en el caso de la lacasa I. Comparando las constantes cinéticas obtenidas con ρ -metoxifenol y ρ -anisidina, se observó que la afinidad de ambas isoenzimas fue más alta para compuestos fenólicos que para aminas aromáticas, aunque la proporción de oxidación de ρ -metoxifenol fue baja en ambos casos, la lacasa I oxidó más eficientemente los fenoles y la lacasa II las aminas.

De Souza y col. (2002) trabajaron con *P. pulmonarius* crecido sobre paja de trigo, donde la máxima producción de lacasas del extracto crudo enzimático fue de 8600 U/g de sustrato a los cinco días de crecimiento. La enzima lacasa fue la única fenoloxidasas producida por este hongo en el medio sólido, por lo que parece ser que la paja de trigo es un excelente medio para producción de lacasas, probablemente por su composición ligninocelulósica. De Souza y Peralta (2003) purificaron la principal isoenzima que se presentó en estas condiciones de crecimiento de *P. pulmonarius*, y determinaron los parámetros cinéticos utilizando siringaldazina, ABTS y guayacol como sustratos. La enzima Lcc2 presentó un bajo valor de K_m (12 μ M con siringaldazina, 210 μ M con ABTS y 550 μ M con guayacol).

Existe gran dificultad para poder definir a las lacasas de acuerdo con a su sustrato específico, porque las lacasas oxidan sustratos sobre los cuales también actúan las tirosinasas. Las catecol oxidasas o tirosinasas oxidan sobre o-difenoles y las lacasas sobre o-difenoles y ρ -difenoles, aunque se ha reportado que tienen más afinidad hacía el segundo grupo y es la única enzima que oxida a la siringaldazina (Eggert y col. 1996). Otra dificultad para definir a las lacasas de acuerdo a con especificidad por el sustrato es que no son específicas, ya que ésta varía de un organismo a otro. Las lacasas oxidan polifenoles, metoxifenoles y amidas, por mencionar algunos. Thurston (1994) reportó que las hidroquinonas y el catecol son sustratos muy utilizados para determinar actividad de lacasas, no obstante que el guayacol y el DMP son considerados los mejores sustratos, pero la siringaldazina es el único sustrato que puede ser oxidado únicamente por las lacasas.

Las lacasas de *Neurospora crasa* sólo oxidan o- y p-difenoles con excepción de cloroglucinol (Germann y col. 1988), pero las lacasas de *Pyricularia oryzae* prefieren el cloroglucinol como sustrato sobre otros fenoles mono-sustituídos (Alsubaey y col. 1996). Las lacasas de *Cerrena unicolor* y *Trametes versicolor* oxidan fenoles meta-sustituídos en diferentes grados, pero la enzima de *Cerrena unicolor* oxida principalmente fenoles para-sustituídos mientras que la de *Trametes versicolor* oxida fenoles orto-sustituídos (Jolivalt y col. 1999).

Se han reportado muchas reacciones catalizadas por las lacasas de diferentes hongos. Un estudio comparativo de lacasas obtenidas de diferentes hongos mostró que tienen la habilidad de oxidar ácidos metoxifenólicos, pero el grado de oxidación es variable y depende del pH (Bollag y Leonowicz 1984). Guillén y col. (2000) reportaron que *Pleurotus eryngii* oxidó dos derivados de hidroquinonas llamadas 2-metoxi-1,4-benzohidroquinina y 2,6-dimetoxi-1,4-benzohidroquinona y que la auto-oxidación de las semiquinonas producidas por la reacción catalítica de lacasas indujo la activación del oxígeno. El compuesto 2,6-dimetoxi-1,4-benzohidroquinona fue oxidado más eficientemente que el 2-metoxi-1,4-benzohidroquinina, lo que se puede correlacionar con la alta afinidad de las lacasas por DMP.

En los procesos industriales tales como el blanqueamiento del papel se producen compuestos organoclorados que incluyen clorofenoles, catecol y guayacol. La enzima lacasa de *Coriolus versicolor* mostró declorinar el tetracloroguayacol y liberar iones cloro. Las lacasas de *Trametes villosa* y *Trametes hirsuta* tienen la habilidad de modificar ácidos grasos y resinas. La cantidad de ácido linoleico, oleico y linolénico, se redujo en los ácidos grasos y la cantidad de resinas conjugadas también disminuyó (Karlsson y col. 2001). La presencia de compuestos fenólicos en aguas residuales es un problema, ya que estos compuestos son tóxicos y se originan por la utilización de herbicidas fenólicos en la agricultura o actividades industriales (Abadulla y col. 2000). Actualmente se utilizan las lacasas para oxidar estos compuestos. Las enzimas lacasas producidas por *Pycnoporus sanguineus* se utilizan en la oxidación de colorantes presentes en aguas residuales. *Pycnoporus cinnabarinus* ha mostrado que degrada una amplia gama de colorantes (Hardin y col. 2000).

3. JUSTIFICACIÓN

Los hongos de pudrición blanca son los principales productores de las enzimas lacasas, mismas que juegan un papel muy importante en la biorremediación. Se sabe que la producción de las lacasas está influenciada por un gran número de factores ambientales tales como el pH, temperatura, tipo de cultivo y composición del medio (Giardina y col. 1999). También se ha reportado que la mayoría de las especies de hongos estudiadas secretan más de una isoforma de lacasas dependiendo de las condiciones de crecimiento que se utilicen, ya que estas enzimas pueden ser constitutivas o inducibles. Sin embargo existen pocos trabajos en los cuales se comparen las isoformas intracelulares con las extracelulares de una misma cepa desarrollada en ausencia de inductores, así como los perfiles de actividad entre especies diferentes del mismo género, por lo que en este trabajo de investigación se propone evaluar la actividad intracelular y extracelular de las enzimas lacasas sobre cinco diferentes sustratos y comparar los patrones zimográficos intracelulares y extracelular de 10 cepas del género *Pleurotus*, las cuales se desarrollarán en un medio no inductor de lacasas.

4. HIPÓTESIS

1. Se detectará actividad de lacasas en las 10 cepas a evaluar en este estudio.
2. La actividad y el número de isoformas intracelulares serán diferentes a las extracelulares en una misma cepa.
3. Existirán diferencias entre especies en cuanto al número de isoformas tanto extracelulares como intracelulares.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Evaluar la actividad intracelular y extracelular de lacasas sobre diferentes sustratos, de 10 cepas del género *Pleurotus* desarrolladas sobre agar e identificar el número de isoformas presentes en cada extracto enzimático a través de zimografía.

5.2. Particulares

1. Evaluar la actividad enzimática de lacasas sobre cinco sustratos en los extractos intracelulares y extracelulares de 10 cepas del género *Pleurotus* desarrolladas sobre agar.
2. Determinar el número de isoformas con actividad de lacasas en los extractos enzimáticos a través de zimografía con tres diferentes sustratos.

6. METODOLOGÍA

La figura 7 muestra la secuencia de la investigación.

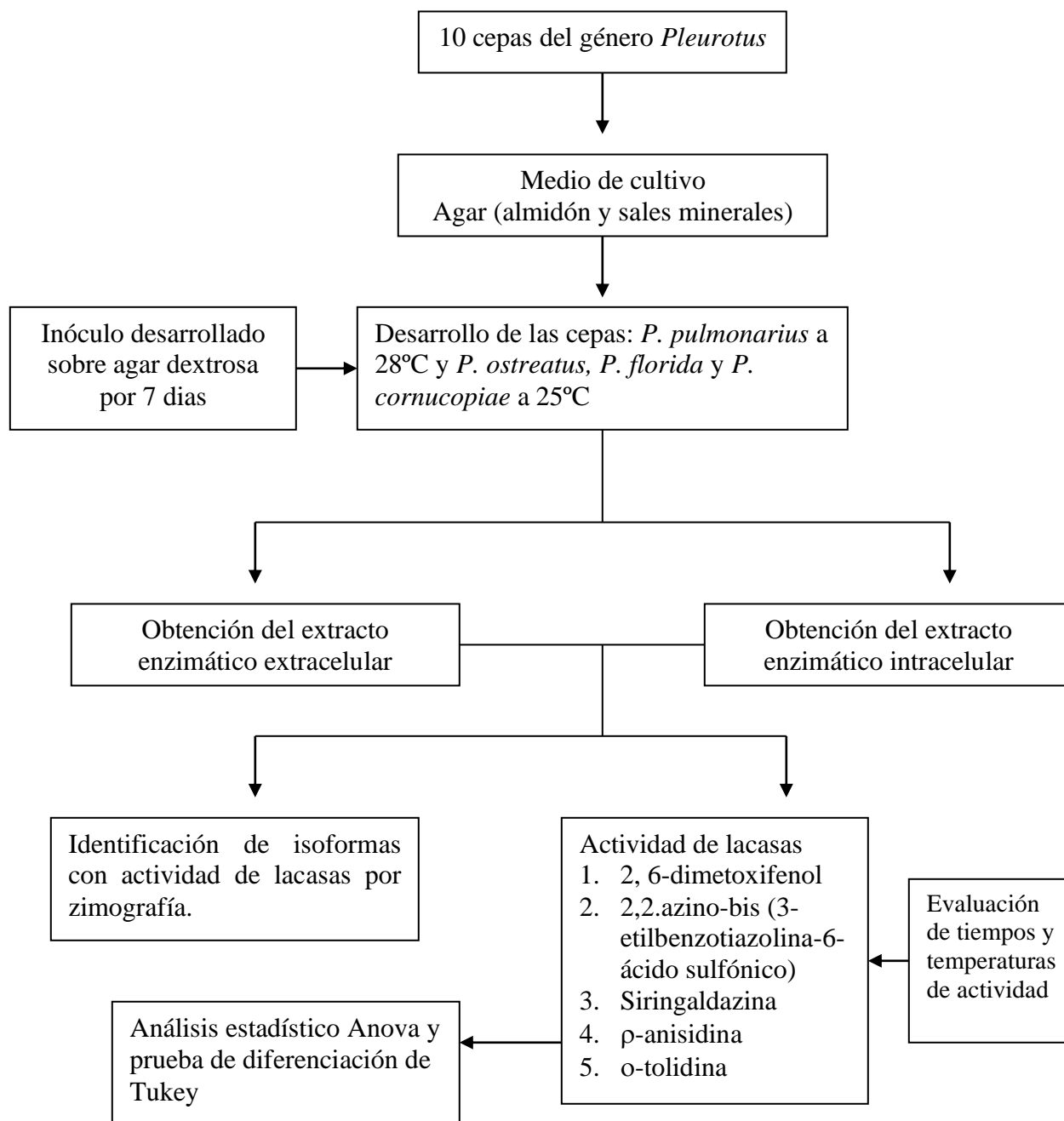


Figura 7. Diagrama de flujo de la metodología.

6.1. Cepas de *Pleurotus*

En la Tabla 1 se muestran las cepas utilizadas en este estudio. Se utilizaron cepas de *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. florida* y *P. cornucopiae*. Todas las cepas se sembraron mensualmente sobre agar dextrosa papa (ADP) y fueron conservadas en refrigeración a 4°C.

Tabla 1. Cepas empleadas en el estudio.

| Cepa | Abreviatura | Procedencia |
|--|-------------|--|
| <i>P. ostreatus</i> (Fr.) P. Kumm. | Po-83 | American Type Culture Collection. Manassas, U.S.A 32783 |
| <i>P. ostreatus ostreatus</i> (Fr.) P. Kumm. | Po-37 | American Type Culture Collection. Manassas, U.S.A 38537 |
| <i>P. ostreatus ostreatus</i> (Fr.) P. Kumm. | Po-52 | American Type Culture Collection. Manassas, U.S.A. 58052 |
| <i>P. ostreatus ostreatus</i> (Fr.) P. Kumm. | Po-7 | American Type Culture Collection. Manassas, U.S.A 201218 |
| <i>P. ostreatus ostreatus</i> (Fr.) P. Kumm. | Po-3 | American Type Culture Collection. Manassas, U.S.A 201216 |
| <i>P. ostreatus ostreatus</i> (Fr.) P. Kumm. | Po-26 | National Center for Agricultural Utilization Research. Peoria Arizona, U.S.A. 3526 |
| <i>P. florida</i> (Li & Egger) | Pfl | Universidad Nacional del Sur de Argentina. Buenos Aires, Argentina |
| <i>P. cornucopiae</i> (Fr.) Paulet: | Pcc | Colección de Hongos de la Universidad de Argentina |
| <i>P. pulmonarius</i> (Fr.) Quelet | Pp-134 | Universidad China de Hong Kong, Shatin, Hong Kong. PPL344 |
| <i>P. pulmonarius</i> (Fr.) Quelet | Pp-127 | Universidad China de Hong Kong, Shatin, Hong Kong. PPL27 |

6.2. Obtención del inóculo

Los inóculos empleados en estos estudios se desarrollaron sobre ADP, a una temperatura de 28°C para las cepas Pp-127 y Pp-134 y a 25°C para las otras cepas por siete días. El inóculo fue de aproximadamente 5 mm de diámetro, el cual se tomó con un horador de la periferia de la colonia. Se colocó en el centro del agar de cada medio de cultivo y las cajas Petri se incubaron hasta obtener una invasión micelial total del medio de cultivo.

6.3. Medio de cultivo y desarrollo micelial

Se utilizaron 35 ml de agar con almidón como fuente de carbono en cada caja de Petri (9 cm de diámetro y 1.5 cm de altura). Las cepas de *P. pulmonarius* (Pp-127 y Pp-134) se incubaron a 28°C y las cepas de *P. ostreatus*, *P. florida* y *P. cornucopiae* a 25°C, todas por siete días. La composición del medio fue (g/l): almidón, 10.5; (NH₄)₂SO₄, 1.0; KH₂PO₄, 0.5; MgSO₄·7H₂O, 0.5; Ca(H₂PO₄)₂·H₂O, 0.3; FeSO₄·7H₂O, 0.02; ZnSO₄·7H₂O, 0.02; MnSO₄·H₂O, 0.02. El pH del medio se ajustó a 6.5 antes y después de la esterilización, usando una solución de KOH 0.1M (Sánchez y Viniegra-González 1996).

6.4. Obtención de extractos enzimáticos

Después del desarrollo micelial de las cepas (3 lotes de 10 cajas cada uno), el extracto enzimático intracelular (EEi) se obtuvo por lisis celular del micelio de cada cepa con un macerador de tejidos (Pirex), se le agregó 1 ml de agua por cada 0.1 mg de micelio. El macerado se centrifugó a 15 000 rpm por 10 min a una temperatura de 2°C. Se consideró al sobrenadante como el EEi. El extracto enzimático extracelular (EEe) se obtuvo por lixiviación del agar donde se desarrollaron las cepas sin micelio con agua desionizada, posteriormente se centrifugó a 15000 rpm por 10 min a una temperatura de 2°C.

6.5. Temperaturas y tiempo de incubación óptimas para los ensayos enzimáticos

Para establecer las condiciones óptimas de tiempo y temperatura de los ensayos enzimáticos se evaluó la actividad intracelular de lacasas de la cepa Po-83 sobre los cinco sustratos a diferentes temperaturas (25, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40 y 45°C), se reportó la actividad como aumento en la absorbancia después de la incubación de la mezcla de reacción por 5 min.

Posteriormente el tiempo de incubación óptimo se determinó incubando la mezcla de reacción a la temperatura óptima para cada sustrato determinada en el experimento anterior. Los tiempos de incubación fueron 5, 10, 15, 20, 25 y 30 min. Se reportó la actividad como la absorbancia obtenida después de la incubación de la mezcla de reacción.

6.6. Determinación de la actividad intracelular y extracelular de lacasas

La actividad de lacasas se cuantificó utilizando como sustratos a los siguientes compuestos: 2,6-dimetoxifenol (DMP), 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS), siringaldazina, *p*-anisidina y *o*-tolidina. El ensayo enzimático se realizó dependiendo del sustrato utilizado:

- a) DMP: la mezcla de reacción contenía 950 μ l DMP 2 mM en buffer de fosfatos 0.1 M y pH de 6.5, 50 μ l de EEi o EEe. La actividad se determinó por incrementos de absorbancia a 468 nm (Téllez-Téllez y col. 2005).
- b) ABTS: la mezcla de reacción contenía 950 μ l de ABTS 0.5 mM en buffer de acetatos 0.1 M pH de 5.0 y 50 μ l de EEi o EEe. La absorbancia se leyó a 420 nm (Téllez-Téllez y col. 2005).
- c) Siringaldazina: la mezcla de reacción contenía 50 μ l de siringaldazina al 1% (en etanol), 900 μ l de buffer de fosfatos 0.1 M pH de 6.5 y 50 μ l de EEi o EEe. La absorbancia se leyó a 527 nm (Téllez-Téllez y col. 2005).
- d) *p*-anisidina: la mezcla de reacción contenía 950 μ l de *p*-anisidina (10 mM) en buffer de fosfatos 0.1 M pH de 6.5 y 50 μ l de EEi o EEe. La absorbancia se leyó a 460 nm (Téllez-Téllez y col. 2005).
- e) *o*-tolidina: La mezcla de reacción contenía 950 μ l de *o*-tolidina (2 mM) en buffer de acetatos 0.1 M pH de 3.7 y 50 μ l de EEi y EEe. La absorbancia se leyó a 627 nm (Téllez-Téllez y col. 2005).

Una unidad de actividad (U) de lacasas medida por cualquier método aquí descrito se consideró como la cantidad de enzima que provoca un incremento de una unidad de absorbancia por minuto.

6.7. Identificación del número de isoformas con actividad de lacasas por zimografía

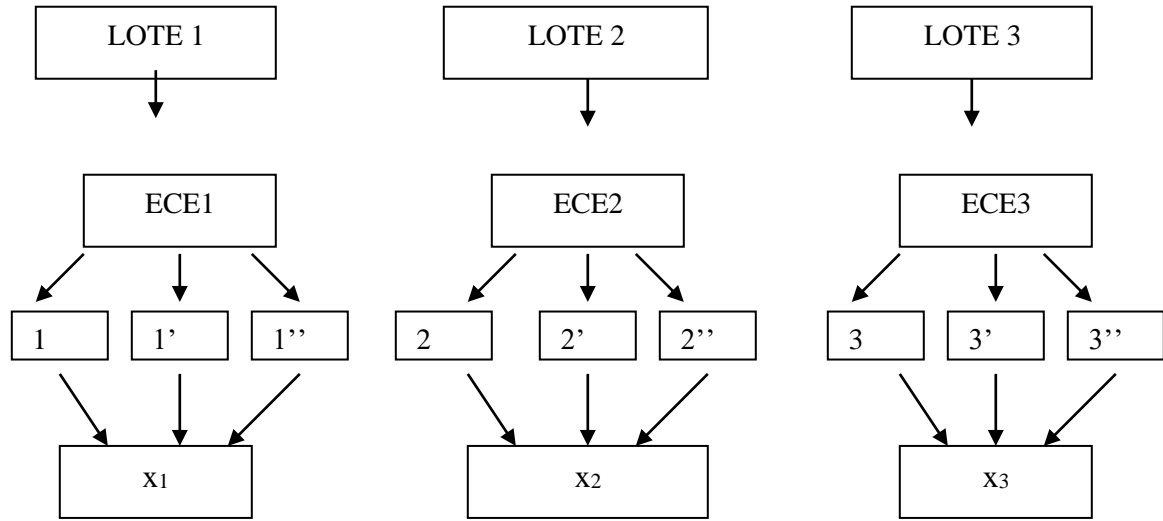
La actividad de lacasas se detectó *in situ*, usando zimogramas, basados en la técnica modificada SDS-PAGE de Laemmli (1970). Los zimogramas se realizaron con alícuotas de EEi o EEe de cada una de las cepas. El gel de separación contenía 10% de acrilamida, 2.7% de *bis*-acrilamida. El gel de empaquetamiento 4% de acrilamida y 2.7% de *bis*-acrilamida. La concentración de SDS fue de 0.1% en el gel. El buffer de corrida contenía: 0.5% M Tris-HCL pH 6.8, 35% glicerol, 0.01% de azul de bromofenol y 10% de SDS. Se usaron geles de 0.75 mm de espesor en un sistema de electroforesis Mini-Protean III (BioRad) a 150 voltios por 1-1.25 horas.

Después de la corrida los geles se lavaron con agua desionizada con ayuda de un agitador orbital (20-30 rpm) por 1-2 horas, se cambió el agua cada media hora para eliminar el SDS y renaturalizar a las proteínas. Posteriormente los geles se incubaron por 18-24 horas a temperatura ambiente en presencia del sustrato a evaluar: 1) Con DMP 2 mM en buffer de fosfatos 0.1M pH 6.5, 2) ρ -anisidina 10 mM en buffer de fosfatos 0.1 M pH 6.5 y 3) o-tolidina 2 mM en buffer de acetatos 0.1 M pH 3.7. La actividad oxidativa de lacasas apareció como zonas oscuras en los geles.

7.7. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Se reportaron las Medias y error estándar. El ANOVA y la prueba de diferenciación de Medias por el método de Tukey se realizaron a la actividad enzimática en presencia de los diferentes sustratos mediante el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System).

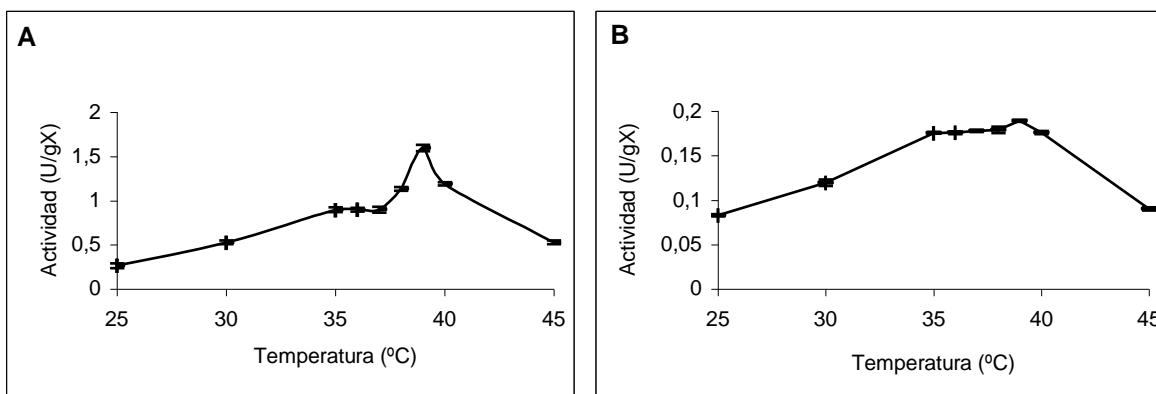
DISEÑO



7. RESULTADOS

7.1. Determinación de las temperaturas y tiempos de incubación

Se evaluó la actividad intracelular de lacasas de la cepa Po-83 sobre cinco sustratos a diferentes temperaturas (25, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40 y 45°C), se reportó la actividad como la absorbancia obtenida después de la incubación de la mezcla de reacción. Cabe mencionar que en todos los casos, el tiempo de incubación fue de 5 min. En la figura 8 se muestra la actividad de lacasas sobre DMP, ρ -anisidina y siringaldazina, donde se observa que la temperatura óptima de reacción fue de 39°C. Pero al utilizar como sustratos ABTS y o-tolidina la temperatura óptima fue de 30°C (figura 9), por lo que se omitieron las temperatura entre el rango de 36-39, únicamente se muestra como descendió drásticamente al trabajar con temperaturas de 40 y 45°C.



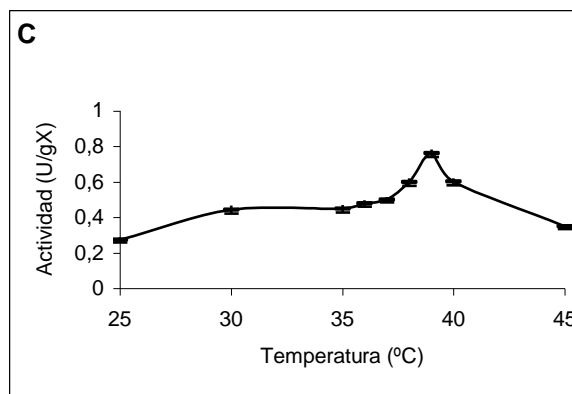


Figura 8. Evaluación de diferentes temperaturas sobre la actividad de lacasas, utilizando siringaldazina (A), *p*-anisidina (B) y DMP (C) como sustratos.

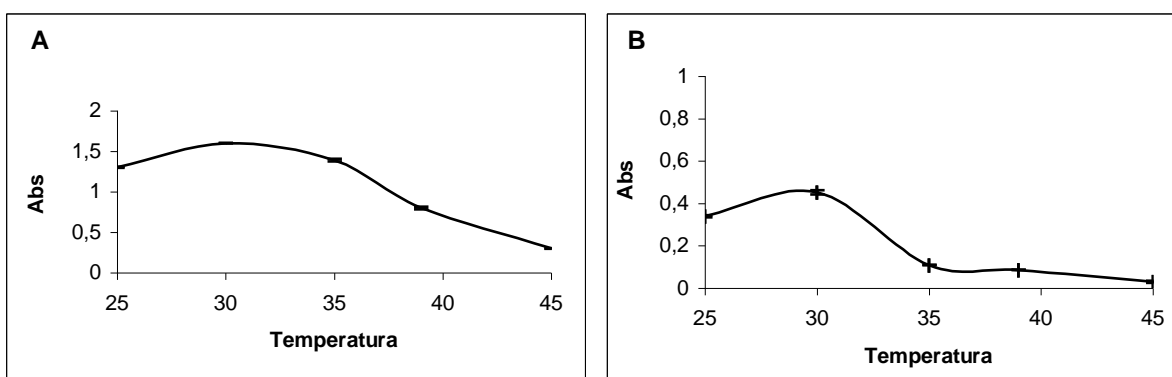


Figura 9. Evaluación de diferentes temperaturas sobre la actividad de lacasas, utilizando o-tolidina (A) y ABTS (B) como sustratos.

Se evaluó la actividad de lacasas a través del tiempo, incubando la mezcla de reacción a la temperatura óptima para cada sustrato determinada en el experimento anterior. En la figura 10 se muestran las curvas de actividad de lacasas. Se observó que hasta los 20 min de reacción, la actividad fue proporcional al tiempo de incubación en todos los casos, por lo que se decidió tomar 15 min como tiempo de incubación para la determinación de la actividad de lacasas en los siguientes experimentos.

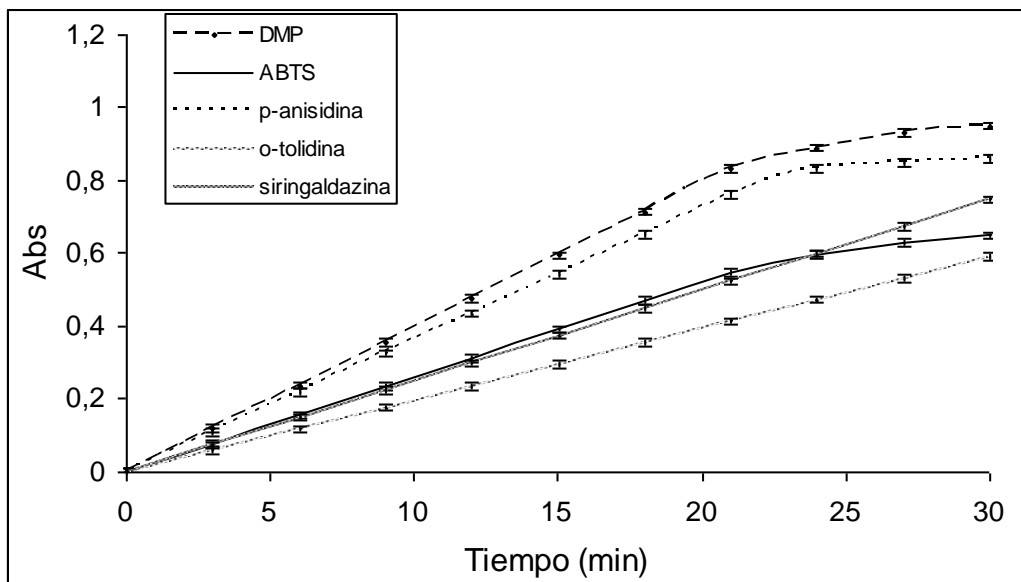


Figura 10. Evaluación de tiempo de incubación de la actividad de lacasas sobre los cinco sustratos.

7.2. Evaluación de la actividad intracelular y extracelular de lacasas

8.2.1. Actividad de lacasas con 2,6-dimetoxifenol como sustrato

La actividad intracelular de lacasas utilizando DMP como sustrato mostró que la cepa que presentó mayor actividad fue Pcc, posteriormente Po-7 y Po-83 (figura 11). Las cepas de *P. pulmonarius* no presentaron diferencia significativa en la actividad de lacasas (Tabla 2, pag 41). La cepa que presentó menos actividad fue Po-26. Con respecto a la actividad extracelular, presentaron más actividad las cepas Po-7, Pcc y Po 26, con diferencias significativas entre ellas (figura 11). Las cepas que menos actividad presentaron fueron Po-52 y Po-3. Entre las cepas de *P. pulmonarius* sí hubo deferencia significativa (Tabla 3, pag 42), con mayor actividad en Pp-127 presentó que en Pp-134.

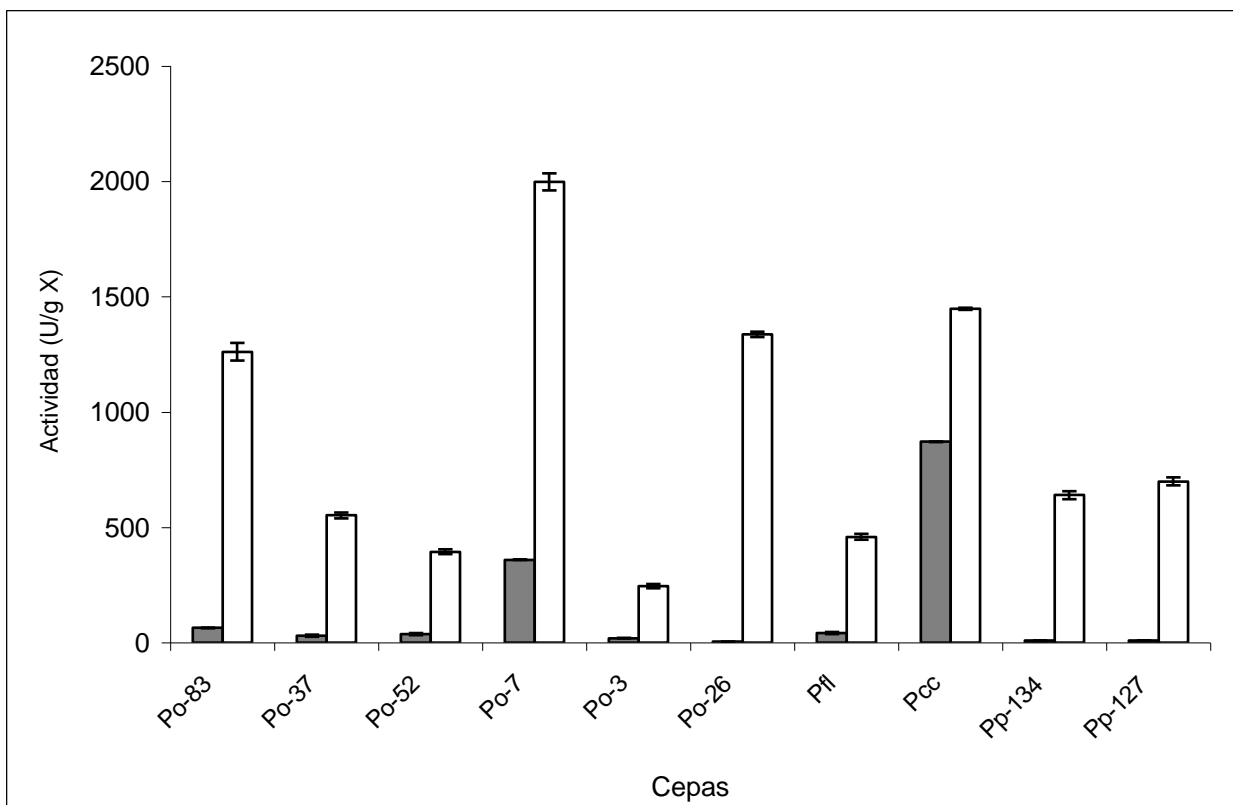


Figura 11. Actividad enzimática intracelular y extracelular de lacasas de 10 cepas del género *Pleurotus* utilizando DMP como sustrato. Barras llenas (actividad intracelular) y barras vacías (actividad extracelular).

7.2.2. Actividad de lacasas con ABTS como sustrato

La actividad intracelular de las cepas de *Pleurotus* utilizando ABTS como sustrato fue mayor en la cepa Pcc (figura 12), seguida de Po-7 y Po-83, las cuales tuvieron 1 y 6 veces menor actividad respectivamente en comparación con Pcc. Las cepas Pfl y Po-52 no presentaron diferencias significativas, las que mostraron menor actividad intracelular fueron Po-26 y Po-3, entre las cuales hubo diferencias significativas (Tabla 2, pág 41). Todas las cepas presentaron diferencias significativas en la actividad extracelular (figura 12), pero las que menor actividad presentaron fueron Po-37 y Po-3. En las que se detectó mayor actividad de lacasas fueron Po-7, Po-83 y Pp-127.

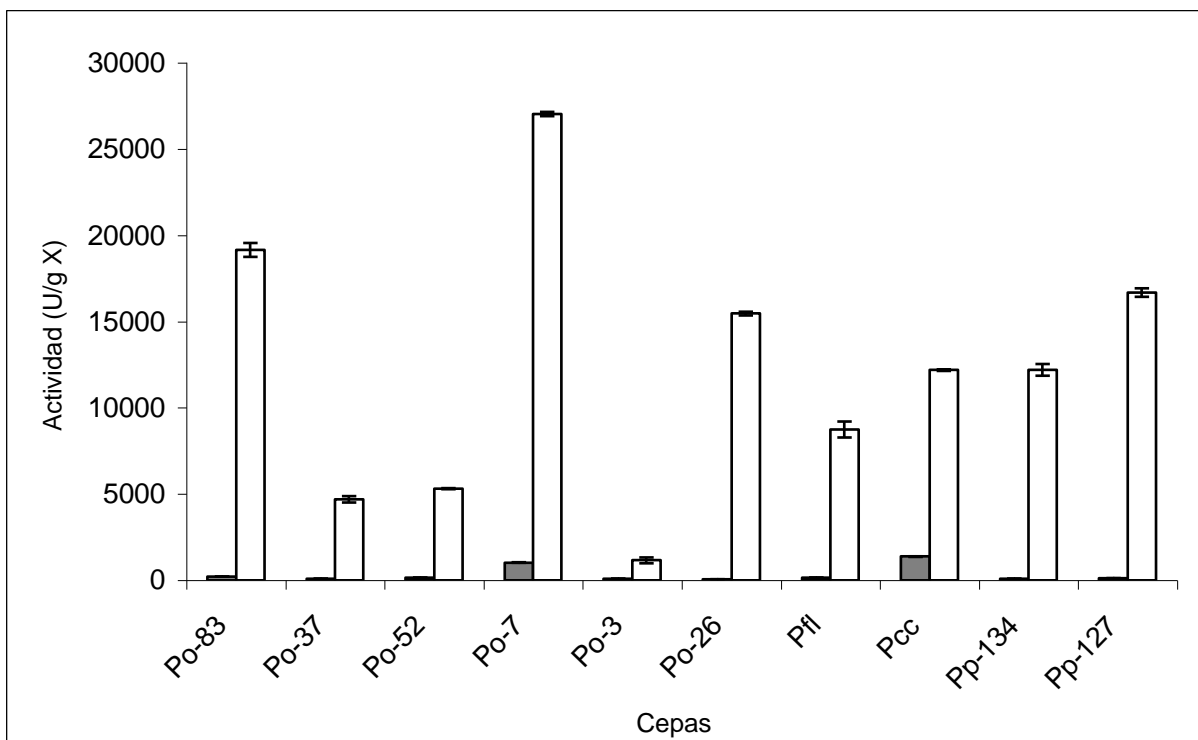


Figura 12. Actividad enzimática intracelular y extracelular de lacasas de 10 cepas del género *Pleurotus* utilizando ABTS como sustrato. Barras llenas (actividad intracelular) y barras vacías (actividad extracelular).

7.2.3. Actividad de lacasas con siringaldazina como sustrato

La cepa Po-7 fue en la que mayor actividad intracelular se detectó con siringaldazina como sustrato, las cepas Pcc y P-37 tuvieron 1.6 y 2 veces menor actividad que la Po-7. La cepa que menor actividad de lacasas mostró fue Po-26 (figura 13), entre las cepas de *P. pulmonarius* (Pp-127 y Pp-134) hubo diferencias significativas, pero la Pp-134 presentó menor actividad en comparación con Pp-127 (Tabla 2, pág 41). En la actividad extracelular también la Po-7 y la Po-37 mostraron mayor actividad, junto con la Po-26 que tuvo 1.6 veces menos actividad en comparación con Po-7 (figura 13). Las cepas Pfl y Pp-134 presentaron menor actividad, sin diferencias significativas entre ellas (Tabla 3, pág 42).

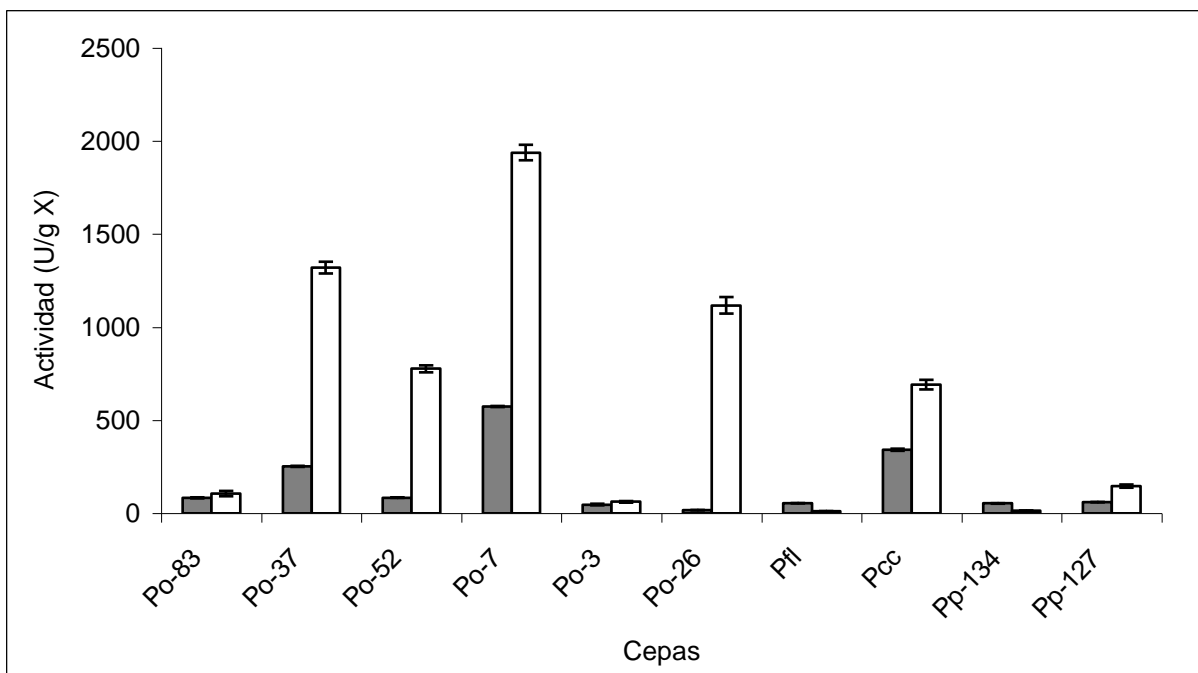


Figura 13. Actividad enzimática intracelular y extracelular de lacasas de 10 cepas del género *Pleurotus* utilizando syringaldazina como sustrato. Barras llenas (actividad intracelular) y barras vacías (actividad extracelular).

7.2.4. Actividad de lacasas con ρ -anisidina como sustrato

La cepa Pcc fue la que mostró mayor actividad intracelular al utilizar ρ -anisidina como sustrato Po-7 presentó 1.4 veces menor actividad (figura 14). Las cepas con menor actividad fueron Po-52, Po-83 y Po-26, entre las cuales no hubo diferencias significativas, en tanto la cepa Po-26 presentó 1.5 menos actividad que Po-3 (Tabla 2, pág 41). Respecto a la actividad extracelular, la cepa Po-26 junto con Pcc fueron las que presentaron mayor actividad, Po-26 mostró 1.3 veces menor actividad que Pcc (figura 14). Entre la actividad de las cepas Po-7, Po-83 y Pp-127, no hubo diferencias significativas (Tabla 3, pág 42). Las cepas que menor actividad mostraron fueron Po-3 y Po-52, ésta última tuvo 2.2 veces menos actividad que Po-3.

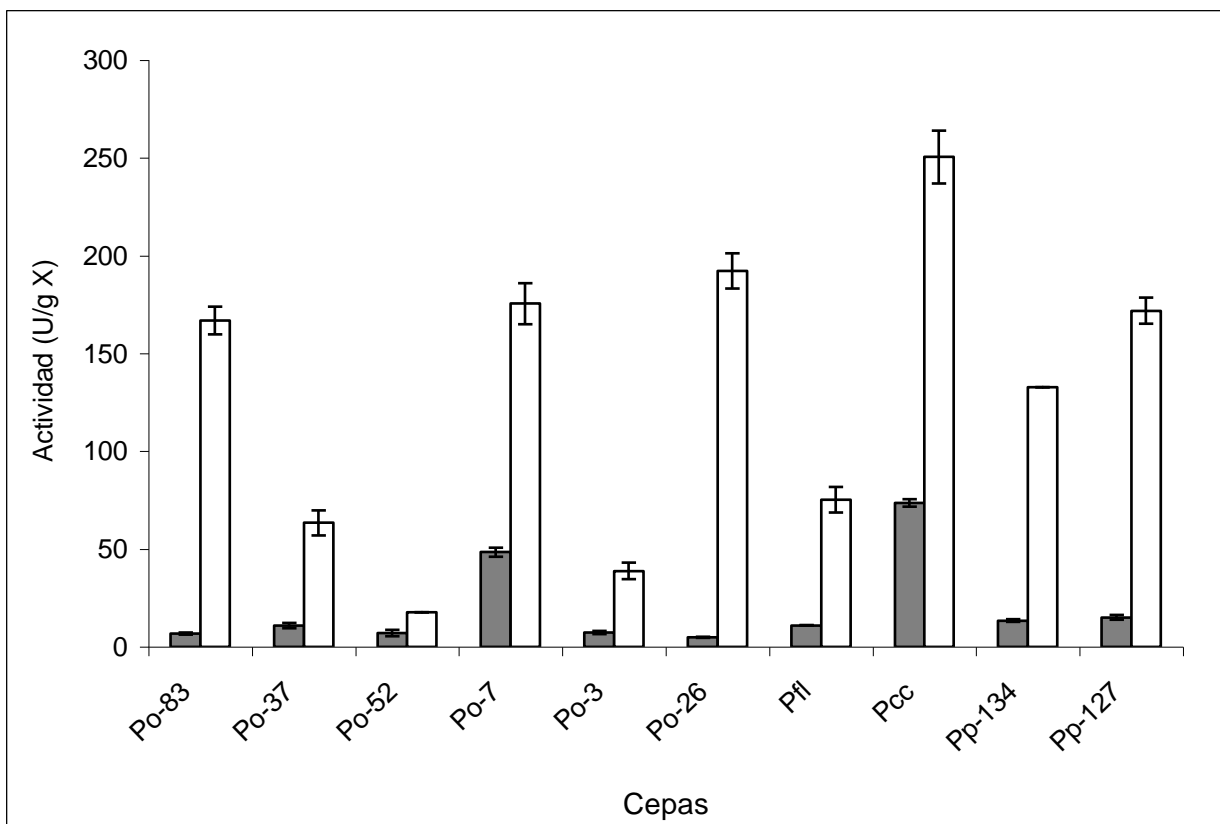


Figura 14. Actividad enzimática intracelular y extracelular de lacasas de 10 cepas del género *Pleurotus* utilizando ρ -anisidina como sustrato. Barras llenas (actividad intracelular) y barras vacías (actividad extracelular).

7.2.5. Actividad de lacasas con o-tolidina como sustrato

La cepa que presentó mayor actividad intracelular fue Pcc, posteriormente Po-7 y Po-83 (figura 15) entre en las que hubo diferencias significativas (Tabla 2, pág 41). La cepa Po-83 presentó 11.3 veces menor actividad que Pcc y Po-7 sólo tuvo 3.2 veces menor actividad de lacasas. La cepa Po-26 fue la que mostró menor actividad. También la cepa Pcc presentó mayor actividad extracelular, seguida por Po-26 y Po-83 que tuvieron 2.6 y 2.7 veces menor actividad que la Pcc (figura 15). Las cepas en las cuales se detectó menor actividad en presencia de este sustrato fueron Po-52 y Po-3, entre las cuales no hubo diferencias significativas. Las cepas de *P. pulmonarius* tampoco presentaron diferencias significativas (Tabla 3, pág 42).

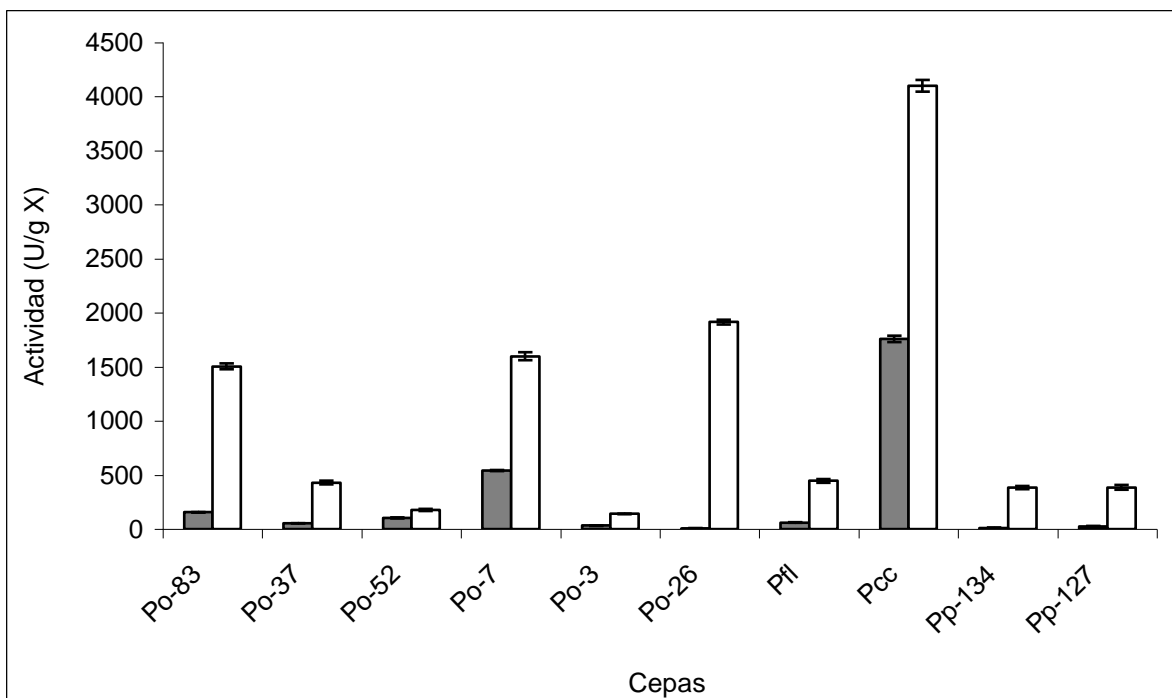


Figura 15. Actividad enzimática intracelular y extracelular de lacasas de 10 cepas del género *Pleurotus* utilizando o-tolidina como sustrato. Barras llenas (actividad intracelular) y barras vacías (actividad extracelular).

Tabla 2. Actividad intracelular de lacasas de 10 cepas del género *Pleurotus* sobre cinco sustratos.

| Cepas | Actividad (U/gX) | | | | |
|--------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| | DMP | ABTS | siringaldazina | ρ -anisidina | o-tolidina |
| Po-83 | 63,75 ^c (1,6) | 208,9 ^c (1,8) | 83,01 ^d (3,4) | 6,78 ^f (0,4) | 155,72 ^c (3,3) |
| Po-37 | 29,24 ^f (4,6) | 91,6 ^{ef} (2,4) | 251,94 ^c (2,6) | 10,88 ^{de} (1,4) | 55,05 ^{ef} (0,9) |
| Po-52 | 36,53 ^e (4,2) | 145,9 ^d (0,4) | 83,84 ^d (1) | 7,11 ^f (1,5) | 102,48 ^d (4,8) |
| Po-7 | 358,99 ^b (1,4) | 1030 ^b (24) | 574,1 ^a (4,1) | 49,44 ^b (2,2) | 540,66 ^b (5) |
| Po-3 | 19,17 ^g (0,6) | 84,7 ^e (0,5) | 47,14 ^f (5,4) | 7,40 ^{ef} (0,8) | 33,00 ^{efg} (1,1) |
| Po-26 | 3,54 ⁱ (0,3) | 58,6 ^g (1,4) | 17,19 ^g (0,7) | 4,84 ^f (0,2) | 7,21 ^g (0,4) |
| Pfl | 41,87 ^d (4) | 146,2 ^d (2,8) | 53,41 ^{ef} (0,0) | 11,03 ^d (0,2) | 61,18 ^e (1,5) |
| Pcc | 870,8 ^a (0,5) | 1379 ^a (6,9) | 341,59 ^b (4,6) | 73,69 ^a (1,8) | 1759,9 ^a (27) |
| Pp-134 | 8,95 ^h (1,0) | 98,2 ^{ef} (3) | 53,37 ^{ef} (0,4) | 13,43 ^{cd} (0,7) | 11,86 ^g (1,0) |
| Pp-127 | 9,35 ^h (0,7) | 112,7 ^e (0,5) | 60,67 ^e (0,4) | 15,04 ^c (1,2) | 26,77 ^{fg} (1,2) |

Las medias (tres replicas) en la misma columna con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.001$). Los números en paréntesis corresponden al error estándar.

Tabla 3. Actividad extracelular de lacasas de 10 cepas del género *Pleurotus* sobre cinco sustratos.

| Cepa | Actividad (U/gX) | | | | |
|--------|--------------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | DMP | ABTS | siringaldazina | p-anisidina | o-tolidina |
| Po-83 | 1261.5 ^d (37) | 19158 ^b (391) | 105,8 ^{fg} (14) | 166.8 ^b (7) | 1505.6 ^d (28) |
| Po-37 | 552,4 ^g (12) | 4695.4 ^g (195) | 1321,3 ^b (31,6) | 63.5 ^{dc} (6) | 429.2 ^e (17) |
| Po-52 | 394,2 ⁱ (10) | 5307.5 ^g (26.9) | 776,7 ^d (17) | 17,6 ^d (0) | 176,5 ^f (8) |
| Po-7 | 1998,4 ^a (36) | 27032.9 ^a (125) | 1937.8 ^a (41) | 175,6 ^b (10) | 1598.7 ^c (36) |
| Po-3 | 245.1 ^j (8) | 1162 ^h (162) | 61,9 ^{gh} (5) | 38,8 ^{dc} (4,2) | 140,7 ^f (4,2) |
| Po-26 | 1335,9 ^c (11) | 15470 ^d (112.4) | 1117,7 ^c (45) | 192,3 ^{ab} (9) | 1915.6 ^b (23) |
| Pfl | 458,8 ^h (13) | 8740.3 ^f (456) | 11,3 ^h (0,0) | 75.2 ^{dc} (6) | 447,5 ^d (17) |
| Pcc | 1447,45 ^b (5) | 12198.6 ^e (44.5) | 692.8 ^e (25) | 250,58 ^a (13) | 4100.6 ^a (56) |
| Pp-134 | 640 ^f (17) | 12209.9 ^e (341) | 14.77 ^h (0.0) | 132,9 ^c (0) | 384 ^e (14) |
| Pp-127 | 699,5 ^e (17) | 16685.9 ^c (244) | 146,5 ^f (8.2) | 171,9 ^b (6,7) | 386.8 ^e (20) |

Las medias (tres replicas) en la misma columna con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.001$). Los números en paréntesis corresponden al error estándar.

7.3. Patrones zimográficos de lacasas intracelular y extracelulares

La figura 16 muestra el patrón zimográfico de actividad intracelular de enzimas lacasas utilizando DMP como sustrato. Todas las cepas de *P. ostreatus* presentaron un patrón similar, con dos bandas de actividad en la misma posición sobre el gel, pero en algunos casos la banda se presentó más intensa que la de otra cepa, lo que sugiere diferente actividad por cantidad de esa isoforma. La Pfl presentó el mismo patrón zimográfico que las cepas de *P. ostreatus*. La cepa Pcc presentó sólo una banda de actividad, al parecer de diferente peso molecular con respecto a las bandas de *P. ostreatus*. Las dos cepas de *P. pulmonarius* mostraron el mismo patrón zimográfico, pero diferente al presentado por las otras especies, al parecer por que son de menor peso molecular.

Figura 16. Zimograma de extractos intracelulares de las cepas del género *Pleurotus* utilizando DMP como sustrato.

La figura 17 muestra el patrón zimográfico de la actividad extracelular de enzimas lacasas utilizando DMP como sustrato. Se observó que todas las cepas de *P. ostreatus* presentaron el mismo patrón zimográfico de tres bandas de actividad, mientras que la Pfl mostró sólo una banda en la misma posición que una de las mostradas por las cepas de *P. ostreatus*. Las cepas de *P. pulmonarius* presentaron un patrón similar entre ellas con dos bandas de actividad; mientras que la cepa Pcc también mostró dos bandas de actividad, pero en diferente posición sobre el gel en comparación con las de las cepas de *P. pulmonarius*.

Figura 17. Zimograma de extractos extracelular de las cepas del género *Pleurotus* utilizando DMP como sustrato.

Las figuras 18 y 19 muestran los patrones zimográficos de la actividad de lacasas intracelulares y extracelulares respectivamente, utilizando p -anisidina como sustrato; de la misma manera, las figuras 20 y 21 muestran estos patrones utilizando o -tolidina como sustrato. Se observó que los patrones intracelulares y extracelulares fueron iguales, independientemente del sustrato utilizado para revelar los zimogramas. Sin embargo algo importante es que al utilizar o -tolidina para revelar el gel de actividad extracelular mostró las tres bandas de actividad que presentan todas las cepas de *P. ostreatus*, probablemente tenga algo que ver que fue el sustrato sobre el que mayor actividad presentaron todas las cepas. Estos resultados sugieren que son las mismas isoformas las que oxidan a los diferentes sustratos evaluados en este estudio.

Se observó que, aunque los tres sustratos evaluados para revelar los zimogramas presentaron buena definición de las bandas de actividad de lacasas, se consideró a la p -anisidina como el

mejor sustrato, ya que produce bandas muy delimitadas y definidas, sin la presencia de manchas sobre el gel diferentes a las bandas de actividad.

Figura 18. Zimograma de extractos intracelulares de las cepas del género *Pleurotus* utilizando ρ -anisidina como sustrato.

Figura 19. Zimograma de extractos extracelulares de las cepas del género *Pleurotus* utilizando p -anisidina como sustrato.

Figura 20. Zimograma de extractos intracelulares de las cepas del género *Pleurotus* utilizando o -tolidina como sustrato.

Figura 21. Zimograma de extractos extracelulares de las cepas del género *Pleurotus* utilizando o-tolidina como sustrato.

8. DISCUSIONES

8.1. Evaluación de la actividad intracelular y extracelular de lacasas

La actividad de lacasas determinada en este trabajo de investigación fue en el extracto crudo, tanto intracelular como extracelular de 10 cepas del género *Pleurotus*. Hay diversos reportes sobre enzimas puras de lacasas extracelulares producidas por hongos de pudrición blanca, pero se han realizado pocos estudios sobre lacasas intracelulares. Se considera que la importancia biológica de las lacasas intracelulares está muy limitada debido a su bajo nivel de producción, pero su importancia aún es incierta (Nagai y col. 2003). En este trabajo se detectó más actividad de lacasas en los extractos crudos extracelulares comparados con los intracelulares de las 10 cepas del género *Pleurotus* sobre los cinco sustratos utilizados. Los EEi y EEe de todas las cepas oxidaron los cinco sustratos, sin embargo cabe mencionar que presentaron actividad sobre siringaldazina, la cual se ha considerado como sustrato específico para lacasas. Por otro lado, ABTS y DMP también son ampliamente utilizados como sustrato para estas enzimas (Nagai y col. 2003). En este estudio se observó que en general, ABTS fue el sustrato en el que mayor actividad de lacasas presentaron las diez cepas de *Pleurotus*, seguido de o-tolidina, siringaldazina, DMP y sobre el sustrato que menor actividad se detectó fue p -anisidina. En estudios previos sobre la actividad extracelular de lacasas de *Melanocarpus* sobre diferentes sustratos mostraron que la mayor actividad se presentó en presencia de ABTS (836 nkat/mg), como ha sido reportado para muchas lacasas de hongos, seguido de siringaldazina (382 nkat/mg) y DMP (290 nkat/mg) (Kiiskinen y col. 2002). También Palonen y col. (2003) reportaron que en *Mauginiella* sp. la actividad específica fue más alta con ABTS como sustrato (2870 nkat/mg.), seguido de DMP (360 nkat/mg) y siringaldazina (283 nkat/mg). Sethuraman y col. (1999) evaluaron la actividad de lacasas del hongo de pudrición blanca, *Cyathus stercoreus*, en presencia de diferentes sustratos y encontraron que la mayor actividad se presentó con ABTS (3.5 U/ml) y DMP (3.06 U/ml). Estos reportes concuerdan con nuestros resultados, sin embargo, en este estudio se utilizaron dos sustratos poco utilizados por otros autores.

8.3. Patrones zimográfico de lacasas intracelular y extracelular

Los zimogramas son una herramienta de gran utilidad para caracterizar los EEi y EEe al detectar bandas de actividad específica, debido a que sólo se hacen evidentes las proteínas con actividad catalítica de interés dependiendo del sustrato con el que se revele el gel de poliacrilamida. Esta técnica permite identificar el número de isoformas presentes en cada uno de los EE de las diferentes cepas. En los patrones zimográficos de actividad intracelular se observó que la mayoría de cepas sólo presentaba dos bandas, sin embargo en los geles de actividad extracelular se presentaron para algunas cepas tres bandas. Rigling y Van Alfen (1993) reportaron que en *Cryphonectria parasitica* encontraron dos isoformas de lacasa extracelular y que una de estas isoenzimas coincide con una banda intracelular en la movilidad sobre el gel del mismo organismo, por lo que sugieren que probablemente una de estas lacasas extracelulares es sintetizada y posteriormente secretada al medio de cultivo por un rompimiento de una secuencia específica. La isoenzima excretada podría actuar como precursor para la formación de otra isoforma. En este trabajo se observó que los extractos extracelulares presentaban una banda más de actividad comparados con los extractos intracelulares, por lo que probablemente la banda extra presente en los extractos extracelulares podría estar presente intracelularmente en forma de zimógeno y al ser excretada al medio sufre modificación en su estructura, así extracelularmente ser una enzima catalíticamente activa. Pero se observó claramente que el número de isoformas no repercutió en la cantidad de actividad detectada, ya que en general la cepa Pcc fue la que presentó el menor número de isoformas, pero fue la cepa mayor actividad mostró tanto intracelular como extracelular.

Los patrones zimográficos de lacasas en una misma cepa muestran diferente número de isoformas intracelulares con respecto a las extracelulares. Estos resultados fueron iguales en todos los sustratos utilizados. Lo que indica que todas las isoformas, tanto intracelulares como extracelulares tienen la misma capacidad de oxidar a los tres sustratos, pero presentan diferentes grados de oxidación. Por otro lado, los patrones zimográficos fueron diferentes entre especies, lo cual sugiere que el perfil de lacasas, tanto intracelular como extracelular, es

particular de cada especie, aún tratándose de cepas del mismo género. Sin embargo varias especies de *Pleurotus* se han identificado erróneamente, a pesar de su importancia económica. El principal problema en la identificación se ha atribuido a la gran variación y su amplia distribución del género. Actualmente se ha encontrado que varias cepas comerciales de *Pleurotus* reportadas como *P. ostreatus* se habían confundido con otras especies, tales como *P. columbinus*, *P. pulmonarius*, *P. sajor-caju*, *P. ostreatus* var. *florida*, *P. floridanus*, *P. flabellatus* y *P. djamor* (Mata y Salmones, 2003). Así como que hay una gran controversia respecto a la cepa Pfl, la cual no se considera como especie. Por los resultados obtenidos se puede sugerir que la cepa Pfl tiene una cercana relación filogenética con la cepas de *P. ostreatus*, ya que sus patrones de zimografía de lacasas intracelulares son muy parecidos. Las cepas de *P. pulmonarius* presentaron patrones diferentes en comparación con los patrones de las otras especies, por lo se podría proponer al patrón de isoformas de lacasas producidas en ausencia de inductores como una metodología sencilla para corroborar su cercanía filogenética o como una herramienta complementaria en la identificación de especies en organismos productores de enzimas lacasas, pero faltan corroborar esta metodología en otros organismo o utilizando más especies del género *Pleurotus* para identificar sus bandas de actividad.

Las isoenzimas obtenidas por electroforesis son una herramienta en la sistemática, genética y biología de poblaciones. Esta técnica se ha utilizado ampliamente en la biología de plantas para el estudio de flujo de genes y diversidad genética. Pero en los hongos un gran número de enzimas se han utilizado en estudios de taxonómicos, estas enzimas son principalmente las que están involucradas en el metabolismo primario, pero en algunos estudios han utilizado modelos de bandas de enzimas extracelulares para la identificación de hongos. Sin embargo, dado que las enzimas extracelulares se encuentran en el caldo del cultivo, limita su uso en algunos hongos debido a que los patrones zimográficos no son constantes. (Rosendahl y Banke, 1998). También se utilizan los patrones zimográficos en estudios filogenéticos; Arana y col. (2004) donde utilizaron el patrón de isoenzimas de lacasas extracelulares para diferenciar especies de *Trametes*, donde reportan la cercanía filogenética entre las especies. Pero en este trabajo como en otros reportados utilizan patrones de enzimas extracelulares y medios de cultivos que inducen la producción de las enzimas, por lo que se hace énfasis en

este trabajo, la utilización de un medio no inductor de la lacasas y para su evaluación por zimografía.

9. CONCLUSIONES

Todas las cepas evaluadas presentaron actividad de lacasas. En general, la actividad extracelular fue mayor que la intracelular, lo cual está en función del papel que desempeñan las enzimas extracelulares en la degradación del sustrato. La actividad tanto intracelular como extracelular de todas las cepas se observó sobre los cinco sustratos utilizados, sin embargo hubo grandes diferencias en la actividad entre las diez cepas de *Pleurotus*. El mejor sustrato para evaluar la actividad de lacasas fue ABTS, el segundo mejor de los sustratos fue o-tolidina, lo cual es importante destacar ya que ha sido poco utilizado para estos fines. La zimografía reveló diferencias entre el número de isoformas en los EEi con respecto a los EEE de la misma cepa, además se observó que los patrones intracelulares son semejantes entre cepas de la misma especie y diferente cuando se compara entre especies distintas. Por lo que se corroboraron las tres hipótesis planteadas de este trabajo de investigación.

Las cepas del género *Pleurotus* presentan actividad intracelular y extracelular sobre los cinco sustratos, y las diferencias en el valor de la actividad dependen de la cantidad de enzima presente en cada extracto enzimático.

10. PERSPECTIVAS

1. Se ha reportado que la actividad enzimática se modifica por varios factores, sin embargo, el pH es muy importante por lo que se propone evaluar la actividad enzimática a diferentes valores de pH.
2. Crecer en fermentación líquida las cepas de *P. cornucopiae* y *P. ostreatus* (Po-7), debido a que fueron las cepas que mayor actividad intracelular y extracelular presentaron sobre todos los sustratos utilizados.
3. Establecer los mecanismos de oxidación de los sustratos catalizados por lacasas para establecer los productos finales e intermediarios de las reacciones.

11. REFERENCIAS

- Abadulla E, Tzanov T, Costa S, Robra K-H, Covaco-Paulo A y Gübitz. 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsute*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3357-3362.
- Alsubaey A, Sisler HD y Matthews BF. (1996). Purification and characterization of an extracellular phenoloxidase from culture filtrates of *Pyricularia oryzae*. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 437-445.
- Arana-Cuenca A, Roda A, Téllez A, Loera O, Carbajo JM, Terrón MC y González AE. 2004. Comparative analysis of laccase-isozymes patterns of several related Polyporaceae species under different culture conditions. *Journal Basic Microbiology* 44: 79-67
- Archibald FS, Bourbonnais R, Jurasek L, Paice MG y Reid ID. 1997. Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. *Journal of Biotechnology* 53: 215-336.
- Bertrand G. 1896. Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. *CR Hebd Seances Acad Sci* 9: 463-465.
- Bohinski RC. 1991. Bioquímica. Pearson Educación. México D.F.
- Bollag J. y Leonowicz A. 1984. Comparatives studies of extracellular fungal laccases. *Applied and Environmental Microbiology* 48:849-854.
- Breene WM. 1990. Nutricional and medicinal value of speciality mushrooms. *J.Food Protec.* 53(10): 883-8949.
- Bryan W y Wilson K. 1976. Electrophoretic techniques. En *Principles and techniques of practical biochemistry*. Eduard Arnold (ed). John Wiley y Sons, Inc. New York, USA. pp 98-118.
- Claus H. 2003. Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives Microbiology* 179: 145-150.
- Chang ST y Hayes WA 1978. *The biology and cultivation of edible mushrooms*. 1st edn. Academic Press, New York.
- Das S, Sengupta S y Mukherjee M. 1997. Importance of laccase in vegetative growth of *Pleurotus florida*. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4120-4122.

- De Souza C y Peralta R. 2003. Purification and characterization of main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. *Journal of Basic Microbiology* 43: 278-286.
- De Souza C, Zilly A y Peralta R. 2002. Production of laccase as the sole phenoloxidase by a Brazilian strain of *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation. *Journal of Basic Microbiology* 42: 83-90.
- Dedeyan B, Klonowska A, Tagger S, Tron T, Iacazio G, Gil G y Le Petit J. 2000. Biochemical and molecular characterization of a laccase from *Marasmius quercophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 925-929.
- Edens W, Goins T, Dooley D y Henson J. 1999. Purification and characterization of secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3071-3074.
- Eggert C, LaFayette PR, Temp U, Eriksson K-E y Dean J. 1998. Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarius*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1766-1772.
- Eggert C, Temp U y Eriksson K-E. 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarius*: purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1151-1158.
- Fukushima Y y Kirk K. 1995. Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispora* lignin degrading system. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 872-876.
- Galhaup C, Goller S, Peterbauer C, Strauss J y Haltrich D. 2002. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology* 148: 2159-2169.
- Germann UA, Muller G, Hunziker PE y Lerch K. 1988. Characterization of two allelic forms of *Neurospora crassa* laccase. *The Journal of Biological Chemistry* 263 (2): 885-896.
- Giardina P, Palmieri G, Scaloni A, Fontanella B, Faraco V, Cennamo G y Sannia G. 1999. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Journal* 341: 655-663.
- Griffin H. 1994. *Fungal Physiology*. Wiley-Liss. New York.

- Guillén F, Muñoz C, Gómez-Torbio V, Martínez AT y Martínez MJ. 2000. Oxygen activation during oxidation of methoxyhydroquinones by laccase from *Pleurotus eryngii*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 170-175.
- Guinberteau J. 1990. Definition and taxonomical place of the genus *Pleurotus* in the mushrooms classification. *Bulletin de la Federation Nationale des Syndicats Agricoles de Cultivateurs de Champignons (Francia)* 48: 261-264.
- Hardin IR, Cao H, Wilson SS y Akin DE. 2000. Decolourisation of textile wastewater by selective fungi. *AATCC Review* 32 (11): 38-42.
- Heinzkill M, Bech L, Halkier T, Schneider P y Anke T. 1998. Characterization of laccase and peroxidases from wood-rotting fungi (family *Coprinaceae*). *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1601-1606.
- Jolivald C, Raynal A, Caminade E, Kokel B, Le Goffic F. y Mouglin C. 1999. Transformation of N',N'-dimethyl-N=(hydroxyphenyl)ureas by laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51: 676-681.
- Karlsson S, Holmbom B, Spetz P, Mustranta A y Buchert J. 2001. Reactivity of *Trametes* laccases with fatty and resin acids. *Applied Microbial and Biotechnology* 55: 317-320.
- Kiiskinen L-L, Viikari L y Kruus K. 2002. Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. *Applied Microbiology Biotechnology* 59: 198-204.
- Kirk-Kent T y Cullen D. 1998. Enzymology and molecular genetic of wood degradation by white-rot fungi. En *Environmentally Friendly Technologies for Pulp and Paper Industry*. Young A y Akhtar M (eds.). John Wiley y Sons, Inc. New York. pp: 273-307.
- Klonowska A, Gaudin C, Fournel A, Asso M, Le Petit J, Giorgi M y Tron T. 2002. Characterization of a low redox potential laccase from the basidiomycete C30. *European Journal Biochemical* 269: 6119-6125.
- Laborde J. 1896. Sur lacasse des vins. *CR Hebd Seances Acad Sci* 123: 1074-1075.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

- Leonowicz A, Matuszawska A, Luterek J, Ziegenhagen D, Wojtaś- Wasilewska M, Cho N, Hofrichter M y Rogalski J. 1999. Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology* 27: 175-185.
- Li K, Xu F y Eriksson LK. 1999. Comparison of fungal laccase and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2654-2660.
- Maller D, Whetten R, Bao W, Chen C-L y Sederoff R. 1993. The role of laccase in lignification. *The Plant Journal* 4: 751-757.
- Mansur M, Suárez T, Fernández-Larrea J, Brisuela M y González A. 1997. Identification of a laccase gene family in the new lignin-degrading basidiomycete CECT 20197. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2637-2646.
- Martínez-Carreara D, Leven R, Morales P, Sobal M y Saavedra L. 1991. Historia del cultivo comercial de hongos comestibles en México. *Ciencia y desarrollo* 16(96): 33-43.
- Mata G, Murrieta-Hernández DM e Iglesias-Andreu LG. 2004. Changes in lignocellulolytic enzymes activities in six *Pleurotus* spp. Strain cultivated on coffee pulp in confrontation with *Trichoderma* spp. *World Journal of Microbiology y Biotecnology* 00: 1-8.
- Mata G y Salmenes. 2003. Edible mushroom cultivation at the Institute of Ecology in Mexico. *Micologia Aplicada International* 15:23-29.
- Moreira M.T, Feijoo G, Sierra-Alvarez R y Field J.A. 1999. Reevaluation of the manganese requirement for the biobleaching of kraft pulp by white rot fungi. *Bioresource Technology* 70: 255-260.
- Muñoz C, Guillén F, Martínez AT y Martínez MJ. 1997. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mg^{2+} oxidation. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2166-2174.
- Nagai M, Kawata M, Watanabe H, Ogawa M, Saito K, Takesawa T, Kanda K y Sato T. 2003. Important role of fungal intracellular for melanin synthesis: purification and characterization of an intracellular laccase from *Lentinula edodes* fruit bodies. *Microbiology* 149: 2455-2462.

- Nagai M, Sato T, Watanabe H, Saito K, Kawata M y Enei H. 2002. Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60: 327-335.
- Palmieri G, Cennamo G, Faraco V, Amoresano A, Sannia G y Giardina P. 2003. Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 220-230.
- 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: 920-924.
- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Scaloni A, Capasso A y Sannia G. 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biological Chemistry* 272: 31301-31307.
- Palonen H, Saloheimo M, Viikari L y Kruus K. 2003. Purification, characterization and sequence analysis of a laccase from the ascomycete *Mauginiella* sp. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 854-862.
- Pointing SB. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology Biotechnology* 57: 20-33.
- Rajarithnam S y Bano Z. 1989. *Pleurotus* mushrooms. Part III. Biotransformations of natural lignocellulosic waste: Comercial applications and implications. *Critical Reviews. Food Science and Nutrition*, 28: 31-107
- Ranocha P, McDougall G, Hawkins S, Sterjiades R, Borderies G, Stewart D, Cabanes-Macheteau M., Boudet AM y Goffner D. 1999. Biochemical characterization molecular cloning and expression of laccase –a divergent gene family- in poplar. *European Journal Biochemical* 259: 485-495.
- Rigling D y Van Alfen N. 1993. Extra-intracellular laccase of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 3634-3639.
- Rosendahl S y Banke S. Use of isozymes in fungal taxonomy and population studies. En *Chemical Fungal Taxonomy*. Frisvad JC, Bridge PD y Arora DK (eds). Marcel Dekker, Inc. New York. Pp:107-120.

- Saito T, Hong P, Kato K, Okazaki M, Inagaki H, Maeda S y Yokogawa Y. 2003. Purification and characterization of an extracellular laccase of a fungus (family Chaetomiaceae) isolated from soil. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 520-526.
- Sánchez C. y Viniegra-González G. 1996. Detection of highly productive strains of *Pleurotus ostreatus* by their tolerance to 2-deoxy-D-glucose in starch-based media. *Mycological Research*. 100: 455-461.
- Savoie JM y Mata G. 2003. *Trichoderma harzianum* metabolites preadapt mushrooms to *Trichoderma aggressivum* antagonism. *Mycologia* 95: 191-199.
- Schwarze F, Engels J y Mattheck C. 2000. Fundamental aspects. En *Fungal strategies of wood decay in trees*. Springer. pp 5-31.
- Sethuraman A, Akin D y Eroksson E. 1999. Production of ligninolytic enzymes and synthetic lignin mineralization by the bird's nest fungus *Cyathus stercoreus*. *Applied Microbiology Biotechnology* 52: 689-697.
- Téllez-Téllez M, Sánchez, C, Montiel-Gonzalez A.M y. Díaz-Godínez G. 2005. Laccases activity of the peripheral and central zones of the vegetative mycelium of colonies of *Pleurotus* spp. *Agro Food Industry Hi-Tech* (In press).
- Thurston CF. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140: 19-26.
- Wilkolazka AJ, Kochmanska-Rdest J, Malarczyk E, Wardas W y Leonowicz A. 2002. Fungi and their ability to decolourize azo and anthraquinonic dyes. *Enzyme and Microbial Technology* 30:566-572.

12. LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------|--|
| μl | Microlitros |
| μM | Micromolar |
| ABTS | 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazilina-6-ácido sulfónico) |
| DMP | 2,6-dimetoxifenol |
| EEe | Extracto crudo extracelular |
| EEi | Extracto crudo intracelular |
| KDa | Kilodaltones |
| Km | Constante de Michael-Menten |
| LiP | Lignina peroxidasas |
| min | Minutos |
| mM | Milimolar |
| Mn | Manganeso |
| MnP | manganeso peroxidasas |
| μkat | microkatal |
| °C | Grados Celsius |
| pH | Potencial de hidrógeno |
| pI | Punto isoeléctrico |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SDS | Dodecil sulfato de sodio |
| U | Unidades |
| U/gX | Unidades por gramo de biomasa seca |

13. PUBBLICACIONES

THE INTERNATIONAL JOURNAL OF
CHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

CHEMISTRY

INTERNATIONAL JOURNAL OF CHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

FOOD

EUROPEAN JOURNAL OF
NUTRACEUTICALS & FUNCTIONAL FOODS

29th November 2004

STATEMENT OF ACCEPTANCE OF PUBLICATION OF A MANUSCRIPT

The Managing Editor of the journal

AgroFOODIndustry HiTech

hereby states that the manuscript titled

**LACASSE ACTIVITIES OF THE PERIPHERAL AND CENTRAL
ZONES OF
THE VEGETATIVE MYCELIUM OF COLONIES OF PLEUROTUS
SPECIES**

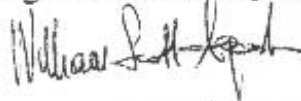
written by

**M. TÉLLEZ-TÉLLEZ, C. SÁNCHEZ, A. M. MONTIEL-GONZALEZ AND G.
DÍAZ-GODÍNEZ**

has been

accepted for publication in the journal.

The Managing Editor
AgroFOODIndustry HiTech



Legal note: This statement is not binding and stands as a courtesy service to the author(s). The editor holds the right to refrain from publishing the aforesaid article for any reason.

Published by Tekno Scietize Srl
Via Aurelio Saffi, 23 - 20123 Milano - Tel +39 02.4818011/4818118 - Fax 39.02.4818070
c/c postale made out to Teknoscienze n. 17393208 - Cap.Soc. Euro 10.000,00
Trib. Milano n. 221399/0029/49 - C.C.I.A.A. 1123566 Milano - P.IVA 06817720151
E-mail: info@teknoscienze.com - Internet: www.teknoscienze.com

**XXXV CONGRESO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS
Acapulco, Gro. 13-15 de septiembre del 2004**

Trabajo 077

**ZIMOGRAFÍA DE LAS ACTIVIDADES INTRA- Y EXTRACELULAR DE CEPAS
DEL GÉNERO *PLEUROTUS***

***Téllez-Téllez M¹²., Sánchez C¹., Loera O³. y Díaz-Godínez G¹.** ¹Laboratorio de Biotecnología, Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala. Tel./Fax +(52)2484815482. E-mail: gdg@cci.uatx.mx. ²Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala. ³Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México DF.

Las lacasas son enzimas producidas por hongos de pudrición blanca que catalizan la oxidación de compuestos fenólicos. Existen isoformas dependiendo de la especie de hongo y condiciones ambientales, pero hasta ahora no se ha determinado si tienen un papel funcional específico, que justifique la presencia de varias isoenzimas. En este estudio se determinó a través de zimografía, el número de isoformas de lacasas intracelulares y extracelulares de especies del género *Pleurotus*. Se estudiaron las cepas de *Pleurotus pulmonarius* (PPL27) de la Universidad de China de Hong Kong, *P. ostreatus* (201218) de la ATCC, *P. florida* (Pfl) y *P. cornucopiae* (Pcc) de la Universidad Nacional del Sur Argentina. Las cepas se desarrollaron sobre agar con almidón como fuente de carbono y sales minerales a 25°C por 7 días. El extracto intracelular se obtuvo por lisis celular y el extracto extracelular por lixiviación del agar libre de micelio. Los zimogramas se realizaron en una cámara de electroforesis (MiniProtean III, BioRad) sobre geles de poliacrilamida (12%) y se revelaron con p -anisidina, o -tolidina y 2,6 dimetoxifenol. Para cada especie se observó el mismo patrón sobre todos los sustratos, lo que indica que las mismas isoformas tienen la misma capacidad de oxidación. Por otro lado, los patrones fueron diferentes al comparar las cepas. Estos resultados muestran diferencias en cantidad y número de isoformas entre las cepas, sin embargo, su función parece ser la misma, ya que las actividades de lacasas se obtuvieron a la misma edad celular de las cepas. Posiblemente, las diferencias podrían deberse a que se trata de especies diferentes, lo cual sugiere que la zimografía de lacasas podría ser un método de diferenciación de especies de *Pleurotus*.

Trabajo 076

**ACTIVIDAD EXTRACELULAR DE LACASAS EN DIFERENTES ESPECIES DEL
GÉNERO *PLEUROTUS***

*Téllez-Téllez M^{1,2}, Sánchez C¹, Loera O³ y Díaz-Godínez G¹. ¹Laboratorio de Biotecnología, Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala. Tel./Fax +(52)2484815482. E-mail: gdg@cci.uatx.mx. ²Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala. ³Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México DF.

Las lacasas son enzimas producidas por plantas, bacterias y hongos de pudrición blanca, que catalizan la oxidación de un gran número de compuesto fenólicos y aminas aromáticas. En los hongos están involucradas en la degradación de lignina o en la eliminación de fenoles tóxicos que surgen durante esta degradación. En este estudio se evaluó la actividad extracelular de lacasas de cuatro especies de hongos comestibles del género *Pleurotus* sobre diferentes sustratos. Se utilizaron las cepas de *Pleurotus pulmonarius* (PPL27) de la Universidad de China de Hong Kong, *P. ostreatus* (201218) de la ATCC, *P. florida* (Pfl) y *P. cornucopiae* (Pcc) de la Universidad Nacional del Sur Argentina. Las cepas se desarrollaron sobre agar con almidón como fuente de carbono y sales minerales a 25°C por 7 días. El extracto enzimático se obtuvo por lixiviación del agar sin micelio. La actividad de lacasas se evaluó utilizando siringaldazina, *p*-anisidina, *o*-tolidina, 2,6 dimetoxifenol y ABTS como sustratos. La actividad se reportó en unidades arbitrarias por g de biomasa seca (U/g X), donde se consideró a una U como la cantidad de enzima que provoca un incremento en una unidad de absorbancia por min. Las cuatro cepas presentaron actividad sobre los cinco sustratos, sin embargo, los valores fueron distintos. La cepa 201218 presentó los valores mayores, seguida de la Pcc, la PPL27 y la Pfl presentaron menor actividad. Podría sugerirse que las diferencias de actividad sobre los diferentes sustratos dependen de la especie en estudio, por lo que estos resultados podrían indicar la capacidad de invasión micelial durante el cultivo de hongos, lo que es importante en la determinación de la productividad de estos organismos.

**12th internacional biotechnology symposium and exhibition
Santiago de Chile. 17-22 October 2004.**