



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Purificación y caracterización parcial de una
enzima lacasa extracelular de *Pleurotus ostreatus***

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:
Q.I. SAUL TLECUITL BERISTAIN

DIRECTOR DE TESIS:
DR. GERARDO DÍAZ GODINEZ

TUTORES:
**DRA. MARIA DEL CARMEN SÁNCHEZ HERNÁNDEZ
DR. OCTAVIO LOERA CORRAL**

ÍNDICE GENERAL.

Hoja de financiamiento	i
Autorización de impresión de tesis	ii
Agradecimientos	iii
Dedicatorias	iv
Resumen	v
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Pleurotus ostreatus</i>	2
1.1.1. Morfología de los hongos del género <i>Pleurotus</i>	3
1.1.2. Ciclo de vida de <i>Pleurotus</i>	4
1.2. Enzimas lacasas	5
1.3. Técnicas de purificación de proteínas	11
1.3.1. Isoelectroenfoque	11
1.3.2. Electroforesis	11
1.3.3. Cromatografía	14
1.3.3.1. Cromatografía de intercambio iónico	15
1.3.3.2. Cromatografía de afinidad	15
1.3.3.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC: High Performance Liquid Chromatography)	16
1.3.3.4. Cromatografía de filtración en gel	16
1.4. Fermentación	17
1.4.1. Fermentación sólida y sumergida	18
2. ANTECEDENTES	20
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. OBJETIVOS	26
4.1. Objetivo general	26
4.2. Objetivos específicos	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1. Cepa e inóculo	28
5.2. Fermentación en medio líquido para la producción de lacasas	28
5.3. Obtención del extracto enzimático	29
5.4. Determinación de la biomasa	29
5.5. Determinación de la actividad enzimática	29
5.6. Determinación de la concentración de proteína soluble	29
5.7. Identificación de isoformas con actividad de lacasas	30
5.8. Determinación de los parámetros de crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> y producción de lacasa	30
5.9. Purificación de una isoforma de lacasa	31
5.10. Determinación de pH y temperatura óptimos de actividad de la lacasa pura	32
5.11. Determinación de los parámetros termodinámicos y cinéticos de la lacasa pura	33
6. RESULTADOS	34
6.1. Caracterización de la fermentación	34
6.1.1. Biomasa	34

6.1.2. Concentración de proteína soluble en el caldo de fermentación	35
6.1.3. Actividad de lacasas (E)	35
6.1.4. Actividad específica	36
6.1.5. Perfiles de pH	36
6.1.6. Determinación del número de isoformas de lacasas.....	38
6.1.7. Parámetros cinéticos de crecimiento y producción de lacasas	39
6.2. Purificación de las enzimas lacasas	39
6.2.1. Cromatografía por isoelectroenfoque	39
6.2.2. Separación de proteínas por cromatografía de intercambio iónico	41
6.2.3. Zimografía y electroforesis para la lacasa purificada de <i>Pleurotus ostreatus</i>	43
6.2.4. Tabla de purificación.....	44
6.3. Caracterización de la enzima lacasa.	45
6.3.1. Determinación de pH óptimo y temperatura óptima de actividad lacasa.	45
6.3.2. Determinación de los parámetros termodinámicos por el modelo de Arrhenius.	47
6.3.3. Determinación de los parámetros cinéticos por el modelo de Michaelis-Menten.....	47
6.3.4. Determinación de los parámetros cinéticos por el modelo de Linewawer-Burk.....	48
6.3.5. Determinación del punto isoeléctrico por Rotofor.	48
6.3.6. Determinación del peso molecular por SDS PAGE	50
6.3.7. Parámetros cinéticos de la enzima lacasa purificada de <i>Pleurotus ostreatus</i>	50
7. DISCUSIONES.	52
8. CONCLUSIONES.....	55
9. PERSPECTIVAS	56
10. REFERENCIAS	57
11. PUBLICACIONES.....	63

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Partes fundamentales de <i>Pleurotus</i> (Sánchez, 1998).	3
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Pleurotus</i> (Sánchez, 1998).	5
Figura 3. Estructura química de la lignina (Leonowicz y col. 1999)	7
Figura 4. Oxidación del ácido 3-hidroxiantranílico a ácido cinabárico en presencia de lacasas de <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> y celobiosa dehidrogenasa (Temp y Eggert, 1999).	8
Figura 5. Oxidación de 1-(3,4-dimetoxifenil)-2-(2-metoxifenol) propano-1,3 diol a través de lacasas fúngicas en presencia de mediadores como el 1-hidroxibenzotriazol y ácido violúrico (Li y col. 1999).	9
Figura 6. Representación tridimensional de una lacasa de <i>Coprinus cinereus</i> (Ducros y col. 2001).	10
Figura 7. Formación de radicales libres en una reacción catalizada por lacasa (Schultz y col. 2001).	10
Figura 8. Formación de un gel de poliacrilamida.	13
Figura 9. Diagrama de flujo para la producción de enzimas lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> por FML y purificación de una isoforma.	27
Figura 10. Cinética de crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación en medio líquido.	34
Figura 11. Proteína soluble en el caldo de fermentación.	35
Figura 12. Actividad de lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> obtenidas por FML.	36
Figura 13. Actividad específica durante la fermentación de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	37
Figura 14. Perfiles de pH durante la fermentación de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	37
Figura 15. Perfil de zimografía de lacasas durante la FML de <i>Pleurotus ostreatus</i> . A) 72-288 h de fermentación, B) 312-456 h de fermentación	38
Figura 16. Cromatograma resultante de la separación de proteínas por isoelectroenfoque (Rotofor, Bio-Rad).	40
Figura 17. Perfil pH y concentración de proteína durante la separación por Rotofor.	40
Figura 18. Cromatograma resultante de la separación de proteína por cromatografía de intercambio iónico (Econo-Pac).	41
Figura 19. Zimografía de las enzimas lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> recolectadas por el cromatógrafo utilizando una columna Econo-Pac. A) Fracciones 1-10. B) Fracciones 11-17.	42
Figura 20. Cromatograma resultante de la separación de proteína por cromatografía de intercambio iónico (Bio Q).	43
Figura 21. Zimografía realizada a cada etapa de la purificación de la enzima lacasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> (A). Electroforesis realizada en cada etapa de la purificación de la enzima lacasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> (B).	44
Figura 22. Actividad de lacasa purificada de <i>Pleurotus ostreatus</i> dependiente de pH y temperatura.	46
Figura 23. Efecto de la temperatura sobre la actividad de lacasa purificada de <i>Pleurotus ostreatus</i> obtenida por fermentación sumergida.	46
Figura 24. Efecto de la temperatura sobre la actividad lacasa purificada de <i>Pleurotus ostreatus</i> obtenida por fermentación sumergida. Modelo de Arrhenius para determinar E_a y E_d .	47

Figura 25. Modelo de Michaelis-Menten para predecir K_m y V_{max} de la enzima lacasa pura de <i>Pleurotus ostreatus</i> obtenida por FML.....	48
Figura 26. Modelo de Linewaber-Burk para predecir K_m y V_{max} de la enzima lacasa pura de <i>Pleurotus ostreatus</i> obtenida por FML.....	49
Figura 27. Determinación del punto isoeléctrico por Rotofor.....	49
Figura 28. Gel de electroforesis teñido con nitrato de plata, para determinación de peso molecular por SDS PAGE.....	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diferencias catalíticas de lacasas de diversas cepas de <i>Pleurotus ostreatus</i> y otros hongos ligninolíticos (Tinoco y col. 2001, modificada).....	22
Tabla 2. Isoformas de lacasas purificadas en diversos organismos.....	23
Tabla 3. Composición del medio de cultivo para la producción de lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i>	28
Tabla 4. Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i>	39
Tabla 5. Valores de actividad de la enzima lacasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> durante la purificación.....	45
Tabla 6. Parámetros cinéticos de la enzima lacasa purificada de <i>Pleurotus ostreatus</i>	51

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 el apoyo recibido por el CONACyT dentro del programa de PIFOP. Por otro lado, Saúl Tlecuítl Beristain recibió una beca para estudios de maestría por CONACyT con el número de registro 177823.

Cabe mencionar que el programa de Maestría en Ciencias Biológicas de la UAT está registrado en el Padrón de Programa Institucional de Fortalecimiento del Postgrado de SEP-CONACyT (PIFOP-UAT-200-30-03)



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

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 el **C. QUIM. SAÚL TLECUITL BERISTAIN** realiza para la obtención del grado de Maestro 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 correspondiente. El título que llevará es: **"Purificación y caracterización parcial de una enzima lacasa extracelular de *Pleurotus ostreatus*"**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., FEBRERO 28 DE 2005

Dr. Gerardo Díaz Godínez

Dra. Blanca Rosa Rodríguez Pastrana

Dr. Arturo Estrada Torres

Dr. Octavio Loera Corral

Dra. María del Carmen Sánchez Hernández

Dr. Gerardo Mata Montes de Oca

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Tlaxcala por permitir la realización de este trabajo en el laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas y a cada catedrático que intervino en mi formación académica.

Al CONACyt por la beca otorgada para la realización de este trabajo de investigación.

Al Dr. Gerardo Díaz Godínez por su asesoría, apoyo y amistad brindado, los cuales fueron alicientes para la realización de este trabajo.

A la Dra. María del Carmen Sánchez Hernández por la paciencia y los valiosos comentarios realizados para este trabajo, además del apoyo incondicional recibido.

Al Dr. Octavio Loera Corral, por los comentarios que enriquecieron este trabajo, así como la amistad brindada.

A los Drs. Arturo Estrada Torres, Gerardo Mata Montes de Oca y Blanca Rosa Rodríguez Pastrana, sinodales.

A la Dra. Margarita Martínez Gómez, coordinadora del postgrado.

DEDICATORIAS

A mi papa Lic. Gildardo Tlecuítl Rojas y a la Profesora Celia Ávila Ocampo les dedico este trabajo por todo el apoyo recibido.

A mis hermanos: Joel, Avelina y Sonia por el cariño y ánimo recibido.

A mi mejor amigo Ing. Joel Tlecuítl Beristain.

A mis compañeros de maestría y laboratorio: Cecilia, Dora Luz, Rosalía, Eduardo, Maura, Guillermo, Víctor y Juvenal.

A la L.E. Martha Pérez Reyes por tu calidez humana que me has brindado, así como la admiración profesional que te tengo.

RESUMEN

En este trabajo de investigación se purificó una enzima lacasa de *Pleurotus ostreatus* (ATCC 32783) producida por fermentación sumergida, se determinaron sus características fisicoquímicas, así como los parámetros cinéticos de crecimiento del hongo y de su producción por este tipo de fermentación.

Los parámetros evaluados en la fermentación fueron: la actividad de lacasas (usando 2,6-dimetoxifenol como sustrato); la biomasa; la concentración de proteína soluble en el caldo de fermentación y el número de isoformas de enzimas lacasas producidas durante la fermentación a través de zimografía.

La cepa de *Pleurotus ostreatus* utilizada en este estudio presentó cuatro isoformas de lacasa a las 432 horas de fermentación a 25°C y con agitación orbital de 120 rpm. Mediante tres pasos de purificación; isoelectroenfoque, cromatografía de intercambio iónico utilizando una columna Econo-Pac (Bio-Rad) y cromatografía de intercambio iónico utilizando una columna Bio-Q (Bio-Rad), se logró purificar una isoforma de lacasa, la cual presentó un peso molecular de 43.7 KDa determinado por SDS PAGE, su punto isoelectrónico fue de 2.27 determinado por isoelectroenfoque, su velocidad máxima de actividad fue de 1.18 Δ Abs/min con 2,6 dimetoxifenol como sustrato, la constante de Michaelis-Menten fue de 90 μ M para el mismo sustrato, la temperatura óptima de actividad fue de 40°C y su pH óptimo de actividad fue de 4.5.

La isoforma purificada presentó alta afinidad por el sustrato evaluado y amplios márgenes de tolerancia a pH y temperatura, así como un punto isoelectrónico y peso molecular diferente a los reportados en la literatura para lacasas de esta especie de hongo.

1. INTRODUCCIÓN

El papel natural de los hongos de pudrición blanca, como *Pleurotus ostreatus*, es su participación activa en el reciclado de polímeros aromáticos de la lignina. Esto es posible gracias a un sistema multienzimático que poseen estos hongos. Entre las enzimas que participan en la degradación de la lignina están las lacasas.

Las enzimas lacasas se caracterizan por tener un amplio número de sustratos, tales como hidrocarburos policíclicos aromáticos, aminas aromáticas y fenoles organofosforados, todos ellos pertenecientes al grupo de los fenoles o polifenoles. Esta propiedad se ha aprovechado en procesos de biorremediación para oxidar contaminantes similares a los sustratos como son los principios activos de: insecticidas, colorantes, herbicidas y fungicidas, entre otros. Para lograr esta aplicación, es necesario caracterizar a las enzimas purificadas y los mecanismos de excreción e inducción de los organismos que los producen mediante fermentaciones sumergidas.

Las fermentaciones sumergidas son procesos biológicos muy empleados para la producción de enzimas de interés industrial, entre otros, utilizando hongos filamentosos, bacterias y levaduras, además permite caracterizar y eficientar dichos procesos.

A partir de la tercera semana, las bolsas se exponen bajo luz indirecta y una humedad ambiental del 80% para inducir la fructificación y posterior cosecha (Guzmán y col. 1993).

1.1.1. Morfología de los hongos del género *Pleurotus*

El hongo tiene una apariencia de masa algodonosa, generalmente blanca, que técnicamente se llama micelio y la cual crece sobre el sustrato elegido para el desarrollo del hongo. La unidad microscópica fundamental de un hongo se denomina hifa, la cual es un filamento tabicado. El micelio es el que se cultiva en el laboratorio sobre medios sintéticos en cajas Petri para obtener una cepa. Ésta crece en forma radial y por ello se forman masas discoidales sobre la superficie en donde crecen (Guzmán y col. 1993).

En la **figura 1** se muestran las partes fundamentales de *Pleurotus*, las cuales son el sombrero o píleo, que protege a las laminillas o el himenio, este último es la parte fértil del hongo en donde se producen las esporas. El sombrero es sostenido por el pie o estípite (Guzmán y col. 1993).

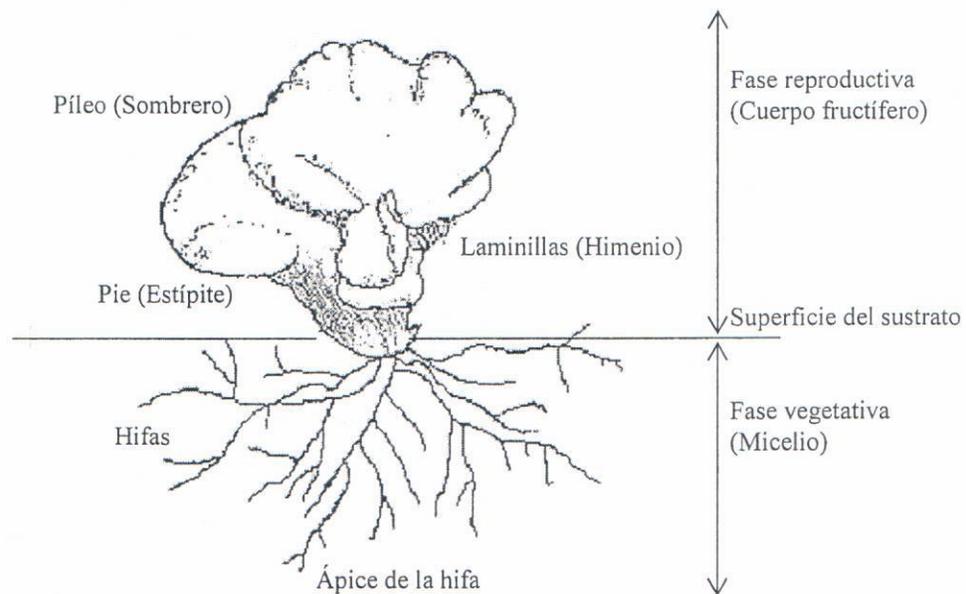


Figura 1. Partes fundamentales de *Pleurotus* (Sánchez, 1998).

1.1.2. Ciclo de vida de *Pleurotus*

Las fructificaciones de los hongos constituyen los cuerpos reproductores en los que el hongo forma sus esporas, la células de dispersión del hongo para perpetuar la especie. Las esporas pueden ser sexuales o asexuales. En la **figura 2** se representa la estructura de un hongo donde la fructificación es el resultado de un proceso sexual y formará las esporas en su parte fértil, el himenio, que es la cara inferior del sombrero.

Las esporas de *Pleurotus* (basidioesporas) al caer sobre un sustrato adecuado, germinan produciendo hifas y éstas un micelio que tienen la particularidad de ser uninucleado. Un micelio uninucleado, también llamado micelio primario, se fusiona con otro individuo para producir un micelio binucleado o secundario (sin fusión nuclear). Esta unión sexual se llama plasmogamia y constituye el primer paso en la reproducción sexual del hongo.

El micelio secundario tiene la característica de desarrollarse abundantemente y esta masa es la que constituye el verdadero hongo. Se pueden formar uno o muchos cuerpos fructíferos, en los cuales, en su himenio terminará la reproducción sexual que es la formación de las esporas. Éstas se forman en los basidios donde se lleva a cabo una fusión nuclear llamada cariogamia y da como resultado la formación de las esporas. Para el caso de *Pleurotus* se forman cuatro esporas por cada basidio, como en la mayoría de los basidiomicetes.

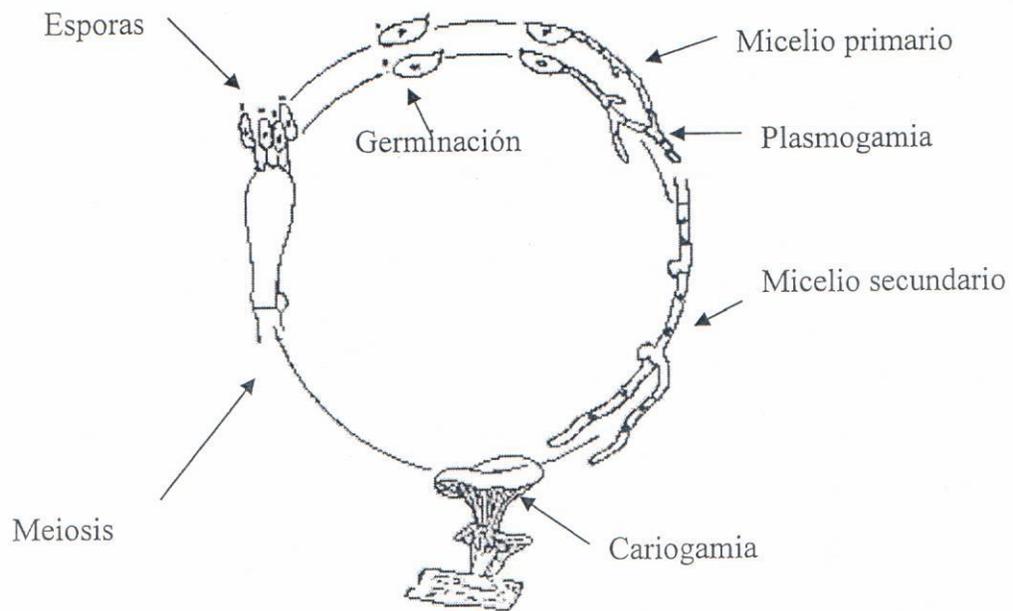


Figura 2. Ciclo de vida de *Pleurotus* (Sánchez, 1998).

Los hongos también se pueden reproducir vegetativamente por medio de fragmentos obtenidos del micelio o del cuerpo fructífero. Si tomamos en condiciones de asepsia una porción del micelio secundario del hongo o una pequeña pieza del cuerpo fructífero y la ponemos bajo humedad, temperatura y nutrimentos adecuados, dicho fragmento crecerá y dará más hifas formando un nuevo micelio. El método vegetativo es el más empleado en el laboratorio para reproducir a los hongos (Guzmán y col. 1993).

1.2. Enzimas lacasas

Las enzimas lacasas forman parte del grupo de las fenoloxidasas, además pertenecen al grupo ligninolítico. Estas enzimas catalizan reacciones de degradación de la lignina, son producidas en su mayoría por hongos de pudrición blanca (Guillén y col. 2000). El grupo de enzimas ligninolíticas se dividen básicamente en tres: manganeso peroxidasas (MnP), lignin peroxidasas (LiP) y lacasas (D'Souza y col. 1999). Las lacasas pueden oxidar compuestos fenólicos produciendo radicales fenoxi libres, mientras que los compuestos no fenólicos son oxidados vía radicales catiónicos. Las lacasas pueden oxidar compuestos no fenólicos con un

potencial de ionización relativamente bajo, mientras que los no fenólicos de alto potencial de ionización son oxidados por LiP y MnP (Srinivasan y col. 1995).

Las manganeso peroxidadas (MnP; EC1.11.1.13) son enzimas extracelulares oxido-reductasas, con potencial para oxidar a la lignina, sustancias húmicas y varios compuestos orgánicos contaminantes. Esta característica hace que estas enzimas sean consideradas atractivas en la aplicación biotecnológica, por ejemplo en el tratamiento de aguas residuales, blanqueamiento de pulpa, remoción de: lignino sulfonas, sustancias húmicas, residuos de plantas en la lana de ovejas, así como en la eliminación de compuestos químicos peligrosos (Nüske y col. 2002). Estas enzimas son ampliamente encontradas en basidiomicetos y su producción es regulada por la concentración de Mn^{2+} (D'Souza y col. 1999).

Las lignin peroxidadas (LiP; EC 1.11.1.14.) son glicoproteínas que contiene un grupo hemo (Ward y col. 2002), estas enzimas participan en la depolimerización extracelular de la lignina en hongos de pudrición blanca (Guillén y col. 2000). La habilidad de la LiP en la degradación de la lignina es atribuida, en parte, a su potencial redox, que se reporta como alto comparado con otras peroxidadas. Esta habilidad de LiP para catalizar las reacciones normalmente no está asociada con otras peroxidadas, en particular la oxidación de sustancias no fenólicas. Se ha reportado que LiP puede oxidar compuestos aromáticos con un potencial de ionización calculado en valores cercanos a 9.0 electrón Volts (Ward y col. 2002).

Las lacasas (bencenodiol: oxígeno oxido-reductasas EC 1.10.3.2) pertenecen a un grupo de enzimas que catalizan la oxidación de un gran número de compuestos fenólicos y aminas aromáticas usando oxígeno como aceptor de electrones, que es reducido a agua (Muñoz-Guillén y col. 1997). Las lacasas se han encontrado principalmente en hongos de pudrición blanca, aunque también son producidas por bacterias, insectos y plantas (Galhaup y col. 2002). El propósito fisiológico de la lacasa en plantas es biosintético y en hongos es degradativo de la lignina (Giardina y col. 1995). La lignina es el segundo polímero orgánico más abundante y renovable en la tierra, es el principal componente de la madera (D'Souza y col. 1999) y es el

polímero aromático más importante en la naturaleza, con el 40% de la energía solar captada por las plantas (Leonowicz y col. 1999).

La lignina es un polímero complejo tridimensional compuesto por subunidades de fenilpropano interconectados por diferentes enlaces carbono-carbono y carbono-oxígeno-carbono (Gardina y col. 1995). Leonowicz y col. (1999) reportaron la estructura de la lignina basándose en estudios de resonancia magnética nuclear realizados en 1974 por Nimz y Glasser a partir de lignina de angiosperma (Figura 3).

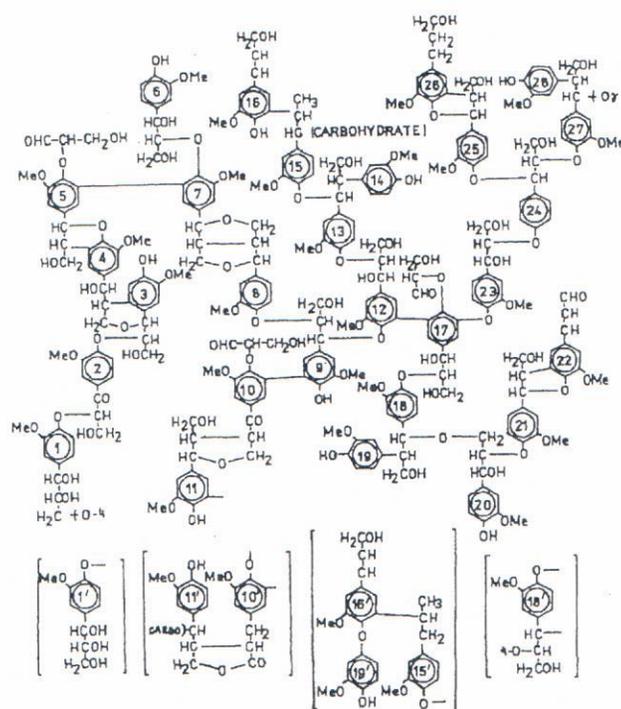


Figura 3. Estructura química de la lignina (Leonowicz y col. 1999)

También es conocida la participación de las lacasas y las celobiosa deshidrogenasas en la formación de pigmentos que caracterizan los cuerpos fructíferos de los hongos y en la síntesis de agentes antimicrobianos. Temp y Eggert (1999) reportaron la formación de un pigmento en presencia de un precursor, el ácido 3-hidroxiantranílico que fue oxidado a ácido cinabárico por

la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* durante la fructificación en un medio que contenía celulosa y celobiosa (Figura 4).

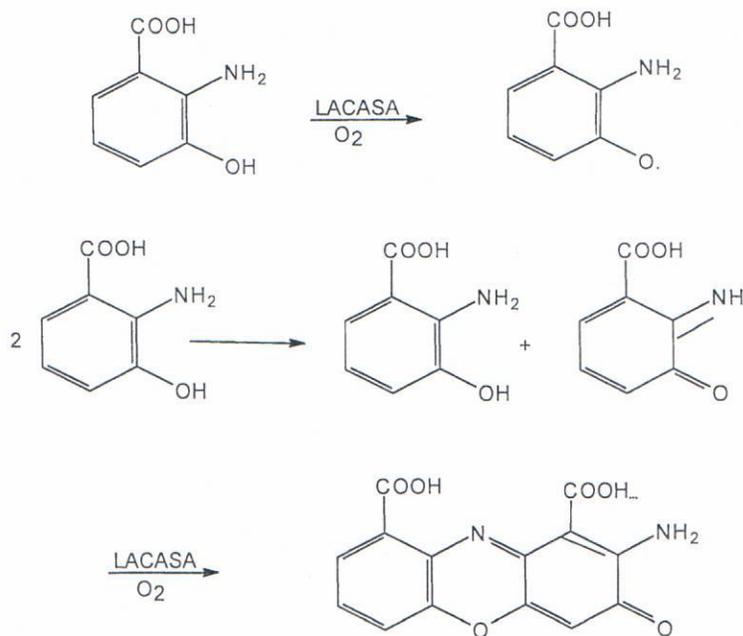
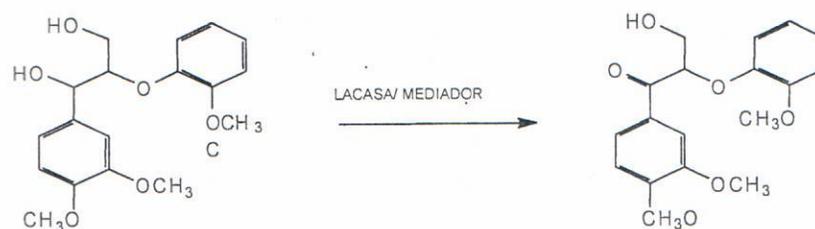
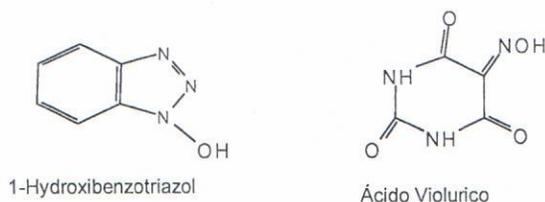


Figura 4. Oxidación del ácido 3-hidroxiantránico a ácido cinabárico en presencia de lacasas de *Pycnoporus cinnabarinus* y celobiosa dehidrogenasa (Temp y Eggert, 1999).

Específicamente, las lacasa fúngicas catalizan sobre una amplia gama de sustratos con características químicas similares al *p*-difenol y se conocen reacciones de polimerización, depolimerización, metilación y dimetilación de compuestos fenólicos (Edens y col. 1999). Recientemente se ha demostrado que las lacasas fúngicas también pueden degradar compuestos no fenólicos de la lignina en presencia de ciertos compuestos llamados mediadores como sustratos artificiales y metabolitos fúngicos. Un ejemplo es el caso de la oxidación de 1-(3,4-dimetoxifenil)-2-(2-metoxifenol) propano-1,3 diol (Figura 5) en presencia de mediadores como el 1-hidroxibenzotriazol (1-HBT) y ácido violúrico (Li y col. 1999).



1-(3,4-dimetoxifenil)-2-(2-metoxifenol) propano-1,3 diol



1-Hydroxibenzotriazol

Ácido Violúrico

Figura 5. Oxidación de 1-(3,4-dimetoxifenil)-2-(2-metoxifenol) propano-1,3 diol a través de lacasas fúngicas en presencia de mediadores como el 1-hidroxibenzotriazol y ácido violúrico (Li y col. 1999).

Las lacasas contienen comúnmente en su sitio activo cuatro átomos de cobre de tres diferentes tipos T1, T2 y T3 (Edens y col. 1999). El centro T1 oxida al sustrato y transfiere los electrones generados a un grupo trinuclear formado por un centro T2 y dos centros T3 (Messerschmidt y Huber 1990), en éste se lleva a cabo la reducción del oxígeno molecular a agua (Xu, 1997). La adición de agentes quelantes, como azida de sodio, cianuro de potasio o EDTA, a una mezcla de reacción catalizada por lacasa provoca una inhibición irreversible, lo que sugiere que los átomos metálicos centrales participan en la catálisis (Edens y col. 1999). En la **figura 6** se muestran los tipos de cobre (representados por esferas) presentes en una lacasa de *Coprinus cinereus* expresada en *Aspergillus oryzae* que fue cristalizada y determinada su estructura tridimensional (Ducros y col. 2001).



Figura 6. Representación tridimensional de una lacasa de *Coprinus cinereus* (Ducros y col. 2001)

Las reacciones catalizadas por una lacasa sobre sustratos fenólicos, consisten en la oxidación de un electrón convirtiendo el anillo fenólico en un radical libre arilo. Estas especies químicas activas pueden ser convertidas a quinonas en un segundo paso de la oxidación y la quinona, producto de los radicales libres, puede sufrir una polimerización no enzimática (Durán y col. 2002). En la **figura 7** se muestra la formación de radicales libres del 3-cloro-4-hidroxibifenil catalizado por una lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* (Schultz y col.2001).

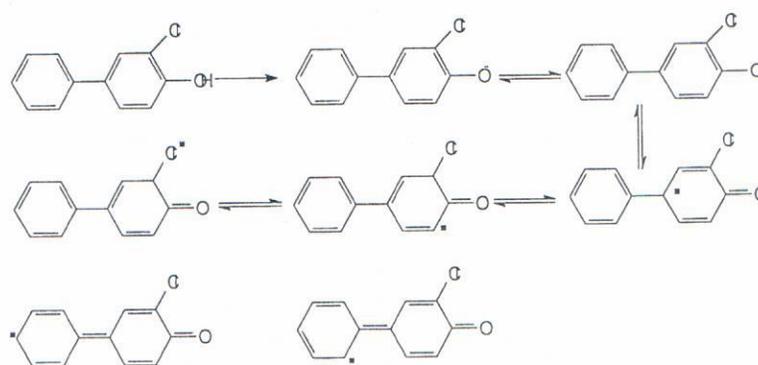


Figura 7. Formación de radicales libres en una reacción catalizada por lacasa (Schultz y col. 2001).

1.3. Técnicas de purificación de proteínas

1.3.1. Isoelectroenfoque

El isoelectroenfoque es una técnica de separación de anticuerpos, antígenos y enzimas no desnaturalizante, lo que permite conservar sus características y actividades biológicas. Esta técnica de alta resolución separa proteínas que difieren en puntos isoeléctricos, está basada en el hecho de que las proteínas poseen una carga neta dependiente del pH, ésta es determinada por la secuencia de aminoácidos de la proteína y el pH ambiental. Cuando una proteína está bajo la influencia de una diferencia de potencial en un gradiente de pH establecido, ésta puede migrar hasta encontrar el pH donde la carga neta de la proteína sea cero, a este valor de pH se le denomina punto isoeléctrico (P.I.).

Los anfolitos son sustancias empleadas para establecer un gradiente de pH desde el ánodo y el cátodo. Cuando se aplica un voltaje al sistema de anfolitos y proteínas, todos los componentes migran a sus respectivos P.I.s. Los anfolitos rápidamente establecen un gradiente de pH y se mantiene por períodos largos de tiempo que permiten a la proteína moverse lentamente.

Una proteína con carga neta positiva, en una región particular de pH, migrará hacia el cátodo. En algún punto del gradiente la carga neta de la proteína será igual a cero, en ese momento la proteína dejará de migrar. De forma similar sucederá con una proteína con carga neta negativa, sólo que ésta migrará hacia el ánodo (Bio-Rad Laboratorios, 2002).

1.3.2. Electroforesis

La electroforesis consiste en una separación de moléculas con una carga neta al desplazarse en un campo eléctrico a través de un material poroso. Este método permite separar proteínas y otras macromoléculas, tales como DNA y RNA. La velocidad (v) de migración de una proteína (o de cualquier otra molécula) en un campo eléctrico depende de la fuerza del campo (E), de la carga neta de la proteína (z) y del coeficiente de fricción (f). La velocidad de

La migración de una proteína separada por electroforesis puede representarse mediante la siguiente ecuación:

$$v = \frac{Ez}{f}$$

La fuerza eléctrica (Ez) que conduce la molécula cargada hacia el electrodo con signo opuesto sufre la resistencia (fv), debida a la fricción viscosa entre la molécula que se desplaza y el medio de desplazamiento. El coeficiente de fricción depende tanto de la masa y de la forma de la molécula que emigra, como de la viscosidad (η) del medio. Para una esfera de radio (r) aplica la siguiente ecuación:

$$f = 6\pi\eta r$$

Las separaciones electroforéticas se realizan casi siempre sobre geles en vez de disoluciones libres, por dos razones principales. La primera, los geles suprimen las corrientes de convección producidas por pequeños gradientes de temperatura, lo cual es un requerimiento para una separación más efectiva. La segunda, los geles sirven de tamices moleculares que potencian la separación. Las moléculas más pequeñas que los poros del gel se desplazan fácilmente a través de él, mientras que las moléculas de mayor tamaño que los poros del gel permanecen casi inmóviles. Las moléculas de tamaños intermedios se desplazan a través del gel con diversos grados de dificultad (Stryer, 2001).

Los geles de poliacrilamida (PAGE) son los soportes de elección para la electroforesis de proteínas, porque son químicamente inertes y se forman con facilidad mediante polimerización de la acrilamida (**Figura 8**). Además, escogiendo distintas concentraciones de acrilamida, metilbisacrilamida (un reactivo que establece enlaces cruzados) y variando los tiempos de polimerización se pueden conseguir diversos tamaños de poro controlados. Los sistemas de electroforesis pueden ser de dos formas: continuos y discontinuos. En los sistemas continuos la concentración del gel es la misma en toda la superficie, a diferencia del sistema discontinuo en que un gel de diferente concentración se coloca sobre otro. Esta diferencia de concentraciones compactará la muestra antes de entrar a la zona de separación para evitar que la muestra se difunda (Allen, 1984).

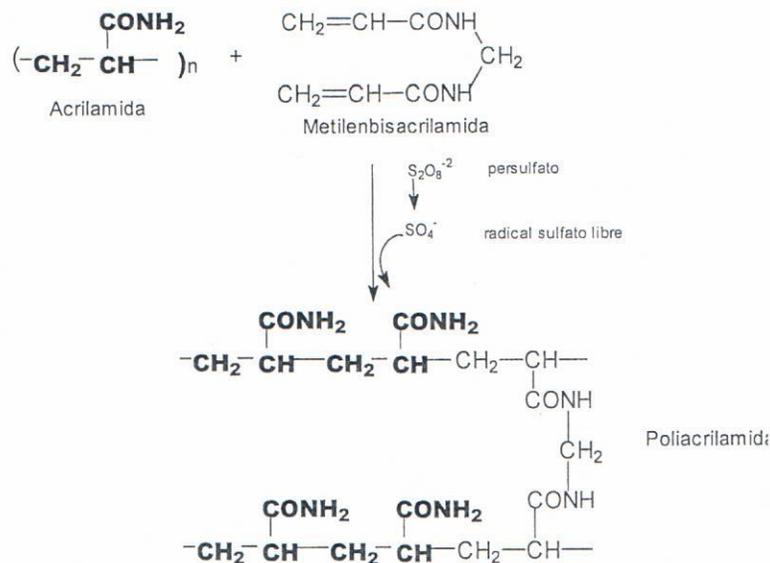


Figura 8. Formación de un gel de poliacrilamida

Las proteínas pueden separarse muy bien, según sus masas moleculares, utilizando electroforesis sobre gel de poliacrilamida, en condiciones desnaturalizantes, que consiste en una mezcla de proteínas en un medio con dodecil sulfato de sodio (SDS), un detergente aniónico capaz de romper casi todas las interacciones no covalentes de las proteínas nativas. También se añade 2-β mercaptoetanol o ditioneitol para reducir los puentes disulfuro. Los aniones de SDS se unen a la cadena principal a razón de un SDS por cada dos aminoácidos, lo que da al complejo SDS-proteína desnaturalizada carga negativa aproximadamente proporcional a la masa de la proteína. Al ser la carga negativa, adquirida por la fijación de SDS, muy superior a la carga de la propia proteína nativa, esta carga se considera despreciable. Los complejos SDS-proteína se someten entonces a electroforesis sobre gel de acrilamida, que normalmente se utiliza como un bloque delgado dispuesto verticalmente. La dirección de la electroforesis es vertical descendente. Las proteínas pequeñas se desplazan rápidamente a través del gel, mientras que las grandes permanecen arriba, cerca del punto de aplicación de la mezcla. El desplazamiento de la mayoría de las cadenas polipépticas es, en estas condiciones, linealmente proporcional al logaritmo de su masa. Pueden distinguirse

proteínas que difieran en su masa sólo en un 2%, por ejemplo 40 y 41 KDa, lo que supone una diferencia aproximada de 10 residuos de aminoácidos. Por último, las proteínas pueden visualizarse sobre el gel tiñéndolas con plata o un colorante tal como el azul de Coomasie, que revela una serie de bandas. Cuando se tiñe con azul de Coomasie es necesario una cantidad de 0.1 µg de proteína (~2 moles) para diferenciar una banda, mientras que con la tinción de plata se necesita cantidades menores (0.02 µg de proteína) (Stryer, 2001)

1.3.3. Cromatografía.

Gran parte de la bioquímica moderna se basa en la utilización de los métodos como la cromatografía, que comprenden el paso de una solución (la fase móvil) a través de un medio (fase estacionaria) que presenta una porción selectiva para distintos componentes. La rapidez con la que pasa cada componente de la fase móvil depende de manera inversa de la fuerza con la que interactúe con la fase estacionaria. La cromatografía consiste en llenar una columna con un material que pueda adsorber las moléculas de modo selectivo debido a alguna diferencia de su estructura química. Inicialmente se humedece la columna con la solución amortiguadora adecuada. A continuación, se coloca la mezcla de las moléculas que se van a separar en la parte superior de la columna y se hace pasar lentamente a lo largo de la columna una solución amortiguadora. Se toman fracciones, utilizando un recolector automático de fracciones, mientras continúa este proceso de elusión (paso a través de la columna). Algunas moléculas sólo se adsorben débilmente o no se adsorben en absoluto, y son las primeras que eluyen. Las que se adsorben con más intensidad son las últimas en eluir. En ocasiones debe modificarse la composición de la solución amortiguadora durante la elusión para eliminar las moléculas ligadas con más fuerza. El material de la columna utilizado y el método de elusión dependen del fundamento que desee utilizarse para la separación.

1.3.3.1. Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico se utiliza para separar las moléculas de acuerdo con su carga eléctrica. Se utilizan resinas de intercambio iónico, que son polianiones o policationes. Supongamos que deseamos separar tres clases de moléculas, una de las cuales está cargada negativamente, otra con una carga positiva débil y la tercera con una carga positiva fuerte. Puede utilizarse para el material de la columna una resina aniónica, que lleva grupos cargados negativamente. Las moléculas de la mezcla cargadas negativamente pasarán a través de la resina sin adsorberse y se encontrarán en las fracciones iniciales. Los dos tipos de moléculas con carga positiva serán ligadas por la resina, aunque las de la carga positiva débil quedarán fijadas con menor fuerza. Dado que los aumentos de concentración salina tienden a romper las interacciones electrostáticas de este tipo, pueden utilizarse gradientes de concentración de sales una vez recogidas las primeras fracciones. Es decir, se incrementa gradualmente la concentración salina de la solución amortiguadora eluyente. A medida que aumenta la concentración salina, los iones de sodio pueden competir cada vez mejor por los lugares negativos en la resina. A continuación eluirán los cationes fijados débilmente y los fijados intensamente con fuerte carga positiva, solo eluirán con la concentración salina más elevada (Mathews y col. 2002).

1.3.3.2. Cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad es una clase de cromatografía más específica, ideal para aislar una o pocas proteínas de una mezcla compleja. Muchas proteínas presentan interacciones bastante fuertes con otras moléculas, por ejemplo las interacciones de las enzimas con análogos de sus sustratos o con cofactores. Las moléculas adecuadas acopladas de modo covalente a una matriz inerte, actuarán como “anzuelos” moleculares para captar la proteína deseada. Todas las proteínas restantes simplemente pasarán a través de la columna. Las moléculas proteicas capturadas pueden liberarse posteriormente eluyendo la columna con una solución amortiguadora que contenga copias de las moléculas “anzuelo” o algún otro reactivo que pueda romper la interacción. En una variante de este método, se acoplan a la resina

anticuerpos para una sustancia concreta y proporciona una retención muy específica del producto deseado.

1.3.3.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC: High Performance Liquid Chromatography)

Con ésta nueva técnica se utilizan presiones de 2000 a 3000 psi para hacer que las soluciones pasen rápidamente a través de la resina. Este nivel de presión ha requerido el desarrollo de resinas no compresibles y columnas metálicas fuertes en la que se lleva a cabo el proceso. La cromatografía solía ser un proceso lento. Con los procedimientos habituales sólo se aplicaba una pequeña presión hidrostática para hacer que los fluidos pasaran a través de la columna y la elusión requería varias horas. Este proceso no sólo precisaba mucho tiempo sino que en ocasiones era perjudicial para los productos sensibles. Además, la muestra tendía a esparcirse, debido a la difusión, a medida que bajaba a lo largo de la columna. Cuanto más duraba el experimento, más grave era la extensión y quedaba afectada la resolución de los componentes. De este modo, las separaciones que anteriormente precisaban horas, en la actualidad pueden realizarse en minutos y con una resolución más elevada (Mathews y col. 2003).

1.3.3.4. Cromatografía de filtración en gel

La filtración en gel es un tipo de cromatografía en el que la base de la separación es el tamaño molecular en lugar de las propiedades químicas. En consecuencia, suele ser una alternativa a la sedimentación. A menudo, constituye un método adecuado para separar las macromoléculas de tamaño diferente o para eliminar los contaminantes de peso molecular bajo de las disoluciones de moléculas grandes.

El aparato para la filtración en gel es muy similar al descrito para la cromatografía en columna. Se llena con esferas de un material poroso, normalmente un polisacárido entrecruzado. Se elige la porosidad del gel de modo que las moléculas más pequeñas de la muestra pueden penetrar en las esferas, mientras que las mayores no pueden hacerlo. La

muestra se aplica en la parte superior de la columna, como en la cromatografía, y se eluye con un amortiguador. A medida que la muestra desciende por la columna, las moléculas más grandes se mueven rápidamente, ya que no pueden entrar en las esferas del gel y sólo pueden fluir por los intersticios que hay entre ellas. Las moléculas más pequeñas pueden entrar en las esferas de gel y en consecuencia se rezagan (Stryer 2001).

1.4. Fermentación

Según el organismo y sus condiciones de crecimiento, la vía de la glucólisis puede cumplir distintas funciones. En muchos microorganismos que viven en condiciones anaeróbicas, sirve como la principal vía productora de energía por catabolismo de los carbohidratos, lo que da por resultado la formación de productos metabólicos finales específicos, como etanol, ácido láctico y glicerol. Este tipo de proceso suele llamarse fermentación. Existen muchas otras vías de fermentación, cada una de las cuales brinda un producto final específico, pero muchas son variantes o derivaciones de la vía glucolítica. El término fermentación es mucho más general, pues sólo implica que el sustrato inicial se degrada anaeróbicamente. En los animales, la producción de lactato por glucólisis anaeróbica es base de procesos tan importantes como proveer energía para la contracción en el músculo esquelético cuando escasea el oxígeno. En condiciones aeróbicas, las reacciones de glucólisis comprenden la fase inicial de la degradación de carbohidratos, que luego se enlazan con otra serie de reacciones de suma importancia, llamada ciclo del ácido cítrico (Bohinski, 1991).

La fermentación, comúnmente, está considerada como un proceso para la producción de alcohol, sin embargo, se trata de un proceso más amplio que comprende un cambio metabólico causado por microorganismos que actúa sobre materiales orgánicos (Bailey y Bailey, 1995) La fermentación es uno de los procesos bioquímicos más antiguos y en la actualidad se sigue usando para la fabricación de bebidas alcohólicas, pan, quesos, fármacos, antibióticos, hormonas, entre otros.

La mayoría de las fermentaciones industriales en la sociedad occidental han utilizado y desarrollado la denominada “fermentación en medio líquido” o “sumergida (FML). Sin embargo, existe otra técnica general de fermentación denominada “fermentación en medio sólido” (FMS), que se ha usado tradicionalmente para la manufactura de varios productos como el pozol que se produce en algunas áreas de México por la fermentación del maíz y quesos madurados de tipo Roquefort y Camembert en Francia. En el ámbito industrial se le da aplicación a la FMS para la producción de enzimas de uso en la tecnología de alimentos, diagnóstico clínico, análisis químico, producción de metabolitos como ácidos de gran demanda industrial como el cítrico, gálico, glucónico, antibióticos y proteínas de origen microbiano (Díaz-Godínez, 1997).

1.4.1. Fermentación sólida y sumergida

La fermentación en estado sólido (FMS) es un proceso microbiológico que ocurre, en su mayor parte sobre la superficie de un material sólido, éste tiene la propiedad de absorber o contener agua con los nutrimentos solubles (Viniegra-González, 1997). El material sólido puede ser biodegradable como el bagazo de caña (Trejo-Hernández y col. 1991; Solís-Pereira y col. 1993; Acuña-Argüelles y col.1995), la pulpa de café (Antier y col. 1993) y celulosa, entre otros, o inerte como el poliuretano (Díaz-Godínez, 1997; Romero-Gómez y col. 2000). Uno de los requerimientos para la FMS es crecer al microorganismo sobre un soporte impregnado de un medio nutritivo y que no se vea limitado por oxígeno.

La fermentación sumergida (FML) o fermentación en estado líquido, incluye una gran variedad de procesos microbiológicos con agitación y sin agitación, donde la biomasa está rodeada completamente por el medio de cultivo líquido. Las principales diferencias entre la FMS y FML son:

- La mezcla y difusión de sustratos y productos con relación a la biomasa, es muy insignificante para la FMS (Viniegra-González, 1997).
- La solubilidad y difusión de oxígeno y otros gases no polares es muy grande en FMS (Viniegra-González, 1997).

- La conducción de calor es muy pequeña en FMS (Viniegra-González, 1997).
- El contenido de agua libre es pequeño en FMS (Viniegra-González, 1997).
- La recuperación de los metabolitos se facilita en FML (Viniegra-González, 1997).
- Existe mayor control de pH, temperatura y actividad de agua en FML (Viniegra-González, 1997).
- La FML permite cuantificar directamente la biomasa (Díaz-Godínez y col. 2001; Viniegra-González y col. 2003).
- Se ha reportado mayor rendimiento de enzimas para FMS (Díaz-Godínez y col. 2001; Viniegra-González y col. 2003).
- Se ha observado menor sensibilidad a la represión catabólica por glucosa de enzimas en FMS (Díaz-Godínez y col. 2001; Viniegra-González y col. 2003).
- En algunos casos se han reportado mayor estabilidad de la enzimas en FMS (Alazard y Raimbault, 1981; Acuña-Argüelles y col 1995)

2. ANTECEDENTES

Las enzimas lacasas son producidas por una gran variedad de hongos de pudrición blanca, son enzimas constitutivas, sin embargo pueden ser inducidas por cobre (Palmieri y col 2000) o medios ricos en nitrógeno (D'Souza y col 1999). Éstas se presentan en diversas isoformas con diferentes propiedades fisicoquímicas como: peso molecular, puntos isoelectricos y contenido de carbohidratos. En algunas especies la adición de inductores al medio de cultivo resulta en la biosíntesis de nuevas isoformas extracelulares (Durán y col. 2002).

Con relación a la inducción de lacasas, D'Souza y col. (1999) realizaron estudios comparativos sobre la producción de enzimas degradativas de la lignina de *Ganoderma lucidum* en donde variaron las concentraciones iniciales de nitrógeno desde 2.4 mM hasta 24 mM, en presencia de sustratos naturales como pino o roble, además de glucosa y celulosa como fuente de carbono. La actividad lacasa fue medida con 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) como sustrato. Una unidad lacasa fue expresada como los micromoles de sustrato transformados por segundo. Los resultados mostraron que las lacasas de *Ganoderma lucidum* son las únicas que presentaron actividad a diferencia de las LiP y MnP. Cuando la concentración de la fuente de nitrógeno fue alta, los niveles de actividad lacasa después de siete días de cultivo fueron altas (50 UI/L aproximadamente) en comparación con concentraciones bajas de nitrógeno, en donde la actividad lacasa fue muy baja (<10 UI/L). Esto demuestra que las lacasas de *Ganoderma lucidum* fueron estimuladas en medios ricos de nitrógeno con glucosa como fuente de carbono (D'Souza y col. 1999).

En otro estudio, Palmieri y col. (1997) demostraron la producción de múltiples isoenzimas lacasas de hongos basidiomicetes de pudrición blanca, específicamente de *Pleurotus ostreatus* (cepa *Florida*). En este trabajo encuentran dos isoenzimas lacasa POXA1 y POXA2 y determinan sus propiedades físicas y químicas. La masa molecular fue determinada por SDS-PAGE, los valores encontrados para POXA1 y POXA2 fueron de 61 kDa y 67 kDa, respectivamente. Los valores de masa molecular obtenidos por cromatografía de filtración en gel muestras valores de 54 kDa y 59 kDa, respectivamente. Los puntos isoelectricos para

POXA1 y POXA2 fueron de 6.7 y 4.0, respectivamente. La actividad lacasa fue estudiada en función de la temperatura utilizando ABTS, guayacol, 2,6-dimetoxifenol (DMP) y siringaldazina. La isoenzima POXA1 mostró la máxima actividad en un intervalo de 45-65°C y POXA2 tuvo intervalos inferiores de temperatura, con valores de actividad máxima entre 25-35°C (Palmieri y col. 1997).

Hablik y Schinner (2000) purificaron una isoforma lacasa de *Pleurotus ostreatus* cepa RK 36 que fue inducida por la adición de ácido ferúlico al medio de cultivo. La enzima presentó un peso molecular de 67 KDa y un punto isoelectrico de 3.6. Los centros de cobre fueron identificados por espectrometría encontrando T1 que mostró un pico de absorbancia a 604 nm, responsable del color azul de la enzima. También reportó un pico de absorbancia a 324 nm que sugiere la presencia de T3 que forma un centro binucleado. La actividad de la enzima fue estable en un rango de pH de 5-9 con siringaldazina como sustrato y una temperatura óptima de actividad de 50°C. La enzima purificada y caracterizada fue inmovilizada por enlaces covalentes en un soporte comercial Eupergit (marca registrada) para la eliminación continua del DMP en solución acuosa (1mM).

Tinoco y col. (2001) purificaron y compararon ocho isoformas lacasas producidas por fermentación sólida bajo las mismas condiciones del medio de cultivo, de las cuales seis fueron de diferentes cepas de *Pleurotus ostreatus*, una de *Coriolopsis gallica* y otra de *Trametes versicolor*. Reportaron diferencias significativas entre las lacasas con respecto a la afinidad de la enzima (K_m) por los sustratos (siringaldazina, ABTS y guayacol) independientemente de la cepa y la especie (Tabla 1). Todas las cepas de *P. ostreatus* mostraron un pH óptimo de actividad de 5.0 utilizando siringaldazina como sustrato, así como una temperatura de máxima actividad entre 30 y 40°C. En contraste, las lacasas de *C. gallica* y *T. versicolor* mostraron alta sensibilidad al pH y la temperatura máxima de actividad fue de 70 y 50°C, respectivamente. Los autores atribuyen las variaciones a las diferencias en los niveles moleculares que afectan significativamente a la catálisis.

Tabla 1. Diferencias catalíticas de lacasas de diversas cepas de *Pleurotus ostreatus* y otros hongos ligninolíticos (Tinoco y col. 2001, modificada)

Cepa	Siringaldazina	ABTS	Guayacol
	Km ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	Km ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	Km ($\mu\text{mol l}^{-1}$)
<i>P. ostreatus</i> ATCC58053	14	80	1.3
<i>P. ostreatus</i> IE 8	52	9	6.6
<i>P. ostreatus</i> UAMH 7972	46	69	0.8
<i>P. ostreatus</i> UAMH 7980	30	8	0.9
<i>P. ostreatus</i> UAMH 7988	15	19	0.5
<i>P. ostreatus</i> UAMH 7992	12	48	4.6
<i>C. gallica</i> UAMH 8260	9	52	1.0
<i>T. versicolor</i> UAMH 8272	15	59	0.5

Múltiples isoformas de lacasas con diversas características fisicoquímicas han sido purificadas. En la **tabla 2** se resumen las características más importantes de las enzimas lacasas de diversos ascomicetos y basidiomicetos. Se han identificado isoformas de pesos moleculares desde 55 hasta 190 KDa; así como puntos isoeléctricos desde 3.0 hasta 6.4; temperaturas óptimas de actividad para diversos sustratos que van desde 22 °C hasta 50 °C; y pHs óptimos para diversos sustratos desde 2.5 hasta 8.0. También se ha reportado la capacidad de una isoforma de *Lentinula edodes* para transformar algunos colorantes como el azul brillante R, Azul de bromofenol, Rojo de metilo, Negro azul naftol, entre otros (Nagai y col. 2002).

Tabla 2. Isoformas de lacasas purificadas en diversos organismos

Organismo	Clasificación	Isoformas	Peso molecular	P.I.	Sustrato	Km (μ M)	V _{max}	pH óptimo	Temp. óptima 50 °C	Características	Referencia
<i>Trametes sp. cepa AH28-2</i>	Basidiomiceto	una	62KDa	4.2	Guayacol ABTS DMP	420 25 25.5	66.8 μ M/min mg 670 μ M/min mg 79 μ M/min mg	4.5	40°C	Estable a pH de 4.2-8.0	Xiao y col. 2003
<i>Mauginiella sp.</i>	Ascomiceto	una	67KDa	6.4	ABTS Guayacol DMP Siringaldazina	-- -- -- --	no determinada no determinada no determinada no determinada	2.5 4.0 3.5 --	40°C -- -- --	-----	Palonen y col. 2003
<i>Melanocarpus albomyces</i>	Ascomiceto	una	80KDa	4.0	Guayacol Siringaldazina ABTS	-- -- --	no determinada no determinada no determinada	5-7.5 6-7 3-5	-- -- --	Estable de 60-70 °C	Kiiskinen y col. 2002
<i>Lentinula edodes</i>	Basidiomiceto	una Lcc I	72.2KDa	3.0	ABTS P-fenilendiamina DMP Guayacol Ac. fértico	108 256 557 917 2860	604 μ M/min mg 0.71 μ M/min mg 0.55 μ M/min mg 2.14 μ M/min mg 0.10 μ M/min mg	4.0 5.0 4.0 4.0 5.0	40°C 40°C 40°C 40°C 40°C	Capaz de decolorar : azul brillante R, azul de bromofenol, rojo de metilo, negro azul de naftol, entre otros	Nagai y col. 2002
<i>Coriolopsis rigida</i>	Basidiomiceto	dos Lac I Lac II	55Kda 66KDa	3.9 3.9	ABTS DMP ABTS DMP	12 328 11 348	no determinada no determinada no determinada no determinada	2.5 3.0 2.5 3.0	de 22 a 25°C	Inducida con cobre y estable a pH de 6-10	Saparrat y col. 2002
<i>Ganoderma lucidum</i>	Basidiomiceto	tres GalC 1 GalC 2 GalC 3	de 65-68 KDa	-- -- --	----- ----- O-toluidina ABTS	-- -- 401.6 3.7	no determinada no determinada 0.0190D/minU 0.01420D/minU	3.5 3.5 3.5	20°C 20°C 20°C	-----	Ko y col. 2001
<i>Gaumannomyces graminis</i>	Ascomiceto	una	190KDa	5.1	DMP	2.6X10 ⁻²	no determinada	4.5	23°C		Edens y col. 1999
<i>Chaetomium thermophilum</i>	Ascomiceto	una	77KDa	5.1	Siringaldazina	--	no determinada	6.0	---	Estable a 70°C	Chefetz y col. 1998
<i>Panaeolus sphinctrinus</i>	Basidiomiceto	una	60 KDa	3.5	ABTS DMP	32.4	no determinada no determinada	3.0 7.0	22°C	-----	Heinzkill y col. 1998

Tabla 2. Isoformas lacasas purificadas en diversos organismos (Continuación)

Organismo	Clasificación	Isoformas	Peso molecular	P.I.	Sustrato	Km (μ M)	V _{max}	pH óptimo	Temp óptima	Otros	Autor
<i>Panaeolus papilionaceus</i>	Basidiomiceto	una	60	3.6	ABTS DMP	50.6	no determinada no determinada	3.0 8.0	22°C	-----	Heinzkill y col. 1998
<i>Coprinus fr-iessi</i>	Basidiomiceto	una	60	3.5	ABTS DMP	41.4	no determinada no determinada	5.0 8.0	22°C	-----	Heinzkill y col. 1998
<i>Polyborus pinsistus</i>	Basidiomiceto	una	60	3.5	ABTS DMP	22.3		3.0 5.0	22°C	-----	Heinzkill y col. 1998
<i>Coriolus hirsutus</i>	Basidiomiceto	una	55Kda	4.0	K ₄ Fe(CN) ₆ Catecol Guayacol Hidroquinona Eugenol Ac Sinapínico	167.6 145.6 62.9 61.1 44.9 24.0		3.5 4.5 -- -- -- --	25°C 25°C 25°C 25°C 25°C 25°C	Inducida con siringaldazina	Koroljova-Skorobogat'ko y col. 1998
<i>Phanerochaete flavida-alba</i> FP106507	Basidiomiceto	una	94	3.5	ABTS DMP Siringaldazina	740	15.4nmol/minµg	3.0	30°C	Confusión entre <i>P. flavida alba</i> y <i>P. chrysosporium</i>	Pérez y col. 1996

ABTS: 2,2'-azino-bis(3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)

DMP: 2,6 dimetoxifenol

P.I.: Punto isoelectrico

Km: Constante de Michaelis-Menten

V_{max}: Velocidad máxima

3. JUSTIFICACIÓN

Las enzimas lacasas pueden ser excretadas por un gran número de hongos de pudrición blanca entre ellos *Pleurotus ostreatus*. Éstas se pueden presentar en diferentes isoformas aún en el mismo organismo y pueden presentar muy diversas características entre ellas. El conocimiento de los factores que inducen la excreción de las enzimas lacasas no es muy claro. Para poder entender dichos mecanismos se requiere de la caracterización físico-química de la enzima así como también determinar los parámetros de crecimiento del hongo productor de la enzima durante la fermentación. La caracterización de la enzima nos permitirá considerar la posibilidad de su utilización en procesos de biorremediación, la caracterización de la fermentación permitirá proponer la optimización de medios de cultivo para mejorar la producción de la enzima. Por lo que en este trabajo se purificó y se caracterizó una isoforma lacasa de *Pleurotus ostreatus* producida por fermentación líquida para poder predecir su posible aplicación en la degradación de los polifenoles o la conversión de productos empleados en la industria.

Por lo anterior en el presente trabajo se plantea resolver las siguientes preguntas:

¿Cuántas isoformas de lacasa produce *Pleurotus ostreatus* en ciertas condiciones de fermentación en medio líquido?

¿Cuáles son las características fisicoquímicas de la isoforma de lacasa más activa?

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Purificar y caracterizar parcialmente una isoforma de lacasa de *Pleurotus ostreatus* obtenida por fermentación en medio líquido.

4.2. Objetivos específicos

1. Producir lacasas extracelulares de *Pleurotus ostreatus* mediante fermentaciones en medio líquido.
2. Purificar y caracterizar parcialmente una isoforma de enzima lacasa conociendo: temperatura y pH óptimos de actividad, K_m , V_{max} , punto isoelectrico así como su peso molecular.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

En la **figura 9** se muestra el diagrama de flujo para la producción de lacasas por fermentación líquida de *Pleurotus ostreatus* y purificación de una isoforma lacasa.

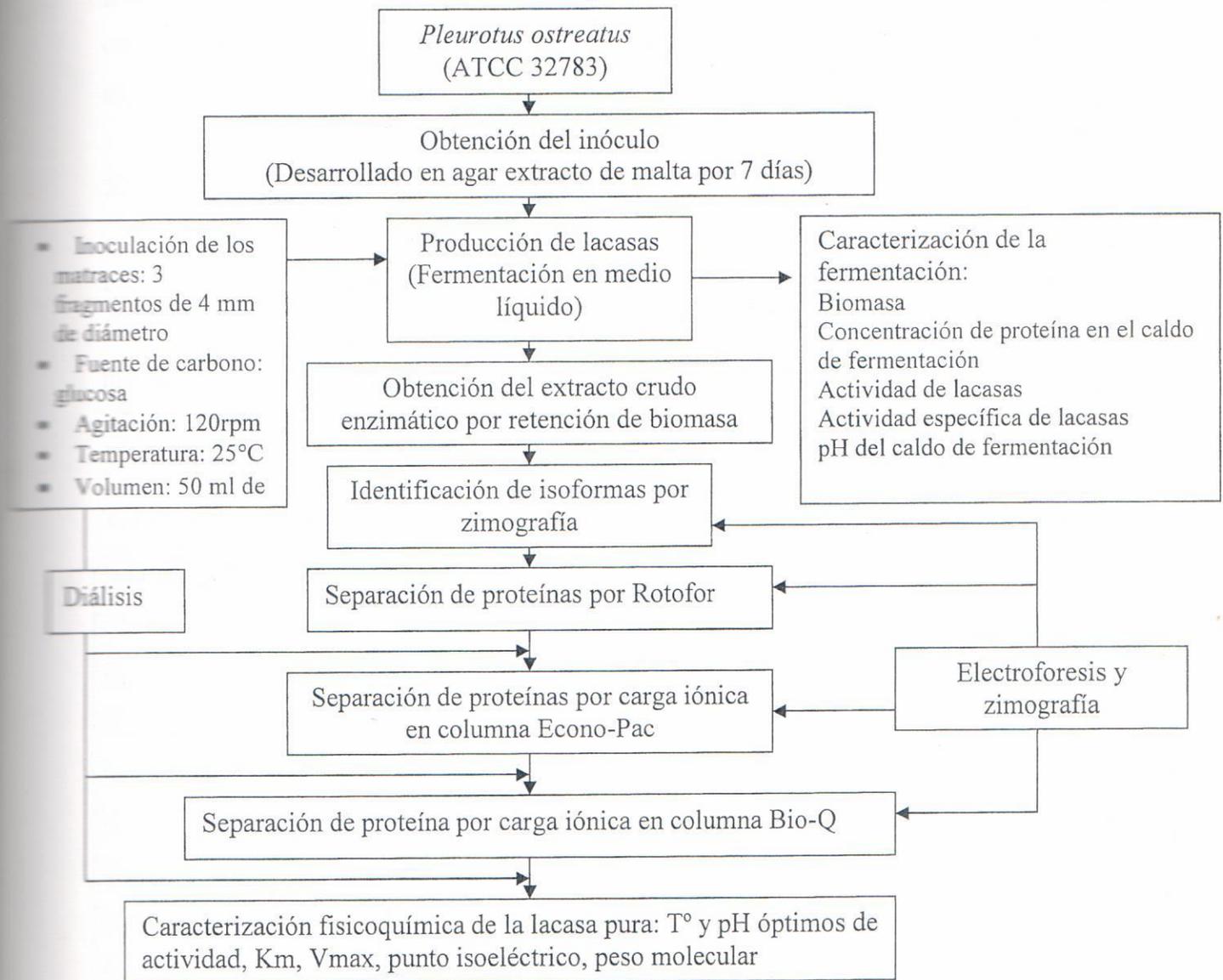


Figura 9. Diagrama de flujo para la producción de enzimas lacasas de *Pleurotus ostreatus* por FML y purificación de una isoforma.

5.1. Cepa e inóculo

Se utilizó la cepa de *Pleurotus ostreatus* 32783, de la American Type Culture Collection (Maryland, USA). La cepa stock se desarrolló en agar extracto de malta a 25°C por 7 días y se mantuvo a una temperatura de 4°C, resemebrándose cada mes. El inóculo para las fermentaciones fueron, para cada matraz, 3 fragmentos de micelio de 4 mm de diámetro cortados de la periferia de la colonia, la cual fue desarrollada en las mismas condiciones que la cepa stock.

5.2. Fermentación en medio líquido para la producción de lacasas

La fermentación en medio líquido (FML) se realizó por triplicado en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 50 ml de medio a pH 6.5, cuya composición se muestra en la **tabla 3**. Los matraces se incubaron a 25°C en agitación orbital a 120 rpm. Se tomaron muestras cada 24 h durante 19 días.

Tabla 3. Composición del medio de cultivo para la producción de lacasas de *Pleurotus ostreatus*

Componente	Cantidades (g/l)
Glucosa	10.5
Extracto de levadura	5
Sulfato de amonio	2.0
Fosfato de potasio	0.5
Sulfato de magnesio	0.5
Fosfato de calcio	0.3
Sulfato ferroso	0.02
Sulfato de zinc	0.02
Sulfato de manganeso	0.02
Sulfato cúprico	0.25

5.3. Obtención del extracto enzimático

El extracto enzimático (EE) se consideró al caldo de fermentación obtenido en cada muestreo de la fermentación por filtración a través de papel Watman No. 1, así como al obtenido después de cualquier paso de purificación y/o caracterización. Los EEs se mantuvieron en refrigeración a 4°C.

5.4. Determinación de la biomasa

La biomasa (X) producida se separó por filtración y se deshidrató en horno a 60°C durante 24 h; se reportó el peso seco (Díaz-Godínez y col. 2001; Tlecuítl-Beristain y col. 2003).

5.5. Determinación de la actividad enzimática

La actividad enzimática de lacasas (E) se determinó en cada punto de la fermentación, así como en cada paso de la purificación utilizando DMP como sustrato. La mezcla de reacción contenía 900 µl de DMP (2mM en buffer de fosfatos 0.1 M y pH de 6.5) y 100 µl de EE. La absorbancia se leyó después de 1 min de incubación a temperatura ambiente a una longitud de onda de 468 nm. Una unidad de actividad de lacasas (U) se consideró como la cantidad de enzima que provocó un incremento de una unidad de absorbancia por minuto.

5.6. Determinación de la concentración de proteína soluble

La proteína total excretada se determinó en los EE libres de células por el método de Bradford (1976). A 100 µl de EE se le adicionaron 200 µl del reactivo de Bradford, el volumen se ajustó a 1 ml con agua destilada y la absorbancia se leyó a 595 nm. Se usó albúmina sérica bovina como proteína estándar.

5.7. Identificación de isoformas con actividad de lacasas

En cada muestreo de la fermentación se determinó el número de isoformas presentes en los EE a través de zimografía. Ésta se realizó usando la técnica modificada de Leammli (1970) usando dodecil sulfato de sodio en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). El gel de separación y de empaquetamiento contenían 12 y 4% de acrilamida, respectivamente. La concentración de SDS fue de 0.1% en el gel. El buffer de la muestra contenía: 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 35% de glicerol, 0.01% de azul de bromofenol y 10% de SDS. Las muestras del EE fueron separadas en geles de 0.75 mm de espesor en un sistema de electroforesis Mini Protean III (Bio-Rad) a 150 voltios durante un tiempo de 1 a 1.25 h. Después de la corrida, los geles fueron lavados con agua destilada y desionizada con ayuda de un agitador orbital (20-30 rpm) durante 1 h, con un cambio de agua cada 15 min para eliminar el SDS y renaturalizar las proteínas. Posteriormente, los geles fueron incubados durante 24 h a temperatura ambiente en buffer de fosfatos 0.1 M a pH de 6.0 y 2 mM de DMP, donde la actividad de lacasas se mostró como bandas de color café.

5.8. Determinación de los parámetros de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* y producción de lacasa

La evolución de la biomasa $X = X(t)$ fue ajustada por la ecuación logística (1) por la minimización del error cuadrático con la herramienta Solver de la hoja electrónica de Excel (Microsoft) (Díaz-Godínez y col. 2001; Tlecuitl-Beristain y col. 2003).

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

la solución de la ecuación logística es (2):

$$X = \frac{X_{\max}}{(1 + C \exp^{-\mu t})} \dots\dots\dots (2)$$

donde μ es la velocidad específica de crecimiento, X_{\max} es el valor de biomasa máxima o de equilibrio y $C = \frac{X_{\max} - X_0}{X_0}$ con $X=X_0$.

El rendimiento teórico de la enzima con respecto a la biomasa ($Y_{E/X}$) fue estimado como la relación entre la E_{\max} (U/L) y X_{\max} (g/L). Se calculó la productividad observada en el pico máximo de actividad ($P_{RO} = E_{\max}/$ tiempo de fermentación), además de la tasa específica de formación de la enzima ($q_p = \mu Y_{E/X}$).

5.9. Purificación de una isoforma de lacasa

El EE obtenido a las 432 h de fermentación se utilizó para purificar una isoforma lacasa, realizando las operaciones que a continuación se describen.

El EE se centrifugó a 15000 rpm durante 15 min a 4°C, para eliminar partículas en suspensión, posteriormente se dializó a través de membranas Millipore (12400 Da, Sigma D9527) después de cada paso de la purificación.

El primer paso de la separación de proteínas se llevó a cabo utilizando la técnica isoelectroenfoque. Se utilizó el Rotofor (Bio-Rad) con la cámara de 60 ml de capacidad y anfolitos de pH 3-10 (Bio-Rad) Las fracciones obtenidas fueron analizadas para determinar pH, actividad de lacasa y concentración de proteína después de su diálisis.

Posteriormente, las fracciones con actividad de lacasas obtenidas del Rotofor fueron eluidas a través de una columna de intercambio iónico (Econo -Pac High Q Anion Exchange Cartridge, Bio-Rad) utilizando el equipo BioLogic LP (Bio-Rad). La muestra se eluyó a una velocidad de 1.5 ml/min con buffer 25 mM Tris HCL, pH 8.1(A) durante 3 minutos. Posteriormente se formó un gradiente de concentración de NaCl de 0-50% con 25 mM Tris HCL, pH 8.1, 0.5M de NaCl (B) por 10 minutos. Posteriormente, se mantuvo el flujo del buffer B durante 6 minutos. Finalmente, se pasó el buffer A durante 6 minutos. El tiempo de colección de las

fracciones fue de 2 min (3 ml por tubo). En cada fracción recolectada del cromatógrafo se evaluó la actividad enzimática, la concentración de proteína y se separó por zimografía.

Las fracciones con actividad de lacasas obtenidas de la cromatografía de intercambio iónico con la columna Econo-Pac se separaron por cromatografía de intercambio iónico en una columna Bio-Q (Bio-Rad). La muestra se eluyó a una velocidad de flujo de 1.5 ml/min con Buffer 50 mM Tris HCL, pH 8.1 (A) durante 3 minutos. Posteriormente se formó un gradiente de concentración de NaCl de 0-100% formado con buffer 50 mM Tris HCL, pH 8.1 con 1M de NaCl (B) por 10 minutos. Posteriormente, se mantuvo el flujo de 1ml/min del buffer B durante 6 minutos. Finalmente, se pasó buffer A durante 6 minutos. El tiempo de recolección de las fracciones fue de 2 min (3 ml por tubo). En cada fracción recolectada del cromatógrafo se midió actividad enzimática, concentración de proteína y se separó por zimografía.

Todos los EE se analizaron por electroforesis (SDS PAGE) (Laemmli, 1970) usando geles al 12% de acrilamida, utilizando un sistema de electroforesis Mini Protean III (Bio-Rad). Se usaron marcadores de peso molecular conocido: fosforilasa b 97.4 KDa; albúmina sérica bovina 66.7 KDa; ovalbúmina 45 KDa; anhidrasa carbónica 31 KDa; inhibidor de la tripsina de soya 21.5 KDa y lisosima 14.4 KDa (Low Range, Num. Catalogo 161-0314, Bio-Rad). La tinción de los geles se realizó con plata. La determinación del peso molecular se realizó mediante la ecuación lineal (3) que involucra el Rf y el logaritmo del peso molecular.

$$\text{Log}(\text{peso}_\text{molecular}) = -1.1764(Rf) + 1.9824 \dots\dots\dots (3)$$

5.10. Determinación de pH y temperatura óptimos de actividad de la lacasa pura

Se determinó el pH óptimo y temperatura óptima de actividad de la enzima lacasa pura. La actividad enzimática se evaluó a diferentes valores de pH (2, 3, 4, 4.5, 5, 6, 7 y 8) utilizando soluciones buffer de fosfatos y acetatos 0.1M. Para cada valor de pH se evaluaron diferentes temperaturas (20, 30, 40, 45, 50 y 60 °C).

3.3.3. Determinación de los parámetros termodinámicos y cinéticos de la lacasa pura

Se determinaron los parámetros termodinámicos: energía de activación (E_a), energía de desnaturalización (E_d) y el factor Q_{10} de la enzima pura a pH óptimo. Se midió la actividad enzimática a diferentes temperaturas (20, 30, 35, 40, 45, 55 y 60 °C), utilizando DMP como sustrato. Los parámetros fueron ajustados por la ecuación de Arrhenius (4) por mínimos cuadrados.

$$\ln(V_o) = \ln(A) - \frac{E_a}{RT} \dots\dots\dots(4)$$

Se determinaron los parámetros cinéticos (K_m y V_{max}) de la enzima pura a temperatura y pH óptimos. Se evaluó la velocidad inicial midiendo el cambio de absorbancia a una longitud de onda de 468 nm ($\Delta Abs/min$) a diferentes concentraciones de sustrato (50, 100, 200, 500 y 1000 μM de DMP en buffer de fosfatos 0.1M). Los parámetros fueron ajustados utilizando los modelos matemáticos de Michaelis-Menten (5) y Lineweaver-Burk (6) por la minimización del error cuadrático con la herramienta Solver de la hoja electrónica de Excel (Microsoft).

$$V_o = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \dots\dots\dots(5).$$

donde V_o es la velocidad de reacción inicial, V_{max} es la velocidad de reacción máxima, K_m es la constante de Michaelis-Menten y $[S]$ es la concentración de sustrato.

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{max}} \dots\dots\dots(6)$$

6. RESULTADOS

6.1. Caracterización de la fermentación

6.1.1. Biomasa

La biomasa producida durante la fermentación se muestra en la **figura 10**. Se observó que la fase de adaptación duró aproximadamente 150 h, después de este tiempo inició la fase exponencial que terminó a las 408 h. La fase estacionaria se inició a partir de las 408 h. La biomasa máxima fue de 7.7 ± 0.209 g/l y se observó a las 480 h. La velocidad específica de crecimiento (μ) fue de 0.020 ± 0.000 h⁻¹. Se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.990 entre los datos experimentales y el modelo matemático, lo cual nos sugiere que el modelo permite predecir y describir la evolución de la biomasa en las condiciones experimentales con un alto grado de confianza.

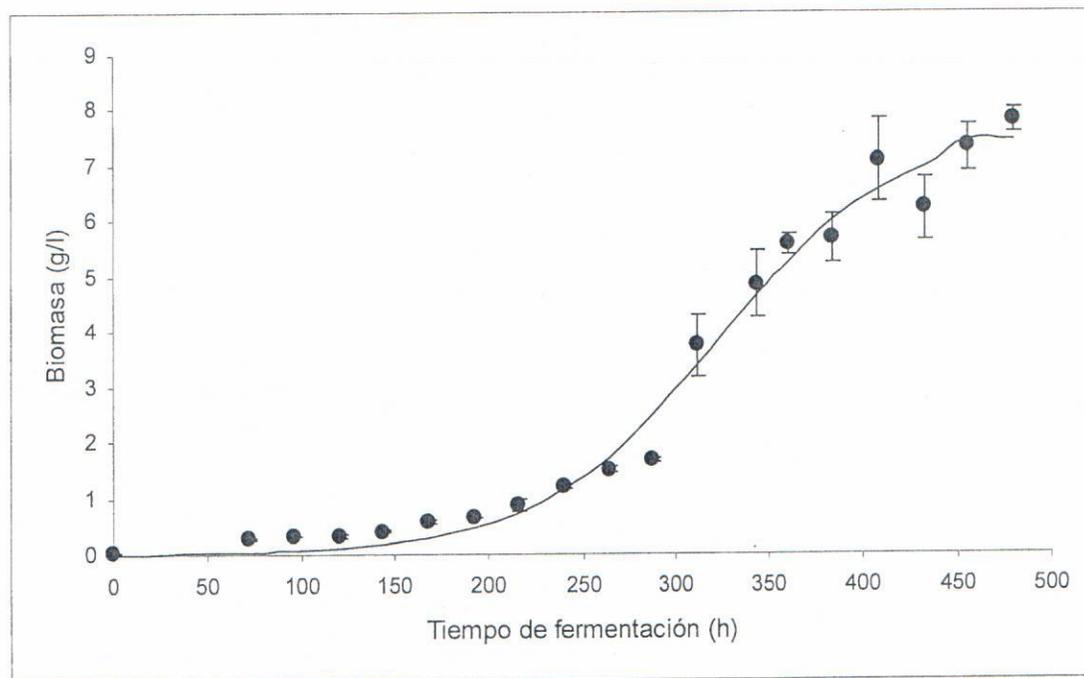


Figura 10. Cinética de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en fermentación en medio líquido.

6.1.2. Concentración de proteína soluble en el caldo de fermentación

La concentración de proteína se muestra en la **figura 11**. Se observó proteína al inicio de la fermentación (tiempo cero) posiblemente por la presencia de proteína en el extracto de levadura adicionada al medio de cultivo. La concentración de proteína total se mantuvo aproximadamente en 0.025 g/l durante los primeros tiempos de fermentación hasta las 216 h. Posterior a este tiempo, la proteína se incrementó gradualmente hasta 0.062 ± 0.001 g/l a las 480 h de fermentación, siendo éste el valor máximo.

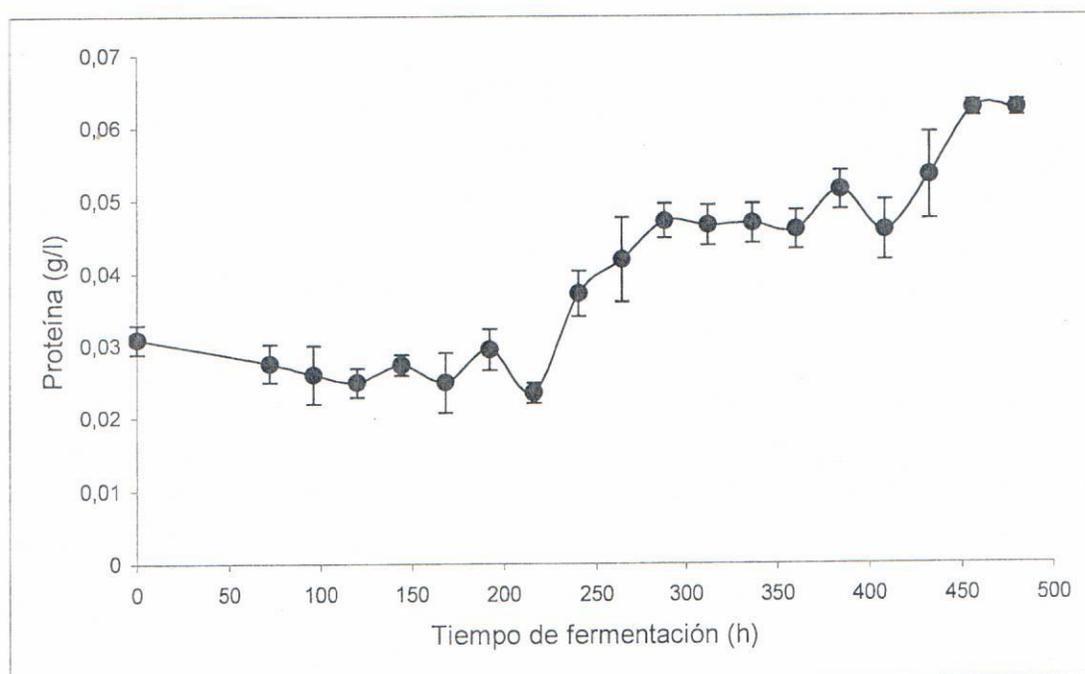


Figura 11. Proteína soluble en el caldo de fermentación.

6.1.3. Actividad de lacasas (E)

La actividad de lacasas se muestra en la **figura 12** y se observa que durante las primeras horas de fermentación existe poca actividad (986.0 U/l). Después de las 216 h se observó un incremento progresivo de actividad hasta las 432 h teniendo la actividad máxima (E_{max}) de 12196.0 U/l. Posterior a este tiempo la actividad descendió hasta 6306 U/l.

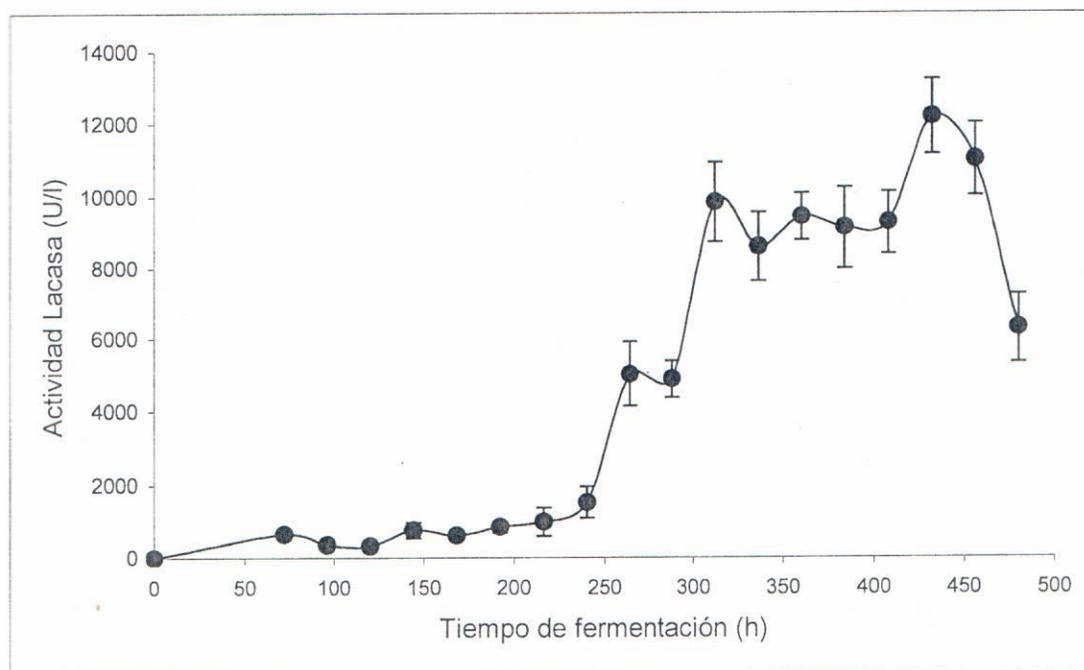


Figura 12. Actividad de lacasas de *Pleurotus ostreatus* obtenidas por FML.

6.1.4. Actividad específica

La actividad específica se mantuvo baja durante las primeras 240 h de fermentación (**Figura 13**). A partir de este tiempo los valores de actividad específica se incrementaron hasta las 312 h manteniéndose con valores alrededor de 200 U/g de proteína. Se observó la máxima actividad específica a las 432 h (228.554 U/g de proteína).

6.1.5. Perfiles de pH

Los valores de pH se muestran en la **figura 14**, donde se observa que durante toda la fermentación el pH se mantuvo cercano a 6.0.

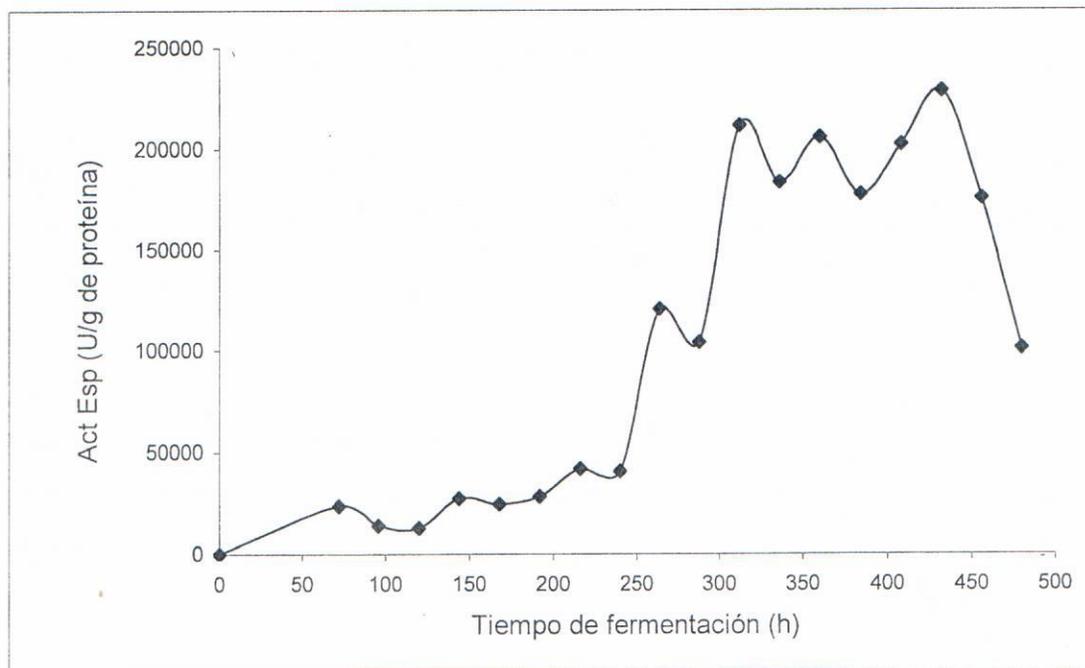


Figura 13. Actividad específica durante la fermentación de *Pleurotus ostreatus*.

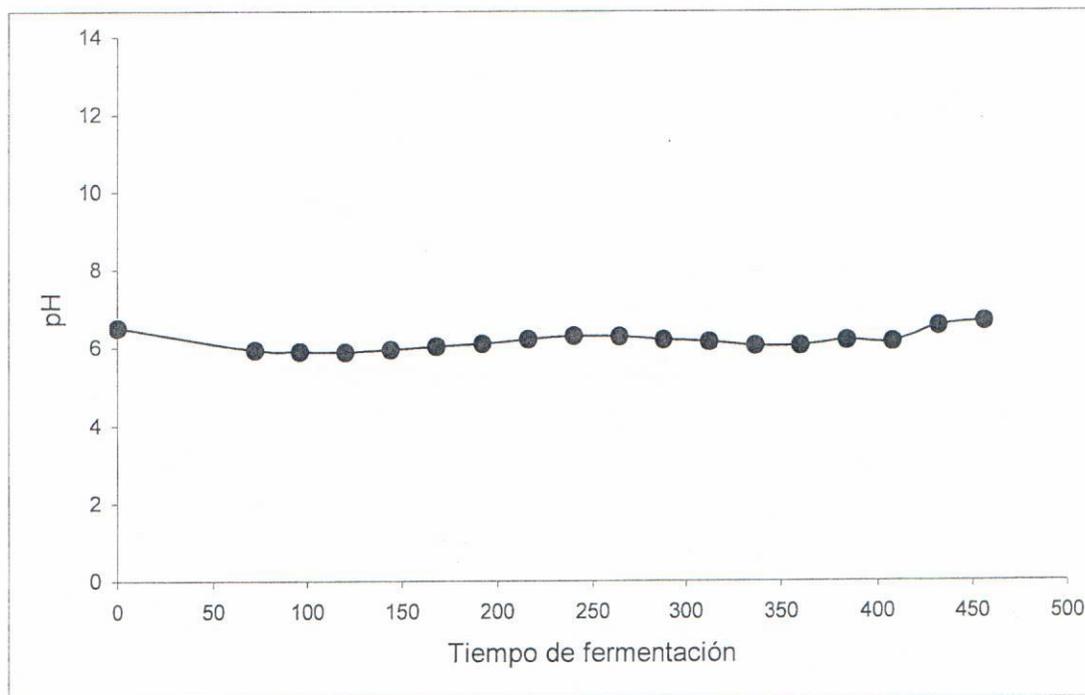


Figura 14. Perfiles de pH durante la fermentación de *Pleurotus ostreatus*

6.1.6. Determinación del número de isoformas de lacasas

En la **figura 15 A-B** se muestran las isoformas encontradas en cada punto de la fermentación. Se observó una sola isoforma desde el tiempo 72 h hasta 384 h de fermentación. En los puntos correspondientes a los tiempos de fermentación 408, 432 y 456 h se observaron cuatro isoformas.

A medida que los valores de actividad lacasa se fueron incrementando (ver **figura 12**) la intensidad del color de las bandas también se incrementó, por lo que se puede correlacionar la intensidad de la banda del zimograma con la actividad enzimática. La mayor actividad enzimática se observó en los tiempos 432 y 456 h (12,196 y 11,023 U/l, respectivamente).

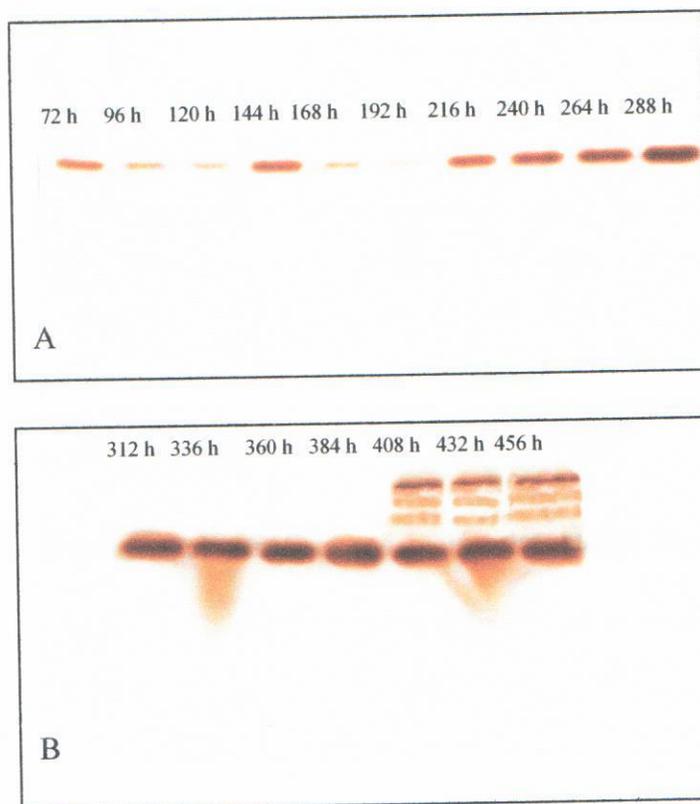


Figura 15. Perfil de zimografía de lacasas durante la FML de *Pleurotus ostreatus*. **A)** 72-288 h de fermentación, **B)** 312-456 h de fermentación

6.1.7. Parámetros cinéticos de crecimiento y producción de lacasas

Los parámetros cinéticos de crecimiento para la producción de las enzimas lacasas de *Pleurotus ostreatus* por fermentación sumergida se muestran en la **tabla 4**.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de crecimiento de *Pleurotus ostreatus*

Parámetro	
X_{\max} (g/l)	7.79 ± 0.20
E_{\max} (U/l)	$12,196.8 \pm 1.02$
μ (h^{-1})	0.020 ± 0.00
$Y_{E/X}$ (U/gX)	1564.4
P_{RO} ($U l^{-1} h^{-1}$)	28.23
q_p (U/h gX)	31.28

6.2. Purificación de las enzimas lacasas

6.2.1. Cromatografía por isoelectroenfoque

El perfil de actividad de lacasas de las fracciones obtenidas del Rotofor se muestra en la **figura 16**. Se detectó actividad entre los valores de pH 2.03 hasta 4.8. Un primer pico de actividad se recolectó en la fracción seis que corresponde a un pH de 2.36 (9000 U/l aproximado). Un segundo pico se colectó en la fracción nueve con un pH de 3.83 (5000 U/l aproximado).

En la **figura 17** se muestra el perfil de separación de proteína dependiendo de su punto isoeléctrico.

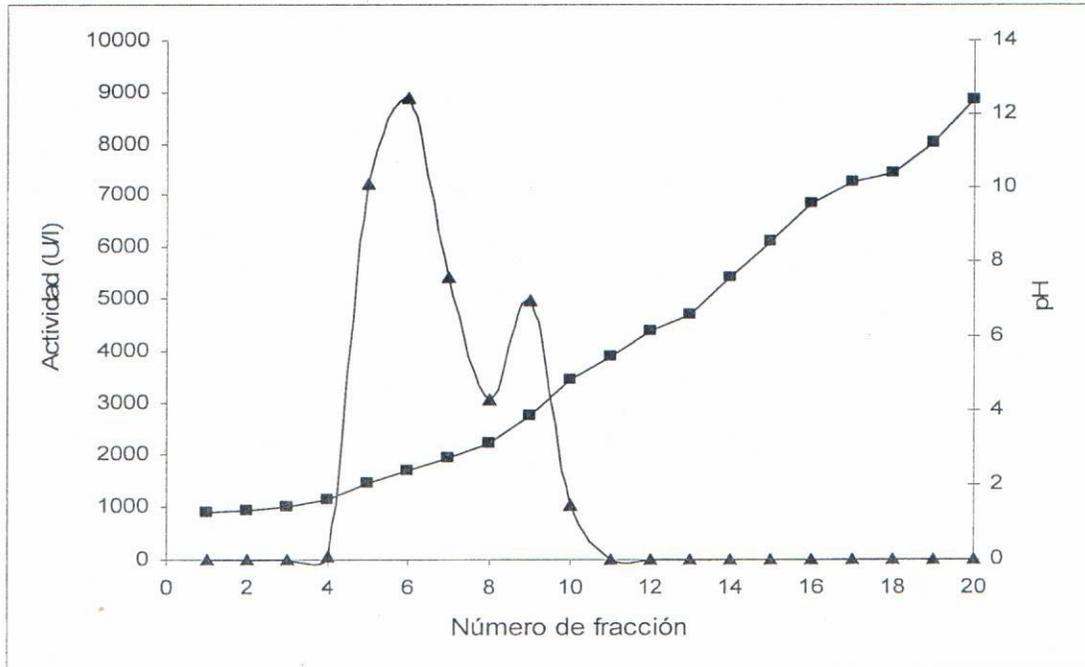


Figura 16. Cromatograma resultante de la separación de proteínas por isoelectroenfoque (Rotofor, Bio-Rad). Actividad de lacasas (▲), pH (■).

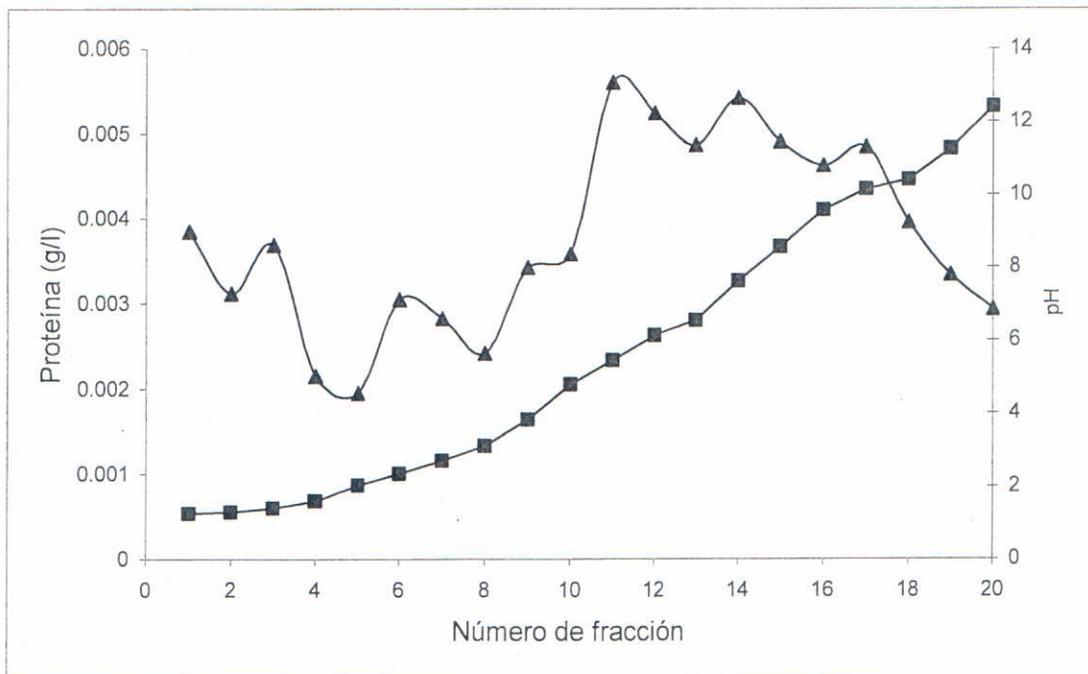


Figura 17. Perfil de pH (■) y concentración de proteína (▲) durante la separación por Rotofor

6.2.2. Separación de proteínas por cromatografía de intercambio iónico

En la **figura 18** se muestra el perfil de actividad lacasa y de proteína de las fracciones obtenidas en la separación por cromatografía de intercambio iónico utilizando una columna Econo-Pac (Bio-Rad)

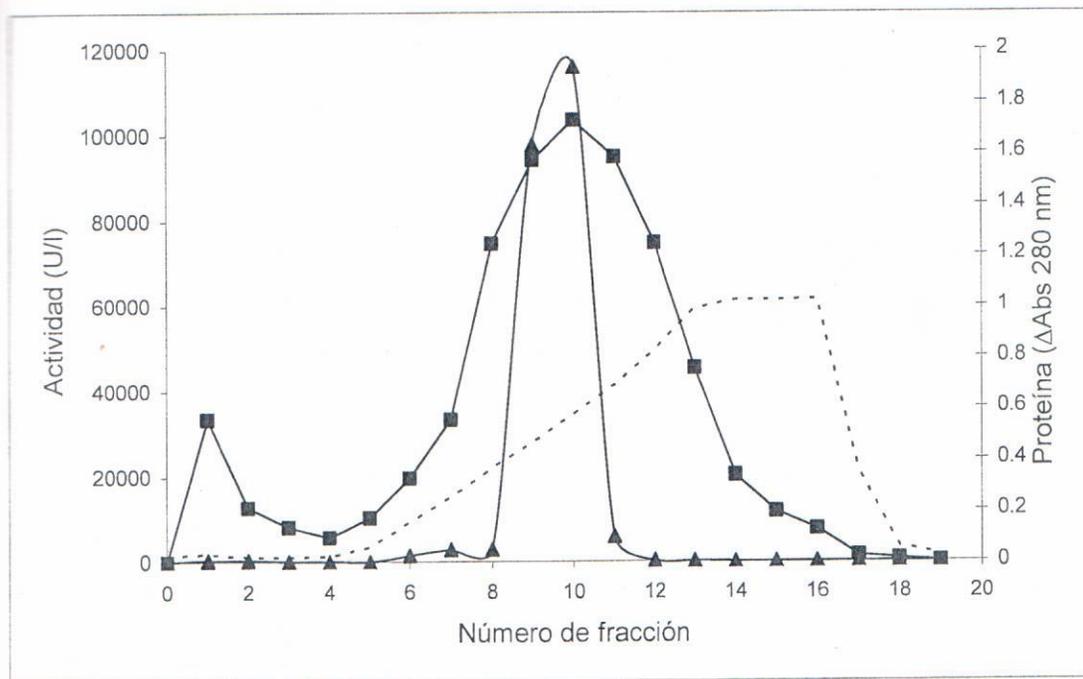


Figura 18. Cromatograma resultante de la separación de proteína por cromatografía de intercambio iónico (Econo-Pac). Actividad lacasa (▲), Proteína (■), Fuerza iónica (---)

Se observaron dos picos de proteína, el primero en la fracción 3 y el segundo en las fracciones 5-16. Se observó un solo pico de actividad lacasa encontrado en las fracciones 9 y 10. Las fracciones que contenían proteína, se dializaron y se les realizó zimografía. La **figura 19 A y B** muestra que en la mayoría de las fracciones (F) que contenían proteína en el segundo pico del cromatograma presentan bandas de actividad lacasa, con bandas más intensas en las fracciones F9 y F10 que corresponden con los puntos de máxima actividad de la figura anterior. Estas fracciones fueron dializadas para continuar con el siguiente paso de la purificación.

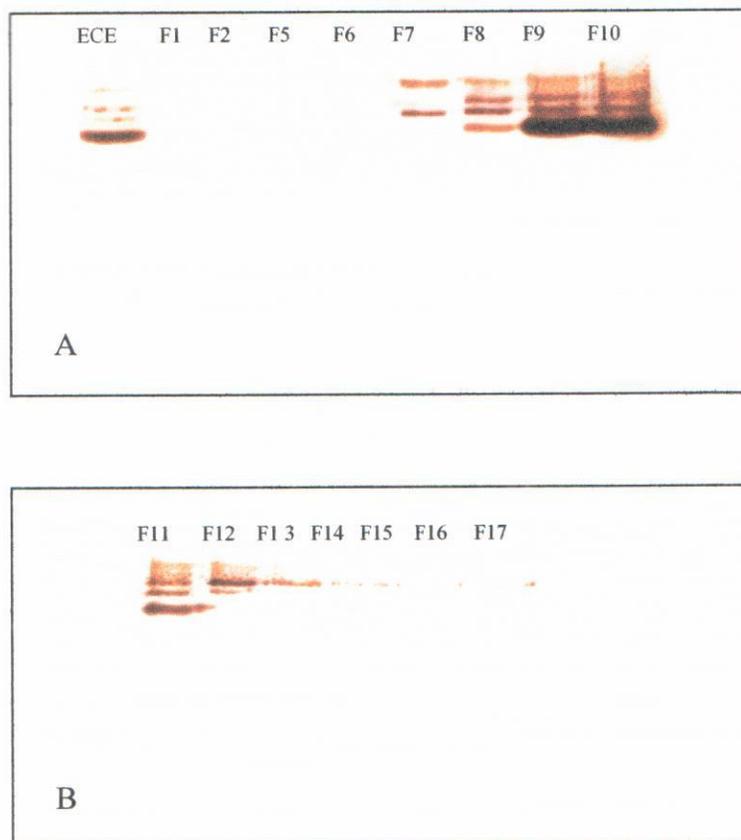


Figura 19. Zimografía de las enzimas lacasas de *Pleurotus ostreatus* recolectadas por el cromatógrafo utilizando una columna Econo-Pac. **A)** Fracciones 1-10. **B)** Fracciones 11-17

La separación de proteínas a través de cromatografía de intercambio iónico utilizando la columna Bio Q (Bio-Rad) (**Figura 20**) mostró un pico de proteína en las fracciones F5, F6, F7 y F8 y un pico de actividad lacasa en las fracciones F5, F6 y F7. El valor máximo de actividad se encontró en la fracción F6 que de igual forma es la fracción con mayor contenido de proteína. Se observa que los picos de proteína y de actividad tienden a ser simétricos, por lo que el contenido de proteína en su mayoría es enzima lacasa.

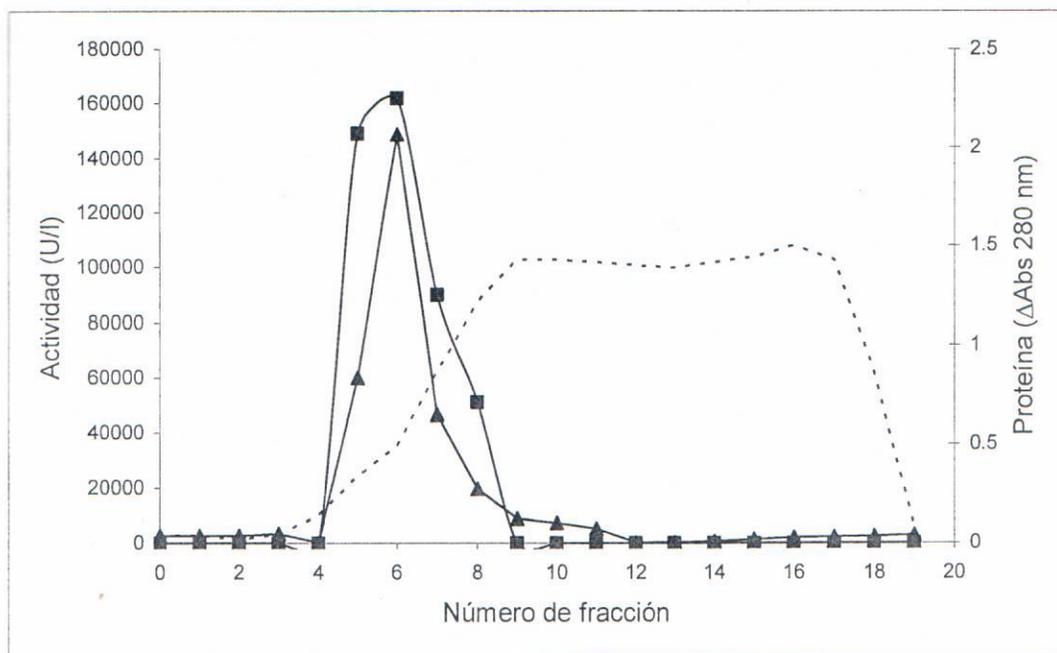


Figura 20. Cromatograma resultante de la separación de proteína por cromatografía de intercambio iónico (Bio Q). Actividad lacasa (▲), Proteína (■), Fuerza iónica (---)

6.2.3. Zimografía y electroforesis para la lacasa purificada de *Pleurotus ostreatus*

En la **figura 21 A** se muestra el zimograma en cada uno de los pasos de la purificación. En la segunda línea (L2) se corrió el EE; en la tercera línea (L3) la muestra obtenida de la cromatografía con la columna Econo-Pac y en las líneas 4, 5, 6 y 7 (L4, L5, L6 y L7) se corrieron las muestras recolectadas por cromatografía a través de la columna Bio-Q. Se aprecia que en las últimas muestras (L4, L5, L6 y L7), las bandas de actividad de las isoformas más pesadas no aparecen, por lo que fueron separadas en la última corrida de cromatografía.

El gel de electroforesis el cual fue teñido con nitrato de plata se muestra en la **figura 21 B**. En la línea 1 se corrieron los marcadores de peso molecular (Low Ranger, Bio-Rad); en la línea 2 se corrió el EE; en la línea 3 se corrió la muestra obtenida por cromatografía con la columna Econo-Pac. En las líneas 4, 5, 6 y 7 se corrieron las muestras que corresponden a la

zimidografía con la columna Bio-Q. En las muestras obtenidas a partir de la columna Bio-Q, no se identificaron otras bandas de proteína, por lo que se consideró pura a la enzima lacasa.

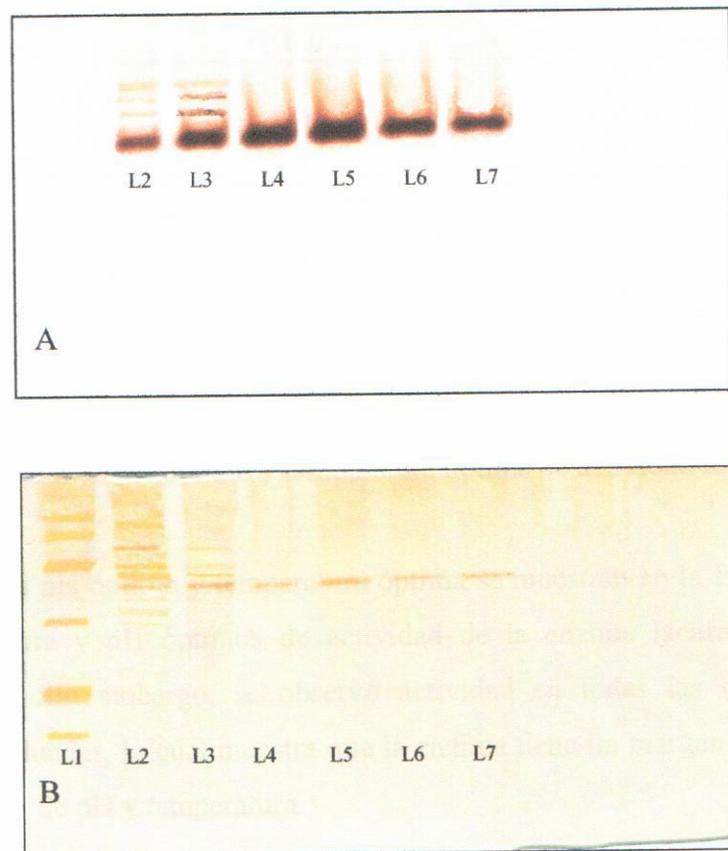


Figura 21. Zimografía realizada a cada etapa de la purificación de la enzima lacasa de *Pleurotus ostreatus* (A). Electroforesis realizada en cada etapa de la purificación de la enzima lacasa de *Pleurotus ostreatus* (B). (L1) marcadores de peso molecular, (L2) ECE, (L3) muestra obtenida de Econo-Pac, (L4, L5, L6 Y L7) muestras obtenidas de Bio-Q.

6.2.4. Tabla de purificación.

En la **tabla 5** se muestran los resultados obtenidos durante cada paso de la purificación, destacando que fueron suficientes tres pasos para lograr tener una sola banda en el gel de electroforesis teñido con plata. Se logró incrementar la actividad específica de 166.2 U/mg de proteína hasta 7080 U/mg de proteína (42.6 veces), obteniendo un volumen final de 3 ml de enzima pura.

Tabla 5. Valores de actividad de la enzima lacasa de *Pleurotus ostreatus* durante la purificación

Paso	Act. lacasa (U/ml)	Proteína (mg/ml)	Act. Esp. (U/mg de proteína)	Volumen (ml)	Factor de purificación
EE	7.0	0.042	166.2	60	1
Econo Pac	10.9	0.022	494.7	3	3
Bio Q	14.2	0.002	7080.0	3	42.6

6.3. Caracterización de la enzima lacasa.

Una vez purificada la enzima se realizó cada una de las determinaciones propuestas, determinación de la temperatura y pH óptimos de actividad, determinación de K_m y V_{max} , punto isoeléctrico y peso molecular.

6.3.1. Determinación de pH óptimo y temperatura óptima de actividad lacasa.

Los resultados de pH óptimo y temperatura óptima se muestran en la **figura 22**. Se encontró que la temperatura y pH óptimos de actividad de la enzima lacasa fue de 40°C y 4.5, respectivamente. Sin embargo, se observó actividad en todas las condiciones de pH y temperaturas evaluadas, lo cual muestra que la enzima tiene un margen amplio de actividad a diferentes valores de pH y temperatura.

En la **figura 23** se muestran los resultados de la actividad medida a diferentes temperaturas a un pH de 4.5 (óptimo). Se observó que a los 60°C existe una pérdida de actividad enzimática del 31.7% con respecto a la temperatura de máxima actividad

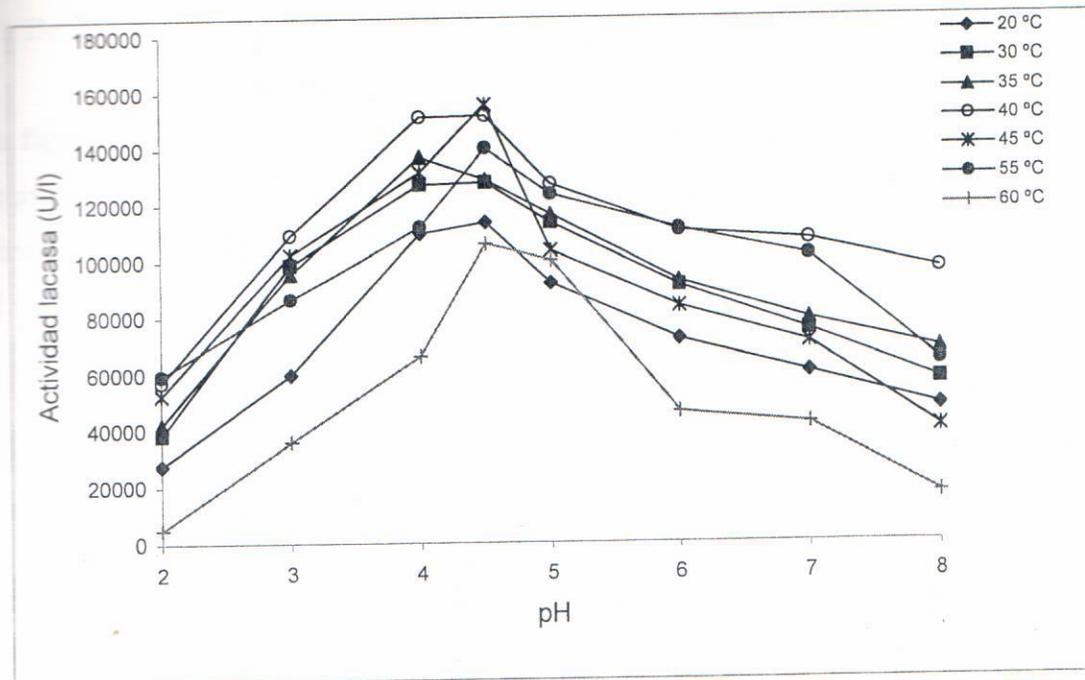


Figura 22. Actividad de lacasa purificada de *Pleurotus ostreatus* dependiente de pH y temperatura.

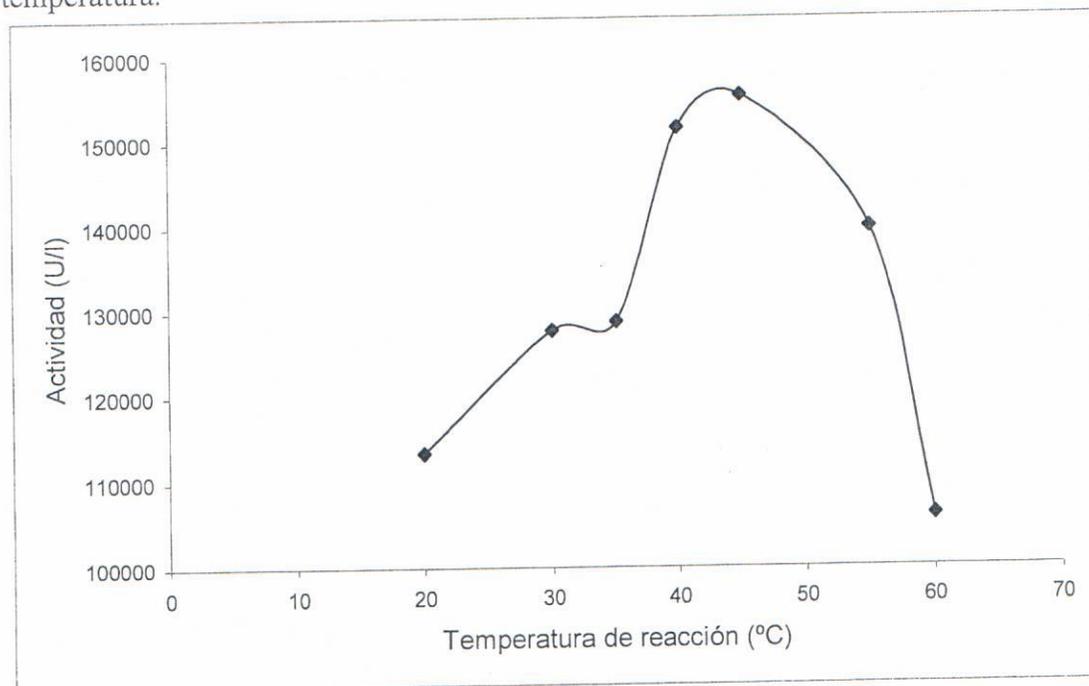


Figura 23. Efecto de la temperatura sobre la actividad de lacasa purificada de *Pleurotus ostreatus* obtenida por fermentación sumergida.

6.3.2. Determinación de los parámetros termodinámicos por el modelo de Arrhenius.

En la **figura 24** se muestran los valores ajustados por la ecuación de Arrhenius para predecir la energía de activación y la energía de desnaturalización de la enzima lacasa. La E_a y E_d de la enzima lacasa fue de 21.6 y 119.3 Cal/mol K, respectivamente y el valor del factor Q_{10} fue de 1.12.

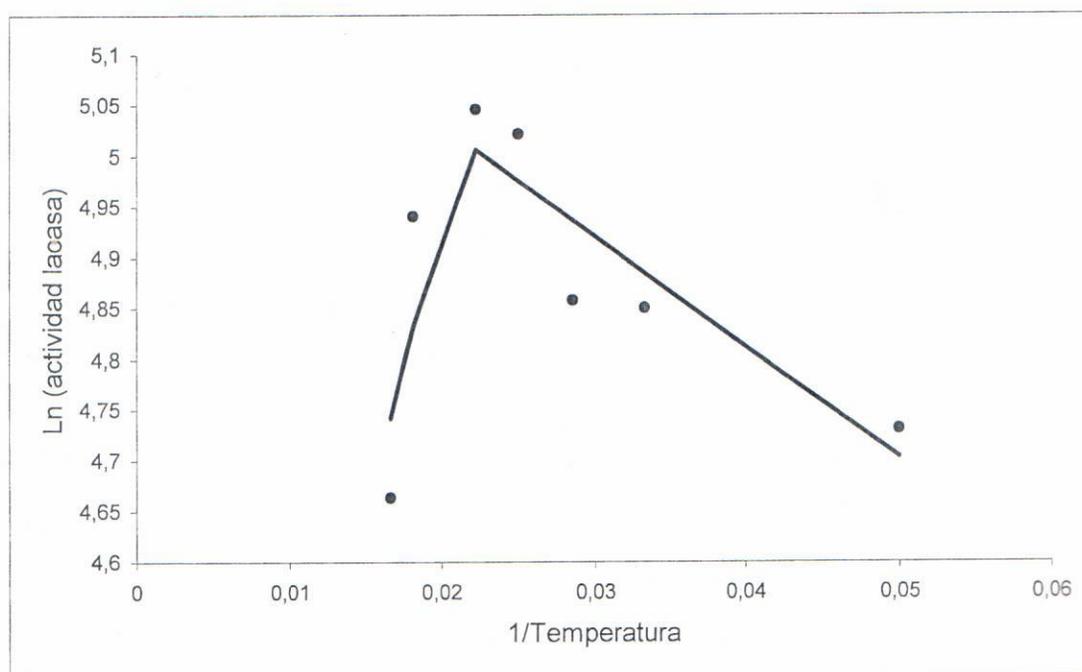


Figura 24. Efecto de la temperatura sobre la actividad lacasa purificada de *Pleurotus ostreatus* obtenida por fermentación sumergida. Modelo de Arrhenius para determinar E_a y E_d .

6.3.3. Determinación de los parámetros cinéticos por el modelo de Michaelis-Menten

Los resultados se muestran en la **figura 25** encontrado valores para K_m de 90 μM de DMP y para la V_{max} de 1.18 $\Delta\text{Abs}/\text{min}$, con un coeficiente de correlación de 0.997 lo que sugiere que el modelo matemático puede predecir los parámetros cinéticos con un grado de confianza muy alto y los valores experimentales se ajustan al modelo.

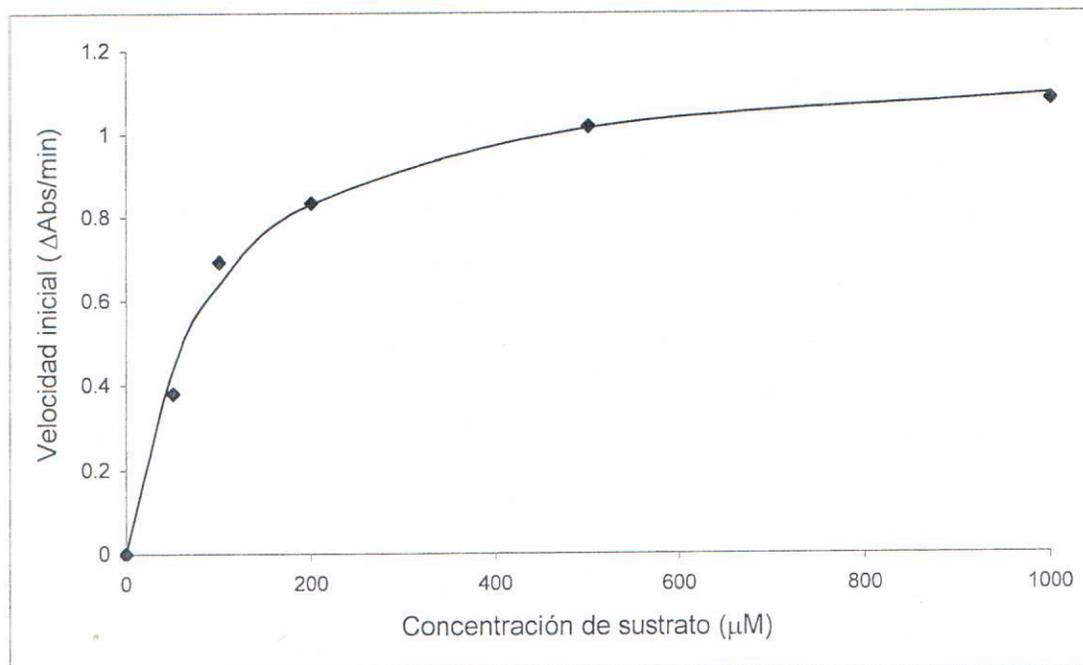


Figura 25. Modelo de Michaelis-Menten para predecir K_m y V_{max} de la enzima lacasa pura de *Pleurotus ostreatus* obtenida por FML.

6.3.4. Determinación de los parámetros cinéticos por el modelo de Lineweaver-Burk.

En la **figura 26** se muestran los valores para predecir las constantes cinéticas por el modelo de Lineweaver-Burk, obteniendo valores para K_m de $115 \mu M$ y V_{max} de $1.31 \Delta Abs/min$. El coeficiente de correlación fue de 0.990, valor ligeramente menor al obtenido por el modelo de Michaelis-Menten, por lo que se consideró este último con un grado de confiabilidad mayor.

6.3.5. Determinación del punto isoelectrico por Rotofor.

Los resultados del punto isoelectrico se muestran en la **figura 27** en la que se observó un pico de actividad lacasa en la segunda fracción recolectada, con valor de PI de 2.27.

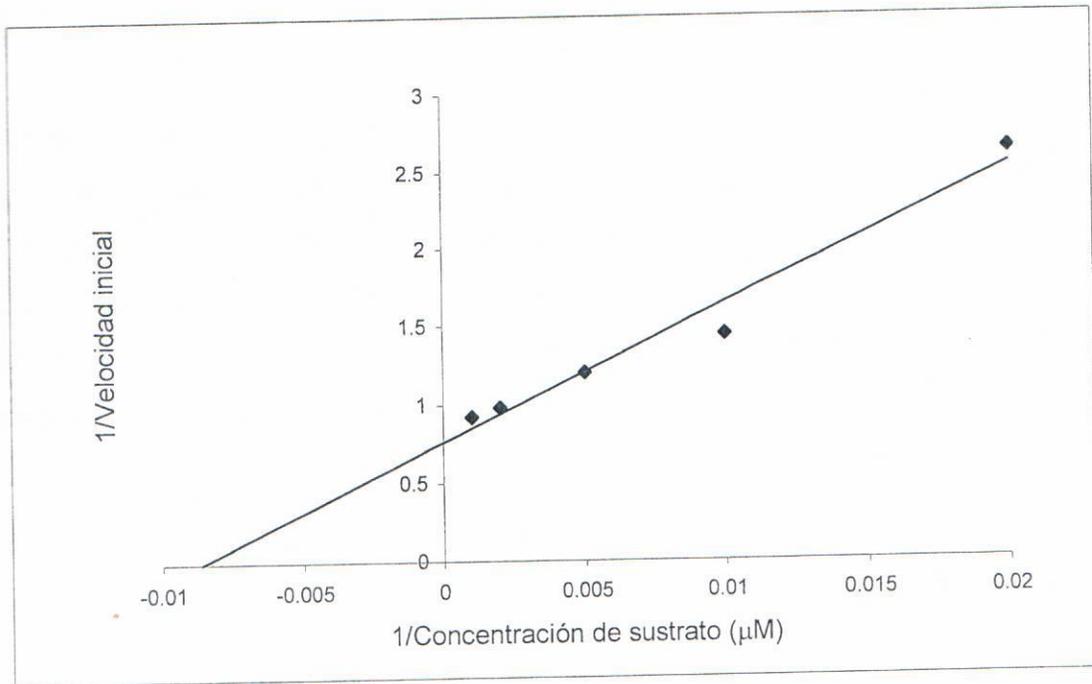


Figura 26. Modelo de Lineweaver-Burk para predecir K_m y V_{max} de la enzima lacasa pura de *Pleurotus ostreatus* obtenida por FML.

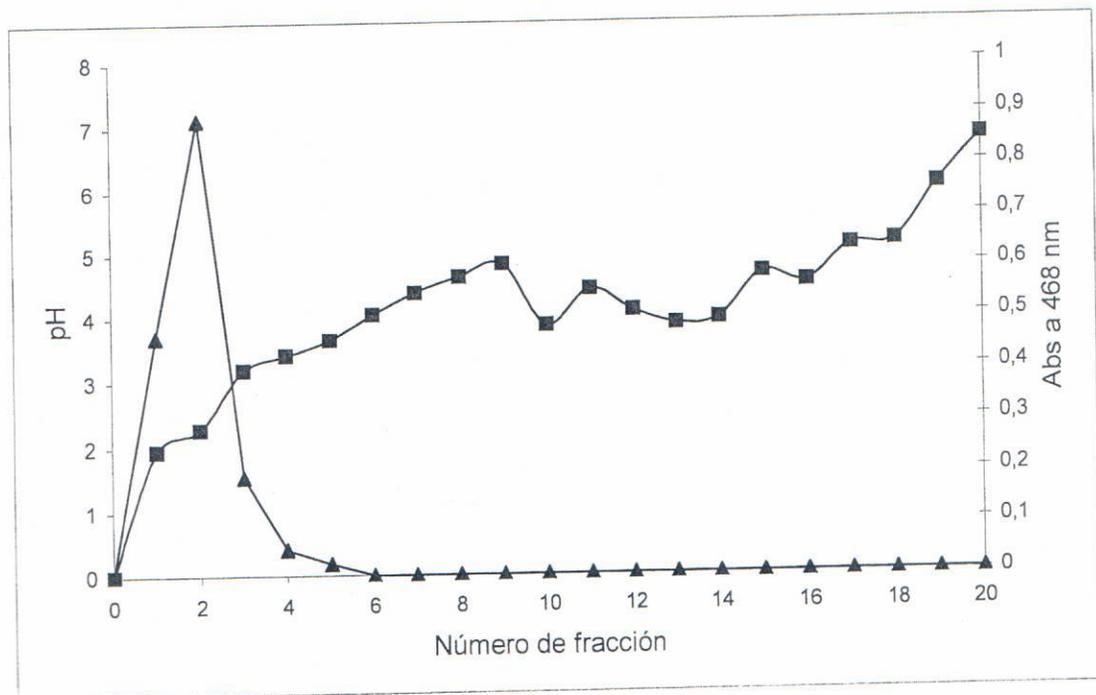


Figura 27. Determinación del punto isoeléctrico por Rotofor.

6.3.6. Determinación del peso molecular por SDS PAGE

En la **figura 28** se muestra el gel de electroforesis teñido con plata para la determinación del peso molecular de la enzima. En la primera línea se muestran las bandas de proteínas estándares (Low Range, Bio-Rad) utilizadas como marcadores de peso molecular. En la segunda línea se muestra la banda de la enzima lacasa purificada, mostrando un peso molecular de 43.7 KDa, obtenido por la relación entre el logaritmo del peso molecular de los marcadores y el Rf de los mismos.

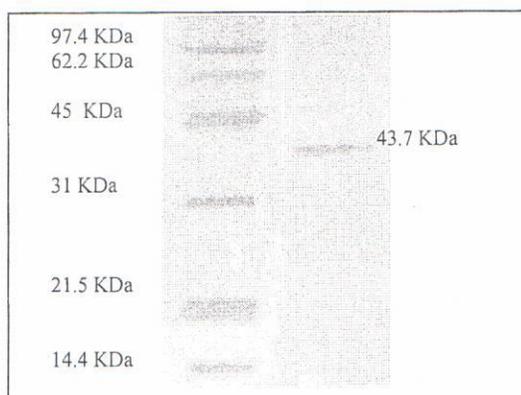


Figura 28. Gel de electroforesis teñido con nitrato de plata, para determinación de peso molecular por SDS PAGE.

6.3.7. Parámetros cinéticos de la enzima lacasa purificada de *Pleurotus ostreatus*

El la **tabla 6** de muestran los parámetros cinéticos y termodinámicos de la enzima lacasa purificada de *Pleurotus ostreatus*

Tabla 6. Parámetros cinéticos de la enzima lacasa purificada de *Pleurotus ostreatus*

Parámetro	
pH óptimo	4.5
Temperatura óptima (°C)	40
E _a (Cal/mol K)	21.6
E _d (Cal/mol K)	119.3
Q ₁₀	1.12
K _m (μM)	90
V _{max} (ΔAbs/min)	1.18
P.I.	2.27
Peso molecular (KDa)	43.7

7. DISCUSIONES.

Se observó que la actividad lacasa se incrementó durante el transcurso de la fermentación hasta alcanzar un máximo a las 432 h, muy próximo a la fase estacionaria. Un patrón muy similar se observó en la producción de lacasas por *Panaeolus sphinctrinus* en un medio que contenía carne de soya y maltodextrinas (Heinzkill y col. 1998), teniendo un máximo de 70,000 U/l aproximadamente utilizando ABTS como sustrato.

Durante la fermentación se mantuvo un pH sin variación alrededor de 6.0, esto sugiere un efecto amortiguador probablemente por la presencia del extracto de levadura en el medio de cultivo, lo que también explica la presencia de proteína soluble en el medio presente durante el inicio de la fermentación.

Se pudo observar que durante la fermentación se mantuvo presente una isoforma de lacasa y en la fase estacionaria se expresan tres isoformas más. La presencia de estas isoformas, probablemente está asociada con la formación de pigmentos en el micelio, ya que durante la fase exponencial se observó una coloración café en los "pellets" del hongo. Estos resultados los podemos asociar con los reportados por Temp y Eggert (1999), en los que describen la formación de pigmentos en *Pycnoporus cinnabarinus* catalizados por lacasas y celobiosa deshidrogenasa.

Durante el proceso de purificación fueron suficientes tres pasos para lograr un alto grado de pureza teniendo una sola banda en el gel de electroforesis teñido con plata con actividad lacasa en geles de zimografía. Se logró incrementar la actividad específica alrededor de 43 veces

Las enzimas lacasas están presentes en un gran número de basidiomicetes, éstas presentan diferencias en cuanto a su peso molecular, puntos isoelectrónicos, contenido de carbohidratos y características catalíticas, como pH y temperatura óptimos de actividad y afinidad por el sustrato. Los valores de pH para la mayoría de las isoformas lacasas en otros basidiomicetos y ascomicetos son ácidos cuando utilizan como sustrato DMP, aunque algunos pueden tener

tolerancia a amplios intervalos de pH como es el caso de *Trametes sp* cepa AH28-2 que reporta estabilidad en pH de 4.2 a 8.0 con un valor óptimo de 4.5 (Xiao y col. 2003). Este último valor coincide con el valor óptimo de pH encontrado para la isoforma de *Pleurotus ostreatus* que hemos purificado y los que reporta Tinoco y col. (2001) para seis cepas de *P. ostreatus*, cuando el sustrato fue siringaldazina y una isoforma que reporta Hublik y Schinner (2000) con tolerancia de 5-9. Por otra parte, se reporta para la lacasa de *Coprinus friessi* un pH óptimo de 8 (Heinzkill y col. 1998) y para las dos isoformas de *Coriolopsis rigida* una tolerancia de hasta un pH de 10, aunque su óptimo está alrededor de 3 (Saparrat y col. 2002).

La temperatura óptima de actividad encontrada para la isoforma que se purificó en este trabajo fue de 40°C usando DMP como sustrato, aunque presentó valores de actividad en un amplio margen de temperaturas ensayadas hasta 60°C. Este último valor es comparable con una lacasa termoestable del ascomiceto *Melanocarpus albomyces* (Kiiskinen y col. 2002). El óptimo de la isoforma purificada en este trabajo coincide con el que reporta Nagai y col. (2002) para la isoforma Lcc1 de *Lentinula edodes* y Palonen y col. (2003) para la mejor isoforma lacasa purificada de *Mauginiella sp.*, un ascomiceto. Tinoco y col. (2001) reportan una temperatura óptima de actividad de lacasas entre 30 y 40°C para seis cepas de *P. ostreatus* cuando utilizaron como sustrato la siringaldazina. Hublik y Schinner (2000) reportaron para una isoforma lacasa de *P. ostreatus* 50°C para el mismo sustrato. La tolerancia a altas temperaturas que presenta la isoforma que hemos purificado puede explicarse en términos de la energía de desnaturalización E_d , ya que se requieren 119.3 calorías para poder desnaturalizar un mol de la enzima. Esta característica le confiere a la enzima importancia para la utilización industrial, ya que garantiza que puede soportar altas temperaturas sin ser desnaturalizada. Como en la mayoría de los procesos industriales se requiere operar a temperaturas altas, la utilización de esta enzima no obligaría a los industriales a invertir en procesos de enfriamiento.

En diversos trabajos se reporta la K_m para las lacasas de otros hongos de pudrición blanca. Los valores aquí encontrados de K_m de la isoforma lacasa de *Pleurotus ostreatus* (90 μM) con DMP son diferentes de los valores encontrados para otros hongos de pudrición blanca. Para *Gaunomyces graminis* reportan un valor de 2.6^{-2} μM (Edens y col. 1999). Para una isoforma

lacasa de *Lentinula edodes* (Lcc 1) empleada para la decolorización de diversos colorantes textiles reportan un valor de 55.7^{-2} μM (Nagai y col. 2002). Para la isoforma de *Trametes sp.* reportan un valor de 25.5 μM (Xiao y col. 2003). Para el basidiomiceto *Coriolopsis rigida* reportan dos isoformas (Lac I y LacII) y sus respectivos valores son 328 y 348 μM , respectivamente.

Los pesos moleculares para las diversas isoformas purificadas son muy variables (por SDS PAGE). Podemos encontrar desde las isoformas más pesadas como la de *Gaumanomyces graminis* de 190 KDa (Edens y col. 1999) hasta isoformas más ligeras como las de *Coriolus hirsutus* de 55 KDa (Koroljova-Skorbogat'ko y col. 1998) y una isoforma (Lac I) de *Coriolopsis rigida* del mismo valor (Saparrat y col. 2002). La isoforma aquí purificada presentó un peso molecular menor de 43.7KDa, lo que sugiere la presencia de una lacasa no descrita para esta especie de hongo.

La variabilidad de la enzimas lacasas secretadas en múltiples isoformas depende de la especie de hongo y de las condiciones ambientales, sin embargo aún no es clara la funcionalidad de las isoformas excretadas.

8. CONCLUSIONES.

- Se observó la presencia de más de una isoforma de lacasas extracelular de *Pleurotus ostreatus* durante la fermentación.
- La isoforma que se purificó fue la que se mantuvo presente en toda la fermentación.
- El peso molecular de la enzima pura y su punto isoeléctrico permiten suponer que es una isoforma lacasa no descrita para esta especie de hongo.
- La enzima lacasa purificada presentó altos valores de actividad enzimática y afinidad por el sustrato usado.
- La isoforma lacasa purificada presentó una tolerancia amplia a valores de pH y temperatura.

9. PERSPECTIVAS

La enzima lacasa de *Pleurotus ostreatus* podría ser aplicada en procesos de biorremediación para la oxidación de diversos contaminantes de tipo fenólico, así como para otros propósitos industriales relacionados, por lo que se sugiere realizar pruebas de degradación de estos compuestos en condiciones de laboratorio.

Por otra parte, se propone estudiar la producción de lacasas optimizando medios de cultivo con variaciones en valores de pH, fuente de carbono, fuente de nitrógeno, diferentes tipos de inductores así como la concentración de éstos. Considerando, también, las variables de su posible escalamiento como: tipos de agitación, aireación y transferencia de gases.

Además, se propone secuenciar la enzima para identificar el gen que la produce para una posible expresión en otro organismo que facilite su producción.

La cepa ATCC-32783 podría presentar la capacidad de invasión micelial sobre diversos sustratos agroindustriales, sin limitar su crecimiento en diferentes valores de pH y temperatura.

10. REFERENCIAS

- Acuña-Argüelles, M. E., Gutiérrez-Rojas, M., Viniegra-González, G. y Favela-Torres, E. (1995). Production and properties of the pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **43**:808-814.
- Alazard, D. y Raimbault, M. (1981). Comparative study of amylolytic enzymes production by *Aspergillus niger* in liquid and solid-state cultivation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **12**: 113-117.
- Allen, R. C., Saravis, C. A. y Maurer, H. R. (1984). Gel electrophoresis and isoelectric focusing of protein. Ed. Gruter, New York. pp 1-15.
- Antier, P., Minjares, C. A., Roussos, S., Raimbault, M. y Viniegra-González, G. (1993). Pectinase-hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid-state fermentation of coffee pulp. *Enzyme Microbiology Technology* **15**:254-260.
- Bailey, S. P y Bailey, A. C. (1995). Química orgánica, conceptos y aplicaciones. Quinta edición. Prentice Hall. México D.F. pp 265
- Bio-Rad Laboratories. (2002) Instruction manual of Rotofor system.
- Bohinski. C. R. (1991). Bioquímica. Quinta edición. Addison Wesley Iberoamericana. México. pp 491-492.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**:248-254.
- Chefetz, B., Chen, Y. y Hadar, Y. (1998). Purification and characterization of lacase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Applied and Environmental Microbiology* **64**(9):3175-3179.
- D'Souza, T. M., Merritt, S. C. y Reddy, A. (1999). Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(12):5307-5313.

- Heinzkill, M., Bech, L., Hlakier, T., Schneider, P. y Anke, T. (1998). Characterization of laccases and peroxidases from wood rotting fungi family *Coprinaceae*. *Applied and Environmental Microbiology* **64**(5):1601-606.
- Herrera, T. y Ulloa, M. (1998). El reino de los hongos: Micología básica y aplicada. Segunda edición. México. DF., UNAM, pp 25-35
- Hublik, G. y Schinner, F. (2000). Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. *Enzyme and Microbial Technology* **27**: 330-336.
- 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.
- Ko, M. E., Leem, E. Y. y Choi, T. H. (2001). Purification and characterization of laccase isoenzymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied Microbiology Biotechnology* **57**:98-102.
- Koroljova- Skorobogat'ko, V. O., Stepanova, V. E., Gavrilova, P. V., Morozova, V. O., Lubimova, V. N., Dzchafarova, N. A., Jarapolov, I. A. y Makower, A. (1998). Purification y characterization of the constitutive form of a laccase from the basidiomycete *Coriolus hirsutus* and effect of inducers on laccase synthesis. *Biotechnology Applied Biochemistry* **28**: 47-54.
- Leammli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J. y Ziegenhagen, D. (1999). Review: Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology* **27**: 175-185.
- Li, K., Xu, F. y Eriksson, L. K. (1999). Comparison of fungal laccase and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Applied and Environmental Microbiology* **65** (6): 2654-2660.
- Mathews, K. C., Van Holden, E. K. y Ahern, G. K. (2002). Bioquímica. Tercera edición. Addison Wesley. Madrid. España.

- Wesserschmidt, A. y Huber, R. (1990). The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase ceruloplasmin. Modelling and structural relationships. *European Journal of Biochemistry* **187**:341-352.
- Mañoz, C., Guillén, F., Martínez, T. A. y Martínez, J. M. (1997). Lacasse isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn^{2+} oxidation. *Applied and Environmental Microbiology* **63** (6):2166-2174.
- Nagai, M., Sato, T., Watanabe, H., Saito, K., Kawata, M. y Enei, H. (2002). Purification and characterization of a extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dye. *Applied Microbiology Biotechnology* **60**:327-335.
- Nüske, J., Scheibner, K., Domberger, U., Ullrich, R. y Hofrichter, M. (2002). Large scale production of manganese-peroxidase using agaric white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*. **30**:556-561.
- 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** (3):920-924.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Scoloni, A., Capasso, A. y Sannia, G. (1997). A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *The Journal of Biological Chemistry* **272** (50):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* **30**:854-862.
- Peñas, M. M., Rust, B., Larraya, M. L., Ramírez, L. y Pisabarro, G. A. (2002). Differentially regulated, vegetative-mycelium-specific hydrophobins of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied Microbiology Biotechnology* **68**(8):3891-3898.
- Pérez, J., Martínez, J. y Rubia, T. (1996). Purification and partial characterization of a laccase from the white rot fungus *Phanerochaete flavidio-alba*. *Applied and Environmental Microbiology* **62** (11):4263-4267.

- Ramero-Gómez, S. J., Augur, C. y Viniegra-González, G. (2000). Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnology Letters* **22**:1255-1258.
- Sánchez, C. (1998). Morphogenesis of mushroom fungi: Ultrastructural, physiology and histological study of *Pleurotus* species. *Ph.D. Dissertation*. Manchester U.K. The University of Manchester.
- Sánchez, C. (2004). Modern aspects of mushroom culture technology. *Applied Microbiology and Biotechnology* **64**:756-762.
- Saparrat, C. N. M., Guillén, F., Arambarri, M. A., Martínez, T. Ángel. y Martínez, M. J. (2002). Induction, isolation and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(4):1534-1540
- Schultz, A., Jonas, U. Hammer, E. y Schauer, F. (2001). Dehalogenation of chlorinated hydroxybiphenyls by fungal laccases. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**(9):4377-4381.
- Solis-Pereira, S., Favela-Torres, E., Viniegra-González, G. y Gutiérrez-Rojas, M. (1993). Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology* **39**:36-41.
- Srinivasan, C., D'Souza, M. T., Boominathan, C. y Reddy, A. C. (1995). Demonstration of laccase in the white rot basidiomycetes *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **61**(12):4274-4277.
- Stryer, L. (2001). Bioquímica, Tomo I. Cuarta edición. Editorial Reverté. España. pp 46-50.
- Temp, U. y Egert, C. (1999). Novel interaction between lacasse and cellobiose dehydrogenase during pigment synthesis in the white rot fungus. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(5):389-395.
- Tinoco, R., Pickard, A. M. y Vazquez-Duhalt. R. (2001). Kinetics differences of purified laccases from a six *Pleurotus ostreatus* strains. *Letters in Applied Microbiology* **32**:331-335.

- Tlecuitl-Beristain, S., Díaz-Godínez, G., Soriano-Santos, J., Romero-Gómez, S. y Sánchez, C. (2003). Effect of the initial concentration of glucose or sucrose on exopolygalacturonase production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. *Chimica Oggi/Chemistry Today*. (issue January February, 2003)
- Trejo-Hernández, M. R., Oriol, E., López-Canales, A., Roussos, S., Viniegra-González, G. y Rambault, M. (1991). Producción de pectinasas de *Aspergillus niger* por fermentación sólida sobre soporte. *Micología. Neotropical. Aplicada* **4**:49-62.
- Viniegra-González, G., (1997). Strategies for the selection of mold strains geared to produce enzymes on solid substrates. *Advances in Bioprocess Engineering* **2**: 123-135.
- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, N.C., Romero-Gómez, SJ, Díaz-Godínez, G. y Augur, C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*. **13**:157-167.
- Ward, G., Belinky, A. P., Hadart, Y., Bilkis, I. y Dosoretz, G. C. (2002). The influence of non-phenolic mediators and phenolic co-substrates on the oxidation of 4-bromophenol by lignin peroxidase. *Enzyme and Microbiology Technology* **30**:490-498.
- Xiao, Y. Z., Tu, X. M., Wang, J., Zhang, M., Cheng, Q., Zeng, W. y Shi, Y. (2003). Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from basidiomycete *Trametes sp.* strain AH28-2. *Applied Microbiology Biotechnology* **60**:700-706.
- Xu, F. (1997). Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 924-928.

11. PUBLICACIONES

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

Trabajo 084

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA LACASA DE *PLEUROTUS OSTREATUS* OBTENIDA POR FERMENTACIÓN SUMERGIDA

*S. Tlecuitl-Beristain^{1,2}, C. Sánchez¹ O., Loera-Corral³, G. Díaz-Godínez¹

¹Laboratorio de Biotecnología, Centro de Investigación en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala. Apdo. Postal 129, Tlaxcala. CP. 90000. Tel. & Fax: (248) 4815482. E-mail: gdg@cci.uatx.mx. ²Maestría en Ciencias Biológicas. UAT. ³Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapala, México DF.

Pleurotus ostreatus es el tercer hongo comestible más cultivado en el mundo, considerado como de pudrición blanca por su capacidad de degradar sustratos ligninocelulósicos, debido a que produce enzimas como; lignina-peroxidasas, manganeso-peroxidasas y lacasas. Estas últimas son utilizadas en procesos de biorremediación porque oxidan un amplio rango de compuestos fenólicos y aminos aromáticos, además de ayudar a reciclar grandes cantidades de desechos agro-industriales. En este trabajo se purificó y se caracterizó una isoforma de lacasa de *P. ostreatus* producida por fermentación sumergida. La fermentación se inoculó con fragmentos de micelio de 4 mm desarrollado sobre agar extracto de malta a 25°C durante 7 días. El extracto crudo enzimático se recuperó a las 456 h de fermentación, la cual se realizó en matraces de 125 ml que contenían 50 ml de medio de cultivo estéril (sales minerales, extracto de levadura y 10.5 g/l de glucosa) incubados a 25°C con agitación orbital de 120 rpm. La lacasa que se purificó fue la más abundante y de menor peso molecular de cuatro isoformas observadas a través de zimografía y de electroforésis. La purificación se realizó por una separación a través de isoelectroenfoque (Rotofor, BioRad), donde se determinaron los puntos isoeléctricos de las isoformas, posteriormente, se utilizó una columna de intercambio iónico EconoPac (BioRad); seguida de otra columna de intercambio iónico BioQ5 (BioRad), obteniendo una sola proteína con actividad de lacasas. Se utilizó 2,6-dimetoxifenol como sustrato, definiendo una unidad de actividad (U) como la cantidad de enzima que incrementa una unidad de absorbancia por min. Fue posible incrementar la actividad específica de 166 a 63720 U/mg de proteína y la Km de la enzima fue de 8.5×10^{-5} M.

Trabajo 083

DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE ACTIVIDAD DE UNA
ENZIMA LACASA PURIFICADA DE *PLEUROTUS OSTREATUS*

*S. Tlecuitl-Beristain^{1,2}, C. Sánchez¹, O. Loera-Corral³, G. Díaz-Godínez¹

¹ Laboratorio de Biotecnología, Centro de Investigación en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala. Apdo. Postal 129, Tlaxcala. CP. 90000. Tel. & Fax: (248) 4815482. E-mail: gdg@cci.uatx.mx.

² Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala.

³ Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapala, México DF

La lacasas son enzimas que catalizan la oxidación de un amplio rango de polifenoles y aminas aromáticas, éstas son producidas, principalmente, por hongos de pudrición blanca como *Pleurotus ostreatus*, donde juegan un papel importante en la degradación de la lignina. Este hongo comestible es capaz de crecer sobre pajas y rastrojos, los cuales son desechos agroindustriales ricos en celulosa y lignina que representan contaminación ambiental. En este trabajo se determinaron las condiciones óptimas de actividad de una lacasa extracelular purificada de *P. ostreatus* (ATCC-32783) producida por fermentación sumergida. Se utilizó 2,6-dimetoxifenol como sustrato. Se evaluó la actividad enzimática a diferentes valores de pH (2, 3, 4, 4.5, 5, 6, 7 y 8) utilizando soluciones buffer de fosfatos y acetatos 0.1M a diferentes temperaturas (20, 30, 40, 50, 60 °C). Se encontró que la temperatura y pH óptimo de actividad de la enzima lacasa fue de 40°C y 4.5, respectivamente. Sin embargo, se observó actividad en todas las condiciones de pH y temperaturas evaluadas. Estos resultados sugieren que la cepa ATCC-32783 podría presentar la capacidad de invasión micelial sobre diversos sustratos agroindustriales, sin limitar su crecimiento a diferentes temperaturas y pH's.

Trabajo 032a:

PRODUCCIÓN DE LACASAS DE *Pleurotus ostreatus* POR FERMENTACIÓN SUMERGIDA

*S. Tlecuitl-Beristain^{1,2}, C. Sánchez¹, G. Díaz-Godínez¹; ¹ Laboratorio de Biotecnología, Centro de Investigación en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala. Apdo. Postal 129, Tlaxcala. CP. 90000. Tel. & Fax: (248) 4815482. E-mail: gdg@cci.uatx.mx; ² Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Pleurotus ostreatus es un hongo comestible capaz de crecer sobre pajas y rastrojos, los cuales generalmente son considerados como desechos y representan contaminación ambiental. La lignina es uno de los principales componentes de las pajas y rastrojos, la cual es uno de los polímeros aromáticos más abundantes en la tierra. *P. ostreatus* por ser un hongo de pudrición blanca, es capaz de degradar a la lignina. Dentro de las enzimas degradadoras de lignina se encuentran las lacasas, que tienen la capacidad de oxidar compuestos fenólicos. En este trabajo se estudió la producción de enzimas lacasas extracelulares de *P. ostreatus* (ATCC-32783) por fermentación sumergida, con objeto de correlacionar dicha producción con la capacidad de degradación de lignina, manifestándose en una mayor velocidad de invasión micelial sobre los sustratos ligninocelulósicos. El inóculo se creció en cajas Petri sobre agar extracto de malta. La fermentación se desarrolló en matraces de 50 ml que contenían 25 ml de medio de cultivo estéril (medio mineral y 10.5 g/l de glucosa) que se inocularon con pellets de 4 mm de diámetro y se incubaron a 25°C por 20 días con agitación orbital a 120 rpm. Se tomaron muestras cada 24 h y se cuantificó la biomasa seca (g/l), actividad de lacasa (U/l), proteína soluble excretada (g/l). Se observó la biomasa máxima (2.6 g/l) a las 344 h de fermentación con un μ de $0.02h^{-1}$; se observaron dos picos de actividad de lacasa (62 y 44 U/l) a las 144 y 432 h de fermentación respectivamente. Estos resultados muestran que la cepa ATCC-32783 es altamente productora de enzimas lacasas, lo que sugiere que sería una cepa hiperproductora en planta piloto. Además, esta cepa podría ser un organismo de estudio en aspectos relacionados con la oxidación de compuestos cancerígenos de tipo fenólico en aguas residuales.