



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta  
Posgrado en Ciencias Biológicas

**Presencia de isoenzimas con actividad lacasa en *Amylomyces rouxii* y *Pleurotus ostreatus* en medio líquido e inserción de un gen de lacasa de *Pleurotus ostreatus* en un vector de clonación**

# T e s i s

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

**Héctor Vázquez Peñaloza**

Directora de tesis

Dra. Alba Mónica Montiel González

Co- director

Dr. Francisco José Fernández Perrino

Tlaxcala, Tlax.

Septiembre 2012





Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta  
Posgrado en Ciencias Biológicas

**Presencia de isoenzimas con actividad lacasa en *Amylomyces rouxii* y  
*Pleurotus ostreatus* en medio líquido e inserción de un gen de lacasa de  
*Pleurotus ostreatus* en un vector de clonación**

# T e s i s

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Héctor Vázquez Peñaloza

Comité Tutorial

Dra. Alba Mónica Montiel González

Dr. Francisco José Fernández Perrino

Dra. Araceli Tomasini Campocosio

Dra. María Mercedes Rodríguez Palma

Tlaxcala, Tlax.

Septiembre 2012

## Hoja de Financiamiento

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. Héctor Vázquez Peñaloza recibió una beca para estudios de maestría por CONACyT con el número de registro: 230597.

Cabe mencionar que el programa de Maestría en Ciencias Biológicas de la UAT está registrado en el Programa Nacional de Posgrado-CONACyT (PNP 00-30-03)



Universidad Autónoma de Tlaxcala  
Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta



COORDINACIÓN DE LA MAESTRÍA  
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA  
P R E S E N T E

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que **Héctor Vázquez Peñaloza** 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 **“Presencia de isoenzimas con actividad lacasa en *Amylomyces rouxii* y *Pleurotus ostreatus* en medio líquido e inserción de un gen de lacasa de *P. ostreatus* en un vector de clonación”**.

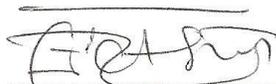
Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
TLAXCALA, TLAX., SEPTIEMBRE 3 DE 2012

  
DR. ARTURO ESTRADA TORRES

  
DRA. ALBA MÓNICA MONTIEL GONZÁLEZ

  
DRA. ARACELI TOMASINI CAMPOCOSIO

  
DR. FRANCISCO CASTELÁN

  
DRA. MAURA TÉLLEZ TÉLLEZ



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado Bajo la Norma:  
ISO 9001:2000-NMX-CC-9001-IMNC-2000



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070 Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: [posgradoctbcuat@gmail.com](mailto:posgradoctbcuat@gmail.com)  
Tlaxcala, Tlax.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por la beca otorgada para la realización de la maestría.

Un especial agradecimiento a los doctores de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapala: Al Dr. Francisco José Fernández Perrino, A la Dra. Araceli Tomasini Campocosio, Al Dr. Francisco Fierro Fierro, Al Dr. Jaime Marcial Quino y a los alumnos del posgrado en biotecnología; MC Jessica, MC Marisol y MC Cristian, por el tiempo, las enseñanzas y el apoyo durante nuestra estancia en al UAM-I, Gracias.

Al comité tutorial: Dra Alba Mónica Montiel González, Dr. Francisco José Fernández Perrino, A la Dra. Araceli Tomasini Campocosio y la Dra María Mercedes Rodríguez Palma, por el tiempo y apoyo para la elaboración de la tesis.

A Leyda, por su apoyo, comprensión y dedicación durante la maestría, las cosas que me enseñó y aprendimos juntos, por estar conmigo en las buenas y en las malas, por todos los momentos que me apoyó en los momentos que más lo necesité y sobre todo por permitirme ser su amigo y esperar que esta relación perdure toda una vida. Muchas Gracias. ☺

Agradecer a mis compañeros y amigos de la maestría, A Faviola por su apoyo y comprensión y a Altayra por enseñarme su metodología de protoplastos☺.

## RESUMEN

Los hongos son organismos eucariotas que influyen en nuestra vida cotidiana, su impacto en el ambiente se debe a su papel como desintegradores, esto involucra reacciones de oxidación en las que participan enzimas del tipo fenoloxidasas y/o peroxidasas que se encuentran de manera intrínseca en los complejos enzimáticos de algunos organismos.

Los hongos del género *Pleurotus* se han distinguido por contener un complejo enzimático constituido por lignina peroxidasas, manganeso peroxidasas y lacasas. Las lacasas se producen en sistemas de fermentación tanto sólidos como líquidos. Entre estos hongos tenemos a *Pleurotus ostreatus* el cual es un basidiomiceto capaz de producir enzimas lacasa intra y extra celulares.

Los hongos filamentosos son la principal fuente de enzimas y metabolitos, entre éstos tenemos al grupo de los Zygomycetos, los cuales conforman un grupo importante que han sido utilizados en la industria de la fermentación de alimentos, Entre los zigomicetos tenemos a *Amylomyces rouxii*, del cual no se ha reportado la presencia de enzimas o genes que codifiquen para lacasa dentro de su genoma. Por esta razón, se planea evaluar las isoenzimas de lacasa de *Pleurotus ostreatus* y *Amylomyces rouxii* en medio líquido y aislar e introducir un gen de lacasa de *Pleurotus ostreatus* en un vector de clonación.

Se realizaron fermentaciones líquidas de *Pleurotus ostreatus* y *Amylomyces rouxii* para la identificación del perfil de isoenzimas lacasa mediante electroforesis de SDS-PAGE intra y extracelulares, por otro lado se extrajeron muestras de DNA con fenol-CIA y se realizaron PCR con cebadores específicos de las extremos de las regiones codificantes del gen de lacasa para su amplificación. Las bandas obtenidas se secuenciaron para identificar un gen de lacasa que se integró dentro de un vehículo plasmídico para posteriores análisis.

Se identifico el perfil de isoenzimas lacasa producidas en fermentación líquida, mostrando un patrón de isoenzimas de 37 y 50 kDa que corresponde con lo ya reportado previamente en otras cepas y organismos productores de lacasas. También se identificó el perfil intracelular que muestra un perfil de tres isoenzimas en las primeras horas de la fermentación y que corresponde con los tamaños aproximados de 37, 50 y 80 kDa respectivamente.

Para *Amylomyces rouxii* con las pruebas realizadas en el laboratorio no se identificaron isoenzimas lacasa y/o genes que codifique para esta enzima.

Finalmente, se aisló e identificación de un gen de lacasa de *Pleurotus ostreatus* de una longitud aproximada de 2700 pb, que consta de toda la región codificante del gen con un 90 % de similitud con lacasas de *Pleurotus ostreatus* y un 91 % de lacasa de *Pleurotus eryngii* de acuerdo con el análisis del NCBI con lacasas ya reportadas.

# ÍNDICE

	Pág.
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 LOS HONGOS Y SU IMPORTANCIA .....	1
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>3</b>
2.1 LOS HONGOS FILAMENTOSOS.....	3
2.2 LOS BASIDIOMICETOS: <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> .....	5
2.3 LACASAS Y SU FUNCIÓN .....	6
2.4.GENES E ISOFORMAS .....	7
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>10</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
4.1 OBJETIVO GENERAL .....	11
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....	11
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
5.1 MICROORGANISMOS UTILIZADOS .....	12
5.2 VECTOR .....	12
5.3 MEDIOS DE CULTIVOS .....	13
5.3.1 Medio de cultivo utilizado para bacterias.....	13
5.3.2 Medio de cultivo utilizado para hongos.....	14
5.4 CONDICIONES DE CRECIMIENTO.....	15
5.4.1 Condiciones de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ ( <i>E. coli</i> ).....	15
5.4.2 Conservación y propagación de <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Amylomyces rouxii</i> .....	16
5.5 EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE ISOENZIMAS LACASA EN <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> Y <i>AMYLOMYCES ROUXII</i> .....	16
5.5.1 Fermentación líquida de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	16
5.5.2 Fermentación líquida de <i>Amylomyces rouxii</i> .....	17
5.5.3 Determinación de isoenzimas mediante Zimogramas.....	18
5.5.4 Identificación de actividad lacasa con siringaldazina.....	19
5.6 BÚSQUEDA DE GENES QUE CODIFICAN PARA LACASA EN <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> Y <i>AMYLOMYCES ROUXII</i> .....	19
5.6.1 Obtención de ácidos nucleicos.....	20
5.6.1.1 Extracción de RNA total .....	20
5.6.1.2 Transcripción reversa (RT).....	20
5.6.2 Extracción de ADN genómico de <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Amylomyces rouxii</i> .....	21
5.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	21

5.6.4 <i>Electroforesis en geles de agarosa</i> .....	22
5.6.4.1 Purificación de productos de PCR a partir de geles de agarosa. ....	23
5.7 AMPLIFICACIÓN DEL VECTOR .....	23
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>27</b>
6.1 PERFIL DE ISOENZIMAS LACASA EN <i>AMYLOMYCES ROUXII</i> .....	27
6.2 ISOENZIMAS LACASA EXTRACELULARES DE <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> .....	29
6.3 ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....	31
6.4 ANÁLISIS DEL GEN DE <i>PLEURORUS OSTREATUS</i> OBTENIDO MEDIANTE ADN TOTAL .....	32
6.5 CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pJET1.2/BLUNT CON EL INSERTO.....	34
6.6 REAMPLIFICACIÓN Y CONFIRMACIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN .....	37
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>38</b>
<b>8. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>39</b>
<b>9. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>40</b>
<b>10. GLOSARIO DE TÉRMINOS.....</b>	<b>45</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plásmido pJET1.2/Blunt, su digestión con <i>EcoRV</i> que deja extremos romos .....	13
Figura 2. Zimogramas de extracto enzimático extracelular de <i>Amylomyces rouxii</i> .....	27
Figura 3. Determinación de actividad lacasa con siringaldazina.....	28
Figura 4. Gel con el producto de PCR de <i>Amylomyces rouxii</i> y de <i>Pleurotus ostreatus</i> como control, usando cebadores para lacasa.....	29
Figura 5. Zimogramas de <i>Pleurotus ostreatus</i> de extracto enzimático extracelular .....	30
Figura 6. Zimogramas de <i>Pleurotus ostreatus</i> de extracto enzimático intracelular donde se muestra el perfil de isoenzimas lacasa durante la fermentación.....	31
Figura 7. Gel de agarosa donde se muestra los diferentes amplicones que corresponde al ADNc obtenidos a partir de RT-PCR.....	32
Figura 8. Producto de PCR a partir de ADN total de <i>Pleurotus ostreatus</i> , se muestra un amplicón de 2700 pb que corresponde al gen POX.....	33
Figura 9. Resultado de la búsqueda con BLAST para determinar la similitud con lacasas reportadas en las bases de datos. ....	34
Figura 10. Plásmido construido con el gen de lacasa, simulación con un programa bioinformático .....	34
Figura 11. Gel con el plásmido lineal digerido con <i>BamH1</i> y esquema del vector con el inserto, para visualizar el sitio de corte único .....	35
Figura 12. Digestión del plásmido con la enzima <i>Bgl/III</i> que cortan a los extremos del inserto.	36
Figura 13. Amplificación del plásmido con cebadores específicos de lacasa y esquema del vector con el inserto, para visualizar la región de los cebadores utilizados .....	37

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes del medio LB .....	13
Tabla 2. Composición del medio PMY .....	14
Tabla 3. Composición del medio Melin-Norkrans .....	15
Tabla 4. Reactivos para la reacción de RT-PCR .....	20
Tabla 5. Reactivos para la reacción de PCR.....	22

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Los hongos y su importancia

La sociedad humana ha obtenido beneficios de los microorganismos de muchas formas, algunos son necesarios para la elaboración de alimentos, tales como pan, queso, cerveza o para síntesis de antibióticos, vacunas, vitaminas, enzimas y otros productos de interés (Prescott y cols., 2004), por otro lado, algunos organismos presentan una serie de capacidades metabólicas apropiadas para llevar a cabo la degradación de compuestos contaminantes. Entre éstos, los hongos tienen gran importancia en términos de beneficio, así como en términos de perjuicio dependiendo de la especie a la que pertenezcan.

Los hongos son organismos eucariotas que influyen en nuestra vida cotidiana en diversas áreas como la medicina, la agricultura y la ciencia (Hara y cols., 1992), su impacto en el ambiente se debe a su papel como desintegradores, por ejemplo, ayudan a la degradación de materia orgánica acumulada hasta compuestos orgánicos y moléculas inorgánicas simples, de esta forma se liberan y se ponen a disposición de otros seres vivos sustancias como carbono, nitrógeno, fósforo y otros compuestos cruciales para su sobrevivencia (Prescott y cols., 2004). La degradación de estos compuestos involucra reacciones de oxidación en las que participan enzimas del tipo fenoloxidasas y/o peroxidasas que se encuentran de manera intrínseca en los complejos enzimáticos de algunos organismos.

Los organismos aislados de la naturaleza que producen metabolitos de interés lo hacen a niveles muy bajos, por lo tanto es necesario incrementar estos rendimientos para lograr una mayor rentabilidad de los procesos.

Una opción atractiva es la expresión heteróloga, en este proceso se utiliza un organismo diferente como hospedero del gen que contienen la información necesaria para la síntesis de un metabolito de interés. Este es el método más aplicado en la producción de proteínas durante los últimos años, por lo que es utilizado no sólo en la obtención de productos para la industria, sino también en la obtención de moléculas de importancia biomédica (García

y cols. 2007). La mayoría de estos sistemas emplean como hospedero a la bacteria Gram Negativa *Escherichia coli* por diversas razones, entre las que destacan, su rápido crecimiento, su amplia caracterización genética, la disponibilidad de un gran número de cepas y de vectores de expresión y la capacidad de producir proteínas a gran escala. Pero tiene limitaciones en cuanto a la maquinaria para las modificaciones postraduccionales que algunas proteínas requieren para ser funcionales, por lo que es necesario intentar con organismos que por su naturaleza ofrezcan mejores oportunidades en este sentido (Esclapez 2004).

El reciente desarrollo de este tipo sistemas de transformación mediado por ADN de varias especies de hongos ha motivado una amplia investigación hacia el desarrollo de expresión en estos organismos. Esta tecnología es ahora un medio viable para la mejora de cepas de hongos y está siendo estudiada para aplicarse a la producción de productos heterólogos de enzimas, antibióticos y productos químicos. (Berka y Barnett, 1989)

Por lo tanto, la utilización de estas herramientas resultan en una alternativa para incrementar la productividad y el rendimiento de metabolitos de un organismo, todo esto mediante el mejoramiento de una cepa a través del control de su genoma., una opción es el uso de técnicas llevadas a cabo en áreas como la ingeniería genética, gracias a que han revolucionado el procedimiento de clonación de ADN, así se puede lograr que genes de cualquier tipo puedan ser tomados de su ambiente natural, analizados, alterados y reinsertados en el mismo tipo de organismo o en otro diferente que posea mayores ventajas.

Es así que la producción de diferentes sustancias como, productos químicos, hormonas, antígenos, enzimas y otras sustancias de interés pueden realizarse en grandes cantidades debido al clonado de genes específicos en organismos que pueden ser desarrollados en escala industrial.

Los hongos filamentosos son capaces de producir una amplia gama de enzimas y proteínas en grandes cantidades, la mayoría de ellos son transformados utilizando plásmidos,

los cuales son integrados dentro del genoma (Wang y cols. 2005). Por estas razones, los hongos filamentosos tienen un enorme potencial como anfitriones de ADN recombinante.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Los hongos filamentosos

Los hongos filamentosos son la principal fuente de enzimas y metabolitos y con el crecimiento de la industria biotecnológica han sido empleados en procesos de fermentación a nivel industrial por contar con características como bajo costo en su producción, conservación y una alta productividad, por lo que se han incrementado esfuerzos de investigación tanto en genética, técnicas moleculares y mejoramiento de los bioprocesos para ser utilizados, manipulados y que puedan obtenerse beneficios de estos organismos (Wang y cols., 2005).

La aplicación de técnicas en ingeniería genética en hongos filamentosos ha llevado a grandes avances en el conocimiento de la estructura, organización y regulación genética de estos microorganismos (Cardoza y col., 2006). Éstos son capaces de producir una amplia gama de enzimas y proteínas en grandes cantidades, la mayoría de ellos son transformados utilizando plásmidos, los cuales son integrados dentro del genoma (Wang y cols., 2005), por estas razones, los hongos filamentosos tienen un enorme potencial como anfitriones de ADN recombinante.

Entre estos hongos, tenemos al grupo de los Zygomycetes, que se han utilizado en la industria de la fermentación de alimentos. Entre los principales géneros utilizados tenemos a: *Rhizopus*, *Amylomyces*, *Actinomucor*, *Mucor*, *Chaetostylum* y *Thamnidium* (Hesseltine 1991), que son utilizados como iniciadores de procesos de fermentación en la elaboración de productos alimenticios.

Entre estos organismos, *Amylomyces*, es un género monotípico compuesto por una sola especie *Amylomyce rouxii* (Kito y cols., 2009) descubierta en 1892, en un estudio taxonómico

de *Amylomyces* basado en aspectos morfológicos, se ha determinado la producción de una gran cantidad de clamidosporas producidas en el micelio aéreo y el sustrato, las cuales son globosas, crece rápidamente produciendo colonias blancas en medios sintéticos y se encuentra filogenéticamente relacionado con *Rhizopus oryzae*. (Abe y col., 2006; Ellis y cols., 2009; Kito y cols., 2009).

*Amylomyces rouxii* es un zigomiceto capaz de desarrollarse en efluentes contaminados con compuestos aromáticos policlorados, por ejemplo, de industrias de manufactura de papel, de donde se ha logrado aislar (Tomasini y cols., 1996). Este hongo ha demostrado la capacidad de degradar pentacolorofenol (PCP) hasta en un 85% de su concentración inicial, tanto en medio de cultivo sólido sobre soportes biodegradable (Marcial y cols., 2005) como en medio de cultivo líquido (Montiel y cols., 2004). Se ha reportado que posee un complejo enzimático que incluye tirosinasas que lo protegen contra radiaciones y algunas otras condiciones estresantes (Fan y Flurkey 2004), Dicha enzima es usada en procesos de biorremediación en suelos que contienen compuestos fenólicos y como un biosensor para determinar contaminación ambiental. Se ha utilizado también en industrias como la de producción de cosméticos, alimentos y farmacéuticas. *Amylomyces* se ha utilizado principalmente en la elaboración de productos fermentados como bebidas y producción de ácido láctico debido a que posee enzimas como glucoamilasas, capaces de degradar almidón y amilopeptina (Wang y cols., 2006). Otro hecho importante es que ha sido transformado con peroxidasas de *Phanerochaete chrysosporium* utilizando promotores de alta eficiencia y terminadores de *Aspergillus* y las ha expresado causando un incremento en el porcentaje de degradación del tóxico (Montiel y cols., 2009) lo que habla no sólo de la expresión si no de la funcionalidad de las peroxidasas obtenidas.

Las características como rápido crecimiento y bajos requerimientos nutricionales, hacen de *Amylomyces rouxii* una buena elección como hospedero del gen de lacasa, ya que revisando la literaria del área no se ha reportado la presencia de estas enzimas o de los genes que la codifiquen dentro de su genoma, lo que permitiría una evaluación más objetiva de su expresión heteróloga, así como ser una especie factible de ser transformada al tener

antecedente de haber expresado genes heterólogos de peroxidasa. Aunado a esto, tiene la característica como la facilidad de desarrollarse en ambos sistemas de fermentación, tanto sólido como líquido, que hacen de este organismo una buena opción para intentar expresar heterológamente enzimas de interés producidas por otros organismos.

## **2.2 Los Basidiomicetos: *Pleurotus ostreatus***

Los basidiomicetos constituyen el grupo más hábil de microorganismos a la hora de llevar a cabo la eliminación rápida y efectiva de lignina, debido a que presentan un complejo enzimático conformado por enzimas tales como: lacasas, lignina peroxidases (Li-P) y manganeso peroxidases (Mn-P), de hecho son los mayores productores de fenoloxidasas del tipo lacasa y otras enzimas degradadoras de lignina (Baldrian, 2006), Entre los basidiomicetos estudiados, el género *Pleurotus* se ha distinguido por su capacidad para producir lacasas cuando es cultivado en sistemas de fermentación tanto sólidos como líquidos. Se ubica entre los hongos que causan la pudrición blanca (WRF por sus siglas en inglés *White Rot Fungi*), en donde las lacasas son consideradas parte de su sistema ligninolítico (Eggert y cols., 1997) En particular, los hongos del género *Pleurotus* degradan lignina de forma más extensa y rápidamente que otros organismos conocidos (Cullen y Kersten 1996), en sistema de fermentación líquida ha sido utilizado para la degradación de compuestos orgánicos como los hidrocarburos policíclico aromáticos (Betzalel y cols. 1996a). y es capaz de metabolizar y mineralizar hidrocarburos policíclicos aromáticos (Bezalel y cols. 2007) y colorantes artificiales causantes de contaminación ambiental en industrias, se ha observado que están sujetos a la reacción de oxidación que las fenoloxidasas llevan a cabo, de tal manera pueden ser transformados por estas enzimas a compuestos menos tóxicos, incluso hasta la mineralización, razón por la que se ha incrementado el interés por su estudio.

### 2.3 Lacasas y su función

Las multicobre oxidasas (MCOs) contienen un centro con cobre que cataliza la oxidación de varios sustratos junto a la reducción de peróxidos a agua, entre éstas tenemos a las lacasas que tienen una amplia distribución entre hongos y plantas debido a su participación en la transformación de una amplia variedad de compuestos fenólicos y a la degradación de lignina por los hongos (Li y cols., 2011, Sirim y cols., 2011).

Las lacasas son polifenoloxidasas (*p*-difenoloxidasas, EC 1.10.3.2) y son una de las enzimas más estudiadas por su interés comercial. La primera vez que se encontraron estas enzimas fue en 1883, en el árbol *Rhus vernicifera*, en Japón (Record y cols., 2002), pero también se han encontrado en varios organismos como hongos, insectos y bacterias (Soden y cols., 2002). El papel biológico de las lacasas no ha sido completamente definido, sin embargo, se le atribuye diferentes procesos biológicos tales como: la esporulación, la producción de pigmento y la degradación de la lignina y su función depende del tipo de organismo al cual pertenezcan,

Las lacasas fúngicas pueden ser constitutivas o inducibles también intracelulares o extracelulares (Sariaslani 1989), su producción es parte importante en el proceso de colonización el sustrato y está relacionada con la pigmentación y patogenicidad (Sonden y cols., 2002) también son determinantes en la producción de cuerpos fructíferos (Murrieta y cols., 2002) y varias lacasas encontradas son extracelulares y se asocian al crecimiento. Estas enzimas han sido detectadas y purificadas a partir de distintas especies de hongos y se ha observado que se producen múltiples isoenzimas (Palmieri y cols., 2000).

Las lacasas son glicoproteínas monoméricas aunque algunas también son multiméricas, son enzimas que catalizan la oxidación de *p*-difenoles acoplada con la reducción del oxígeno en agua. Son consideradas polifenoloxidasas cupro-proteicas que catalizan la oxidación de una gran cantidad de compuestos fenólicos con la reducción correspondiente del O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O sin la necesidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para su acción (Palmieri y cols., 2000). Catalizan la reducción de 4 electrones de oxígeno a agua acoplado a la oxidación de sustratos orgánicos de bajo peso

molecular. Tienen un sitio catalítico caracterizado por cuatro átomos de cobre unidos a tres sitios REDOX (T1, T2 y T3), a su vez unidos a cuatro electrones para reducir oxígeno a agua mientras oxida su respectivo sustrato (Kunamneni 2008). Son capaces de catalizar la oxidación, polimerización o transformación de compuestos aromáticos como el fenol o la anilina, otros no aromáticos como los alquenos o antropogénicos contaminantes a derivados menos tóxicos. Así se pueden listar entre su gran diversidad de sustratos a los fenoles, colorantes, pesticidas, e hidrocarburos aromáticos policíclicos (Karam 2007, Rodgers y cols., 2009). Precisamente debido a su alta inespecificidad para oxidar compuestos tóxicos, constituyen una buena alternativa para implementarse en procesos de biorremediación de suelos y aguas, así como en las industrias papelera y petroquímica (Prescott y cols., 2004, Baldrian 2005).

El interés de la lacasa en la industria es incrementar su potencial para ser utilizados en diferentes sectores, sus aplicaciones son variadas y van desde los sectores textiles, de alimentos, papel, en la industria farmacéutica, nano biotecnología, cosméticas y bio-remediación. También se han mostrado que participan activamente en la descomposición de la lignocelulosa (Salmones y cols., 2005), a nivel industria su importancia radica en la destoxificación de residuos (Salony y cols., 2007), saneamiento de aguas y biorremediación (Madzak y cols., 2006).

#### **2.4. Genes e Isoformas**

Las lacasas en los basidiomicetos están codificadas por varios genes, por lo general, las secuencias de lacasa descritas en las bases de datos codifican para una cadena polipeptídica de entre 520-550 aminoácidos. El alineamiento de secuencias de lacasas de hongos ha mostrado que los dominios de unión al cobre están altamente conservados, incluso cuándo el resto de la secuencia de aminoácidos posee una baja similitud. Se ha reportado que los hongos del género *Pleurotus* secretan más de una isoenzima lacasa. La familia de lacasas del basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* representan un grupo variado de enzimas. Además de la isoenzima POXC (Giardina y cols., 1996), que representa la producción más abundante, el hongo excreta la

isoenzima POXA1w y la lacasa heterodimérica POXA3, que se ha observado estable en pH alcalinos. También, se ha mostrado que el cobre en *Pleurotus ostreatus* promueve la expresión de las isoenzimas *POXA1b* regulando así el nivel de la transcripción del gen; siendo el *poxa1b* ARNm el más abundante en la transcripción inducida a todos los tiempos de crecimiento analizados (Palmieri y col., 2000). Hasta ahora se han reportado 11 genes (lacc1, lacc2, lacc3, lacc4, lacc5, lacc6 lacc7, lacc8, lacc10, lacc11, lacc12), sin embargo, solo se han encontrado las secuencias de 6 genes completos en las bases de datos, de los cuales se han logrado aislar seis diferentes isoenzimas de *Pleurotus ostreatus* (Pezzella y cols., 2012) y su expresión puede depender de las condiciones de cultivo (Palmieri y cols 2000) y de la fase de crecimiento (Lettera y cols., 2010).

La regulación de la expresión de genes de la lacasa difiere de un organismo a otro, reflejando probablemente las diferentes funciones fisiológicas de estas enzimas en los hongos. La expresión de genes de lacasa en algunos hongos puede ser estimulada por inductores, por ejemplo *Pleurotus ostreatus* que se ha mostrado la inducción por cobre ser adicionarlo en el medio de cultivo, mientras que en otros, la expresión es sensible a las condiciones del medio de cultivo y es afectada por las concentraciones de nitrógeno o fuentes de carbono. Por otro lado, se ha mostrado que la regulación de los genes puede estar influenciado por regiones denominas elementos de repuesta a xenobiótico (MRX) y elementos de respuesta a metales (MRE). Algunos estudios han demostrado que la expresión de genes para las isoenzimas de lacasa en fermentación en estado sólido puede ser diferente a los presentes en fermentación sumergida (Iwashita 2002).

Sin embargo, a pesar del conocimiento que se tiene y de su enorme potencial para descontaminación, su uso se ha limitado a escala de laboratorio debido a los elevados costos de producción (Majeau y cols., 2009). Por lo tanto, resulta imprescindible la búsqueda de nuevos organismos capaces de producir cantidades apreciables de metabolitos de interés que puedan degradar compuestos tóxicos.

Dentro de los estudios para el mejor conocimiento de estas enzimas en *Pleurotus ostreatus*, se han aislado algunas isoformas con el fin de conocer sus características catalíticas. A pesar de que éstas presentan mejores actividades enzimáticas y de que se hayan estudiado sus características de producción en distintos sistemas de fermentación, además de tener identificados algunos genes que las codifican, este organismo no es un buen modelo para llevar a cabo estrategias para su sobreproducción debido a su lento crecimiento

Por estas razones en el presente estudio se pretende evaluar a *Amylomyces rouxii* al determinar las características intrínsecas de producción de lacasas o genes que no se estén expresando, además de determinar los perfiles de isoenzimas lacasa en la cepa PoB de *Pleurotus ostreatus*, así como aislar y clonar en *E. coli* uno de los genes que las codifican para tenerlo disponible para estudios posteriores.

### 3. JUSTIFICACIÓN

*Amylomyces rouxii* es un hongo filamentoso que presenta rápido crecimiento, facilidad para desarrollarse en ambos sistemas de fermentación y un complejo enzimático que favorece su desarrollo en condiciones estresantes. Este organismo ha sido utilizado para la degradación de compuestos tóxicos y en los últimos años se han realizado investigaciones en las que se evalúa su potencial de aplicación en procesos biotecnológicos, especialmente de biorremediación y como un organismo susceptible de ser transformado al introducir en su genoma genes de otros organismos por lo que resulta interesante determinar si este organismo con un complejo enzimático constituido por lacasa.

Por otro lado *Pleurotus ostreatus* es un organismo productor de lacasas con variación en el número de isoenzimas y actividad dependiendo de la cepa utilizada y el sistema de cultivo, razón por la cual es determinante evaluar estos parámetros en la cepa PoB cultivada en medio líquido. Las lacasas son enzimas utilizadas para diferentes procesos biotecnológicos como la biorremediación. Por esta razón resulta una opción atractiva contar con un gen de lacasa disponible para su uso en posteriores estudios de expresión.

Por lo tanto se plantean las siguientes preguntas de investigación:

¿Cuenta *Amylomyces rouxii* con actividad extracelular de lacasas o genes que la codifiquen?

¿Cuál es el perfil de isoenzimas que presenta la cepa PoB de *Pleurotus ostreatus* cultivada en medio líquido?.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Evaluar las isoenzimas de lacasa de *Pleurotus ostreatus* y *Amylomyces rouxii* en medio líquido e introducir un gen de lacasa de *Pleurotus ostreatus* en un vector de clonación.

### **4.2 .Objetivos particulares**

1. Determinar los perfiles de isoenzimas de lacasa de la cepa PoB de *Pleurotus ostreatus* en cultivo en medio líquido.
2. Definir la capacidad intrínseca de *Amylomyces rouxii* para producir lacasas a través de la evaluación de su actividad enzimática y de la determinación de la existencia de genes que codifica para su síntesis.
3. Aislar al menos un gen de lacasa y obtener un vehículo plasmídico con el gen de lacasa de *Pleurotus ostreatus* disponible en *E. coli*.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Microorganismos utilizados

*Pleurotus ostreatus*: Se utilizó la cepa Po. B de *Pleurotus ostreatus* que forma parte de la colección de hongos del Laboratorio Institucional de Hongos Comestibles de la Universidad Autónoma de Chapingo.

*Amylomyces rouxii*: Donada por el laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, aislada de un efluente de desecho de la industria del papel.

*Escherichia coli* **DH5 $\alpha$**  (*E. coli* *DH5 $\alpha$* ), donada por el laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, utilizada en experimentos de transformación debido a su alta eficiencia de transformación, tiene una mutación en el gen Z del operón *lac* que permite seleccionar a las transformantes que posean un plásmido capaz de originar la  $\alpha$ -complementación de dicha mutación.

Genotipo: *deoR*, *endA1*, *gyrA96*, *recA1*, *hsdR17* (rk-, mk+), *relA1*, *supE44*, *thi-1*,  $\Delta(lacZYA-argFV169)$  f80 $\delta lacZ\Delta M15F\lambda^-$ .

### 5.2 Vector

**pJET 1.2/Blunt** (Fermentas) Vector de clonación comercial de 2,974 pb para *E. coli* (Figura 1), se encuentra en forma lineal con *Eco321* (*EcoRV*) y está diseñado para la clonación de productos PCR generados por polimerasas dejan productos en terminación como. Contiene un gen letal (*eco47IR*) que es interrumpido al ligar el inserto de ADN en el sitio de clonaje, lo que facilita la selección de las recombinantes. Como marcador de selección posee resistencia a ampicilina.

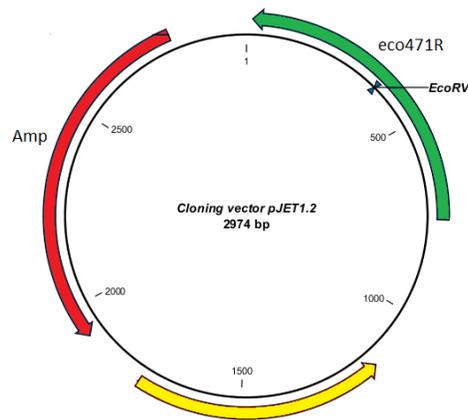


Figura 1. Plásmido pJET1.2/Blunt, su digestión con EcoRV que deja extremos romos

## 5.3 Medios de cultivos

### 5.3.1 Medio de cultivo utilizado para bacterias

**Medio Luria–Bertani (LB):** Medio de cultivo utilizado para la propagación y conservación de la cepa de *Escherichia coli*. La composición del medio LB se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Componentes del medio LB

Bacto-triptona	10.0 g
NaCl	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Agua destilada	c.s.p 1000 mL

Se ajustó el pH a 7.0 con KOH 0.1 M.

Cuando se utilizó como medio sólido (Medio LA), se adicionó agar bacteriológico al 2 % (p/v), se esterilizó y se vertieron 30 mL de medio en cajas Petri.

También se utilizó para la selección de las bacterias transformantes que contuvieran el plásmido con resistencia al antibiótico mediante la adición de ampicilina (concentración final: 100 µg/mL).

### 5.3.2 Medio de cultivo utilizado para hongos

**Agar extracto de malta (EMA):** Se utilizó para la producción, propagación y conservación de micelio de *Pleurotus ostreatus* y *Amylomyces rouxii*, se utilizaron cajas Petri (*Pleurotus ostreatus*) y matraces Erlenmeyer de 125 mL (*Amylomyces rouxii*) con 30 mL medio agar extracto de malta (Dibco) siguiendo las especificaciones del fabricante.

**Agar Papa Dextrosa (PDA).** Medio utilizado para la conservación de hongos.

**Medio PMY:** Medio de cultivo líquido utilizado para el crecimiento del micelio de *Amylomyces rouxii*. Su composición se muestra en la tabla 2

**Tabla 2. Composición del medio PMY**

Glucosa		40 g
NaNO <sub>3</sub>		3 g
Extracto de levadura		2 g
KCl		0.5g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O		0.5 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O		0.01 g
H <sub>2</sub> O destilada	c.s.p.	1000 mL

Se ajustó el pH a 6.0 con KOH 0.1 M

**Medio Melin-Norkrans (MN):** Utilizado como medio de cultivo líquido para el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* y *Amylomyces rouxii*. Su composición se muestra en la tabla 3.

**Tabla 3. Composición del medio Melin-Norkrans**

Extracto de levadura	5 g
Glucosa	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.4 g
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.001 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6 g
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.05 g
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0.05 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.5 g
H <sub>2</sub> O destilada c.s.p.	1000 mL

(Ainsworth 1995 Modificado).

Se Ajustó el pH a 6.5 con NaOH 0.1 M y/o HCl 1 M.

Todos los medios descritos anteriormente se esterilizaron en autoclave con vapor a presión a 121 psi durante 15 minutos.

### **Antibiótico**

Ampicilina: Se utilizó como marcador de selección para bacterias.

## **5.4 Condiciones de crecimiento**

### **5.4.1 Condiciones de crecimiento de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ (*E. coli*)**

Para el crecimiento de *E. coli* se utilizaron los medios LB y LA, dependiendo si se requería sólido (LA) o líquido (LB). Para seleccionar las transformantes con el plásmido se adicionó ampicilina como marcador de selección, se incubaron a 37°C durante 24 h (Medio LA) y 120 rpm (Medio LB).

#### **5.4.2 Conservación y propagación de *Pleurotus ostreatus* y *Amylomyces rouxii***

Para su conservación, *Pleurotus ostreatus* y *Amylomyces rouxii* fueron sembrados en medio PDA e incubados a 24°C durante 7 y 3 días, respectivamente. Después de este tiempo se mantuvieron en viales con glicerol al 40% a -20°C hasta su utilización. Para su propagación se sembraron en placas con medio EMA, se incubaron en las mismas condiciones y se conservaron en refrigeración a 4°C.

### **5.5 Evaluación de la presencia de isoenzimas lacasa en *Pleurotus ostreatus* y *Amylomyces rouxii***

#### **5.5.1 Fermentación líquida de *Pleurotus ostreatus***

La fermentación líquida de *Pleurotus ostreatus* Po B se realizó en medio Melin-Norkrans. En matraces Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de medio se inocularon 3 *pellets* de 4 mm de diámetro sin agar tomados con un horador de un pre inóculo propagado con anterioridad y re-suspendidos en 2 mL de agua estéril. Se incubaron a 24°C con agitación orbital constante a 120 rpm. Se realizaron 3 fermentaciones con 21 matraces cada una y se tomaron muestras a las 0 h (tiempo 0) y posteriormente cada 24 h hasta completar 21 muestras.

#### **Obtención de biomasa y extracto crudo enzimático**

Para la obtención del extracto enzimático de *Pleurotus ostreatus* Po B se tomaron alícuotas de los puntos de muestreo en tubos Eppendorf de 1.5 mL, Cada alícuota se centrifugó durante un minuto a 10,000 rpm, el sobrenadante se transfirió a tubos tipo Falcón de 50 mL y se conservaron a -20°C hasta el momento de ser utilizados.

La biomasa obtenida por centrifugación se utilizó para la extracción de ADN.

## 5.5.2 Fermentación líquida de *Amylomyces rouxii*

### Método de propagación de *Amylomyces rouxii*

La propagación de *Amylomyces rouxii* se realizó en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 30 mL de medio EMA y se incubó a 24°C durante 3 días hasta que el hongo esporuló, después de lo cual se conservaron en refrigeración a 4°C hasta su utilización.

**Obtención de esporas:** Para la obtención de las esporas de *Amylomyces rouxii*, se agregaron 5 mL de Tween 80 al 0.2% (v/v) a cada matraz Erlenmeyer, se dejó en agitación en una parrilla magnética durante 5 minutos para favorecer la liberación de las esporas, al finalizar el tiempo se filtró con una tela estéril y se realizó el conteo de esporas con la cámara de Neubauer.

**Conteo de esporas:** Las esporas se contaron en una cámara de Neubauer, se realizó contando las áreas de recuento para glóbulos rojos y se calculó el número de esporas/mL con la siguiente fórmula

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{ml}} = \frac{N}{5} \times 25 \times \text{factor dilución} \times 1 \times 10^4$$

Donde N es el número de esporas contadas en total

### Método de Fermentación líquida de *Amylomyces rouxii*

La fermentación líquida de *Amylomyces rouxii* se realizó en medio Melin-Norkrans. Muestras de 1 mL de suspensión de esporas con aproximadamente  $5.8 \times 10^6$  esporas/mL se inocularon en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de y se incubaron a 24°C con agitación orbital constante a 120 rpm. Se realizaron 3 fermentaciones con 21 matraces cada una y se tomaron muestras a las 0 h (tiempo 0) y posteriormente cada 24 h durante 20 días.

### **Obtención de biomasa y extracto crudo enzimático**

Para la obtención del extracto, se tomaron alícuotas de cada punto de muestreo en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Cada alícuota se centrifugó durante un minuto a 10,000 rpm y el sobrenadante se transfirió a tubos tipo Falcón de 50 mL que se conservaron a -20°C hasta el momento de ser utilizados.

### **5.5.3 Determinación de isoenzimas mediante Zimogramas**

Para identificar las isoformas de lacasa, se tomaron muestras del cultivo de *Pleurotus ostreatus* en medio MN al tiempo inicial (tiempo 0) y posteriormente cada 24 h durante 20 días y del cultivo de *Amylomyces rouxii* cada 12 h durante 5 días. Se utilizó la técnica de zimografía mediante electroforesis en geles de acrilamida en condiciones semi-desnaturalizantes en cubetas Mini-Protean (Bio-Rad). La concentración de acrilamida fue del 4 % en el gel concentrador y de 12% en el gel separador y se reveló con 2,6-dimetoxifenol (DMP), el cual ha sido reportado como sustrato para revelar zimogramas de lacasa (Sodem y cols., 2002).

En tubos Eppendorf se mezclaron 29 µL de muestra y 6 µL de buffer de muestra y se cargaron en cada pocillo de gel. Se aplicó un voltaje constante de 150 V y se dejó correr durante 90 minutos, para determinar una referencia del peso molecular, se utilizó el marcador pre teñido para SDS-PAGE Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio Rad) que comprende un intervalo de peso molecular de 10 a 250 kDa.

Para revelar los geles se utilizó DMP 2mM disuelto en buffer de fosfatos 0.1 M pH 6.5, se añadió la mezcla a los geles después de la electroforesis, se agitaron 15 minutos y se dejó en reposo durante 12 h. Para quitar el exceso de DMP se lavó 3 veces con agua desionizada durante 15 minutos cada vez.

#### **5.5.4 Identificación de actividad lacasa con siringaldazina**

Se determinó la presencia de actividad lacasa cualitativamente para el cultivo de *Amylomyces rouxii*. Para esto se utilizó siringaldazina que es ha reportado como un sustrato para lacasa, con la siguiente metodología: se preparó siringaldazina al 1% en etanol al 96%, se tomaron 100 µL de siringaldazina 1% y de disolvió en 800 µL de buffer de fosfatos 0.1 M pH 6.5 y 100 µL de extracto enzimático, se incubaron a 24°C y se observó de forma cualitativa el cambio de color. Como control positivo se determinó la actividad lacasa de una muestra del extracto enzimático de *Pleurotus ostreatus*.

#### **5.6 Búsqueda de genes que codifican para lacasa en *Pleurotus ostreatus* y *Amylomyces rouxii***

##### **Propagación de *Pleurotus ostreatus* para obtención de ADN**

Para la obtención de la biomasa de *Pleurotus ostreatus* Po B se tomaron alícuotas de cada punto de muestreo en tubos Eppendorf de 1.5 mL a partir de los matraces de la fermentación líquida para la determinación de la actividad enzimática. Cada alícuota se centrifugó durante un minuto a 10,000 rpm y la biomasa obtenida por centrifugación se utilizó para la extracción de ADN.

##### **Propagación de *Amylomyces rouxii* para obtención de ADN**

Para la obtención del ADN total de *Amylomyces. Rouxii*, se inocularon aproximadamente  $1 \times 10^6$  esporas en medio PMY, se incubaron a 24°C con agitación orbital constante a 120 rpm durante 48 h, después se recuperó el micelio por filtración, se lavó con 50 mL de solución isotónica (NaCl 0.9% p/v), 50 mL de solución de lavado (EDTA 100 mM pH 8.0, NaCl 150 mM y Tris-HCl 50 mM pH 8.0) y agua estéril, se secó con papel filtro Whatman hasta retirar el exceso de humedad y el micelio se guardó en tubos Eppendorf a -20°C hasta el momento de ser utilizados

## 5.6.1 Obtención de ácidos nucleicos

### 5.6.1.1 Extracción de RNA total

Para la extracción de RNA total todo el material utilizado se trató previamente con dietil pirocarbonato (DEPC) 0.2 % (v/v). Para su obtención se seleccionó un punto de la fermentación líquida por presentar mayor número de isoenzimas.

La muestra se congeló con nitrógeno líquido y se maceró con un pistilo, la extracción de RNA total se realizó con el kit RNeasy mini kit (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante.

### 5.6.1.2 Transcripción reversa (RT)

Después de la extracción de RNA total, se realizó una limpieza para eliminar residuos de ADN utilizando DNasa tipo I que degrada el ADN.

Posteriormente, se realizó la técnica de transcripción reversa (RT por sus siglas en inglés *Reverse transcription*) la cual tiene como objetivo sintetizar una cadena de ADNc a partir de un RNA molde. Se realizó la síntesis del ADNc a partir del RNA total, previamente tratado con DNasa I, para esto se utilizó el cebador: Oligo d(T)<sub>18</sub> 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3' (Fermentas), que es un cebador que utiliza la región Poli(A) de los mRNA, esta reacción se realizó con el kit Revertaid™ Premium First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas), siguiendo el protocolo del fabricante.

La reacción se realizó en un tubo eppendorf de 200 µL de la siguiente manera:

**Tabla 4 Reactivos para la reacción de RT-PCR**

RNA total, tratado con DNasa	5 µL
Oligo d(T) <sub>18</sub>	1 µL
10 mM dNTPs Mix	1 µL
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	8 µL
5X TR Buffer	4 µL
Premium Reverse Transcriptase	1 µL

### **5.6.2 Extracción de ADN genómico de *Pleurotus ostreatus* y *Amylomyces rouxii***

Para la extracción de ADN genómico de *Pleurotus ostreatus* y *Amylomyces rouxii*, se realizó la técnica de Fenol-CIA.

A partir de la fermentación líquida, cada muestra se lavó con 50 mL de solución de lavado (EDTA 100 mM pH 8.0, NaCl 150 mM y Tris-HCl 50 mM pH 8.0), solución isotónica (NaCl 0.9% p/v) y agua estéril. Una vez lavado, el micelio se recogió y se secó con papel filtro para retirar el exceso de humedad.

Al finalizar, todo el micelio se congeló con nitrógeno líquido y se maceró en un mortero con ayuda de un pistilo, después se recogió el polvo obtenido y se separó en alícuotas (aproximadamente 100 mg de muestra pulverizada) en un tubo Eppendorf. A continuación se añadieron 0.5 mL de tampón de ruptura (EDTA 100 mM pH 8.0, SDS 1% p/v, Tris-HCl 0.2 M, ajustado a pH 8.0), se homogenizó y se añadieron 0.5 mL de fenol y 0.5 mL de CIA (cloroformo-alcohol isoamílico en una relación 24:1), Se mezcló con suavidad y se incubó a 50°C durante 20 minutos (mezclando constantemente con suavidad), al finalizar el tiempo se centrifugó a 14,000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos y se recuperó la fase acuosa (esta fase de desproteinización se lleva a cabo mediante extracción sucesiva con fenol-CIA hasta que se obtiene una interface limpia, aproximadamente 7 u 8 ocasiones), a continuación se hizo una nueva extracción con un volumen de CIA y se precipita el ADN a 4°C durante 12 horas con 0.7 volúmenes de isopropanol. Se centrifugó a 14,000 rpm a 4°C durante 20 minutos, se desechó el sobrenadante y se re-suspendió el precipitado con 1 mL de etanol al 70% (v/v). Finalmente el precipitado se secó y se re suspendió en 20 µL de TE (EDTA 1 mM pH 8.0, Tris-HCl 10mM pH 8.0).

### **5.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Mediante la búsqueda en literatura y el análisis de las secuencias disponibles en las bases de datos internacionales se realizó una alineación de genes completos y la selección de los cebadores se realizó de acuerdo a lo reportado por Giardinia y cols., (1996). A uno de ellos (O1) se le modificó por la integración de nucleótidos pertenecientes a la región conservada del

inicio del gen Pox 2, haciéndolo más largo y más específico para la región promotora del gen y cambiando su nombre a O1´.

Forward O1´ \*                    5´-ATGTTTCCAGGCGCACGGATTCT-3´  
 Reverse LAC 2\*                5´-GCGCTGCAGCTAAGCTATGCCACCTTTGTC-3´

Se realizó la técnica de reacción en cadena de las polimerasas (PCR), la cual tiene por objetivo amplificar regiones de ADN utilizando cebadores específicos de la región de interés. La mezcla de reacción se realizó en tubos Eppendorf de 200 µL mantenidos a 4°C durante todo el proceso, los reactivos utilizados fueron los mostrados en la tabla 5.

Tabla 5. Reactivos para la reacción de PCR

10X <i>Pfu</i> Buffer	5 µL
dNTP's (2 mM)	1 µL
Forward O1´ Primer(20 mM)	2 µL
Reverse Lac 2 Primer (20 mM)	2 µL
<i>Pfu</i> Polimerasa	0.5 µL
ADN (Muestra)	2 µL
DEPC Treated water	37.5 µL
Volumen Total	50 µL

La PCR se realizó en un termociclador My Cycler (Bio-Rad) con 30 ciclos en las siguientes condiciones:

Desnaturalización inicial	96°C	4 minutos	1 Ciclo
Desnaturalización	96°C	1 minuto	} 30 Ciclos
Alineación	52°C	1 minuto	
Extensión	72°C	3 minutos	
Extensión final	72°C	7 minutos	1 Ciclo

#### 5.6.4 Electroforesis en geles de agarosa

Para el análisis y separación de ADN, se utilizaron geles de agarosa a una concentración de 1.0 % preparado con Buffer TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8.4 de Fermentas). Para esto se mezclaron 3 µL de producto de PCR y 2 µL

de buffer de carga (Azul de bromofenol y xilencianol en Tris pH 8.0) y 5  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas, se dejaron a baño maría durante un minuto a 85°C e inmediatamente después se sumergieron en hielo, enseguida se añadieron al pozo del gel y se corrió en una cámara horizontal durante 85 minutos a 85 V, para la estimación del tamaño se utilizó Gene Ruler™ 100 pb DNA Ladder (Fermentas) como marcador de peso molecular.

Para la identificación de las bandas de ADN, el gel de agarosa se tiñó con una solución de bromuro de etidio (BrEt) a una concentración de 0.5  $\mu\text{g/L}$  durante 15 minutos, se observaron las bandas mediante luz UV en un transluminador (Ultra•Lūm) y se fotografió en un equipo Gel Doc XR™ 170-8170 (Bio Rad).

#### **5.6.4.1 Purificación de productos de PCR a partir de geles de agarosa.**

Para la purificación de los productos de PCR, se preparó un gel de agarosa “low melting point” con una concentración al 1 % (p/v) en TAE 1X. Para cada pozo se mezclaron 20  $\mu\text{L}$  de producto de PCR, 2  $\mu\text{L}$  de buffer de carga y 8  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas se dejaron a baño maría durante un minuto a 85°C e inmediatamente después se sumergieron en hielo, se cargaron en el gel y se dejó correr en las condiciones descritas previamente, se seleccionaron las bandas de mayor peso molecular, para su purificación se utilizó el Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante.

#### **Secuenciación de productos de purificados**

Los productos de obtenidos de la purificación se enviaron a secuenciar para confirmar la presencia del inserto buscado.

### **5.7 Amplificación del vector**

#### **Obtención de células competentes de *Escherichia coli* con $\text{CaCl}_2$**

Con la finalidad de facilitar la inserción del plásmido en las bacterias, se generaron células competentes de *E. coli* con cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) con la siguiente metodología

Para esto se utilizaron bacterias de *E. coli DH5a*. Se tomó una colonia incubada en placa y se inoculó en 5 mL de medio LB, se dejó incubar 12 h a 37°C, después se transfirió en 100 mL de medio LB y se incubó 4 h a 37°C y 120 rpm, al finalizar se mantuvo en hielo a 4°C durante 30 minutos, se centrifugó a 5,000 rpm a 4°C durante 7 minutos para quitar el exceso de medio, se re-suspendió en 20 mL de CaCl<sub>2</sub> 50 mM y se dejó en hielo a 4°C durante 20 minutos, se centrifugó 10 minutos a 4°C y se les retiró el sobrenadante, se realizó un segundo lavado con CaCl<sub>2</sub> 50 mM, se centrifugándolo a 7000 rpm durante 10 minutos a 4°C, al final el pellet se resuspendió en 2 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM, se hicieron alícuotas de 100 µL en tubos Eppendorf y se guardaron a -20°C hasta su utilización (no mayor a una semana).

### **Inserción del fragmento al plásmido pJET1.2/Blunt**

La inserción del gen dentro del plásmido se realizó con una reacción de ligación, ésta consistió en lo siguiente: el plásmido digerido y el inserto se purificaron, se realizó una reacción de ligación de acuerdo con la siguiente esquema.

Inserto	3 µL
Plásmido pJet1.2 /Blund	1 µL

La mezcla se introdujo en agua a 65°C durante 15 segundos, después se introdujo en hielo inmediatamente y se mantuvo en hielo a 4°C durante 2 minutos, finalmente se agregaron los siguientes reactivos.

T4 DNA Ligase	1 µL
Buffer ligase	5 µL

Y se dejó en incubación a 22°C durante 12 h

El plásmido se introdujo en *E. coli DH5a* mediante choque térmico para su amplificación, la obtención de las células competentes y la introducción se realizó con la metodología mencionada anteriormente.

### **Introducción del plásmido mediante choque térmico**

Se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de células competentes con  $\text{CaCl}_2$  y se descongeló en hielo a  $4^\circ\text{C}$  durante 5 minutos, se le agregó 3  $\mu\text{L}$  de plásmido y se dejó en baño con hielo a  $4^\circ\text{C}$  durante 20 minutos, de inmediato se dio un choque térmico en baño maría a  $42^\circ\text{C}$  durante 1 minuto para abrir los poros de la bacteria y permitir la introducción del plásmido, después del choque térmico se transfirió a hielo a  $4^\circ\text{C}$  durante 3 minutos, posteriormente se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de medio LB sin ampicilina y se dejó en incubación 60 minutos a  $37^\circ\text{C}$  y 200 rpm, finalmente se tomaron alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  y se sembraron en medio LA + Amp (100  $\mu\text{g/ml}$ ) a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 h.

### **Aislamiento de ADN plasmídico (MINI-PREPS)**

Para la obtención del ADN plasmídico se siguió la siguiente metodología:

Se tomó una colonia del medio LA + Amp con un palillo estéril, se inoculó en 25 mL de medio LB +Amp (100  $\mu\text{g/mL}$ ) y se dejó incubando durante 18 h a  $37^\circ\text{C}$  y 140 rpm, después de la incubación, se centrifugó a 14,000 rpm durante un minuto, se decantó y se resuspendió en 350  $\mu\text{L}$  de solución de STET (Sacarosa 8% p/v, Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 50 mM pH 8.0, Triton X-100 0.5% v/v), se agregó 20  $\mu\text{L}$  de solución de lisozima (10 mg/mL), esta solución se mezcló por inversión durante un minuto y los tubos se sumergieron en agua en ebullición durante un minuto, se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos y se retiraron los restos celulares con un palillo estéril, el ADN plasmídico se precipitó con 40  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol, se mezcló y se dejó en reposo durante 15 minutos, después se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos y el precipitado se lavó con etanol al 70 % (v/v), finalmente el etanol se dejó evaporar y se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de agua estéril libre de nucleasas.

### **Análisis de las colonias transformadas con el plásmido**

El análisis de las colonias de *E. coli* se realizó de forma directa al contener el plásmido un gen que confiere información para una proteína letal que al ser ligado entre sí promueve letalidad en las células que lo contenga, por lo tanto, las colonias encontradas son las que contienen el plásmidos con el inserto del gen dentro de él.

Se seleccionaron colonias para la extracción de plásmido mediante las técnicas descritas previamente y se confirmó la presencia del inserto mediante PCR, para esto se realizó una PCR con las condiciones descritas previamente con los siguientes cebadores.

Secuencias de los cebadores.

Forward 5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'

Reverse 5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'

Los cebadores corresponden con secuencia del plásmido en el sitio de corte.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este trabajo se encuentra dividido en dos partes: la primera etapa comprende la evaluación del perfil de isoenzimas lacasa producidas en las fermentaciones líquidas para ambos organismos y la segunda corresponde con el aislamiento de un gen de lacasa de *Pleurotus ostreatus* y su inserción en un plásmido de clonación.

### 6.1 Perfil de isoenzimas lacasa en *Amylomyces rouxii*

En la Figura 2 se muestra un zimograma realizada a partir de las muestras obtenidas de la fermentación de *Amylomyces rouxii* para evaluar la presencia de isoenzimas lacasa presentes en este organismo.

En este gel de acrilamida se puede observar que no se presentó alguna actividad que evidenciara la presencia de lacasas, por lo tanto se puede determinar que no están presentes o que no se están expresando genes que puedan tener la información necesaria para la síntesis de enzimas lacasas o bien que el método utilizado para la evaluación de actividad no es suficientemente sensible para su detección.

v

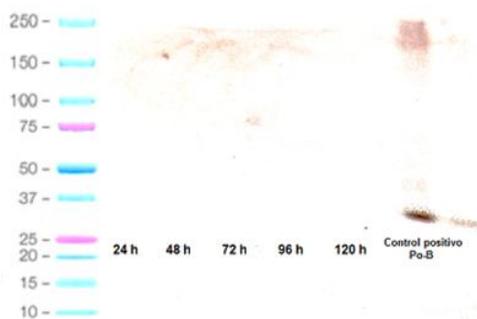
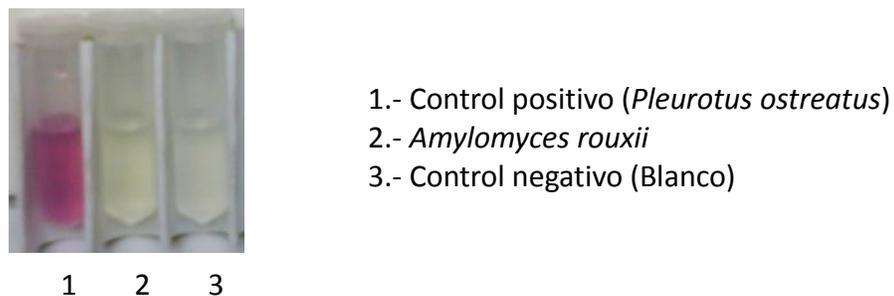


Figura 2. Zimogramas de extracto enzimático extracelular de *Amylomyces rouxii*

Alternativamente se realizaron pruebas cualitativas para evidenciar actividad. Entre los reactivos utilizados para determinar la presencia de lacasa en este organismo encontramos y utilizamos ABTS, 2,6 DMP, guayacol y siringaldazina que han sido reportados como sustratos

para determinar la presencia de lacasas y se utilizaron como pruebas cualitativas para determinar que no hay presencia de actividad lacasa en *Amylomyces rouxii*. Como resultado no se obtuvo ningún ensayo positivo para lacasa, al no observarse cambios en la coloración de la mezcla de reacción (figura 3)



**Figura 3. Determinación de actividad lacasa con siringaldazina**

En la primera etapa se muestra la ausencia de isoenzimas con actividad lacasa en *Amylomyces rouxii*, ya que mediante técnicas de zimografía no se encontraron evidencias de estas enzimas, Cabe señalar que no se han reportado enzimas lacasa en *Amylomyces* ni en *Rhizopus*, un organismo filogenéticamente muy cercano.

Sin embargo, la ausencia de actividad lacasa no implica la ausencia de genes que por alguna razón no se estén expresando, debido a que estos genes pueden ser inducibles (Sariaslani 1989), o que sus condiciones de cultivo no sean ideales para expresar estas enzimas (Palmieri y cols 2000) que favorezcan su expresión, por lo tanto, este trabajo también muestra la ausencia de un gen de lacasa, para esto se realizó una PCR con las condiciones estandarizadas de *Pleurotus ostreatus*, en la figura 4, se muestra una electroforesis en gel de agarosa con el producto amplificado por PCR, en el primer carril se muestra el marcador de peso molecular, en el segundo el producto de PCR de *Amylomyces rouxii*, en el cual se muestra un amplicón de aproximadamente 500 pb, sin embargo, no se logro secuenciar este amplicón, en el tercer carril se muestra el producto de PCR de *Pleurotus ostreatus* utilizado como control positivo, donde se muestra un amplicón de 2700 pb aproximadamente. Puede ser esta a razón por la que no se realizó la amplificación. Sin embargo, Montiel, (2005), utilizando

cebadores diseñados para lacasas a partir de la región correspondiente al sitio activo, no obtiene amplificación tampoco para este hongo. A pesar de que la mayoría de las pruebas realizadas para determinar la presencia de lacasa en *Amylomyces rouxii*, para poder contundentemente, reportar la ausencia de lacasas es necesario el diseño de nuevos cebadores para tener una mayor oportunidad de obtener un amplicón, tal vez usando regiones diferentes a las utilizadas en éste y en trabajos previos.

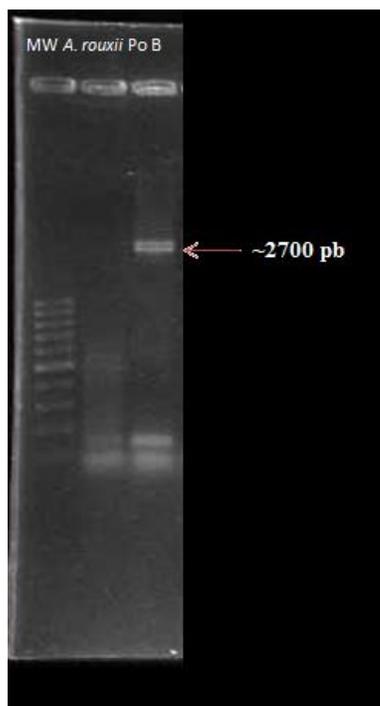


Figura 4. Gel con el producto de PCR de *Amylomyces rouxii* (Carril 2) y de *Pleurotus ostreatus* (Carril 3) como control, usando cebadores para lacasa

## 6.2 Isoenzimas lacasa extracelulares de *Pleurotus ostreatus*

Para *Pleurotus ostreatus* se obtuvo el extracto enzimático intra y extracelular, con el cual se determinaron las isoenzimas de lacasa mediante electroforesis SDS-PAGE. Con esta técnica se identificó el perfil de isoenzimas lacasa,

En la Figura 5 se muestra un gel de acrilamida del perfil de isoenzimas extracelulares de lacasa producidas por *Pleurotus ostreatus*, se observa la presencia de dos isoenzimas de un tamaño aproximado de 37 y 50 kDa respectivamente iniciando a las 96 h y continuando así durante toda la fermentación. A las 264 h se observa que las primeras isoenzimas de 37 y 50 kDa respectivamente incrementan su actividad conforme avanza la fermentación. A las 144 h se observa la presencia de una isoenzima más de aproximadamente 80 kDa, este perfil continua hasta las 240 h en donde se puede observar que su intensidad disminuye notablemente.

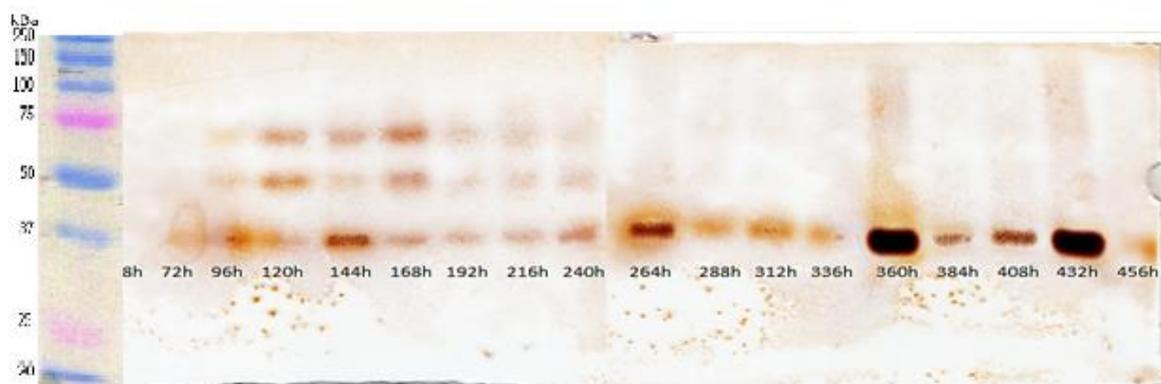


Figura 5. Zimogramas de *Pleurotus ostreatus* de extracto enzimático extracelular

### Isoenzimas lacasa intracelulares de *Pleurotus ostreatus*

En la figura 6, se muestra un gel de acrilamida del perfil de isoenzimas intracelulares de lacasa. Se observaron tres isoenzimas, de 37, 50 y 80 kDa, desde las 120 h hasta las 240 h. A las 264 h se puede observar que sólo se mantiene una isoenzima de aproximadamente 37 kDa, hasta las 432 h y a las 456 se observan 2 isoenzimas. A las 360 y 432 h se observa un incremento en la actividad similar a lo ocurrido en lo presentado en el perfil enzimático de actividades lacasa extracelulares.

Estos resultados corresponden con los obtenidos en estudios previamente descritos donde se muestran tamaños similares a los obtenidos en este trabajo, como el de Mansur y cols., (2003) que lograron caracterizar cuatro isoenzimas (Lcc1, Lcc2, Lcc3 y Lcc4) de

*Pleurotus ostreatus* V-184 con un peso molecular de 60 kDa, 65 kDa, 80 kDa y 82 kDa mediante geles SDS-PAGE, sin embargo, Lettera y cols., (2010) determinan el peso molecular de Lacc12 como de 55 kDa mediante SDS-PAGE. En general las lacasas de hongos son proteínas de aproximadamente 60 a 70 kDa (Piscitelli y cols., 2010; Lettera y cols., 2010).

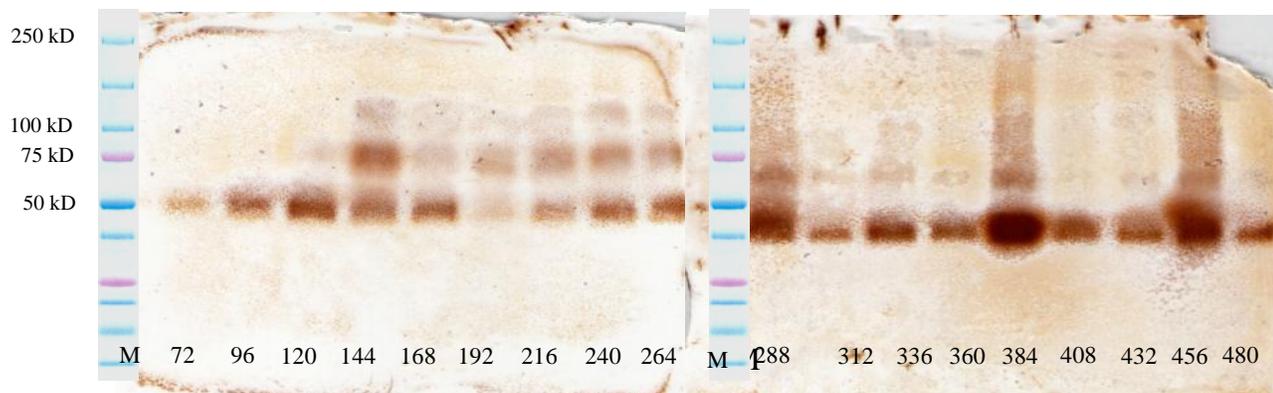


Figura 6. Zimogramas de *Pleurotus ostreatus* de extracto enzimático intracelular donde se muestra el perfil de isoenzimas lacasa durante la fermentación

### 6.3 Análisis de ácidos nucleicos

Para el análisis de transcritos de *Pleurotus ostreatus* se realizó la técnica de RT-PCR para la obtención de ADNc de lacasa a partir de RNA total obtenido siguiendo la metodología descrita previamente.

En la figura 7, se muestra una electroforesis en gel de agarosa donde se muestra los resultados obtenidos de la RT-PCR con las bandas obtenidas que corresponden al ADNc, en el primer carril se muestra el marcador de peso molecular, en el cuarto y quinto carril se muestra amplicones obtenidos de esta técnica para las muestras de *Pleurotus ostreatus*, donde se puede observar que se obtuvieron diferentes bandas con una longitud aproximada de 2200 pb, 900 pb, 700 pb, 550 pb, 450 pb y 300 pb. Todas las bandas se purificaron y se secuenciaron, sin embargo, las bandas de 300, 450, 550 y 700 pb corresponde con RNAs ribosomales y no corresponden con una lacasa y de las de mayor longitud (2200 y 900 pb) no se logró su

secuenciación. Es recomendable estandarizar una técnica de RT-PCR que nos permita la obtención de un ADNc de lacasa, ya que no se logró aislarlo en el laboratorio.

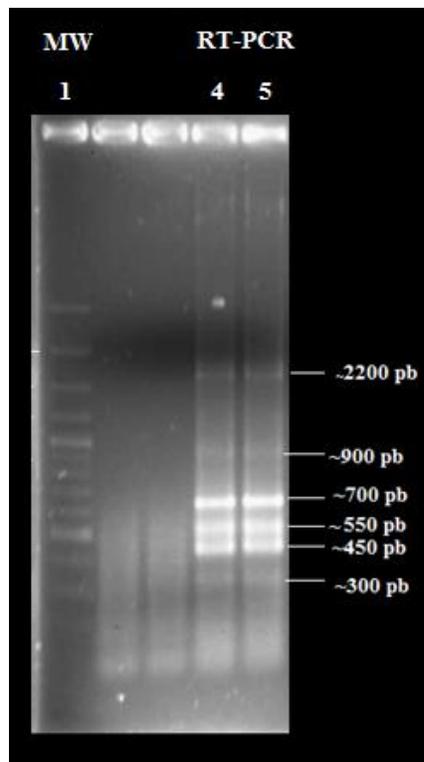
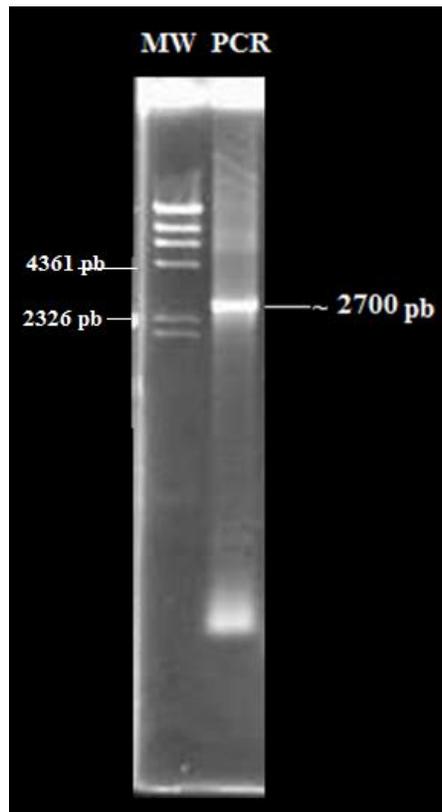


Figura 7. Gel de agarosa donde se muestra los diferentes amplicones en el carril 4 y 5 que corresponde al ADNc obtenidos a partir de RT-PCR

#### 6.4 Análisis del gen de *Pleuororus ostreatus* obtenido mediante ADN total

Para realizar el análisis de los genes obtenidos de las bases de datos, alineación de secuencias de varios genes para hallar sitios conservados, corroborar las secuencias de cebadores, encontrar promotores, alinear primers a secuencias génicas, análisis de restricción, construcción y modelación de los plásmidos, simulaciones de electroforesis, digestiones entre otros se utilizó el programa bioinformático CLC Genomics Workbench 3.0,(CLC Bio), que nos permitió el análisis de nuestros datos, así como, el modelado de construcciones de plásmidos y electroforesis de insertos, estos datos fueron utilizados para realizar una simulación para determinar que resultados esperar con las pruebas realizadas.



**Figura 8. Producto de PCR a partir de DNA total de *Pleurotus ostreatus*, en el carril 2 se muestra un amplicón de 2700 pb que corresponde al gen POX**

En la figura 8 se observa un gel de agarosa con el producto amplificado por PCR a partir de una muestra de ADN total de *Pleurotus ostreatus*. Se observa una banda (Carril 2) con una longitud aproximada de 2700 pb. La banda se purificó y se secuenció para el análisis posterior.

Algunos genes de lacasa se han reportado con longitudes parecidas a las obtenidas en este estudio, por ejemplo, Pox4 se ha reportado 3297 pb, el pox3 con 4400 pb, el pox5 una secuencia parcial de 2837 pb (Pezella y cols.,2008). Sin embargo, para comparar el tamaño real de nuestro inserto, es necesario secuenciar todo el producto de PCR.

Los resultados de la secuencia se analizaron en BLAST para determinar la similitud que hay con las lacasas, se obtuvo una similitud del 90 % con un gen de lacasa de *Pleurotus ostreatus* y un 91% de similitud con una lacasa de *Pleurotus eryngii*, con este resultado podemos concluir que nuestro inserto obtenido por PCR corresponde a una lacasa de *Plaurotus ostreatus* (Figura 9).

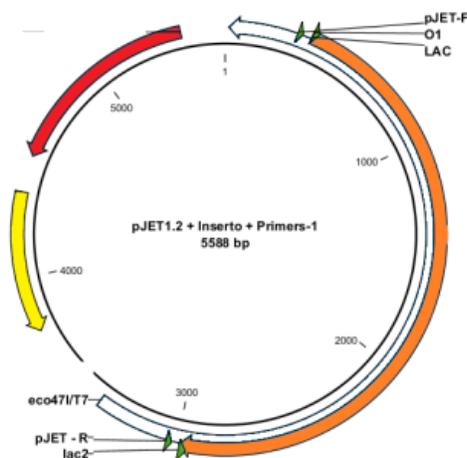
**Sequences producing significant alignments:**

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	Max ident
<a href="#">AY686700.1</a>	<i>Pleurotus eryngii</i> laccase precursor (pel3) gene, complete cds	440	440	93%	91%
<a href="#">AB514560.1</a>	<i>Pleurotus ostreatus</i> pox1 gene for phenol oxidase 1, partial cds	429	429	94%	90%
<a href="#">Z22591.1</a>	<i>P.ostreatus</i> diphenol oxidase gene	429	429	94%	90%
<a href="#">GU953215.1</a>	<i>Pleurotus eryngii</i> laccase gene, complete cds	248	248	55%	90%
<a href="#">AB514561.1</a>	<i>Pleurotus ostreatus</i> pox1 mRNA for phenol oxidase 1, complete cds	237	237	45%	94%
<a href="#">FJ532096.1</a>	<i>Pleurotus ostreatus</i> laccase-like (CHSH) mRNA, partial sequence	237	237	45%	94%
<a href="#">Z34847.1</a>	<i>P.ostreatus</i> pox1 mRNA for diphenol oxidase	237	237	45%	94%
<a href="#">GU480806.1</a>	<i>Pleurotus eryngii</i> laccase mRNA, complete cds	231	231	45%	94%
<a href="#">AM773999.1</a>	<i>Pleurotus eryngii</i> mRNA for laccase (ery3 gene)	231	231	45%	94%
<a href="#">AY485827.1</a>	<i>Pleurotus ostreatus</i> laccase mRNA, complete cds	231	231	45%	94%

**Figura 9. Resultado de la búsqueda con BLAST para determinar la similitud con lacasas reportadas en las bases de datos.**

### 6.5 Construcción del plásmido pJET1.2/Blunt con el inserto

Para la construcción del plásmido con el inserto identificado se utilizó un plásmido comercial de clonación (pJET1.2/Blunt Fermentas) y se realizó una ligación previamente descrita en la metodología.



**Figura 10. Plásmido construido con el gen de lacasa, simulación con un programa bioinformático**

En la figura 10 se muestra el plásmido construido, en color anaranjado se muestra el gen de lacasa que se identifico mediante BLAST e insertado en el plásmido. El plásmido construido tiene un longitud aproximada de 5500 pb. Este tamaño lo corroboramos con digestión de corte único en el plásmido y un gel de agarosa como se muestra en la figura 11.

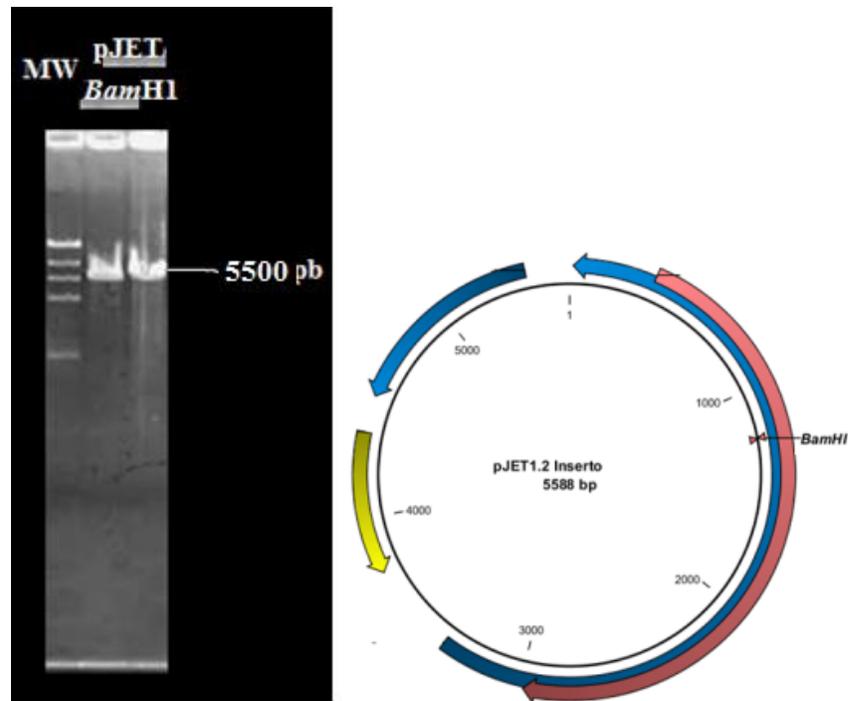


Figura 11. Gel con el plásmido lineal digerido con *Bam*H1 y esquema del vector con el inserto, para visualizar el sitio de corte único

En la Figura 11 se muestra la digestión del plásmido construido con una enzima de restricción (*Bam*H1), en el primer carril se muestra el marcador de peso molecular, en el segundo y tercer carril se muestra el plásmido digerido con un tamaño aproximado de 5500 pb, en la imagen de la derecha se muestra el plásmido construido y mostrando el sitio de corte.,

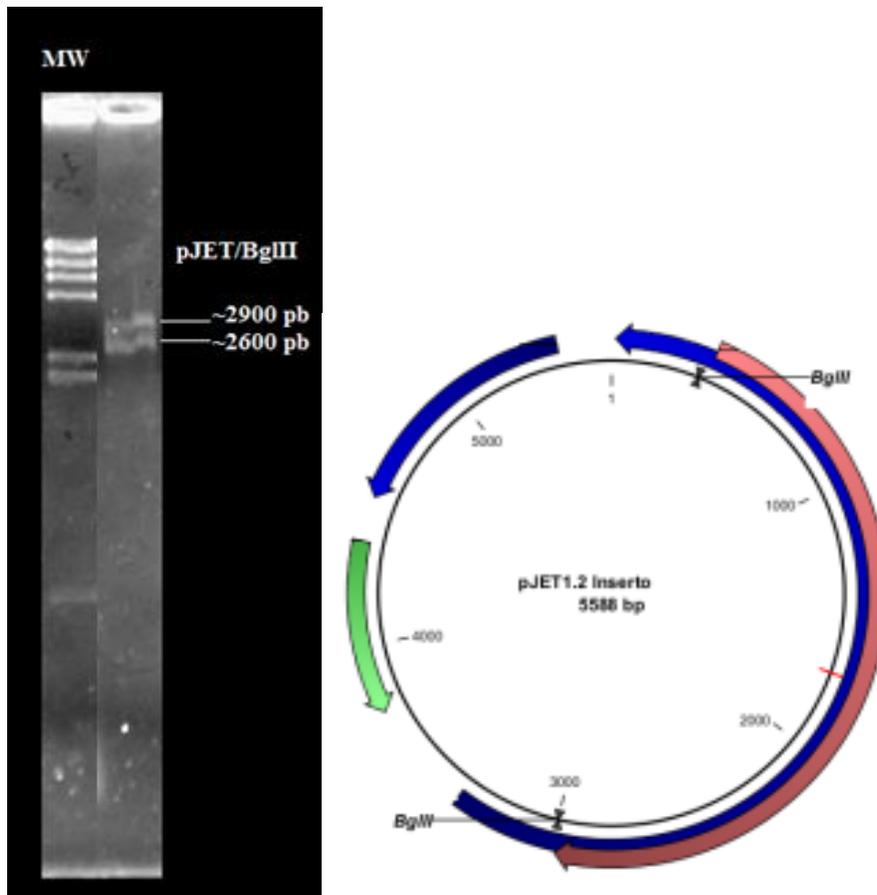


Figura 12. Digestión del plásmido con la enzima *BglIII* que cortan a los extremos del inserto

En la figura 12 se muestra un gel de agarosa con el que se observa la digestión del plásmido con el inserto con la enzima *BglIII* (Carril 2), la cual tiene corte en los extremos del inserto y se pueden observar dos bandas, la primera de ellas de un aproximado de 2900 pb correspondiente al plásmido y la segunda de un aproximado de 2600 pb que correspondería con el inserto.

## 6.6 Reamplificación y confirmación de la construcción

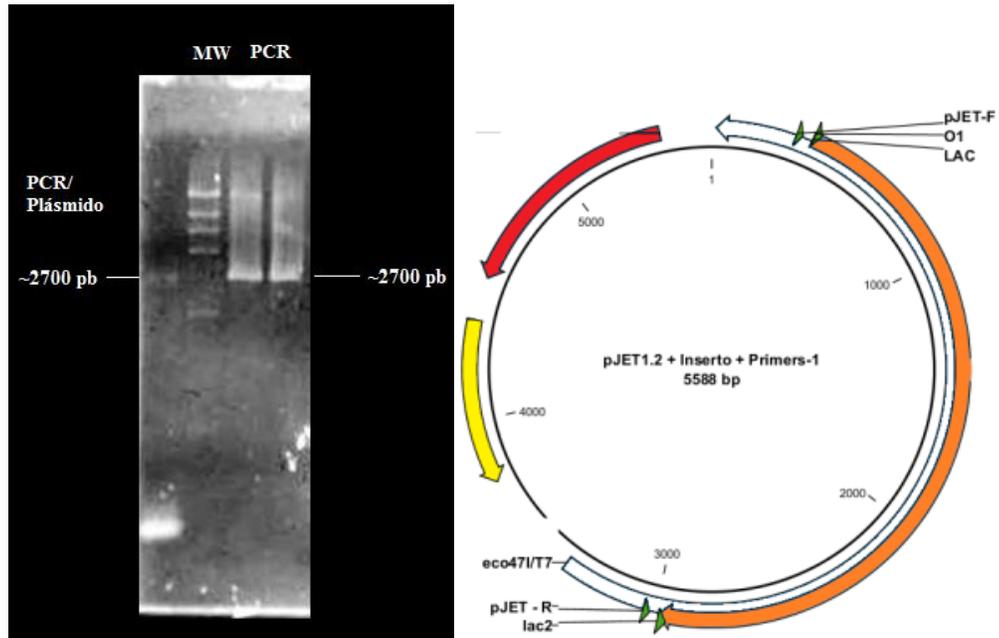


Figura 13. Amplificación del plásmido con cebadores específicos de lacasa y esquema del vector con el inserto, para visualizar la región de los cebadores utilizados

Para confirmar que el plásmido contuviera el inserto, se realizó una PCR en las condiciones ya estandarizadas y se obtuvo un fragmento del tamaño esperado como se muestra en la figura 13, en el primer carril se muestra el producto de PCR con el plásmido como molde y se observa un amplicón de aproximadamente 2700 pb que corresponde con el tamaño del inserto con que se trabajó, como control se corrió al mismo tiempo una muestra de ADN total de *Pleurotus ostreatus* (Carril 3 y 4) para comparar los tamaños obtenidos con los el producto de PCR del plásmido, lo que asegura que el inserto se integro dentro del plásmido, pero es conveniente realizar una secuenciación para afirmar su presencia.

## 7. CONCLUSIONES

- Se determinó la ausencia de actividad lacasa en *Amylomyces rouxii* mediante zimogramas y pruebas cualitativas de actividad enzimática con sustratos para lacasa
- En este estudio no se encontraron genes que codifiquen para lacasa en *Amylomyces rouxii*, por lo que puede usarse para expresar de manera heteróloga una lacasa de *Pleurotus ostreatus*.
- Se identificó el perfil de isoenzimas lacasa para una cepa comercial que no ha sido previamente caracterizado de *Pleurotus ostreatus* PoB en medio de cultivo líquido. Éste consiste de tres isoenzimas ubicadas a la altura de los 37, 50 y 80 KDa del marcador de peso molecular, tanto intra como extracelularmente.
- Se logró aislar, y secuenciar parte de un gen de Lacasa de *Pleurotus ostreatus* Po-B, con un tamaño de 517 Pb .
- El gen de lacasa obtenido se integró en un plásmido de clonación para ser utilizados en próximos estudios

## 8. PERSPECTIVAS

- ✓ Es necesario secuenciar todo el producto amplificado en la PCR para su caracterización así como identificar los extremos del gen (promotor y terminador) y anexarlo a una base de datos internacional.
- ✓ Establecer una metodología de RT-PCR para la obtención de un ADNc de lacasa que no se logró obtener en el laboratorio.
- ✓ Construir un vector de expresión con el gen aislado para la transformación de *Amylomyces rouxii*.
- ✓ Transformar *Amylomyces rouxii* con el gen y caracterizar la o las isoenzimas producidas.
- ✓ Evaluar las condiciones de crecimiento para determinar la expresión de las isoenzimas producidas por las mutantes con el gen de lacasa.
- ✓ Secuenciar las enzimas producidas por el gen de lacasa introducido en el genoma de *Amylomyces rouxii*.

## 9. LITERATURA CITADA

- Abe A., Oda Y., Asano K., Sone T. 2006. The molecular phylogeny of the genus *Rhizopus* based on rDNA sequences. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**: 2387-2393.
- Ainsworth AM, 1995. Technical information sheet No 11: Isolation techniques for basidiomycetes. *World journal of microbiology and biotechnology.* 11:364-366.
- Baldrian P. 2006. Fungal laccases occurrences and properties. *FEMS Microbiology Reviews.* 30:215-242.
- Berka RM, Barnett CC. 1989. The development of gene expression systems for filamentous fungi. *Biotechnology advances.* 7:127-154.
- Bezalel L, Hadar Y, Cerniglia CE. 1996a. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 62:292-295.
- Bezalel L, Hadar Y, Cemiglia CE. 1997. Enzymatic mechanisms involved in phenanthrene degradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology.* 63:2495-2501.
- Bezalel L, Hadar Y, Fu PP, Freeman JP, Cerniglia CE. 1996 Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiolgy.* 62:2547-2553.
- Brown MA, Zhao Z, Mauk AG. 2002. Expresion and characterization of a recombinant multi-copper oxidase: laccase IV from *Trametes versicolor*. *Inorganica chimica acta* 331:232-238.
- Burda P, Aebi M. 1999. The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA).* 1426:239–257.
- Buswell JA, Cai YJ, Chang St, 1996. Ligninolytic enzyme production and secretion in edible mushroom fungi. *Mushroom Biology and Mushroom Products.* Reyse (Ed.) 113-122
- Cardoza RE, Vizcaino JA, Hermosa MR, Monte E, Gutiérrez S. 2006. A Comparison of the Phenotypic and Genetic Stability of Recombinant *Trichoderma* spp. Generated by Protoplast and *Agrobacterium*-Mediated Transformation. *The Journal of Microbiology.* 44: 383 395.

- Cullen D, Kersten PJ 1996. Enzymology and Molecular Biology of Lignin Degradation. En. Kinghorn JR, Turner G. Applied molecular genetics of filamentous fungi. Chapman and hall, London. Pp. 100-131
- Eggert C, Temp U, Eriksson KEL. 1997. Laccase is essential for lignin degradation by the white rot fungi *Pycnoporus cinnabarinus*. FEBS letter. 407:89-92.
- Ellis JJ, Rhodes LJ, Hesseltine. 2009. The genus *Amylomyces*. Mycological society of America. 68:131-143.
- Esclapez JE. 2004. Análisis estructural de la adaptación a medios de elevada fuerza ionica de la glucosa deshidrogenasa de *Haloferax mediterranei*. Tesis Doctoral. Universidad Alicante.
- Fan Y, Flurkey WH. 2004. Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms. Phytochemistry 65:671-678.
- Fan L, Soccol AT, Pandey A, Soccol CR. 2003. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* mushrooms on Brazilian coffee husk and effects of caffeine and tannic acid. Micología Aplicada International. 15:15-21.
- García MA, Sarmiento ME, Coria R, Kawasaky L, Ongay L, de la Rosa JF, Norazmi Mohd Nor4, Acosta A. 2007. Expresión heteróloga de un péptido multiepitópico de células B de *M. tuberculosis* en *Saccharomyces cerevisiae*. Vaccimonitor. 16:15
- 
- Hara S, Kitamoto K, Gomi K. 1992. New developments in fermented beverages and foods with *Aspergillus*. Biotechnology. 23:133-135.
- Hesseltine CW, 1991. *Zygomycetes* in food fermentations. Mycologist 5:162-169.
- Iwashita K. 2002 Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. Journal of Bioscience Bioengineering. 94:530-535.
- Karam J, Nicell JA. 1997. Potential applications of enzymes in waste treatment. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 69:141- 153.
- Kito H, Abe A, Sujaya I-N, Ooda Y, Asano K, Sone T. 2009. Molecular Characterization of the Relationships among *Amylomyces rouxii*, *Rhizopus oryzae*, and *Rhizopus delemar*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 73:861-864.

- Kunamneni A, Camarero S, García-Burgos C, Plou FJ, Ballesteros A, Alcalde M. 2008. Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microbial Cell Factories* 7:32.
- Kunamneni A, Plou FJ, Ballesteros A, Alcalde M. 2008. Laccases and their applications: a patent review. *Recent patents on Biotechnology* 2:10-24.
- Lettera V, Piscitelli A, Leo G, Birolo L, Pezzella C, Sannia G, 2010. Isolation and characterization of a new member of *Pleurotus ostreatus* laccase family from mature fruiting body. *Fungal Biology* 114:724–730.
- Li y, Gong Z, Li X, Li Y, Guo X 2011, Engineering *Klebsiella* sp. 601 multicopper oxidase enhances the catalytic efficiency towards phenolic substrates. *BMC Biochemistry*, 12:30
- Madzak C, Mimmi MC, Caminade E, Brault A, Baumberger S, Briozzo P, Mougín C, Jolivalt C. 2006. Shifting the optimal pH of activity for a laccase from the fungus *Trametes versicolor* by structure-based mutagenesis. *Protein engineering, design and selection*. 19:77-84.
- Majeau JA, Brar SK, Tyagi RD. 2009. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technology*. 101:2331-2350.
- Marcial J, Barrios-González J, Tomasini A. 2006. Effect of medium composition on pentachlorophenol removal by *Amylomyces rouxii* in solid-state culture. *Process Biochemistry* 41:496–500.
- Mansur M 2003. The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities. *Mycologia*, 95:1013–1020.
- Montiel AM, Fernández FJ, Marcial J, Soriano J, Barrios-González J, Tomasini A. 2004. A fungal phenoloxidase (tyrosinase) involved in pentachlorophenol degradation. *Biotechnology letter*. 26:1353-1357.
- Murrieta-Hernández DM, Mata G, Iglesias-Andreu LG. 2002. Cambios en la producción de lacasa por el hongo *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Qué. cultivado en pulpa de café en confrontación con *Trichoderma viride* Pers. un moho contaminante. *Foresta veracruzana*. 4:47-52.

- Palmieri G, Giardina P, Sannia G, 2005. Laccase-mediated Remazol Brilliant Blue R decolourization in a fixed-bed bioreactor. *Biotechnology Progress* 21:1436-1441.
- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Fontanella B, Sannia G. 2000. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 66:920–924.
- Pezzella C, Autore F, Giardina P, Piscitelli A, Sannia G, Faraco V. 2008. The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: isolation and heterologous expression of new family members. *Current genetics*. 55:45-57.
- Pezzella C, Lettera V, Piscitelli A, Giardina P, Sannia G, 2012, Transcriptional analysis of *Pleurotus ostreatus* laccase genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, en prensa
- Piscitelli A, Pezzella C, Giardina P, Faraco V, Giovanni S. 2010. Heterologous laccase production and its role in industrial applications. *Bioengineered Bugs* 1:252-262;
- Prescott LM, Harley JP, Klein DA. 2004. *Microbiología* 5ta Ed, Editorial Mc Graw Hill, Madrid, España.
- Record E, Punt PJ, Chamkha M, Labat M, Van de Hondel CAMJJ, Asther M. 2002. Expression of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *European journal biochemistry*. 269:602-609.
- Rodgers CJ, Blanford CF, Giddens SR, Skamnioti P, Armstrong FA, Gurr SJ. 2009. Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes?. *Trends in Biotechnology*.28:63-72.
- Salony N, Garg R, Berawal M, Chhabras S, Mishra TK, Chadhuri VS, Bisaria. 2007. Laccase of *Cyathus bulleri*; estructuras, catalytic characterization and expression in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1784;259-268.
- Salmones D, Mata G. 2005. Efecto de la presencia de compuestos solubles de lignina y fenoles sobre la producción de acasa y biomasa en cultivos de *Pleurotus* spp. *Revista Mexicana de Micología*. 21:63-69.

- Sirim D, Wagner F, Wang L, Schmid RD, Pleiss J. 2011, The Laccase Engineering Database: a classification and analysis system for laccases and related multicopper oxidases. Database (Oxford) Article ID bar006.
- Sariaslani, F. S. 1989. Microbial enzymes for oxidation of organic molecules. Critical reviews in biotechnology. 9. pp. 171-257.
- Soden DM, Callaghan JO, Dobson ADW. 2002. Molecular cloning of laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host. Microbiology. 148:4003-4014.
- Tomasini, C. A., Villarreal, A. H. y Barrios-González, J. (1996). Resistencia de una cepa de *Rhizopus sp.* al crecer en medios conteniendo pentaclorofenol. *Av. Ing. Quím.* 6:36-40.
- Wang L, Ridgway D, Gu T, Moo-Young M. 2006. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnology Advances* 23:115-129.
- .

## 10. GLOSARIO DE TÉRMINOS

amp	Ampicilina
BrEt	Bromuro de Etidio
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
CIA	Cloroformo-Alcohol Isoamílico
C.S.P.	Cantidad suficiente para
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMP	2,6-dimetoxifenol
ADN	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Dinucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EMA	Agar Extracto de Malta
g	Gramo
h	Hora
HCl	Ácido clorhídrico
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	Agua desionizada
kDa	Kilo Dalton
KOH	Hidróxido de potasio
LA	Medio Luria-Bertani Agar
LB	Medio Luria-Bertani
L	Litro
Li-P	Lignina peroxidasa
M	Molaridad
mM	Milimolar
Mn-P	Manganeso peroxidasa
mg	Miligramos
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio
mL	Mililitro
MN	Melin y Norskrans

NaCl	Cloruro de Sodio
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDA	Agar extracto de papa
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pH	Potencial de hidrógeno
p/v	Relación peso-volumen
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
TAE	Tris-Acetato-EDTA
UV	Ultravioleta
V	Volts
v/v	Relación volumen-volumen
°C	Grados Celsius
µg	Microgramo
µL	Microlitro