



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Maestría en Ciencias Biológicas

*“Estudio de los patrones de expresión de los genes que codifican las isoformas de lacasa de *Pleurotus ostreatus* en cultivo líquido, en presencia y ausencia de cobre”*

T e s i s

Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Biológicas

P r e s e n t a

Elizet Cuatecontzi Cuahutle

Director (es) de tesis

Dra. Alba Mónica Montiel González
Dr. Francisco José Fernández Perrino

Posgrado CTBC



Maestría en
Ciencias Biológicas

Tlaxcala, Tlax.



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Maestría en Ciencias Biológicas

“Estudio de los patrones de expresión de los genes que codifican las isoformas de lacasa de Pleurotus ostreatus en cultivo líquido, en presencia y ausencia de cobre”

T e s i s

Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Biológicas

P r e s e n t a

Elizet Cuatecontzi Cuahutle

Comité tutorial

Dra. Alba Mónica Montiel González
Dr. Francisco José Fernández Perrino
Dra. María Mercedes Rodríguez Palma
Dr. Octavio Loera Corral

Tlaxcala, Tlax.



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

Maestría en Ciencias Biológicas



**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 Elizet Custocentzi Cuchute 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 "Estudio de los patrones de expresión de las isoformas de lacasas de *Pleurotus ostreatus* producidas en cultivo líquido en presencia y ausencia de cobre". Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

Atentamente

Tlaxcala, Tlax., febrero 3 de 2011

DR. FRANCISCO JOSÉ FERNÁNDEZ PERRINO

DR. MARÍA MERCEDES RODRÍGUEZ PALMA

DR. ARTURO ESTRADA TORRES

DR. MARÍA GUADALUPE SAN ILDEFONSO MARTÍNEZ

DR. ALBA MÓNICA MONTIEL GONZÁLEZ



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado Bajo la Norma:
ISO 9001:2000-NMX-CC-9301-IMNC-2000



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90670 Tel./Fax. 01(243)462-15-57 e-mail: posgrado@cbuam@gmail.com
Tlaxcala, Tlax.

Agradecimientos.

Al Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (CTBC) el apoyo brindado para el desarrollo del presente estudio, el cual se realizó en las instalaciones del laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas (CICB) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Al apoyo financiero otorgado por el fondo de Ciencia Básica SEP-CONACYT para el proyecto "Estudio de los patrones de expresión de los genes de lacasa en dos sistemas de fermentación y su implicación en la fisiología de *Pleurotus ostreatus* No. 61796"

Al apoyo financiero otorgado por PROMEP para el proyecto "Estudios de Expresión del gen de una lacasa altamente activa de *Pleurotus ostreatus* en fermentación líquida", con folio UATLX-EXB-197.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar estudios de maestría con número de registro 228853.

A la Dra. Alba Mónica Montiel González, por su apoyo y consejos durante estos últimos años, pero sobre todo por su aceptación para ser mi guía. Es un gran ser humano y profesionalista, la admiro, quiero y respeto.

Al Dr. Francisco José Fernández Perrino, por aceptarme como parte de sus alumnos, pero sobre todo por cada uno de esos consejos durante los tutoriales. Lo admiró por ser un gran profesionalista pero sobre todo por esa calidad humana que es usted.

A la Dra. María Mercedes Rodríguez Palma y el Dr. Octavio Loera Corral, por acompañarme durante todo este tiempo.

Dedicatoria.

Primeramente, doy gracias a Dios por bendecirme con la familia que tengo y por ser tan generoso conmigo.

Todos y cada uno de mis logros es para las personas que me dieron la vida sin pedirla y no conforme de ello, me han educado, guiado y sé que siempre estarán ahí a mí lado para apoyarme.

A mi madre, por todo el sacrificio que ha tenido que hacer, porque es un ejemplo de vida y porque ante la adversidad nunca mostró miedo, te amo.

A mi padre, porque cada vez que me siento cansada, triste y creo que la vida no vale la pena, me viene a la mente el recuerdo de cada uno de los momentos que él ha estado a mí lado, es justo cuando me digo: no tengo derecho a quejarme, mucho menos sentir que el mundo puede conmigo, puesto que me mostró como enfrentarme a el mundo. Papá eres mi orgullo, mi motivo de vida, antes de tomar cada decisión pienso en ti y me pregunto si te sentirás orgulloso de mí. Padre todos me podrán dar la espalda y no me importará porque sé que te tengo a ti, te amo. Gracias porque tanto tú como mi madre me han mostrado el camino y nunca los defraudaré.

A mi hermano, porque en momentos difíciles me ha escuchado, aconsejado y apoyado...gracias Adrián, porque sé que nunca olvidarás lo que nuestros padres nos mostraron, somos hermanos y ante todo debemos amarnos, respetarnos y apoyarnos. Si no fuera así, ¿quién lo hará?

Al hombre que amo y que a pesar del tiempo y quizá tantas diferencias y dificultades al final lo que nos une es el gran amor que nos tenemos y sé que ahí estará siempre diciéndome: Eli, tú puedes, no te preocupes por mí, yo estaré bien. Gracias Angelito, gracias por ser parte de mí vida y como siempre te lo he dicho... te amo, nunca dudes de eso.

A mis amigos, Leyda, Rafa, Pily, Gaby y Omar por creer en mí, pero sobre todo por estar en los buenos y malos momentos. Los quiero mucho y sé que siempre estarán ahí para apoyarme.

Resumen.

El género *Pleurotus* es un basidiomiceto de pudrición blanca con un alto valor nutricional, con propiedades terapéuticas y variadas aplicaciones biotecnológicas. Una de sus principales características es la capacidad de degradar compuestos lignocelulósicos –gracias al complejo enzimático que poseen–, entre éstas las lacasas. *Pleurotus ostreatus* produce enzimas lacasa en diversas isoformas y existen diferentes genes que las codifican.

Actualmente se han podido estudiar características como actividad enzimática y la aparición de isoformas en diferentes condiciones de cultivo del hongo a través de zimografía lo que ha permitido determinar que las proteínas se presenta en tamaños diferentes o si la actividad de algunas proteínas de tamaño específico es mayor. En cuanto a la expresión de algunos genes que codifican para algunas de las isoformas de lacasa se han abordado utilizando cobre como agente inductor y se ha podido confirmar que el RNAm incrementa en cultivos adicionados con sales de este metal. Sin embargo la aparición de las isoformas y el cambio en las actividades fluctúa a lo largo del cultivo y no se sabe mucho acerca de la expresión de los genes codificantes para lacasa en cada momento de éste, así como no se ha determinado que genes son los que responden al estímulo de inducción por cobre y cuales se expresan de manera constitutiva. Sabemos también que se puede tener expresión de los genes sin poder conseguir actividad de la proteína y no debemos descartar que un solo gen puede ser quien de origen a más de una isoforma con grados de glucosilación distintos y que hagan que tengan un peso diferente. En consecuencia, la actividad nos habla más de la forma funcional de la enzima, que de algún modo pudiera estar limitada por componentes ambientales donde se desarrolla el organismo productor, por ejemplo; el pH, temperatura, tipo de cultivo y composición del medio. Es necesario contar con criterios adecuados en cuanto a condiciones moleculares que rigen el procesamiento endógeno de las enzimas lacasa, de forma que permita elegir las isoformas más apropiadas para su futuro manejo.

Por tal motivo, en este trabajo se estudiaron las enzimas con actividad lacasa producidas por *Pleurotus ostreatus* cepa ATCC 32783. Se realizó fermentación en medio líquido sintético con y sin la adición de sulfato de cobre. Las fermentaciones se caracterizaron determinando los parámetros de: actividad de lacasa volumétrica, actividad específica, cuantificación de proteína, determinación de azúcares residuales, así como la determinación

del perfil zimográfico, tanto de las enzimas extracelulares como intracelulares. Posteriormente, para determinar el efecto que pudiera tener el cobre potenciando el incremento en la actividad de lacasa de las enzimas excretadas, se agregó sulfato de cobre a los extractos crudos enzimáticos y se determinó la actividad enzimática. De ambos cultivos se recolectó la biomasa cada 24 h para la extracción del ácido ribonucleico (RNA) el cual se usó en una reacción de Transcripción inversa (RT) seguida de la amplificación por la Reacción en Cadena de la Polimerasa utilizando primers específicos para el gen POXA2 de lacasa, para finalmente obtener el perfil de cDNA.

Como resultados se obtuvo que en ambas fermentaciones la biomasa máxima aproximada fue de 7.2 g/L a las 288 horas en ambos cultivos, las actividades que se mostraron fueron mayores en la fermentación adicionada con sulfato de cobre en comparación con la fermentación sin adición de cobre, 12 000 U/L y 700 U/L, respectivamente. En ambas fermentaciones se obtuvo un patrón zimográfico con hasta tres isoformas de lacasa, las cuales se ubican entre los 30, 37 y 50 kDa de peso molecular aproximadamente considerando que se resolvieron en geles semi-desnaturalizantes junto con un marcador, se observó también que el perfil zimográfico de las isoformas extracelulares se puede visualizar a tiempos mayores, aproximadamente a partir de las 168 horas, en comparación con las isoformas intracelulares donde se puede ver el perfil desde el inicio de la fermentación y con mayor intensidad cuando se trata de las enzimas intracelulares, lo que posiblemente sugiere que poseen mayor sensibilidad al efecto causado por el cobre.

En cuanto al patrón de expresión del cDNA, se pudieron visualizar bandas pequeñas de 150 a 300 pb y solo una banda de aproximadamente 700 pb a las 408 horas en las muestras de fermentación adicionada con cobre, sin embargo no se puede asegurar concluir que el perfil de cDNA sea real debido a que los tamaños son menores a los que se esperaban considerando los primers utilizados y que es necesario contar con la secuencia de las bandas para tener la certeza de que corresponden a genes codificantes de enzimas lacasa.

Índice general

Índice de figuras

Índice de tablas

Índice de gráficas

1. Introducción	1
1.1 Enzima lacasa.	2
1.2 Organismos productores de enzima lacasa.	2
1.3 <i>Pleurotus ostreatus</i>	3
1.3.1 Descripción y ciclo de vida del género <i>Pleurotus</i>	4
1.4 Estrategias de sobreproducción de enzimas.	7
1.5 Expresión génica.	9
1.5.1 Mecanismos de inducción y represión.	10
1.5.2 Represión enzimática.	11
2. Antecedentes	12
3. Justificación	14
3.1 Problema.....	15
3.2 Preguntas.....	15
4. Objetivos	16
4.1 Objetivos específicos.....	16
4.2 Objetivos particulares.....	16
5 Metodología	17
5.1 Microorganismo.....	18
5.2 Medios e inóculos.....	18
5.3 Fermentación en medio líquido (FML).....	18
5.4 Caracterización de la fermentación en medio líquido.	19
5.4.1 Obtención del extracto crudo enzimático.....	19
5.4.2 Cuantificación de la biomasa.....	19
5.4.3 Determinación de proteína soluble.....	19
5.4.4 Determinación de pH.....	19
5.5.5 Determinación de actividad enzimática.....	19

5.5.6 Zimografía.....	20
5.5 Obtención de biomasa para estudios de expresión de lacasa.	20
5.5.1 Extracción de ácido ribonucleico (ARN).....	20
5.6 Transcripción inversa – Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).....	21
5.6.1 Limpieza de ARN total.....	21
5.6.2 Transcripción inversa (RT).....	21
5.6.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	22
5.6.4 Electroforesis en gel de agarosa.....	22
6 Resultados y discusión.	23
6.1 Caracterización de la fermentación líquida sin adición de cobre para producción de lacasa de <i>Pleurotus ostreatus</i>.	24
6.1.1 Determinación de biomasa.....	24
6.1.2 Concentración de proteína soluble en el extracto crudo enzimático.....	25
6.1.3 Actividad de lacasa.....	26
6.1.4 Actividad específica de lacasa.....	27
6.1.5 Perfiles de pH.....	28
6.1.6 Cuantificación de azúcares residuales.....	29
6.1.7 Determinación de isoformas extracelulares de lacasa.....	30
6.1.8 Determinación de isoformas intracelulares de lacasa.....	31
6.2 Caracterización de la fermentación en medio líquido con adición de sulfato de cobre (CuSO₄).	32
6.2.1 Determinación de biomasa.....	32
6.2.2 Concentración de proteína soluble en el extracto crudo enzimático.....	33
6.2.3 Actividad de lacasa.....	34
6.2.4 Actividad específica de lacasa.....	35
6.2.5 Perfiles de pH.....	36
6.2.6 Cuantificación de azúcares residuales.....	37
6.2.7 Determinación de isoformas extracelulares de lacasa.....	38
6.2.8 Determinación de isoformas intracelulares de lacasa.....	39

6.3 Caracterización de la fermentación en medio líquido con adición de sulfato de cobre y sin adicionar cobre	40
6.3.1 Determinación de la actividad volumétrica en la fermentación con cobre y sin adicionar cobre, adicionando al extracto crudo enzimático sulfato de cobre.....	41
6.3.2 Determinación de la actividad volumétrica con la adición de sulfato de cobre al extracto crudo enzimático a una concentración de 0.10 g/L, en ambas fermentaciones.....	42
6.3.3 Determinación de la actividad volumétrica adicionando sulfato de cobre en lacasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación sin cobre.....	43
6.3.4 Determinación de la actividad volumétrica adicionando sulfato de cobre en lacasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación con cobre.....	44
6.4 Extracción de ácido ribonucleico (ARN)	46
6.4.1 Extracción del ARN en fermentación sin adicionar cobre.....	46
6.4.2 Extracción del ARN en fermentación con adición de cobre.....	46
6.4.3 Transcripción inversa – Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT – PCR).....	47
7. Conclusiones	49
8. Perspectivas	50
9. Referencias	51
10. Abreviaturas	54

Índice de figuras.

Figura 1. Ciclo de vida del género <i>Pleurotus</i>	6
---	---

Índice de tablas.

Tabla 1. Composición de medio de cultivo.....	18
Tabla 2. Cebador utilizado para la transcripción inversa.....	21
Tabla 3. Cebadores utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa.....	22

Índice de gráficas.

Gráfica 1. Crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> en medio líquido.....	25
Gráfica 2. Concentración de proteína soluble presente en el extracto crudo enzimático obtenido por fermentación en medio líquido (FML).....	26
Gráfica 3. Actividad volumétrica de lacasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación en medio líquido (FML).....	27
Gráfica 4. Actividad específica durante la fermentación en medio líquido de <i>Pleurotus ostreatus</i>	28
Gráfica 5. Perfiles de pH obtenidos de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación en medio líquido.....	29
Gráfica 6. Consumo de glucosa de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación en medio líquido...30	
Gráfica 7. Perfil de isoformas extracelulares de lacasa producidas por <i>Pleurotus ostreatus</i> en medio líquido.....	31
Gráfica 8. Perfil de isoformas intracelulares de lacasa producidas por <i>Pleurotus ostreatus</i> en medio líquido.....	31
Gráfica 9. Crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación en medio líquido con adición de sulfato de cobre.....	33
Gráfica 10. Concentración de proteína soluble presente en el extracto crudo enzimático obtenido por fermentación en medio líquido con cobre.....	34
Gráfica 11. Actividad volumétrica de lacasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación en medio líquido.....	35

Gráfica 12. Actividad específica durante la fermentación en medio líquido de <i>Pleurotus ostreatus</i> con cobre.....	36
Gráfica 13. Perfil de pH obtenidos de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación en medio líquido con cobre.....	37
Gráfica 14. Consumo de glucosa de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación en medio líquido con cobre.....	38
Gráfica 15. Perfil de isoformas extracelulares de lacasa producidas por <i>Pleurotus ostreatus</i> en medio líquido adicionado con sulfato de cobre.....	39
Gráfica 16. Perfil de isoformas de lacasa intracelulares producidas por <i>Pleurotus ostreatus</i> en medio líquido con sulfato de cobre.....	40
Gráfica 17. Actividad volumétrica de lacasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación en medio líquido, con adición y sin adicionar sulfato de cobre.....	42
Gráfica 18. Actividad volumétrica de lacasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> con la adición de sulfato de cobre a una concentración de 0.10 g/L en fermentación en medio líquido, con adición y sin adicionar sulfato de cobre.....	43
Gráfica 19. Fermentación sin cobre y adicionando cobre al extracto crudo enzimático a una concentración de 0.10 g/L, en lacasa de <i>Pleurotus ostreatus</i>	44
Gráfica 20. Fermentación con cobre y adicionando cobre a una concentración de 0.10 g/L, en lacasa de <i>Pleurotus ostreatus</i>	45
Gráfica 21. Perfil de ARN total de lacasa en <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación líquida sin adicionar sulfato de cobre.....	46
Gráfica 22. Perfil de ARN total de lacasa en <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación líquida con adición de sulfato de cobre.....	47
Gráfica 23. RT – PCR de la fermentación de <i>Pleurotus ostreatus</i> . A. Sin adicionar cobre. B. Con adición de cobre.....	48

1. Introducción.

Uno de los mayores problemas a los que se enfrenta la humanidad en nuestros días es la contaminación ambiental. En la búsqueda de productos que nos hagan la vida más cómoda y fácil, se emiten al ambiente gran cantidad de compuestos sintéticos (xenobióticos), que por la naturaleza de su estructura son difícilmente degradados por los microorganismos nativos de los ecosistemas, volviéndose compuestos recalcitrantes. Estos compuestos se encuentran presentes en efluentes gaseosos y líquidos, así como en las diferentes capas del suelo. Algunos de los más habituales son hidrocarburos aromáticos policíclicos, compuestos fenólicos, etc. (Sánchez y col., 1996).

Son evidentes las razones por las que existe un gran interés en recuperar la constitución original de los recursos, principalmente de los efluentes, pues cada vez es más pronunciada la escasez de agua en todos los ámbitos. Al respecto, una de las causas principales de la contaminación de efluentes líquidos es la emisión y descarga de desechos industriales y municipales a los ríos y otros cuerpos acuíferos. En particular, la industria textil genera una gran cantidad de desechos químicos de origen fenólico (ya que estos compuestos son la base de los colorantes textiles). Dichos compuestos son recalcitrantes y su degradación es lenta cuando se utilizan procesos químicos y fisicoquímicos convencionales, generando un impacto ambiental negativo al ser descargados (frecuentemente sin tratamiento previo), en los cauces de los ríos. Hasta el momento han sido muchos los grupos de investigación que han trabajado en procesos para eliminar este tipo de compuestos, pero en forma insuficiente, por lo que es muy importante contribuir con investigación para aportar otros elementos que puedan ser de utilidad en este campo.

Existen diversos procesos, en los que se han utilizado organismos, partes de ellos o sus metabolitos, para actuar sobre este tipo de compuestos de forma que los hagan menos tóxicos en el ambiente. Ejemplos de ellos son la fitorremediación o estudios que involucran la utilización de enzimas (una de las líneas de especial interés para nuestro grupo de investigación). Por la naturaleza química de los compuestos contaminantes, se buscan enzimas que, en general, tengan la capacidad de oxidar e hidroxilar los fenoles a formas menos tóxicas (llegando incluso a mineralizar dichos compuestos). Entre las enzimas que cumplen con este

requisito se encuentran las lacasas, que tienen la capacidad de oxidar compuestos fenólicos e incluso compuestos policlorados (Decker y Terwilliger, 2000).

1.1 Enzima lacasa.

Las lacasas (p-difenol: oxígeno oxidorreductasas, EC 1.10.3.2) son enzimas que catalizan la oxidación de p-difenoles acoplada con la reducción del oxígeno en agua. Tienen una amplia gama de sustratos, que varían con el origen de las enzimas (Eggert y col., 1998) y son glicoproteínas que utilizan el cobre como cofactor, con peso molecular de entre 60 y 80 kDa (Heinzkill y col., 1998). Pertenecen al grupo de enzimas denominadas azul cobre oxidasas, las cuales se caracterizan por tener cuatro átomos cúpricos (Cu^{2+}) por molécula, aunque hay lacasas con pocos átomos de cobre o con otros elementos. Las lacasas catalizan la oxidación de sustratos fenólicos, así como la polimerización, despolimerización y metilación y/o desmetilación de compuestos fenólicos (Edens y col., 1999). En los hongos, estas enzimas están implicadas en la pigmentación y formación de cuerpos fructíferos, además de jugar un papel importante en la patogenicidad en plantas y en la degradación de la lignina; pocas de estas funciones, sin embargo, han sido demostradas experimentalmente (Eggert y col., 1998).

La función biológica de las lacasas no ha sido completamente aclarada y se ha reportado que varía dependiendo del tipo de organismo. Se ha reportado que el propósito fisiológico de la lacasa en las plantas es biosintético, mientras que en los hongos es degradativo (Giardina y col., 1995). En los hongos se ha reportado que la lacasa está involucrada en la degradación de lignina o en la eliminación de fenoles potencialmente tóxicos que surgen durante la degradación de la misma, en la morfogénesis, patogénesis y virulencia del hongo. Es una enzima de interés industrial, dado que tiene diversas aplicaciones: en la tecnología de alimentos, como biosensores y en la biorremediación (destoxificación de desechos y transformación de colorantes y biocatálisis) (Galhaup y col., 2002).

1.2 Organismos productores de enzima lacasa.

Se ha reportado que estas enzimas son secretadas por diversos organismos; entre los más estudiados se encuentran insectos, plantas y bacterias (Galhaup y col., 2002; Kumar y col., 2003). Entre las bacterias, se ha sugerido la presencia de lacasas en eubacterias (Claus, 2004). No obstante, solamente en *Bacillus subtilis* y en otras pocas especies bacterianas se ha podido demostrar actividad lacasa sobre sustratos sintéticos para lacasa eucariótica (Martins y col., 2002). Otro grupo de organismos productores de lacasas son los hongos basidiomicetos, principalmente los clasificados como de pudrición blanca, que las secretan en múltiples isoformas dependiendo de la especie del hongo y de las condiciones de desarrollo (Giardina y col., 1999). Estos hongos de pudrición blanca son de gran interés en este aspecto, por la cantidad y actividad que poseen las lacasas que producen. Las especies más usadas de este grupo han sido *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonaris*, *Trametes versicolor* y *Trametes villosa*. En algunos casos se ha evaluado la capacidad de estos hongos para degradar una amplia gama de sustratos, lo que abre un área interesante de investigación debido a la necesidad de producir de manera constante y sustentable enzimas que se incluyan dentro del desarrollo de un método eficaz para el biotratamiento de los efluentes textiles mencionados anteriormente.

Las lacasa de *Pleurotus ostreatus* han sido evaluadas a distintos niveles: se ha determinado su producción en diferentes cepas y en diferentes condiciones de cultivo (y dentro de este apartado, en cultivo líquido, sólido con soportes inertes y sustratos biodegradables). Los avances en los estudios de lacasas en esta especie han llegado hasta la purificación, caracterización catalítica e incluso a la clonación de los genes que las codifican, lo que hace de esta especie un buen modelo para el estudio de los mecanismos de expresión de estas enzimas.

1.3 *Pleurotus ostreatus*.

El género *Pleurotus* pertenece a los basidiomicetos de pudrición blanca. Entre otras cosas, posee un alto valor nutricional, además de que cuenta con propiedades terapéuticas y variadas aplicaciones biotecnológicas. Una de sus principales características es la capacidad de

degradar compuestos ligninocelulósicos, gracias al complejo enzimático que posee. Los basidiomicetos de pudrición blanca presentan además de lacasas, lignina peroxidadas y manganeso peroxidadas, entre otras peroxidadas (Muñoz y col., 1997); sin embargo, en el caso particular de *Pleurotus ostreatus* se ha descrito que produce lacasas, manganeso peroxidasa y veratril alcohol oxidasa, pero no produce lignina peroxidadas (Palmieri y col., 1997).

1.3.1 Descripción y ciclo de vida del género *Pleurotus*.

El género *Pleurotus* comprende especies generalmente de color blanco, amarillento o rosado, a veces grisáceo u oscuro. Su forma puede ser de embudo, pétalo de flor o concha de ostra. Con relación al estípite, puede carecer de éste, ser lateral o excéntrico, ya sea corto, mediano o largo. Las esporas son de color blanco, crema o lila pálido, presentan una forma cilíndrica (muy raramente elipsoides) y son lisas. El género es cosmopolita, está distribuido en Europa, Asia, África, Australia y Latinoamérica (Guinberteau, 1990). Es un hongo saprótrofo, crece sobre troncos, ramas o árboles muertos, y algunas veces se encuentra en el suelo sobre raíces podridas. La temperatura óptima de desarrollo de las especies de este género varía entre 15 y 28°C. *P. ostreatus* se desarrolla en climas templados, a una temperatura de alrededor de 25°C.

La fase vegetativa es filamentosa y está constituida por un conjunto de filamentos (hifas) denominado micelio (Herrera y Ulloa, 1998). El crecimiento del micelio se realiza sólo en las puntas y es un sistema de biomasa ramificada que se origina de la germinación de esporas o a partir de fragmentos de hifas. Su crecimiento se atribuye a un fenómeno complejo, en el que participan vesículas (agregados de enzimas hidrolíticas y sintéticas que degradan y restauran fragmentos de la pared celular). Las vesículas se producen a lo largo del segmento sub-apical y se transportan hasta llegar al centro distribuidor de vesículas, conocido como spitzenkörper. Desde ahí son distribuidas en forma radial y aleatoria hacia la pared apical, dando lugar al crecimiento de las hifas (Viniestra-González y col., 1993).

El crecimiento de la hifa causa que se formen sitios adicionales para la síntesis de la pared en la región sub-apical, originando ramificaciones laterales que a su vez sintetizan una nueva pared. La formación de las ramificaciones requiere de la producción de un nuevo ápice de la

célula madre existente. El micelio tiene por función adquirir y distribuir los nutrientes, así como el crecimiento y la formación de la estructura de soporte para el desarrollo de los cuerpos fructíferos (Klein, 1996).

En los basidiomicetos existen dos modelos sexuales: 1) el homotalismo, término empleado para los hongos que son autocompatibles, es decir en los que la unión sexual puede efectuarse entre hifas de un mismo micelio, y 2) el heterotalismo, en el que son necesarios dos micelios para que se lleve a cabo la reproducción. El género *Pleurotus* se incluye en este último modelo (**Figura 1**), y en él las basidiosporas con un núcleo germinan (micelio primario monocariótico) (**A**) y se fusionan dos micelios primarios compatibles, con un intercambio de núcleos recíproco (plasmogamia) (**B**). De esta forma se origina el micelio secundario dicariótico, con la presencia de fibulas (**C**); la fusión nuclear (cariogamia) ocurre en los basidios, que se encuentran en las laminillas del cuerpo fructífero (**D**). Posteriormente ocurre la meiosis, dando origen a células haploides (basidiosporas) que son expulsadas hacia el ambiente (**E**).

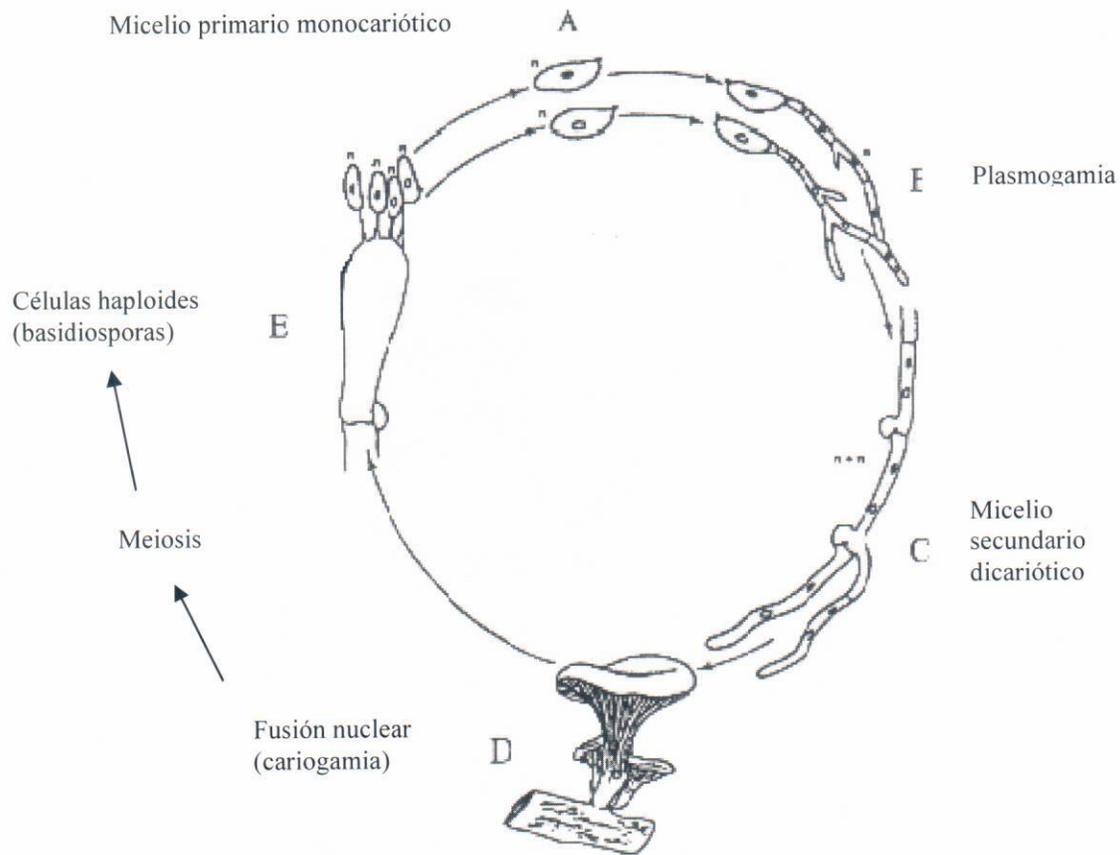


Figura 1. Ciclo de vida del género *Pleurotus*.

Se sabe que los hongos presentan una gran variedad de formas de vida, por lo que existen diferentes clasificaciones. Una de ellas se basa en su capacidad de degradación de sustratos, donde se encuentran los hongos de pudrición: 1) blanda; que degradan carbohidratos sencillos, 2) oscura; que degradan polisacáridos tales como la celulosa y hemicelulosa y 3) blanca; que pueden degradar hasta lignina. Los hongos del género *Pleurotus* se clasifican como de pudrición blanca. Este nombre de pudrición blanca se deriva de la apariencia que los hongos dan al atacar la madera, pues al degradar la lignina aparece una capa de apariencia blanquecina en el sustrato. Estos hongos excretan una o más de las tres enzimas extracelulares que son esenciales para la degradación de lignina (lacasa, Mn-peroxidasa y Lignin-peroxidasa) y se combinan con otros procesos para alcanzar su mineralización (Pointing, 2001).

El hecho de que estos hongos produzcan enzima lacasa en diversas isoformas, e incluso el hecho de que haya diferentes genes que las codifiquen, hace que en los estudios de aplicación a futuro de estas enzimas sea necesario contar con criterios adecuados en cuanto a características cuantitativas de producción, a las características catalíticas y a las condiciones moleculares que rigen su procesamiento endógeno, de forma que permita elegir las isoformas más apropiadas para cada caso. Cabe mencionar que hasta el momento los estudios realizados se han dirigido más bien a la utilización o selección de mezclas enzimáticas para obtener los parámetros de producción; sin embargo, se desconoce mucho con respecto a los mecanismos moleculares que ocurren a nivel de la expresión génica (lo que limita el alcance de dichos trabajos).

1.4 Estrategias de sobreproducción de enzimas.

Siendo las enzimas metabolitos muy útiles en diversos procesos y campos, tanto industriales como de investigación, lo que generalmente se busca es producirlas de manera masiva y constante, lo que facilitaría su aplicación real y rentable a muchos de dichos procesos. Las lacasa no son una excepción, y los trabajos que se han realizado a nivel de investigación han tenido como objetivo determinar parámetros que describan las ventajas de su producción evaluadas en distintas condiciones.

Para tal fin, lo primero que se ha realizado es la búsqueda de organismos mejores productores de lacasa. A partir de una selección previa, las estrategias que se han implementado para elevar los títulos de producción de la enzima han ido desde la búsqueda de la composición óptima de algún medio de cultivo hasta la sobreproducción mediante manipulación genética.

En el caso de la lacasa de *Pleurotus ostreatus*, se ha reportado que son enzimas constitutivas y, sin embargo, pueden ser inducidas por cobre (Palmieri y col., 2000) o medios ricos en nitrógeno (D'Souza y col., 1999). Se presentan como diversas isoformas con diferentes propiedades fisicoquímicas y, en algunas especies, la adición de inductores al medio de cultivo se traduce en la biosíntesis de nuevas isoformas extracelulares (Durán y col., 2002).

En otro estudio, Palmieri y col., (1997) demostraron que se podían producir múltiples isoformas de lacasa de hongos basidiomicetos de pudrición blanca (y específicamente de *Pleurotus ostreatus*) encontrando dos isoenzimas lacasa, POXA1 Y POXA2. La actividad de lacasa fue estudiada en función de la temperatura, utilizando ABTS, guayacol, 2,6-dimetoxifenol (DMP) y siringaldazina como sustratos. La isoenzima POXA1 mostró la máxima actividad en un intervalo de 45-65°C. Posteriormente Palmieri y col. (2000) reportaron que al agregarle CuSO₄ al caldo de cultivo se incrementó la actividad de lacasa y se produjeron tres isoenzimas (POXA1b, POXA2 y POXC). Durante el estudio probaron diversos tipos de inductores adicionales, como el MnSO₄, FeCl₃, ZnSO₄, alcohol veratrílico, veratrilaldehído, ácido vinílico y ácido ferúlico, los cuales no tuvieron un efecto significativo sobre la actividad de lacasa. La actividad de lacasa se determinó a 25°C, usando ABTS como sustrato. El mayor incremento en la actividad de lacasa se obtuvo en el cultivo suplementado con cobre (10 UI/mL).

En estudios realizados por Baldrian y Gabriel (2001) se encontró que la adición de cobre (0.5-5 mM) al hongo de pudrición blanca *Pleurotus ostreatus*, cultivado en un medio líquido limitado por nitrógeno, incrementó la actividad de lacasa hasta ocho veces. Palmieri y col. (2003) reportaron un fuerte incremento de la actividad de lacasa y la producción de una nueva isoenzima, POXA1b, en un cultivo de *Pleurotus ostreatus* suplementado con cobre.

En el caso particular de la lacasa de *Pleurotus ostreatus*, los estudios realizados con el fin de incrementar su producción se han basado en el manejo de diferentes condiciones fisicoquímicas, lográndose visualizar diferencias en actividades enzimáticas, número de isoformas en cada etapa del proceso de crecimiento y pudiendo purificarse algunas de la isoformas. Sin embargo, la mayoría de los resultados obtenidos son inconsistentes en muchos de los parámetros: por ejemplo, se han encontrado variaciones importantes en la actividad cuando se han medido estas enzimas en distintos experimentos para la misma cepa. Por otro lado, se han logrado clonar algunos genes sin reportar ventajas importantes en la producción. En este sentido se puede ver que la selección de las isoformas que se han utilizado para clonación no son elegidas con base en argumentos sólidos, pues generalmente las

determinaciones de concentración se dan para toda la mezcla de isoformas y aún no se han purificado la totalidad de las mismas (hecho que permitiría conferirles parámetros cinéticos específicos). Por otro lado, es discutible el concepto de expresión constitutiva o inducible de los distintos genes, hasta el momento se desconoce el patrón de expresión a nivel del ARNm correspondiente a las enzimas que se muestran activas. Por tales razones, es necesario iniciar estudios básicos de expresión de la lacasa, con el fin de aportar mejores criterios para la selección de las isoformas que presenten mayor conveniencia y tratar de sobre producir las. Por otro lado, probar la participación de cofactores a nivel de promotor debe permitir decidir las mejores estrategias fisiológicas que permitan la sobreproducción enzimática.

1.5 Expresión génica.

La expresión es el mecanismo mediante el cual el genoma de los organismos provee de los productos génicos que necesita para la vida a través de la formación de ARN y su posterior traducción a proteína.

Existen tres clases principales de ARN, las cuales participan en la síntesis proteica: ARN ribosómico (ARNr), ARN de transferencia (ARNt) y ARN mensajero (ARNm). Todos estos ARNs se sintetizan en presencia de moldes de ADN, proceso conocido como transcripción (Voet y Voet, 1992). La transcripción de los genes y su traducción son los sucesos bioquímicos que constituyen la expresión génica. Los genes se expresan con una frecuencia particular, según lo demande la fisiología celular (Laguna, 2002). De esta forma, es posible determinar momentos de expresión característicos o fenómenos como la inducción, a la que muchas veces se atribuye la sobreproducción de algún producto génico.

En bacterias se conocen diferentes mecanismos de control de la síntesis de enzimas, y todos ellos se ven afectados por el ambiente en que el microorganismo esté creciendo (y, en particular, por la presencia o ausencia de determinadas moléculas específicas). Estas moléculas pueden, a su vez, interactuar con otras que controlan la transcripción y, más raramente, la traducción.

La regulación de la expresión génica puede darse por dos mecanismos, uno en el que se induce la síntesis del producto codificado y otro en el que se inhibe dicha síntesis.

1.5.1 Mecanismo de inducción y represión.

La represión o inducción enzimáticas actúan a nivel de la transcripción; la síntesis de las enzimas se controla en la iniciación de la síntesis de los ARN mensajeros. Este efecto lo ejercen indirectamente, combinándose con proteínas reguladoras específicas que a su vez afectan a la síntesis del ARN.

La sustancia que inicia la inducción de una enzima se llama inductor, y una sustancia que reprime la inducción se llama correpresor; a estas sustancias, que son siempre pequeñas moléculas, a veces se les denomina colectivamente efectores. No todos los inductores y correpresores son sustratos o productos finales. En la naturaleza los inductores y correpresores son metabolitos muy frecuentes.

En el caso de una enzima reprimible, el correpresor se combina con una proteína represora específica que está presente en la célula. El represor es una proteína alostérica, y su conformación se altera cuando el correpresor se combina con él. Este represor alterado puede combinarse entonces con una región específica del ADN, cerca del promotor, que se denomina región operadora. Esta región dio su nombre al operón, un grupo de genes cuya expresión está bajo el control de un operador. Todos los genes de un operón se transcriben como una unidad. El operador está al lado del promotor donde comienza la síntesis del ARNm. Si el represor se une al operador, la síntesis de ARNm se bloquea.

La inducción enzimática puede controlarse también mediante un inductor. En este caso, la situación es la contraria al caso anterior. El represor es activo en ausencia del inductor y cuando éste se añade se combina con el represor y lo inactiva; tiene entonces lugar la síntesis de la enzima. Todos los sistemas que implican represores comparten un mismo mecanismo, que es la inhibición de la síntesis de ARNm por la acción de represores específicos, que a su

vez están bajo el control de moléculas pequeñas específicas, como los inductores y co-represores.

Es necesario señalar que no todas las enzimas de la célula se controlan por este mecanismo simple de inducción o represión y que, por otra parte, la síntesis de algunas enzimas no está controlada de ninguna manera. Las enzimas cuyos niveles se mantienen constantes en células en crecimiento se denominan enzimas constitutivas; éstas son generalmente enzimas clave requeridas para el crecimiento celular y son sintetizadas con independencia de las fuentes nutricionales.

En el caso de las enzimas con actividad lacasa se ha reportado al Cu como un agente inductor de la expresión, sin embargo hasta la fecha sólo se ha demostrado que es capaz de hacer que la actividad enzimática se incremente, dejando serias dudas de su verdadera participación como inductor.

1.5.2 Represión enzimática

Muy a menudo, las enzimas que catalizan la biosíntesis de productos específicos no son sintetizadas si el producto está presente en el medio. Por ejemplo, las enzimas implicadas en la formación de arginina solamente serán sintetizadas cuando la arginina no esté presente en el medio de cultivo; la adición de arginina exógena reprime la síntesis de estas enzimas.

La represión enzimática es un fenómeno muy común en bacterias, estando implicada en vías de síntesis de aminoácidos, purinas y pirimidinas. En casi todos los casos, es el producto final el que reprime las enzimas de la vía. En estos casos, la represión es muy específica y el resto del metabolismo celular es independiente de ella. La importancia del mecanismo para el microorganismo es obvia y garantiza que el microorganismo no gaste energía para la síntesis de enzimas innecesarias.

Es importante hacer mención que independientemente de los mecanismos por los cuales pueda ser regulada la expresión génica, existen procesos donde se requiere tener el control de

dichos mecanismos, para tener una producción constante y adecuada de enzimas. Por esa razón resulta necesario estudiarlo a nivel de inducción y represión enzimática.

2. Antecedentes.

Hay muchos estudios que se han realizado sobre *Pleurotus ostreatus* como productor de enzima lacasa y sobre la importancia de tal enzima como degradador de lignina, aunque aún resulta interesante estudiar a la enzima lacasa desde el punto de vista genético. De esta forma, ya se sabe cuántos genes codifican para lacasa en *Pleurotus ostreatus* (antes se pensaba que las numerosas isoformas de lacasa eran variantes postranscripcionales de un mismo producto génico). Varios grupos han aislado y caracterizado diversos genes de lacasa y han encontrado que, por ejemplo, existen cuatro secuencias diferentes de ARNm para *Rhizoctonia solani*, cinco genes distintos para *Trametes villosa* y otras tres secuencias han sido descritas en basidiomicetos. Ahora se sugiere que si hay una diversidad bioquímica de isoformas de lacasa es debida a la multiplicidad genómica de la secuencia del gen para la lacasa (Mansur y col., 1997).

En otro estudio se ha reportado que la transcripción de los genes de lacasa en el hongo *Trametes versicolor* es regulada por la presencia de cobre y nitrógeno. En esta investigación se demostró que cuando la concentración de cobre y nitrógeno en el cultivo de hongos aumentaba se incrementaba la actividad de lacasa, a través de un aumento en el ARNm (Dobson y Collins, 1997).

En el laboratorio de Biotecnología del Centro de investigación de Ciencias Biológicas de la UAT, se han realizado varios trabajos con el fin de estudiar la producción de lacasas al modificar los medios de cultivo. En estudios recientes realizados por Tlecuilt-Beristain (2005) se logró purificar una enzima lacasa con altos valores de actividad y afinidad por el sustrato utilizado, obteniendo una actividad máxima de 12196 U/L a las 432 h, usando para ello un medio de cultivo con glucosa, extracto de levadura y alta concentración de cobre. Con el fin de estudiar la producción de lacasa, Téllez-Téllez (2005) evaluó la actividad intracelular y extracelular de lacasa en 10 cepas diferentes del género *Pleurotus*, utilizando diferentes

sustratos; encontró diferente número de isoformas intracelulares y extracelulares para una misma cepa. Por otro lado, se sabe que la producción de la lacasa está influenciada por un gran número de factores ambientales, tales como el pH, temperatura, tipo de cultivo y composición del medio de cultivo (Giardina y col., 1999). Todo lo anterior no se ha podido explicar en función de genes activados y productos activos, existen trabajos en que se han utilizado iones metálicos y, sin embargo, aún no se ha determinado con precisión cuales son las isoformas que son constitutivas o inducibles, o de ambos tipos. El único trabajo en el que se ha tratado de evaluar como varían los niveles de ARNm en función de la adición de cobre en un medio es el de Palmieri y col. (2000), quienes realizaron fermentación y agregaron sulfato de cobre al cultivo. Observaron un incremento en la actividad de lacasa y se produjeron tres isoenzimas (POXA1b, POXA2 y POXC). También realizaron estudios de expresión, observando que el cobre induce algunos genes de lacasa.

Existen pocos trabajos en los que se reporte el efecto inductor del cobre, adicionado al medio de cultivo, sobre la lacasa de *Pleurotus* y básicamente los perfiles de producción de isoformas son muy diferentes entre cepas (por lo que los efectos de la inducción serían particulares también para cada cepa). Es por ello que el presente estudio propone definir el papel real del cobre sobre la actividad de la lacasa y saber de qué manera se están expresando las isoformas de esta enzima en *Pleurotus ostreatus* cepa ATCC 32783, de tal forma que se puedan caracterizar mejor las isoformas con mejores características para su producción.

3. Justificación.

El estudio de las características de enzimas potencialmente aplicables en el ámbito de la biorremediación exige el conocimiento más a fondo de los procesos de producción endógena que realizan las células de los organismos que las poseen.

En este sentido, el presente trabajo tiene como fin principal caracterizar los patrones de expresión de las isoformas de lacasa producidas por el basidiomiceto de pudrición blanca *Pleurotus ostreatus* cuando es cultivado en medio líquido, que en la actualidad sólo se han visualizado de manera indirecta mediante zimografía (al ser un método no cuantitativo no permite decidir si la actividad lacasa de las proteínas se presenta en proteínas de tamaños diferentes o si la actividad de algunas proteínas de tamaño específico es mayor). Sin embargo, el hecho de que una proteína no tenga actividad no es un indicativo definitivo para sugerir que no se ha transcrito o expresado, ya que la actividad se refiere más a la forma funcional de la enzima, que de algún modo pudiera estar limitada por componentes del ambiente en el que se desarrolla el organismo productor.

Como meta adicional, el uso de la misma metodología permitirá tener evidencias para decidir si el cobre es un agente inductor de la expresión de todos los genes de la lacasa o si sólo participa como una de las condiciones ambientales que pueden hacer que la funcionalidad de la enzima cambie en el medio en que se desarrolla.

3.1 Problema.

Se desconoce si las isoformas de lacasa producidas en fermentación líquida por *Pleurotus ostreatus* son productos de genes distintos o del mismo gen, pero con cambios postraduccionales en su estructura.

No se sabe con certeza si estas isoformas son productos de genes que se expresan de manera constitutiva y/o son productos de genes que necesitan un agente inductor.

Existe la duda de que el cobre participe como un agente inductor real para todos los genes, pues se sabe que para que un compuesto sea inductor forzosamente debe actuar a nivel de promotor.

3.2 Preguntas.

- ¿Las isoformas de lacasa son productos génicos diferentes?
- ¿Existen formas constitutivas e inducibles de lacasa?
- ¿Es realmente el cobre un inductor de los promotores de los genes que codifican para la enzima lacasa o sólo es un potenciador postraduccionales de su actividad?

4. Objetivos.

4.1 Objetivo General.

Caracterizar los patrones de expresión de los genes que codifican a las isoformas de lacasa producidas por *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783 en fermentación líquida, con y sin adición de sulfato de cobre.

4.2 Objetivos Particulares.

- Determinar los perfiles de isoformas de lacasa producidas por *Pleurotus ostreatus* en fermentación líquida, con y sin adición de cobre.
- Determinar los momentos pre-expresión, expresión y post-expresión de las isoformas de lacasa de *Pleurotus ostreatus* en cultivo líquido, con y sin adición de cobre.
- Determinar la naturaleza de las isoformas encontradas.
- Determinar si el cobre es inductor de los genes que codifican para lacasa.

5. Metodología.

Pleurotus ostreatus (ATCC 32783)

Desarrollo del inóculo durante siete días en agar dextrosa-papa a 25°C

Conservación de la cepa: en agar dextrosa-papa a 4°C

Fermentación en medio líquido: (Incubación a 25°C con agitación orbital de 120 rpm).
Inóculo: 2 ml. De una suspensión de micelio (3 fragmentos / 50 mL del medio).

Adición de sulfato de cobre al medio de cultivo

Sin adicionar sulfato de cobre al medio de cultivo

Caracterización de fermentación:

- Obtención del extracto enzimático.
- Cuantificación de la biomasa.
- Actividad enzimática volumétrica y específica de extractos extra celulares.
- Perfil de actividad de las isoenzimas producidas intra y extracelulares por zimografía.

Caracterización de fermentación:

- Obtención del extracto enzimático
- Actividad enzimática volumétrica de extractos extra celulares.

Adición de sulfato de cobre al extracto crudo enzimático a una concentración de .10 g/L.

Caracterización de la fermentación:

Actividad enzimática volumétrica de extractos extracelulares

Recolección de biomasa

Selección de primers de lacasas

Extracción del ARN

Electroforesis

RT-PCR

Electroforesis

Análisis de datos

5.1 Microorganismo.

Se utilizó la cepa *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783 (Po 83) y se incubó sobre agar dextrosa-papa durante siete días a una temperatura de 25°C.

5.2 Medio e inóculo.

La fermentación en medio líquido se realizó en el siguiente medio (Tabla 1). El pH inicial de la fermentación se ajustó a 6.0. Se realizó una suspensión con solución tween 80 al 0.2% y el inóculo se tomó con un horador de 4 mm de diámetro de la periferia de la colonia de *P. ostreatus*.

Tabla 1 Composición del medio de cultivo.

Componentes	Concentración en g/L
Extracto de levadura	5
Glucosa	10
K ₂ HPO ₄	0.4
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.001
KH ₂ PO ₄	0.6
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.05
MnSO ₄ H ₂ O	0.05
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.25

(Juárez, 2006)

5.3 Fermentación en medio líquido.

Se realizó en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de medio y se inoculó bajo condiciones estériles, agregando 2 mL de la suspensión que contenía el micelio del hongo. Los cultivos fueron incubados a 25°C, con agitación orbital de 120 rpm.

5.4 Caracterización de la fermentación en medio líquido.

5.4.1 Obtención del extracto enzimático.

El extracto extracelular (ECE) se obtuvo por filtrado y retención de la biomasa a través de papel filtro Whatman No. 4 a peso constante. El ECE se filtró a través de membranas Millipore (0.45 μm de diámetro de poro).

5.4.2 Cuantificación de la biomasa.

La cuantificación se llevó a cabo pesando la biomasa retenida sobre el papel Whatman previamente puesto a peso constante y realizando la diferencia de pesos con respecto al peso constante inicial del papel (AOAL).

5.4.3 Determinación de proteína soluble.

La proteína total soluble se determinó en el ECE libre de células por el método de Bradford (1976). A 50 μL de ECE se le adicionaron 200 μL del reactivo de Bradford (Sigma), el volumen se ajustó a 1 mL con agua destilada y se determinó la absorbancia a 595 nm. Se usó albúmina sérica bovina como proteína estándar (Díaz-Godínez y col., 2001).

5.4.4 Determinación de pH.

Se determinó el pH inicial del medio, y durante la fermentación, por potenciometría. El análisis se realizó con un potenciómetro marca Conductronic Pc 45.

5.4.5 Determinación de actividad enzimática.

La actividad de lacasa extracelulares se determinó utilizando como sustrato 2,6 dimetoxifenol (DMP). La mezcla de reacción contuvo 900 μL DMP 2 mM en buffer de fosfatos 0.1 M y pH 6.5, la absorbancia a la que se realizó la determinación fue de 468 nm. Una unidad de actividad de lacasa (U) se considera como la cantidad de enzima que provoca el incremento de una unidad de absorbancia por minuto (Téllez-Téllez y col., 2005).

5.4.6 Zimografía.

Es una técnica mediante la cual se puede observar la actividad enzimática de las proteínas embebidas en una matriz de poliacrilamida reveladas a través de un sustrato específico. En el trabajo se realizaron zimogramas para detectar isoformas activas de lacasa a partir de extractos intra y extracelulares, de tal manera que se pueda reportar el total de las isoformas activas producidas por el hongo.

Los zimogramas se realizaron de los extractos dializados obtenidos por la fermentación líquida. Se usó la técnica SDS-PAGE modificada (Laemmli, 1970; Téllez-Téllez y col., 2005).

5.5 Obtención de la biomasa para estudios de expresión de lacasa.

En la fermentación se determinaron los tiempos en que se presentó la fase pre-expresión, expresión y pos-expresión de la enzima con actividad lacasa, mediante la determinación indirecta por actividad. Tomando en cuenta estos datos, se realizó la separación de la biomasa del medio de cultivo mediante filtración y la biomasa fue utilizada para la extracción posterior del ARN total.

5.5.1 Extracción de ácido ribonucleico (ARN).

Las muestras de micelio seleccionadas se lavaron con un volumen de solución salina 0.9 g/L, filtrando a través de filtros de nylon estériles (30 μ m de diámetro de poro). Se congelaron inmediatamente con nitrógeno en un mortero de porcelana, donde se machacaron hasta ser reducidos a polvo fino (es importante mantener el mortero muy frío con nitrógeno líquido mientras dura el proceso de rotura). Previamente, el mortero fue lavado con etanol y cloroformo. Una porción de la muestra congelada y machacada, no mayor a 100 mg, se procesó para la extracción de ARN, utilizando el Rneasy Plant Mini Kit (Qiagen) y siguiendo el protocolo del fabricante. El excedente de micelio congelado se guardó a -70°C , para ser utilizado posteriormente en caso de ser requerido.

5.6 Transcripción inversa – Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).

5.6.1 Limpieza de ARN total.

El ARN total extraído puede contener restos de ADN que es importante remover para que no interfieran en el siguiente experimento. La remoción de este material se realizó incubando la muestra con una endonucleasa (ADNasa I) que digiere ADN mono y bicatenario, al hidrolizar los enlaces fosfodiéster, produciendo mono y oligodesoxirribonucleótidos. Después de la digestión, la muestra fue utilizada para la síntesis de la cadena complementaria de ADN. La limpieza se realizó con el DNasa (FERMENTAS) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

5.6.2 Transcripción inversa (RT).

Esta técnica consiste en sintetizar una cadena de ADN complementaria (ADNc) de una cadena de ARN molde con una enzima transcriptasa inversa y un cebador de ADN (dT-Not), que contiene varias timinas que complementan la cola de poli A que sólo tienen los ARN mensajeros eucarióticos. El producto resultante de esta reacción es utilizado como molde en una posterior reacción de amplificación convencional. La RT se realizó con el kit Revertaid™ H minus First Strand cDNA Synthesis (FERMENTAS), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Primer	Secuencia	Referencia
dT-Not	AATTCGCGCCGCTTTTTTTTTTTTTTTT	Giardina y col., 1996

Tabla 2. Cebador utilizado para la transcripción inversa.

5.6.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis y Faloona, 1987) es una técnica de biología molecular utilizada para llevar a cabo replicaciones exponenciales de un fragmento particular de ADN *in vitro*. El ADN es enzimáticamente amplificado por ADN polimerasas, en este caso particular por Taq polimerasas. Esta técnica necesita de un molde de ADN que contiene la región que nos interesa amplificar y dos cebadores, que se unen a las regiones que se desean flanquear en el ADN molde. En este paso se utilizó como molde la cadena obtenida de la transcripción inversa.

Para la amplificación se utilizaron los cebadores Lac1 y Lac2 (cuadro 2). La reacción se realizó en tubos Eppendorf de 0.5 mL, en un volumen total de reacción de 50 μ L con 5 μ L de ADN molde, 5 μ L 10x PCR Buffer, 5 μ L MgCl₂, 1 μ L dNTP, 23.5 μ L H₂O y 0.5 μ L Taq polimerasa. La reacción se incubó en un termociclador MJ-RESEARCH PT-100 con los siguientes parámetros: desnaturalización durante 1 minuto a 95°C, hibridación a 60°C durante 1 minuto y extensión a 72°C durante 1 minuto, 30 ciclos.

Primer	Secuencia	Referencia
LAC1	CGCTCTAGACTCGTCATTGAAGCAGATG	Giardina y col., 1996
LAC2	GCGCTGCAGCTAAGCTATCCCACCTTTGTC	Giardina y col., 1996

Tabla 3. Cebadores utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa

5.6.4 Electroforesis en gel de agarosa.

Los productos de la amplificación se mezclaron con 2 μ L de buffer de carga y se aplicaron en un gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE 1X. Transcurrida la electroforesis, el gel se tiñó en bromuro de etidio y se visualizó bajo luz ultravioleta. Se tomó una imagen del gel con el equipo Gel Doc 1000 de Bio Rad. En el gel también se colocó un marcador (Gene ruler, FERMENTAS) para determinar la longitud de las bandas obtenidas de cada muestra.

6. Resultados y discusión.

El trabajo se encuentra dividido en dos partes: la primera comprende la caracterización de las fermentaciones y la segunda corresponde al análisis de la expresión génica mediante RT-PCR.

A. Se consideró la caracterización de la fermentación por las siguientes razones:

1. En la fermentación en medio líquido existen trabajos que han mostrado diferentes resultados en cuanto a producción de biomasa, pH y, en general, en cuanto a la caracterización de la fermentación. Por tal motivo, resulta imprescindible evaluar estas variables en las fermentaciones realizadas, con el fin de valorar si el hongo tiene un crecimiento acorde con el que se ha reportado para esta cepa y si la producción de la lacasa sigue el mismo comportamiento.
2. La forma de inoculación utilizada en el presente estudio fue distinta a la reportada en estudios anteriores con esta cepa. Derivado de esto, es posible esperar que muchos de los parámetros que se miden para caracterizar la fermentación (como es el caso de la producción de proteína y la actividad enzimática) cambien en alguna medida.
3. Para el fin de este proyecto es necesario ser muy precisos en cuanto a los perfiles de isoformas obtenidos en cada punto de muestreo y su patrón de expresión, para poder asumir una correspondencia entre los mismos.

B. La extracción del ARN y la RT-PCR se hizo para poder obtener el perfil de expresión de los genes de lacasa, y de esa forma se pudo realizar una comparación con el perfil de isoformas que se presentaron durante la fermentación.

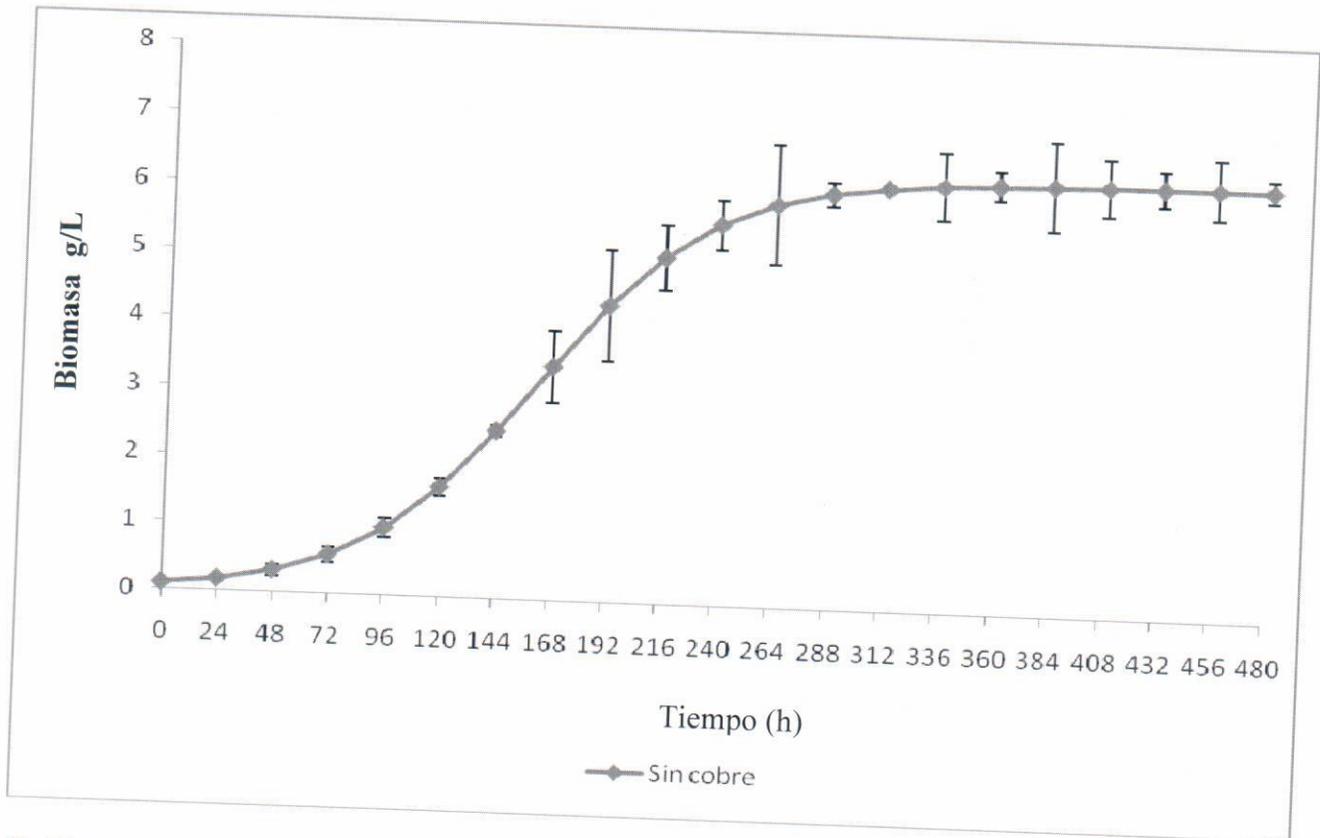
Los resultados y discusión correspondientes a la primera parte son los siguientes:

6.1 Caracterización de la fermentación en líquido sin adición de cobre para producción de lacasa de *Pleurotus ostreatus*.

6.1.1 Determinación de biomasa.

En la gráfica 1 se puede observar el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en el medio sin adición de cobre. En esta gráfica se aprecia que la fase de adaptación duró hasta aproximadamente las 120 h, y a partir de ese momento se observó un crecimiento exponencial, alcanzando su máximo alrededor de las 288 h con una biomasa de 7.2 g/L. En el trabajo de Juárez en el 2006, reportó que la fase exponencial concluye alrededor de las 360 h, lo que sugeriría una menor eficiencia en el crecimiento. Sin embargo, en dicho trabajo la cantidad de biomasa obtenida es sensiblemente mayor a la obtenida en el presente estudio. En este sentido deben considerarse dos aspectos: la forma de inoculación (como habitualmente se realizaba implica la adición conjunta con el micelio de un cilindro de agar que al momento de filtrar la biomasa se queda también retenido en el filtro y puede hacer que se sobreestime la cantidad de biomasa) y el hecho de que la presencia de ese mismo cilindro de agar puede estar contribuyendo a un crecimiento mayor (por no interrumpirse el crecimiento al cambiar al hongo de medio sólido a líquido). A pesar de estas razones, en el presente trabajo era importante contar con un inóculo libre de la presencia de un medio distinto al de prueba, es decir, al medio en el que se quiere evaluar la respuesta en cuanto a aparición de isoformas y de ARNm para lacasa. Aunque se obtienen aproximadamente 3 g menos de biomasa total en éste trabajo, el comportamiento no presenta diferencias importantes.

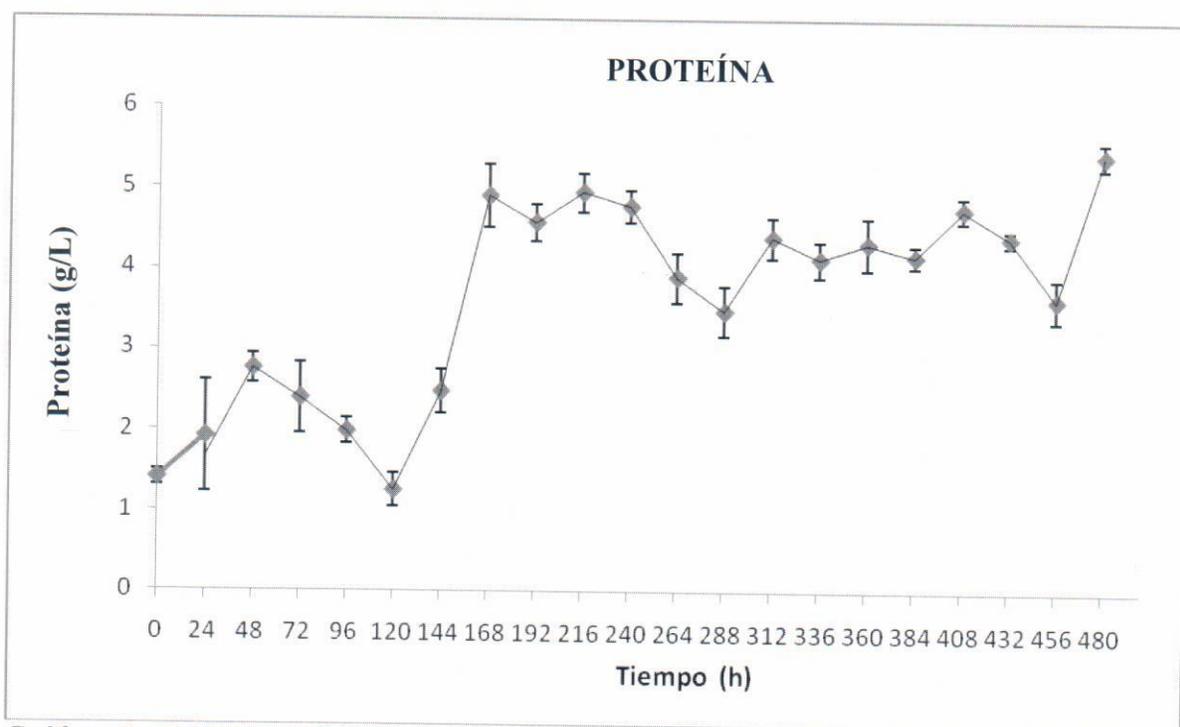
BIOMASA



Gráfica 1. Crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en medio líquido.

6.1.2 Concentración de proteína soluble en el extracto crudo enzimático.

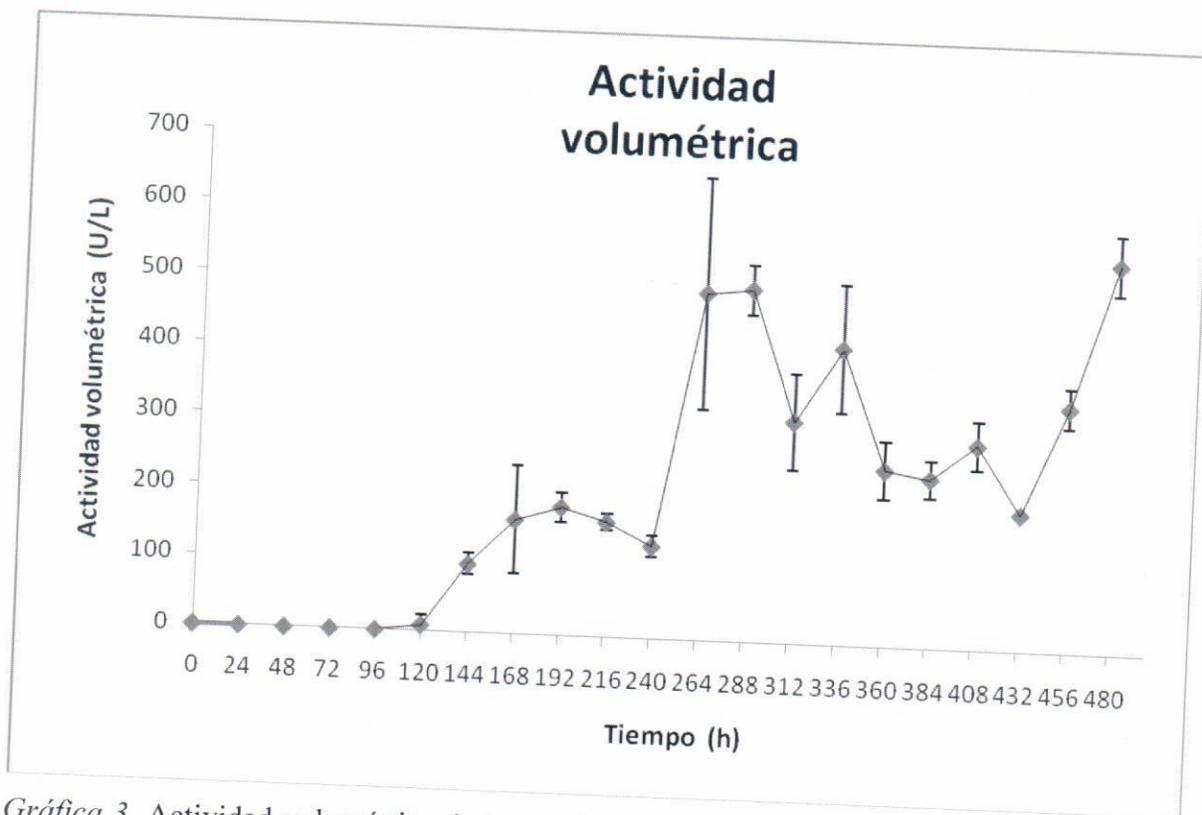
En cuanto a la producción de proteína soluble, se puede observar que la concentración máxima de proteína extracelular obtenida durante la fermentación fue de alrededor de 0.25 g/L a las 360 h, siendo la concentración mínima de 0.5 g/L alrededor de las 72 h (Gráfica 2). Los valores crecientes en la concentración de proteína producida pueden deberse a un cúmulo variable de proteínas extracelulares solubles propias del metabolismo del hongo. Un suceso importante es que si bien el perfil de producción de proteína es muy parecido al ya evaluado en otros trabajos con esta cepa, la concentración de proteína medida se encuentra un orden de magnitud por debajo de lo reportado, algo difícil de explicar con argumentos fisiológicos.



Gráfica 2. Concentración de proteína soluble presente en el extracto crudo enzimático obtenido por fermentación en medio líquido (FML).

6.1.3 Actividad de lacasa.

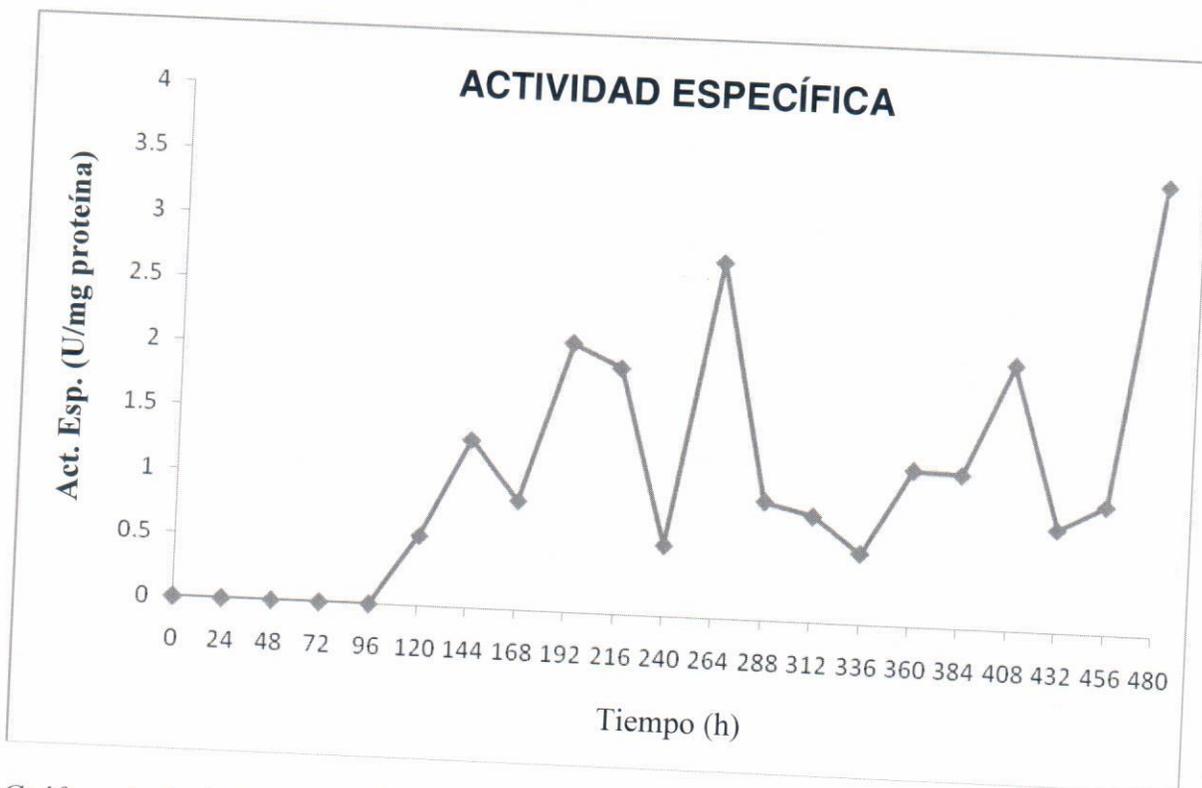
La actividad volumétrica de lacasa mostró valores de 200 U/L a las 190 horas y alcanzó su valor máximo a las 264 horas, con una actividad de 500 U/L, con otro pico de actividad a las 480 h (gráfica 3). Durante los primeros días de fermentación la actividad es prácticamente nula. Cuando en otros trabajos con esta cepa se ha determinado esta actividad se encuentra que hay una buena correspondencia de los valores de actividad en los primeros tiempos, sin embargo, la actividad máxima obtenida representaría sólo el 50% de la reportada. Esto puede ser debido también a las características del inóculo utilizado y puede especularse con que el crecimiento del hongo, es decir, la mayor cantidad de biomasa es un factor crucial en relación con este parámetro.



Gráfica 3. Actividad volumétrica de lacasa de *Pleurotus ostreatus* en fermentación en medio líquido (FML).

6.1.4 Actividad específica de lacasa.

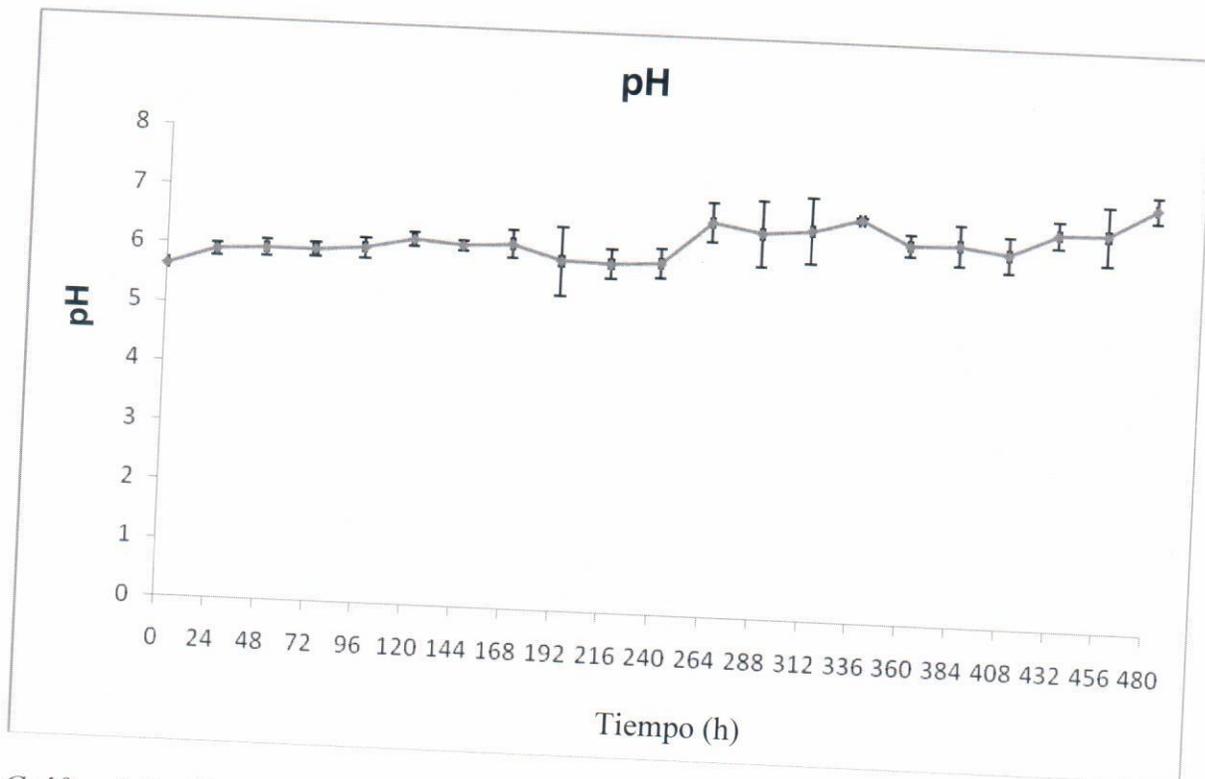
En la gráfica 4, la actividad específica en las primeras 100 horas de fermentación no es cuantificable. Posteriormente hay un aumento alrededor de las 120 horas con 0.5 U/mg de proteína y a partir de ese momento existen fluctuaciones. Existen dos picos de actividad, de aproximadamente 2.8 y 3.5 U/mg de proteína, alrededor de las 264 y 480 h, respectivamente. En cuanto a lo que se ha reportado con respecto a los valores de esta actividad se puede mencionar que lo máximo que se había encontrado para Po83 era de 8 U/mg de proteína. Nuestros resultados de actividad específica de lacasa se encuentran dentro de los rangos reportados.



Gráfica 4. Actividad específica durante la fermentación en medio líquido de *Pleurotus ostreatus*.

6.1.5 Perfil de pH.

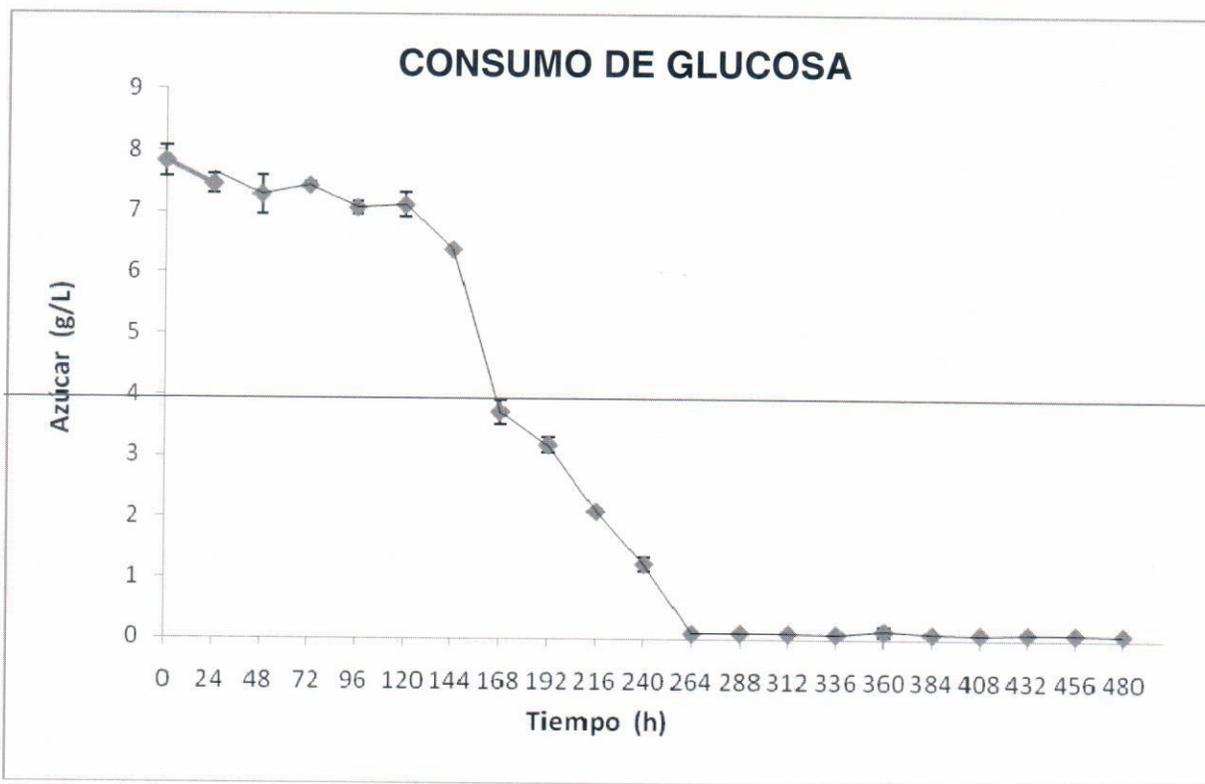
Se sabe que el cambio en el pH del medio puede alterar el perfil de producción de las lacasa, por tal razón al inicio de la fermentación se utilizó un amortiguador con ajuste del pH a 6.0. Sin embargo, lo que se observó durante el tiempo de fermentación fue que los valores variaron de 6 hasta 7.2 al final (gráfica 5). Se puede mencionar que éste es un comportamiento que se ha observado también en otros trabajos reportados, no sólo de esta cepa, y esta sugiriendo que el sistema amortiguador utilizado no es tan efectivo como se sospechaba.



Gráfica 5. Perfil de pH obtenidos de *Pleurotus ostreatus* en fermentación en medio líquido.

6.1.6 Cuantificación de azúcares residuales.

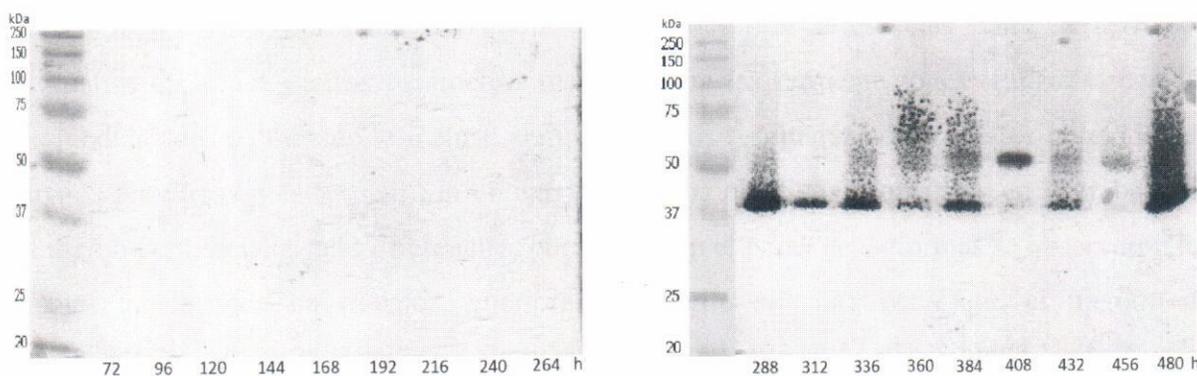
En la gráfica 6 se observa que el consumo de glucosa corresponde a las etapas de crecimiento que pudieron describirse con anterioridad. La concentración de glucosa disminuyó ya de manera importante después de las 120 h, aproximadamente el tiempo que dura la fase de adaptación. A partir de este momento es evidente un descenso importante de su concentración hasta llegar al consumo casi total alrededor de las 250 horas, lo que correspondería con la fase de crecimiento exponencial y la fase estacionaria que alcanza el hongo.



Gráfica 6. Consumo de glucosa de *Pleurotus ostreatus* en fermentación en medio líquido.

6.1.7 Determinación de isoformas extracelulares de lacasa.

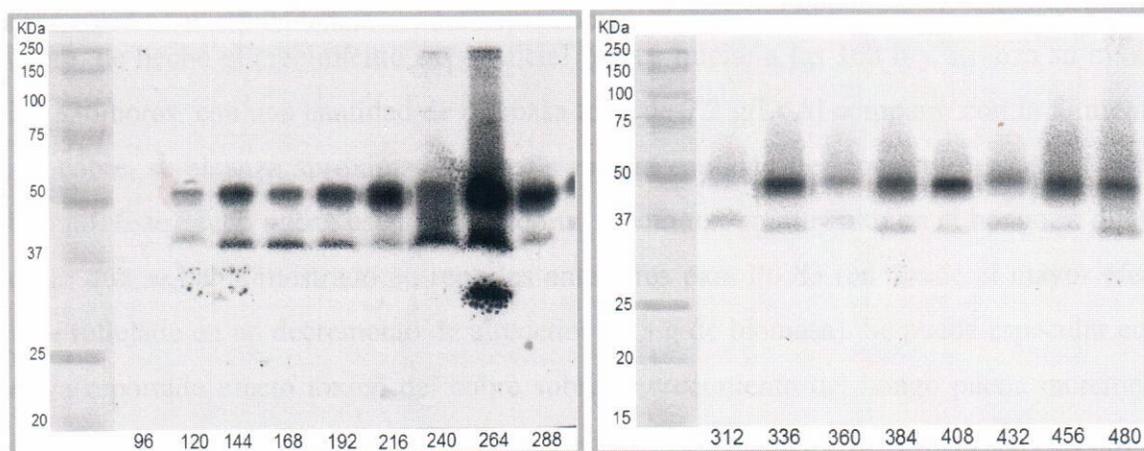
En la gráfica 7 se muestra el perfil de isoformas de lacasa producidas por el hongo en el medio sin adición de cobre. Se observa la presencia de dos isoformas de 30 y 37 kDa a partir de las 144 h, este perfil sigue hasta las 216 h y a partir de las 264 h se empieza a observar una nueva isoforma de aproximadamente 50 kDa. La isoforma de 30 kDa pierde gradualmente actividad después de las 360 h, sin embargo la isoforma de 37 kDa incrementa su actividad conforme avanza la fermentación.



Gráfica 7. Perfil de isoformas extracelulares de lacasa producidas por *Pleurotus ostreatus* en el medio líquido.

6.1.8 Determinación de isoformas intracelulares de lacasa.

En la gráfica 8 se puede observar el perfil de isoformas intracelulares que se determinó en la fermentación sin adicionar cobre. Se observaron dos isoformas, de 37 y 50 kDa, desde las 120 horas hasta el término de la fermentación (480 h). Se puede observar que este perfil es constante también en su actividad, al menos para la isoforma de 50 kDa (puesto que la isoforma de 37 kDa va perdiendo su actividad conforme pasan las horas).



Gráfica 8. Perfil de isoformas intracelulares de lacasa producidas por *Pleurotus ostreatus* en medio líquido.

El crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida ya había sido estudiado para producción de enzima lacasa (Palmieri y col., 1997). Sin embargo, el sistema de inoculación basado en la suspensión de micelio nunca se había probado en la cepa *Pleurotus ostreatus*

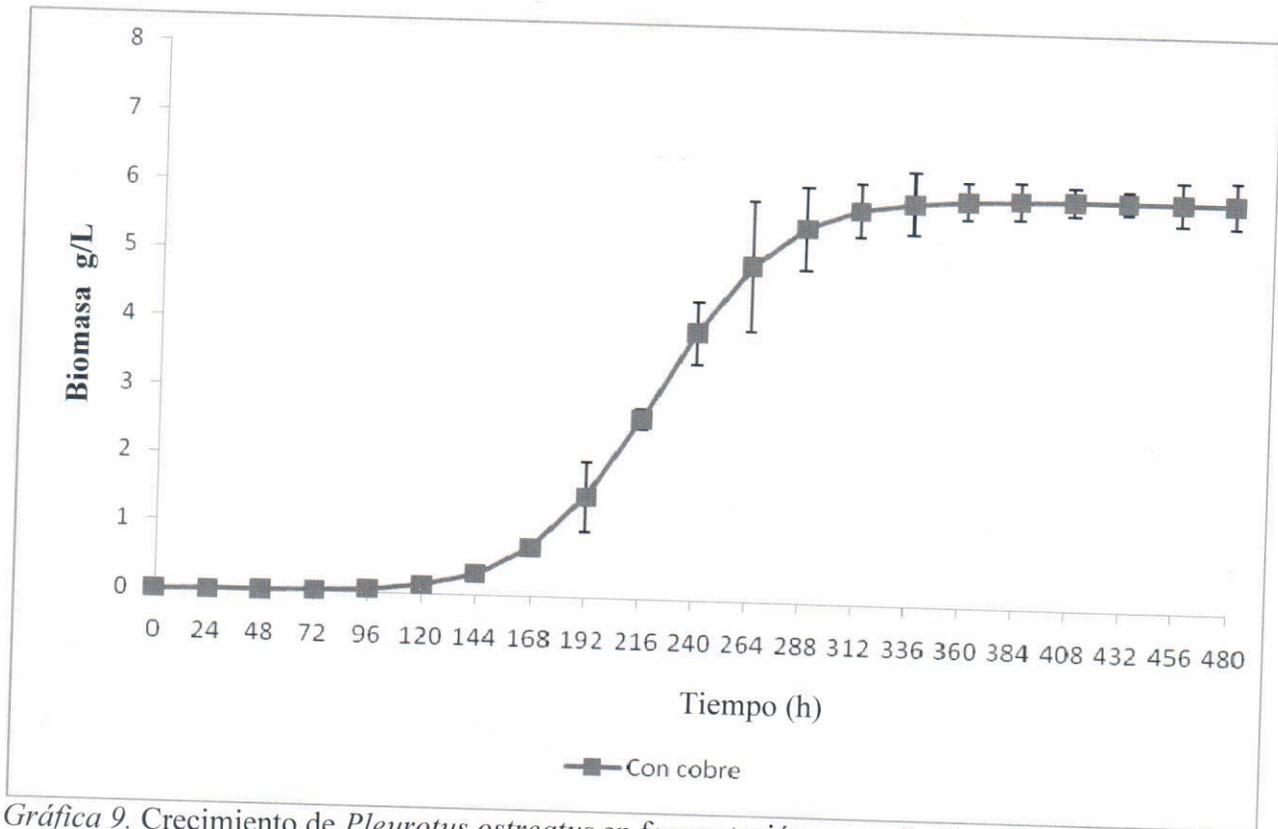
ATCC-32783. En el presente trabajo se pueden observar diferencias entre la actividad enzimática de lacasa y otros parámetros medidos para las fermentaciones realizadas con las dos modalidades de inóculo, e incluso comparando los resultados con los datos obtenidos en trabajos previos con esta cepa. Sin embargo, para los objetivos propuestos en el trabajo no resultaron perjudiciales tales diferencias, puesto que en el perfil de isoformas se observaron las mismas bandas que en trabajos anteriores. Con ello se comprueba que el método de inoculación basado en la suspensión de micelio no repercute en la aparición de las isoformas que produce *Pleurotus ostreatus*. Por el contrario, con esta técnica se tiene la seguridad de que no existirá interferencia de los cilindros de agar empleados en el método tradicional en la fisiología del crecimiento, la extracción del ARN o, incluso, en la expresión de los genes.

6.2 Caracterización de la fermentación en medio líquido con adición de sulfato de cobre (CuSO_4).

6.2.1 Determinación de biomasa.

En la gráfica 9 se observa el crecimiento del hongo con la presencia de cobre en el medio de cultivo. Es notorio que la fase de adaptación es más prolongada que en la fermentación sin cobre, de hecho el crecimiento exponencial parece iniciar a las 168 h y alcanza su máximo a las 336 horas, con una cantidad de biomasa total de 7.2 g/L. Al comparar con la fermentación sin cobre, se alcanza aproximadamente la misma cantidad de biomasa, pero en el doble de tiempo. Este hecho puede estar reflejando un efecto tóxico muy alto en el hongo, a diferencia de lo que se había mostrado en reportes anteriores para Po 83 (en donde el mayor efecto se veía reflejado en un decremento de alrededor de 3 g de biomasa). Se puede especular con que el ya reportado efecto tóxico del cobre sobre el crecimiento del hongo pueda incrementarse debido al sistema de inoculación empleado, en el que el micelio en suspensión carecería de la relativa protección del medio sólido (agar) inicial de la forma tradicional de inoculación.

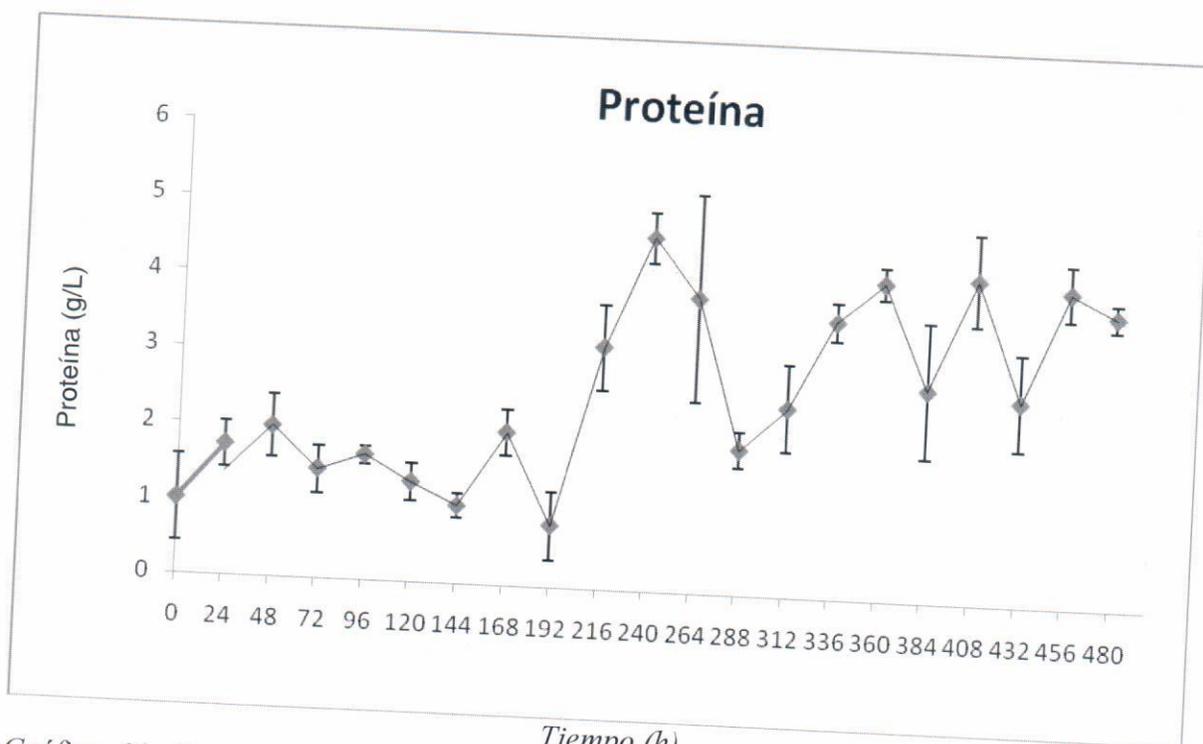
BIOMASA



Gráfica 9. Crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en fermentación en medio líquido con cobre.

6.2.2 Concentración de proteína soluble en el extracto crudo enzimático.

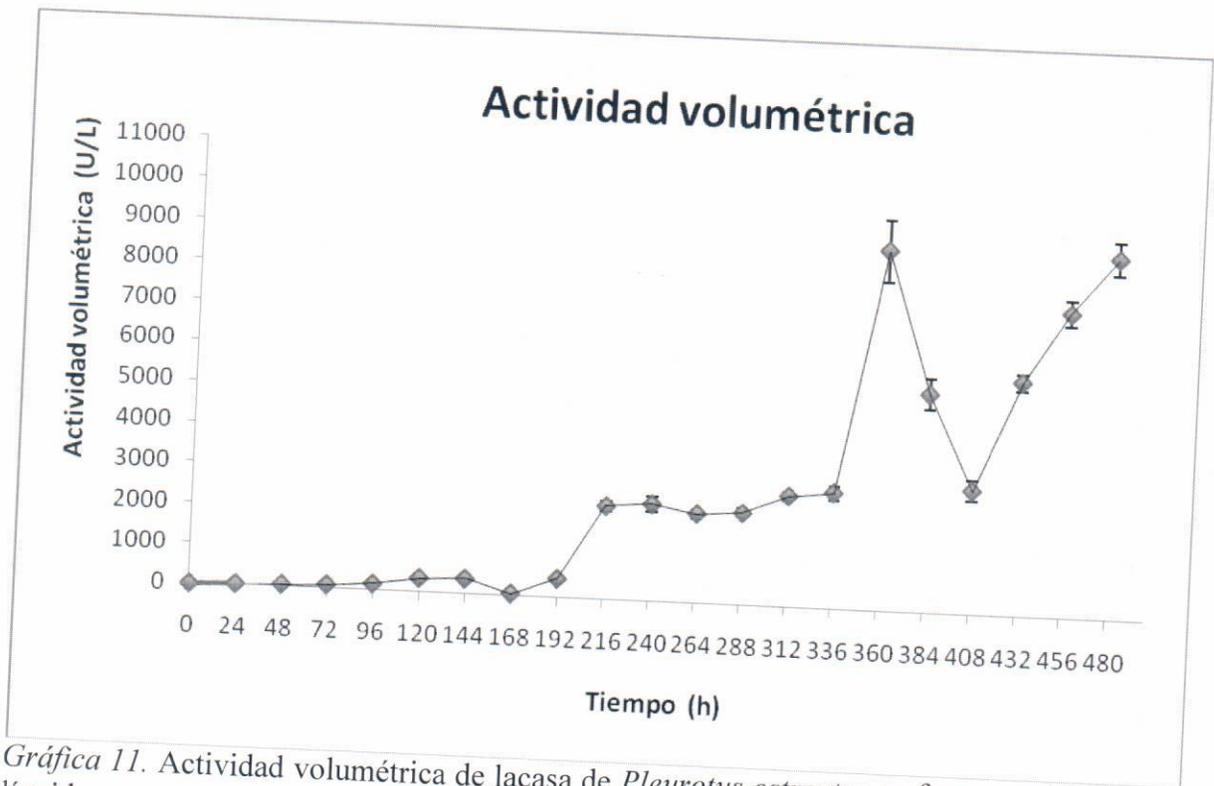
Se observa en la gráfica 10 que la cantidad de proteína se mantuvo hasta las 144 horas, aproximadamente. A partir de ese tiempo se puede observar un incremento en la cantidad de proteínas, sin embargo, no se alcanza una estabilidad, como la que se observó en la fermentación sin adición de cobre.



Gráfica 10. Concentración de proteína soluble presente en el extracto crudo enzimático obtenido por fermentación en medio líquido con cobre.

6.2.3 Actividad de lacasa.

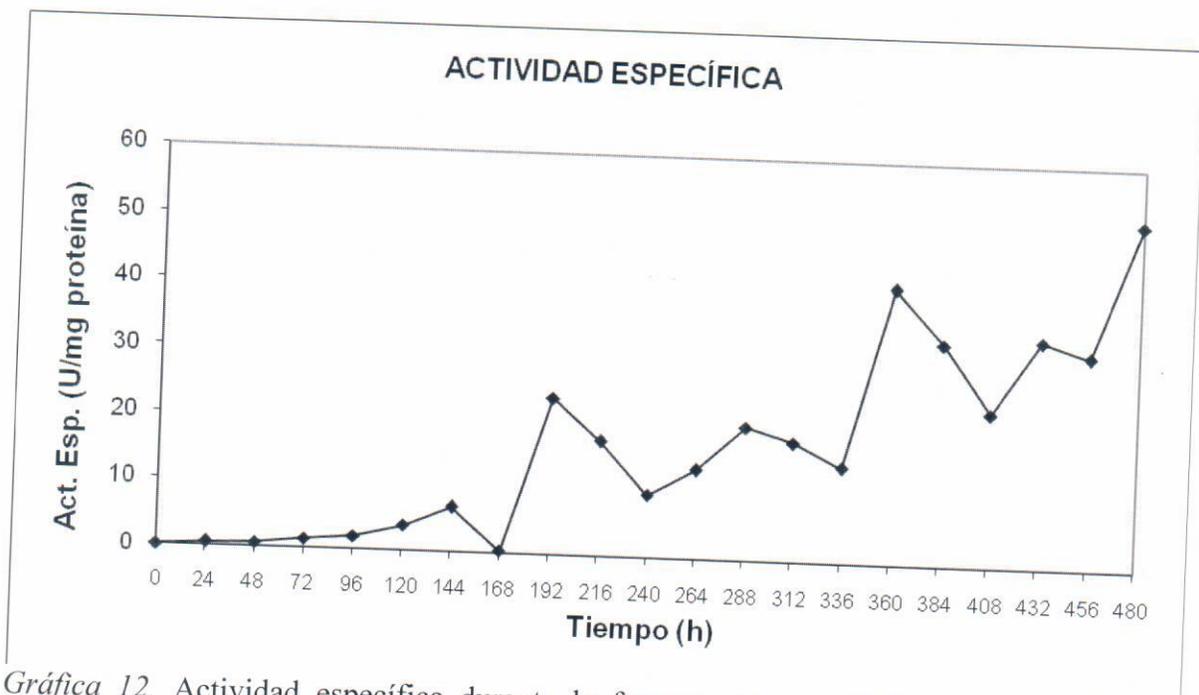
En la gráfica 11 se puede observar la actividad volumétrica obtenida en presencia de cobre. En los primeros días se observa una actividad muy baja, en comparación con la actividad obtenida en la fermentación sin cobre. Esto puede deberse nuevamente a que el cobre puede estar teniendo un efecto negativo en el hongo y la producción enzimática depende de la cantidad de biomasa para fines de comparación. Como se muestra en la gráfica, el periodo de actividad empezó a partir de las 192 h, hasta llegar a su actividad máxima a las 360 h con un valor de 9000 U/L. El perfil zimográfico (gráficas 15 y 16) corresponde con tales actividades y de alguna manera corresponde con el momento en el que la cantidad de biomasa empieza a incrementarse. Este efecto sobre el valor alto de actividad es esperable si se parte del supuesto de que el cobre tiene un efecto tóxico sobre el crecimiento del hongo, pero un efecto positivo en cuanto al incremento de actividad.



Gráfica 11. Actividad volumétrica de lacasa de *Pleurotus ostreatus* en fermentación en medio líquido.

6.2.4 Actividad específica de lacasa.

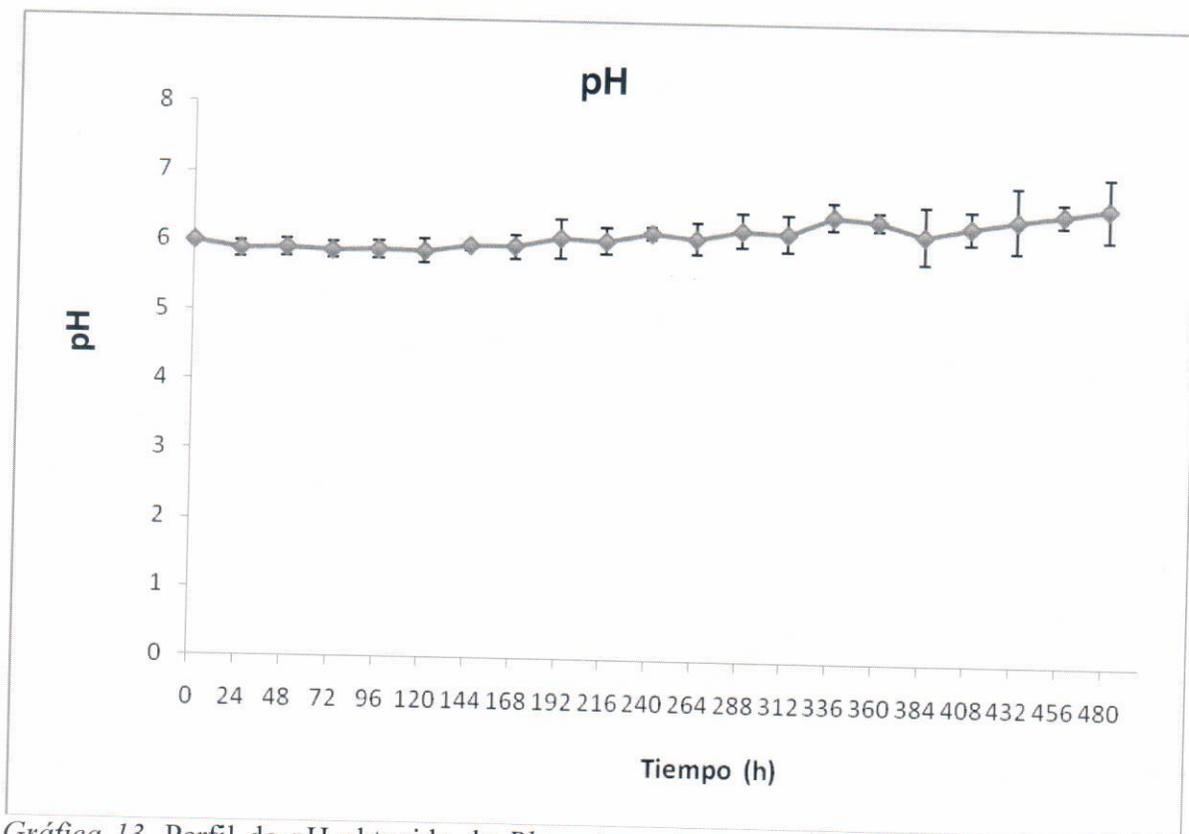
La actividad específica en las primeras 168 horas de fermentación no es cuantificable, por carencia de actividad volumétrica en este periodo (gráfica 12). Posteriormente, hay un aumento alrededor de las 192 horas, con 20 U/mg de proteína, y un pico de actividad de aproximadamente 40 U/mg de proteína alrededor de las 360 horas. Los resultados obtenidos en el medio sin cobre y con cobre indican en este caso una mayor proporción de proteína con actividad lacasa, con respecto a la proteína total soluble excretada, lo que puede ser considerado un buen parámetro para purificación.



Gráfica 12. Actividad específica durante la fermentación en medio líquido de *Pleurotus ostreatus* con cobre.

6.2.5 Perfil de pH.

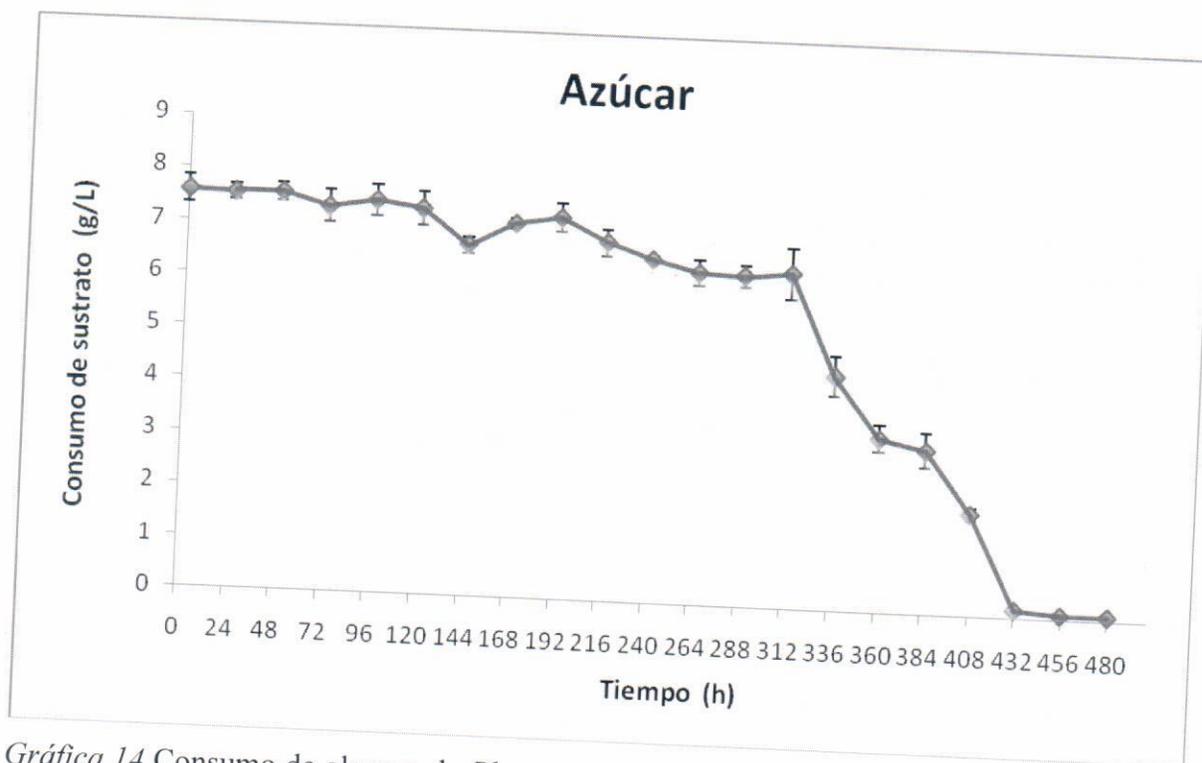
Durante esta fermentación, los cambios en el valor de pH (gráfica 13) fueron menores que en la fermentación sin cobre, lo que puede estar asociado con el hecho de que el crecimiento del hongo está disminuido (y por lo tanto, los productos metabólicos que pudieran estar propiciando este efecto no se encuentran presentes en la misma concentración).



Gráfica 13. Perfil de pH obtenido de *Pleurotus ostreatus* en fermentación en medio líquido con cobre.

6.2.6 Cuantificación de azúcares residuales.

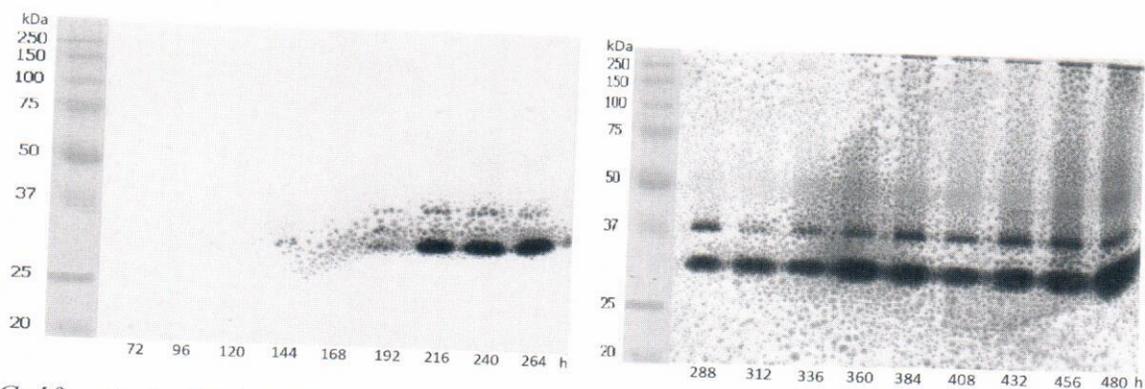
En el caso del consumo de sustrato, como se muestra en la gráfica 14, se puede observar que corresponde con el crecimiento del hongo, puesto que éste inicia la fase exponencial alrededor de las 168 horas y termina a las 336 horas (y dicho crecimiento corresponde con el consumo de sustrato que se puede observar en la gráfica). Al comparar el consumo de sustrato con la fermentación sin cobre, se puede observar un consumo más rápido en menos tiempo, lo que se puede deber al efecto del cobre sobre el hongo; en este caso se podría decir que el hongo tarda más tiempo en su fase de adaptación.



Gráfica 14 Consumo de glucosa de *Pleurotus ostreatus* en fermentación en medio líquido con cobre.

6.2.7. Determinación de isoformas extracelulares de lacasa.

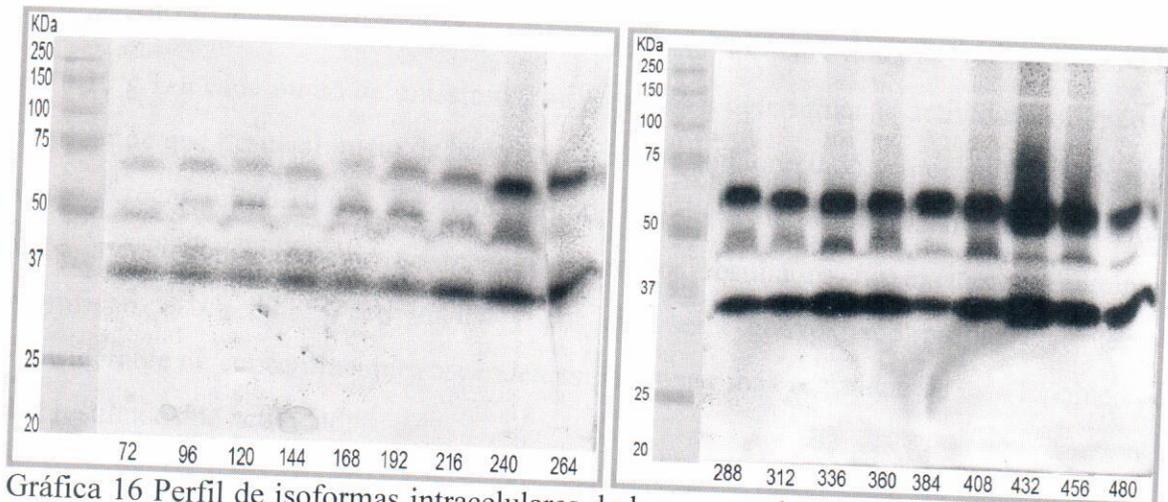
En la gráfica 15 se observa el perfil de isoformas de lacasa producidas por el hongo cuando crece en presencia de cobre. Éste coincide con lo que se ha visto en otros trabajos, donde la presencia de cobre en el medio incrementa la actividad en el extracto crudo enzimático, aunque en este caso se presenta en los últimos días de la fermentación y hace desaparecer isoformas. La actividad de la isoforma de 30 kDa empezó a partir de las 144 h y se incrementó hacia el final de la fermentación; a las 192 h se observó otra isoforma de 37 kDa que incrementó paulatinamente su actividad hasta el final de la fermentación, de igual forma a partir de las 288 h, se observa la aparición de otra isoforma de aproximadamente 50 kDa, que se mantuvo hasta el final de la fermentación.



Gráfica 15 Perfil de isoformas extracelulares de lacasa producidas por *Pleurotus ostreatus* en medio líquido adicionado con CuSO_4 .

6.2.8 Determinación de isoformas intracelulares de lacasa.

En el perfil de isoformas intracelulares (gráfica 16) se observaron tres isoformas, de aproximadamente 37, 50 y 60 kDa. En la fermentación sin cobre, por el contrario, sólo se observaron dos isoformas, de 37 y 50 kDa, por lo que podría ser que el cobre estuviera induciendo la aparición de la isoforma intracelular de 60 kDa (o en su caso tener alguna participación para que esta se presente). Algo también importante por mencionar es que en el perfil de isoformas extracelulares el patrón que se presenta es diferente al mostrado en el perfil de isoformas intracelulares, puesto que aquí se observa actividad de las isoformas desde el inicio de la fermentación, lo cual no se puede percibir en el otro perfil zimográfico, se ha mencionado que el cobre tiene efectos tóxicos sobre el crecimiento del hongo, sin embargo, al observar este perfil zimográfico (gráfica 16), estaría mostrando que efectivamente es tóxico para el crecimiento pero no para la actividad, ya que desde el inicio de la fermentación se observan las isoformas intracelulares pero aún no se han excretado y por lo tanto no logramos visualizarlas en el perfil de isoformas extracelulares.



Gráfica 16 Perfil de isoformas intracelulares de lacasa producidas por *Pleurotus ostreatus* en medio líquido con CuSO_4 .

Se ha reportado en diversos estudios que el cobre actúa como cofactor (Thurston, 1994) y como inductor de las lacasas a nivel de transcripción de genes en *Trametes versicolor* (Collins y Dobson, 1997), *Phanerochaete chrysosporium* (Dittmer y col., 1997), *Pleurotus ostreatus* (Palmieri y col., 2000) y *Corioloropsis rigida* (Saparrat y col., 2002). En el presente estudio se utilizó al sulfato de cobre como posible inductor de lacasa y se observó que la presencia de este compuesto ocasionó la aparición de mayor actividad de las enzimas: en las fermentaciones con adición de cobre se obtuvieron valores de actividad de hasta 9000 U/L, en comparación con la fermentación sin adición de cobre, donde la actividad alcanzada fue de 600 U/L.

6.3 Caracterización de la fermentación en medio líquido con adición de sulfato de cobre (CuSO_4) y sin adicionar cobre.

Con el objetivo de comprobar si el cobre es sólo un potenciador de la actividad enzimática de la lacasa, más que un compuesto inductor de la expresión de los genes que las codifican, se realizó una prueba adicional a la metodología propuesta inicialmente. El experimento consistió en:

1. Se prepararon dos fermentaciones como las realizadas anteriormente (una con cobre y la otra sin adicionar sulfato de cobre).
2. A la fermentación que al inicio no tenía cobre se le adicionó, en cada punto de muestreo, sulfato de cobre en una concentración de 0.10 g/L y se determinó la actividad volumétrica.

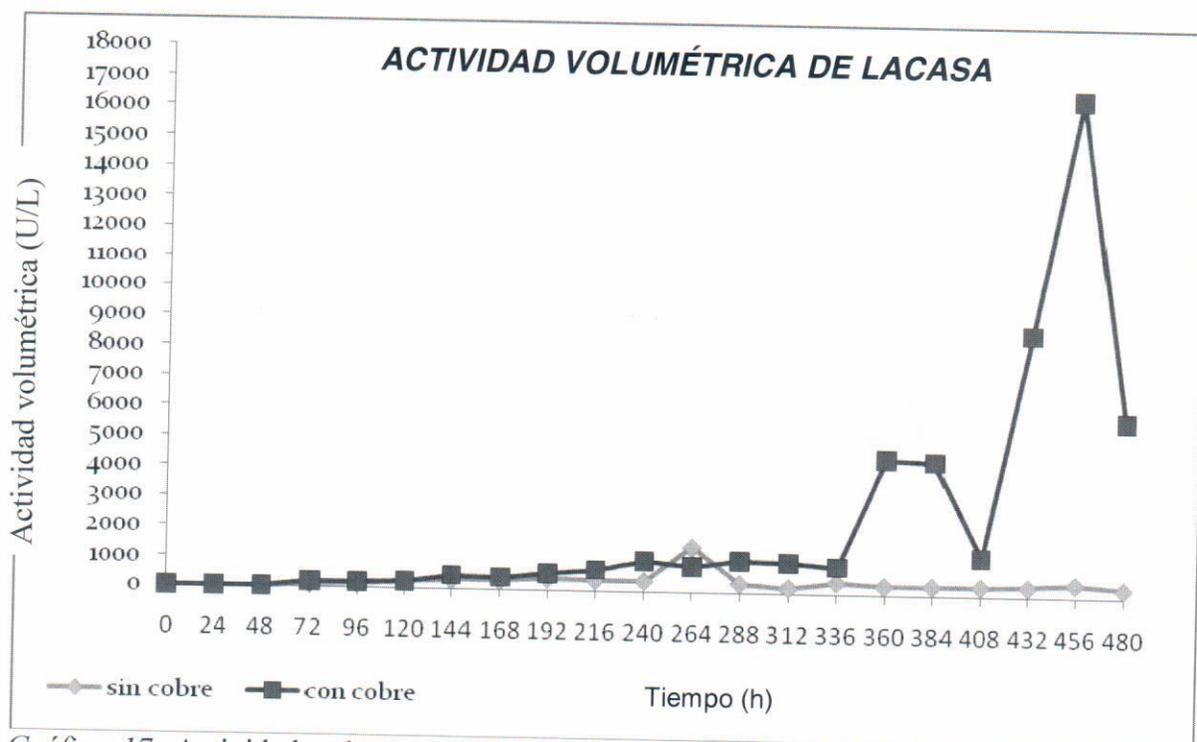
3. En cuanto a la fermentación con cobre, de la misma forma se adicionó una cantidad extra de 0.10 g/L a cada punto de muestreo y se procedió a determinar la actividad volumétrica. A pesar de que desde el inicio de la fermentación se adicionó 0.25 g/L de sulfato ferroso, se decidió agregar sólo 0.10 g/L, esto con el fin de ver si existía un incremento en la actividad, cabe mencionar que como se mencionan en los resultados no existieron diferencias significativas en dichas actividades y por ello sería conveniente probar un intervalo considerable de concentraciones ascendentes para tener más seguridad de éste fenómeno en los resultados de actividad.

En el caso de la fermentación a la que se le adicionó cobre desde el principio y además se agregó una concentración extra, se buscó observar si existía algún aumento en las actividades obtenidas anteriormente. Como no pudimos probar que existe dicho aumento se podría especular que el cobre actúa como inductor, puesto que necesitó estar presente desde el momento del proceso transcripcional para poder tener un efecto sobre las lacasas.

Los resultados obtenidos se describen a continuación.

6.3.1 Determinación de la actividad volumétrica en la fermentación con cobre y sin adicionar cobre, adicionando al extracto crudo enzimático sulfato de cobre a una concentración de 0.10 g/L.

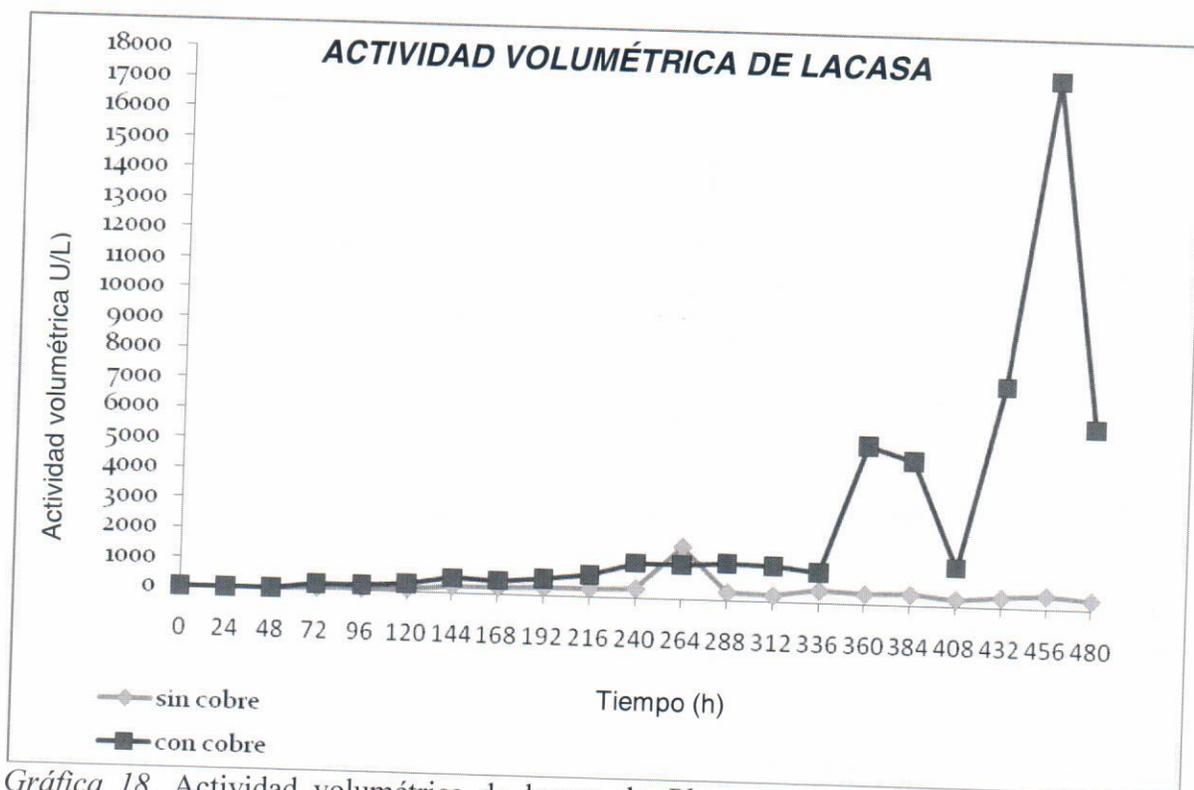
En la gráfica 17 se representa la actividad volumétrica en ambas fermentaciones sin adición extra de cobre. Esta gráfica muestra la misma tendencia que se había observado en las fermentaciones anteriores.



Gráfica 17. Actividad volumétrica de lacasa de *Pleurotus ostreatus* en fermentación en medio líquido, con adición y sin adicionar cobre.

6.3.2. Determinación de la actividad volumétrica con la adición de sulfato de cobre al extracto crudo enzimático a una concentración de 0.10 g/L, en ambas fermentaciones.

En la gráfica 18 se puede observar casi la misma tendencia que se aprecia en la gráfica 17: estabilidad en ambas fermentaciones hasta aproximadamente las 216 horas y un incremento gradual posterior. En la fermentación sin cobre (gráfica 17) se obtuvo una actividad de entre 400 y 500 U/L durante toda la fermentación a partir de las 192 horas y un pico de actividad de aproximadamente 1200 U/L a las 264 horas. Al momento de adicionar sulfato de cobre al extracto crudo enzimático, la tendencia en la actividad no varía de manera significativa. En cuanto a la fermentación con cobre, se observan actividades de alrededor de 4000 U/L en los tiempos de 360 a 384 horas con un pico de actividad de 16000 U/L a las 408 horas; este patrón no se ve afectado en el momento de la adición de cobre al extracto.

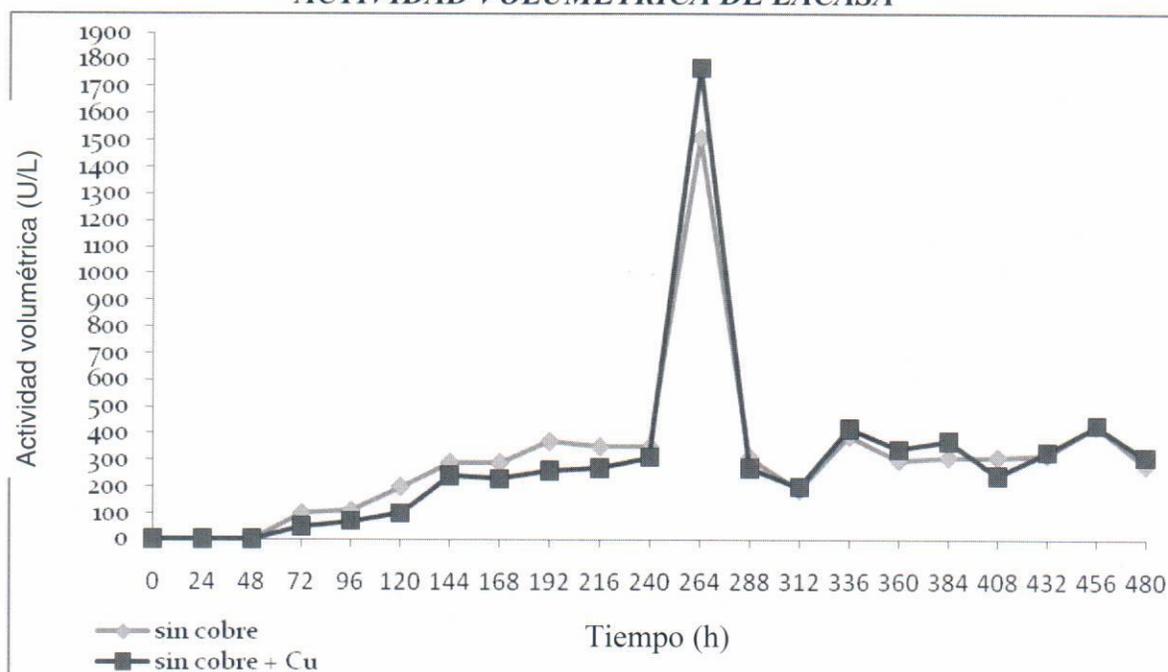


Gráfica 18. Actividad volumétrica de lacasa de *Pleurotus ostreatus* con la adición de sulfato de cobre a una concentración de 0.10 g/L en fermentación sumergida, con adición y sin adición de cobre.

6.3.3. Determinación de la actividad volumétrica adicionando sulfato de cobre en lacasa de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sin cobre.

Como se muestra en la gráfica 19, al comparar la misma fermentación sin cobre con aquella en la que se le adicionó cobre al extracto crudo enzimático, se puede observar que no existe gran diferencia en sus actividades y que el patrón de actividad se conserva. Por ello se podría pensar que el cobre no es un potenciador de la actividad, puesto que si así fuera se hubieran detectado diferencias significativas en la actividad volumétrica

ACTIVIDAD VOLUMÉTRICA DE LACASA

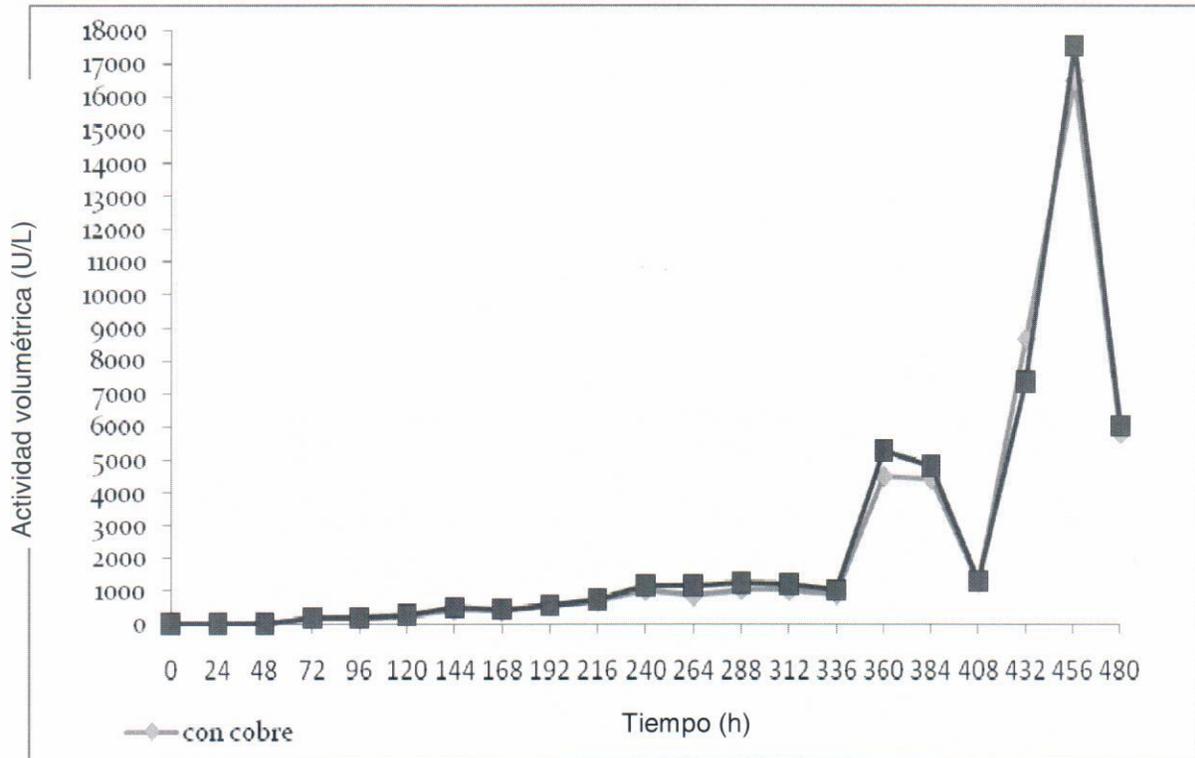


Grafica 19. Fermentación sin cobre y adicionando cobre al extracto crudo enzimático a una concentración de 0.10 g/L, en lacasa de *Pleurotus ostreatus*.

6.3.4 Determinación de la actividad volumétrica adicionando sulfato de cobre en lacasa de *Pleurotus ostreatus* en fermentación con cobre.

Como se muestra en la gráfica 20, al comparar la misma fermentación con cobre con la que posteriormente se le adicionó cobre al extracto crudo enzimático, se puede observar que tampoco existen diferencias en la actividad ni en el patrón de actividad. Por ello podría pensarse, sin poder asegurarlo con este ensayo, que el cobre puede ser un inductor de la actividad de la lacasa y que estaría actuando a nivel de transcripción, sin reflejo directo por lo tanto en la actividad.

ACTIVIDAD VOLUMÉTRICA DE LACASA



Gráfica 20. Fermentación con cobre y adicionando cobre a una concentración de .10 g/L de sulfato de cobre, en lacasa de *Pleurotus ostreatus*.

Existen reportes donde se menciona que existen lacasa constitutivas e inducibles (Bollag-Leonowicz 1984). Sin embargo, de acuerdo a lo observado en el presente trabajo con la adición de cobre al extracto crudo enzimático de una fermentación que en su inicio no contenía cobre (y su comparación con una que sí lo tenía), no se observaron diferencias en la actividad volumétrica entre las dos fermentaciones.

La fermentación sin cobre justificaría la existencia de lacasa constitutiva, cuya actividad no se ve favorecida por la adición posterior de cobre al extracto crudo enzimático (al menos en una concentración de 0.10 g/L). Este resultado indicaría un papel como inductor para el cobre, puesto que necesita actuar a nivel de transcripción para poder tener efecto sobre alguna isoforma de la lacasa.

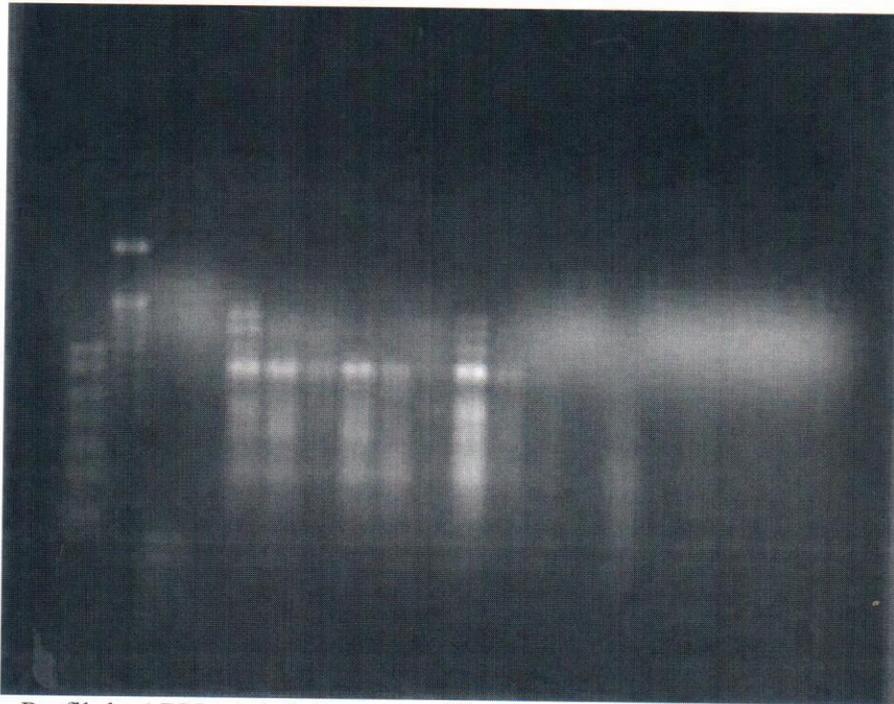
La fermentación con cobre permite observar la aparición de lacasa inducible.

Los resultados correspondientes a la segunda parte son los siguientes:

6.4 Extracción de ácido ribonucleico (ARN).

6.4.1 Extracción del ARN en fermentación sin adicionar cobre.

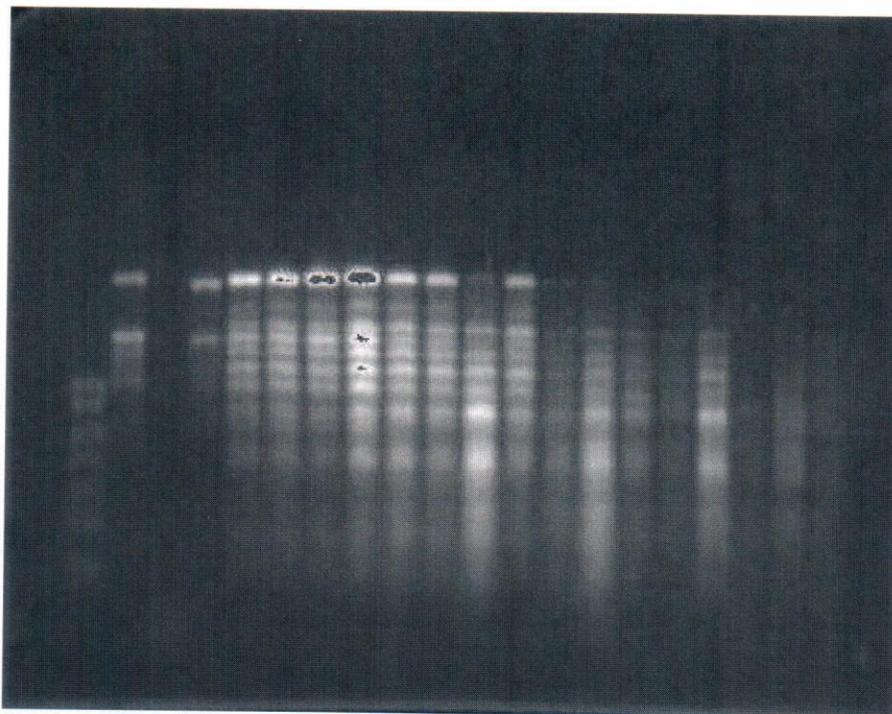
Se realizó la extracción del ARN, para lo cual se procesaron sólo doce tiempos de la fermentación. Se eligieron los últimos, debido a la actividad lacasa que se presentó en los mismos. Además, en los primeros tiempos la cantidad de biomasa no fue suficiente. En la gráfica 21 se observa una extracción eficiente de ARN.



Gráfica 21. Perfil de ARN total de lacasa en *Pleurotus ostreatus* en fermentación líquida sin adicionar sulfato de cobre.

6.4.2. Extracción del ARN en fermentación con adición de cobre.

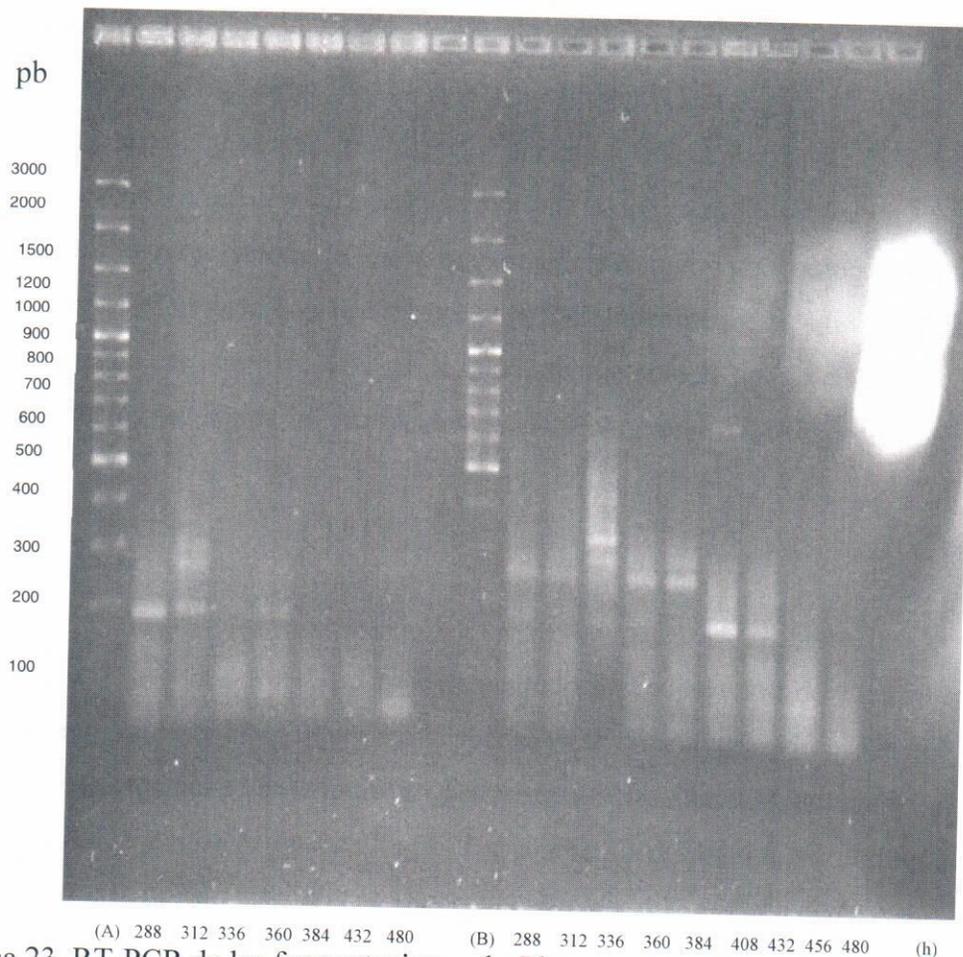
Se realizó la extracción del ARN, para lo cual se procesaron sólo dieciocho tiempos de la fermentación. Se eligieron los últimos, debido a la actividad lacasa que se presentó en los mismos. Además, en los primeros tiempos la cantidad de biomasa no fue suficiente. En la gráfica 22 se observa una extracción eficiente de ARN.



Gráfica 22. Perfil de ARN total de lacasa en *Pleurotus ostreatus* en fermentación líquida con adición de sulfato de cobre.

6.4.3 Transcripción inversa – Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).

Una vez realizada la RT-PCR correspondiente a los tiempos seleccionados (sólo los puntos con mayor actividad lacasa, de acuerdo al perfil zimográfico), se corrieron las muestras de las dos fermentaciones (una sin adicionar cobre y otra con adición de cobre), en un mismo gel. En la gráfica 23 se puede observar que en la fermentación sin cobre (izquierda) se alcanzan a observar dos bandas, una de 200 y otra de 300 pb, observándose el mismo patrón a lo largo del resto de los puntos. En cambio, al estudiar los resultados para la fermentación en la cual se adicionó cobre (derecha), se pueden observar tres bandas: una de alrededor de 200, otra de 300 pb y una de 700 pb, que no se aprecia en la fermentación sin cobre.



Gráfica 23. RT-PCR de las fermentaciones de *Pleurotus ostreatus*. A. Sin adicionar cobre. B. Con adición de cobre.

Al realizar una comparación de las muestras de la fermentación con cobre con las procedentes de la fermentación sin adición del metal, se pueden observar diferencias significativas en el perfil de ARN total. Esto puede deberse a que efectivamente el cobre tiene un efecto importante a nivel de transcripción, por lo que se podría pensar en un papel inductor de dicho metal.

Al realizar el análisis del perfil de expresión de genes de lacasa se observa también una diferencia, con la aparición adicional de una banda de aproximadamente 700 pb en la fermentación con cobre, que no se observa en la fermentación sin cobre. Esto daría pie a pensar que el cobre está teniendo un efecto a nivel de transcripción de los genes de lacasa. Al realizar una comparación con las bandas mostradas en el perfil de expresión de tanto la fermentación sin adición de cobre, como en la que se adicionó cobre, podemos observar

que no coincide con la intensidad en la actividad que se muestra en los zimogramas con las bandas de cDNA, se pudiera pensar que si cada banda es un cDNA diferente, se estaría hablando que existe genes diferentes para cada una de las isoformas de lacasa, sin embargo resulta difícil asegurarlo en primer lugar porque los primers utilizados en la prueba PCR, con ellos se esperaría bandas de aproximadamente 600 a 700 pb, como se muestra en el gel a excepción de una banda que se observa en la fermentación que se adicionó cobre todas las demás no tienen ese tamaño aproximado, sin embargo solo se podría discutir acertadamente si se tuvieran las secuencias de las bandas de cDNA aparentemente específicas para lacasas.

7. Conclusiones.

- Se puso a punto y estandarizó un método de inoculación de *Pleurotus ostreatus*, basado en la obtención de una suspensión de micelio, para la producción de lacasa por fermentación utilizando en fermentación líquida. La fermentación se llevó a cabo con éxito, ya que se logró el crecimiento del hongo, se obtuvo actividad de lacasa; la mayor actividad se encontró en la fase estacionaria de crecimiento.
- Al realizar la correspondiente zimografía se observaron tres isoformas durante la fermentación, tanto en medio líquido sin adición de sulfato de cobre como adicionando dicho compuesto.
- No fue posible mostrar que existen isoformas constitutivas e inducibles de lacasa puesto que para ello aún es necesario tener las secuencias de las bandas de cDNA.
- Al observar el perfil de la expresión de genes de lacasa durante las fermentaciones con cobre y sin adicionar cobre y correlacionarlos con los zimogramas de lacasa se podría pensar que las isoformas de lacasa son productos génicos diferentes.

8. Perspectivas.

1. Es conveniente realizar nuevamente la RT-PCR, esto con motivo de que es importante verificar si se conservan las bandas que se están observando en el gel, en caso de continuar dichas bandas se procedería a secuenciar y comparar con los cDNA que ya han reportados para lacasa.

- 2.- Actualmente se cuenta con un análisis cualitativo el cual no nos permite asegurar que contamos con los RNAm codificantes para enzimas lacasa, por lo que es conveniente hacer un análisis cuantitativo a través de Northern blot y sonda específica para lacasa. Dicho análisis permitirá verificar si es un solo gen que origina todas las isoformas reportadas o es resultado de la expresión de genes diferentes.

9. Referencias bibliográficas.

- Baldrian P., Gabriel J. 2001. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. FEMS Microbiology Letters 206: 69-74.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dry binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
- Claus H. 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. Micron 35: 93-96.
- D'Souza T.M., Merritt S.C., Reddy A. 1999. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. Applied and Environmental Microbiology 65(12): 5307-5313.
- Dean J.F.D., Eriksson K.-E.L. (1994). Laccase and the deposition of lignin in vascular plants. Holzforschung 48: 21-33.
- Decker H., Terwilliger N. (2000). COPs and robbers: putative evolution of copper oxygen binding proteins. Journal of Experimental Biology 203: 1777-1782.
- Díaz-Godínez G., Soriano-Santos J., Augur C., Viniestra-González G. 2001. Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid state and submerged fermentation: a comparative study. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 26: 271-275.
- Dobson A., Collins P. 1997. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. Applied and Environmental Microbiology 63(9): 3444-3450.
- Doran N., Esposito E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidases-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. Applied Catalysis B: Environmental 28: 83-99.
- Durán N., Rosa M.A., D'Annibale A., Gianfreda L. 2002. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. Enzyme and Microbial Technology. 31: 907-931.
- Edens W., Goins T., Dooley D., Henson J. 1999. Purification and characterization of secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. tritici. Applied and Environmental Microbiology 65(7): 3071-3074.
- Eggert C., LaFayette P.R., Temp U., Eriksson K.-E., Dean J. 1998. Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. Applied and Microbial Technology 64(5): 1766-1772.
- Filip y col., 1997. Laccases: structure, reactions, distribution. Micro 35 (1): 97 - 96.

- Galhaup C., Wagner H., Hinterstoisser B., Haltrech D. 2002. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 529-536.
- Giardina P., Cannino R., Martirani L., Marzullo L. 1995. Cloning and sequencing of the laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 61(6): 2408-2413.
- Giardina P., Palmieri G., Scaloni A., Fontanella B., Faraco V., Cennamo G., Sannia G. 1999. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Journal* 341: 655-663.
- Guinberteau J. 1990. Definition and taxonomical place of the genus *Pleurotus* in the mushrooms classification. *Bulletin de la Federation Nationale des Syndicats Agricoles de Cultivateurs de Champignons (Francia)* 48: 261-264.
- Heinzkill M., Bech L., Halkier T., Schneider P., Anke T. 1998. Characterization of laccase and peroxidases from wood-rotting fungi (family Coprinaceae). *Applied and Environmental Microbiology* 64(5): 1601-1606.
- Herrera T., Ulloa M. 1998. El reino de los hongos: micología básica y aplicada, 2a edición. México. DF., UNAM, pp 25-35.
- Juárez J. 2006. Optimización de las condiciones de producción de lacasas de *Pleurotus ostreatus* por fermentación en medio líquido. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala
- Kumar S., Durani S., Prashant S., Phale E., Wangikar T. (2003). Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnology and Bioengineering* 83: 386-394.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Laguna J. 2002. Bioquímica, 5ª edición. Manual Moderno. México D.F. pp. 611-614.
- Mansur M., Suárez T., González A. 1997. Differential gene expresión in the laccase gene family from basidiomycete I-62. *Applied and Environmental Microbiology* 64(2): 771-774.
- Martins O., Soares M., Pereira M., Teixeira M., Costa T., Jones H., Henriques O. 2002. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *Journal of Biological Chemistry* 277:18849-18859.

- Muñoz C., Guillén F., Martínez A.T., Martínez M.J. 1997. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mg^{2+} oxidation. *Applied and Environmental Microbiology* 63(6):2166-2174.
- Palmieri G., Giardina P., Bianco C., Scaloni A., Capasso A., Sannia G. 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biological Chemistry* 272: 31301-31307.
- 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 (3): 920-924.
- Palmieri G., Cennamo G., Faraco V., Amoresano A., Sannia G., Giardina P. 2003. Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 220-230.
- Pointing S.B. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 20-33.
- Téllez-Téllez M. 2005. Evaluación de la actividad intracelular y extracelular de lacasas en cepas del género *Pleurotus*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Tlecuilt-Beristain S. 2005. Purificación y caracterización parcial de una enzima lacasa extracelular de *Pleurotus ostreatus*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Voet D., Voet J.G. 1992. *Bioquímica*. Ediciones Omega. Barcelona, España. pp. 908-909.
- Viniegra – Gonzalez. 1993. Symmetric branching model for the kinetics of mycelia growth. *Biotechnol Bioeng* 5; 42 (1): 1 – 10.

10. Abreviaturas.

<i>ABTS</i>	=	2,2 azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)
<i>ADN</i>	=	Ácido desoxirribonucleico.
<i>ARN</i>	=	Ácido ribonucleico.
<i>ARN_m</i>	=	Ácido ribonucleico mensajero
<i>ARN_r</i>	=	Ácido ribonucleico ribosómico.
<i>ARN_t</i>	=	Ácido ribonucleico de transferencia.
<i>ATCC</i>	=	American Type Culture Collection
<i>°C</i>	=	Grados Celsius
<i>cDNA</i>	=	Ácido desoxirribonucleico complementario
<i>Cu</i>	=	Cobre
<i>CuSO₄</i>	=	Sulfato de cobre.
<i>DMP</i>	=	2,6-dimetoxifenol
<i>ECE</i>	=	Extracto Crudo Enzimático
<i>FML</i>	=	Fermentación en Medio Líquido
<i>g</i>	=	Gramos
<i>g/L</i>	=	Gramos sobre litros
<i>h</i>	=	Horas
<i>kDa</i>	=	Kilo Dalton
<i>L</i>	=	Litro
<i>LiP</i>	=	Lignin Peroxidasa
<i>M</i>	=	Concentración molar
<i>mg</i>	=	Miligramos.
<i>mL</i>	=	Mililitros
<i>mm</i>	=	Milímetros
<i>mM</i>	=	Concentración milimolar
<i>Mn</i>	=	Manganeso
<i>MnP</i>	=	Manganeso Peroxidasa
<i>μL</i>	=	Microlitros

<i>nm</i>	=	Nanómetros
<i>%</i>	=	Por ciento
<i>pb</i>	=	Pares de bases.
<i>PCR</i>	=	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<i>pH</i>	=	Potencial de Hidrógeno
<i>rpm</i>	=	Revoluciones por minuto
<i>RT</i>	=	Transcripción inversa.
<i>U</i>	=	Unidad arbitraria de actividad de lacasas
<i>U/L</i>	=	Unidad arbitraria de actividad de lacasas sobre litro
<i>U/mg</i>	=	Unidad arbitraria de actividad de lacasas sobre miligramo de proteína