



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA**

**Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta  
Posgrado en Ciencias Biológicas**

**Efecto de la actividad proteasa sobre la actividad  
de lacasas extracelulares producidas  
por *Pleurotus ostreatus***

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA

**Arcadio Cruz Vázquez**

Comité Tutorial:

Director: Dra. Alba Mónica Montiel González

Tutores: Dra. Araceli Tomasini Campocosio

Dr. Arturo Estrada Torres

## HOJA DE FINANCIAMIENTO

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Este trabajo contó con el apoyo financiero otorgado por el fondo de Ciencia Básica SEP-CONACyT para el proyecto "Implicación fisiológica de la inactivación de genes de lacasa de *Pleurotus ostreatus* PoB sobre la morfogénesis y aprovechamiento de fuentes complejas de carbono" No. 167759.

Cabe mencionar que el programa de Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala está registrado en el Programa para el fortalecimiento del Posgrado Nacional. Padrón Nacional de Posgrado-CONACyT (PNP 00-30-03).

Para la realización del presente trabajo se contó con una beca para estudios de Maestría otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT con el número de registro 332791 y número de beca 388312.



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



COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
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 Arcadio Cruz Vázquez 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: "Efecto de la actividad de proteasas sobre la actividad de lacasas extracelulares producidas por *Pleurotus ostreatus*". Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
TLAXCALA, TLAX., JUNIO 28 DE 2016

DR. ARACELI TOMASINI CAMPOCOSIO

DR. ARTURO ESTRADA TORRES

DRA. ALBA MÓNICA MONTIEL GONZÁLEZ

DRA. ESTELA ROMERO CUEVAS

DRA. YENDI E. NAVARRO NOYA



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



## AGRADECIMIENTOS

Al Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (CTBC) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala por el apoyo brindado para el desarrollo del presente estudio, el cual se desarrolló en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Al apoyo financiero otorgado por el fondo de Ciencia Básica SEP-CONACYT para el proyecto "Implicación fisiológica de la inactivación de genes de lacasa de *Pleurotus ostreatus* PoB sobre la morfogénesis y aprovechamiento de fuentes complejas de carbono" con folio 167759.

Al CONACyT por la beca otorgada para la realizar estudios de Maestría con número de registro 332791.

A la Dra. Alba Mónica Montiel González por su confianza, paciencia y todas sus enseñanzas que obtuve de su parte. Asimismo por el apoyo incondicional que recibí.

A la Dra. Araceli Tomasini Campocosio por su paciencia, asesoría, comentarios y por su valiosa aportación a este trabajo.

Al Dr. Arturo Estrada Torres por su asesoría, enseñanza, comentarios y su valiosa aportación al estudio realizado.

A la Dra. Estela Romero Cuevas por sus comentarios y apoyo recibido.

A la Dra. Yendi E. Navarro Noya por sus valiosos comentarios.

No es fácil llegar al final, se necesita mucho esfuerzo, sacrificios y dedicación, pero sobre todo, la fuerza y voluntad de cumplir un sueño. La fuerza que me ha ayudado a conseguir esta meta ha sido el apoyo recibido de muchas personas a quienes escribo estas palabras de agradecimiento.

Gracias a mi madre por darme la vida y por haber dado hasta lo último para que yo cumpliera cada una de mis metas, estaré eternamente agradecido contigo mamá.

Gracias a mi Hija Marianelly, puesto que ha sido el principal motor en mi vida y es quien me motiva cada día a seguir adelante. A mi esposa Guadalupe Santiago por su amor, paciencia, comprensión y por su inmenso apoyo en cada una de mis decisiones.

A mis hermanos, abuelos y tíos por su apoyo, principalmente a Sergio Vázquez por su apoyo incondicional en todo momento. Asimismo a mi padrino Reynaldo Cuevas por sus consejos y apoyo.

Gracias a la Dra. Alba Mónica Montiel Gonzales, Directora de esta tesis, por su enorme dedicación, por su confianza depositada en mí, por todas sus enseñanzas y por todos sus consejos y apoyo en todo momento.

A mis compañeras y amigas de laboratorio, Anahí Armas, Rut Ortega y Diana Torres, por sus enseñanzas y paciencia, por las convivencias y experiencias vividas, pero sobre todo por su amistad y por todos esos momentos de risa.

A mis amigos de toda la vida, Joel Vázquez, Adelfo Galindo y Julio Herman Pérez, gracias por su amistad y apoyo.

Al M.C. Juan Antonio Barrón, Al Biol. Juliser Avendaño por su amistad, consejos, apoyo profesional y académico.

A mis compañero y amigos de Maestría, en especial a Yoselin Hernández, Fernando Palacios y Victoria Conde, gracias por su amistad y los momentos vividos.

*A mi madre*

*Soledad Vázquez Santos †*

## RESUMEN

Las lacasas, por su enorme capacidad catalítica, son enzimas útiles en diversos procesos industriales. Estas enzimas son secretadas por hongos de podredumbre blanca, como *Pleurotus ostreatus*, en cantidad y actividad notables, siendo recursos prometedores para su producción masiva. No obstante, se ha evaluado su producción bajo distintas condiciones, incluyendo la vía recombinante, sin alcanzar resultados satisfactorios. Al respecto, diferentes autores sugieren que el abatimiento de la actividad de las lacasas en extractos celulares de *P. ostreatus*, puede deberse a la acción de proteasas (ácidas, neutras o alcalinas) a través de algún mecanismo de regulación enzimática. Sin embargo, aún se desconoce cuáles de estos tipos de proteasas son producidas y excretadas por este hongo y sobre todo, cuáles afectan con su acción a las lacasas. Por esta razón, el presente estudio tiene como objetivos caracterizar la presencia de isoenzimas de lacasa, así como de los tres tipos de proteasas, producidas extracelularmente por la cepa PoB de *P. ostreatus*, en cultivo en medio líquido y determinar cuál es la influencia que las proteasas ejercen sobre la actividad de las lacasas, mediante el uso de la inhibición de la actividad de proteasas específicas. Esta información permitirá correlacionar el efecto entre ellas, con la intención de ofrecer otro tipo de estrategias que, a nivel bioquímico o molecular, contribuyan a incrementar la producción de lacasas. Para llevar a cabo la caracterización de la producción de lacasas y proteasas, se realizó el cultivo de la cepa PoB de *Pleurotus ostreatus* en medio mineral líquido durante 20 días, empleando glucosa como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno. Durante el cultivo se monitoreó el valor de pH del medio, además de la evaluación de parámetros tales como: biomasa producida, consumo de sustrato, actividades extracelulares de lacasa y proteasa. Adicionalmente, se realizaron zimogramas para conocer el perfil de isoenzimas presentes en el cultivo, para ambos tipos de enzimas. Para evaluar el efecto que cada tipo de proteasas ejerce sobre la actividad de lacasas extracelulares, se llevaron a cabo cultivos en los que se incluyeron los inhibidores específicos para cada tipo de proteasas de manera independiente (PMSF, EDTA, Pepstatin A), además de un cultivo en el que se incluyó un coctel de inhibidores de todos los tipos de proteasas, y un cultivo sin inhibidores como control. Se determinaron nuevamente los parámetros antes mencionados. Como resultado de la

caracterización, se obtuvo una  $X_{\max}$  de 6.465 g/L a las 384 h con una  $\mu$  de 0.02 h<sup>-1</sup>. Debido a que el medio de cultivo se amortiguó con fosfato de potasio, el pH tuvo poca variación (6.87 - 6.33) durante el cultivo, lo que mantuvo estable la inducción de las enzimas por este factor. Se observó un consumo parcial del sustrato, siendo más importante a partir de las 264 h de cultivo, coincidente con el tiempo en que se llevaba a cabo el crecimiento exponencial de la biomasa. La mayor actividad de lacasas fue de 15.97 U/L a las 480 h del cultivo. Se observaron dos isoenzimas de lacasa a la altura de los marcadores con peso molecular de 35 y 55 kDa, a partir de las 72 h y que permanecieron hasta el final del cultivo. En cuanto a las proteasas, se obtuvieron actividades de los tres tipos durante todo el cultivo y se detectaron al menos cuatro isoenzimas de proteasas neutras, ubicadas entre los marcadores de peso molecular de 70 y 130 kDa. Para el cultivo con inhibidores para proteasas, los tratamientos no afectaron significativamente la producción de biomasa y consumo de sustrato. Los diferentes inhibidores probados (coctel, PMSF y Pepstatin A) afectan de manera positiva la actividad de lacasas, es decir, ésta aumenta al inhibirse la actividad de las proteasas en el medio de cultivo de *P. ostreatus*. Se concluye que las proteasas neutras y ácidas son las que particularmente afectan de manera negativa a la actividad de lacasas, debido a que a consecuencia de su inhibición, se mostró un aumento de 1.33 veces de la actividad lacasa.



## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Generalidades de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	1
1.2. Generalidades de las lacasas .....	2
1.3. Generalidades de las proteasas.....	4
1.3.1. Clasificación de proteasas.....	5
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	8
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	11
<b>4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN</b> .....	12
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	12
<b>6. PREDICCIÓN</b> .....	12
<b>7. OBJETIVOS</b> .....	13
7.1. Objetivo general.....	13
7.2. Objetivos específicos.....	13
<b>8. METODOLOGÍA</b> .....	14
8.1. Diagrama de árbol de la metodología.....	14
8.2. Primera fase experimental (caracterización).....	15
8.2.1. Organismo.....	15
8.2.2. Propagación de la cepa .....	15
8.2.3. Condiciones del cultivo líquido .....	15
8.2.4. Determinación de biomasa y obtención del extracto enzimático.....	16
8.2.5. Determinación de pH.....	16
8.2.6. Cuantificación del consumo de sustrato .....	16
8.2.7. Determinación de actividad de lacasas por espectrofotometría.....	17
8.2.8. Determinación de actividad proteasa por espectrofotometría.....	18

8.2.9.	Perfiles de isoenzimas con actividad enzimática lacasa extracelular por zimografía	19
8.2.10.	Perfiles de isoenzimas con actividad enzimática proteasa extracelular por zimografía .....	20
8.3.	Segunda fase experimental .....	20
8.3.1.	Diseño experimental.....	21
8.3.2.	Propagación de la cepa .....	23
8.3.3.	Condiciones de cultivo .....	23
8.3.4.	Determinación de biomasa y obtención del extracto enzimático.....	24
8.3.5.	Análisis estadísticos. ....	24
<b>9.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
9.1.	Primera fase experimental (caracterización).....	25
9.1.1.	Determinación de pH.....	25
9.1.2.	Producción de biomasa .....	26
9.1.3.	Determinación del consumo de sustrato .....	27
9.1.4.	Determinación de actividad lacasa .....	27
9.1.5.	Determinación de actividad proteasa .....	28
9.1.6.	Perfiles de isoenzimas con actividad enzimática lacasa extracelular por zimografía	30
9.1.7.	Perfiles de isoenzimas con actividad enzimática proteasa extracelular por zimografía .....	31
9.2.	Segunda fase experimental .....	32
9.2.1.	Determinación de pH.....	33
9.2.2.	Producción de biomasa .....	34
9.2.3.	Determinación del consumo de sustrato .....	35
9.2.4.	Determinación de actividad lacasa .....	36
9.2.5.	Determinación de actividades proteasa .....	38

9.2.5.1. Actividad proteasa a pH alcalino (9.0) .....	38
9.2.5.2. Actividad proteasa a pH neutro (7.0).....	39
9.2.5.3. Actividad proteasa a pH ácido (2.0) .....	40
9.2.6. Perfiles de isoenzimas con actividad enzimática lacasa extracelular por zimografía 41	
9.2.7. Perfiles de isoenzimas con actividad enzimática proteasa extracelular por zimografía .....	44
<b>10. DISCUSIÓN .....</b>	<b>47</b>
<b>11. CONCLUSIONES .....</b>	<b>51</b>
<b>12. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>52</b>
<b>13. REFERENCIAS .....</b>	<b>53</b>
<b>14. ANEXOS.....</b>	<b>61</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Diagrama del diseño experimental.....	18
<b>Figura 2a.</b> Perfil de isoenzimas de lacasa obtenidos en cada punto de muestreo del cultivo con la cepa PoB de <i>P. ostreatus</i> en medio líquido.....	26
<b>Figura 2b.</b> Perfil de isoenzimas de lacasa obtenidos en cada punto de muestreo del cultivo con la cepa PoB de <i>P. ostreatus</i> en medio líquido.....	27
<b>Figura 3.</b> Perfil de isoenzimas de proteasas (pH neutro 7.0) obtenidos en cada punto de muestreo del cultivo con la cepa PoB de <i>P. ostreatus</i> en medio líquido.....	28
<b>Figura 4.</b> Perfil de isoenzimas de lacasa obtenidos a las 72 h de cultivo con la cepa PoB de <i>P. ostreatus</i> en medio líquido con inhibidores. ....	37
<b>Figura 5.</b> Perfil de isoenzimas de lacasa obtenidos a las 192 h de cultivo con la cepa PoB de <i>P. ostreatus</i> en medio líquido con inhibidores. ....	38
<b>Figura 6.</b> Perfil de isoenzimas de lacasa obtenidos a las 312 h de cultivo con la cepa PoB de <i>P. ostreatus</i> en medio líquido con inhibidores. ....	38
<b>Figura 7.</b> Perfil de isoenzimas de lacasa obtenidos a las 432 h de cultivo con la cepa PoB de <i>P. ostreatus</i> en medio líquido con inhibidores.....	39
<b>Figura 8.</b> Perfil de isoenzimas de proteasas obtenidos a las 192 h de cultivo con la cepa PoB de <i>P. ostreatus</i> en medio líquido con inhibidores. ....	40
<b>Figura 9.</b> Perfil de isoenzimas de proteasas obtenidos a las 312 h de cultivo con la cepa PoB de <i>P. ostreatus</i> en medio líquido con inhibidores.....	40
<b>Figura 10.</b> Perfil de isoenzimas de proteasas obtenidos a las 432 h de cultivo con la cepa PoB de <i>P. ostreatus</i> en medio líquido con inhibidores.....	41

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Cinética de pH del cultivo líquido con la cepa PoB de <i>P. ostreatus</i> .....	21
<b>Gráfica 2.</b> Cinética de crecimiento de la cepa PoB de <i>P. ostreatus</i> en medio mineral líquido.....	22
<b>Gráfica 3.</b> Consumo de sustrato (g/L) en cada punto de muestreo del cultivo líquido con la cepa PoB de <i>P. ostreatus</i> .....	23
<b>Gráfica 4.</b> Actividad lacasa (UI/L) extracelular durante el cultivo.....	24
<b>Gráfica 5.</b> Actividad proteasa extracelular (U/L) a pH alcalino (pH 9.0), neutro (pH 7.0) y ácido (pH 2.0) de cada punto de muestreo del cultivo con la cepa PoB de <i>P. ostreatus</i> en medio líquido.....	25
<b>Gráfica 6.</b> Cinética de pH del ECE del cultivo líquido (con inhibidores de proteasa) con la cepa PoB de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	29
<b>Gráfica 7.</b> Cinética de crecimiento de la cepa PoB de <i>Pleurotus ostreatus</i> en medio mineral líquido con inhibidores de proteasa.....	30
<b>Gráfica 8.</b> Consumo de sustrato (g/L) de cada punto de muestreo del cultivo líquido (actividad proteasa inhibida) con la cepa PoB de <i>P. ostreatus</i> .....	32
<b>Gráfica 9.</b> Actividad lacasa extracelular durante el cultivo con inhibidores de proteasas.....	33
<b>Gráfica 10.</b> Actividad proteasa (U/L) extracelular, a pH alcalino 9.0, durante el cultivo con inhibidores de proteasas .....	34
<b>Gráfica 11.</b> Actividad proteasa (U/L) extracelular, a pH neutro 7.0, durante el cultivo con inhibidores de proteasas.....	35
<b>Gráfica 12.</b> Actividad proteasa (U/L) extracelular, a pH ácido 2.0, durante el cultivo con inhibidores de proteasas.....	36

## 1. INTRODUCCIÓN

Debido a una gran variedad de ventajas, como su manipulación estandarizada en el laboratorio, su respuesta relativamente rápida a los estímulos externos, sus cortos tiempos de generación, por mencionar algunas, los microorganismos han jugado un papel muy importante para la obtención de metabolitos con diferentes aplicaciones, en múltiples áreas de nuestro interés (Giardina y Sannia 2015, Pezzella y cols. 2015). Asimismo, el conocimiento *per se* de la biología de estos microorganismos, necesario para su aprovechamiento, ha impulsado el estudio de la participación de los metabolitos en los diferentes mecanismos biológicos, es decir, la manera en cómo interactúan los metabolitos para constituir, por ejemplo, rutas metabólicas o mecanismos de regulación (Rao y cols. 1998, Dorneles y cols. 2014).

En lo que a la producción de metabolitos respecta, se han utilizado diferentes sistemas, organismos y sustratos, lo cual ha generado diversos datos sobre el número de enzimas excretadas por un microorganismo en específico y de las características de éstas. Muchas de estas enzimas han resultado de interés, por sus diferentes aplicaciones en campos industriales y para determinar sus funciones biológicas (Rodríguez y cols. 2008, Macellaro y cols. 2014). Se han estudiado enzimas de organismos como las plantas, debido al uso extensivo que el hombre hace de este recurso, sin embargo, en la práctica se observaban altos costos para la obtención de metabolitos a partir de ellas (Strong y Claus 2011). Debido a esto, se inició la búsqueda de organismos que permitieran un fácil manejo y menores costos de mantenimiento a nivel de laboratorio.

Uno de los grupos de organismos utilizados en estudios de producción de compuestos de interés es el de los hongos. Se han puesto a prueba en un sin número de investigaciones con el fin de evaluar la producción de diferentes compuestos de interés industrial y por su controlado manejo en el laboratorio. Uno de estos organismos es *Pleurotus ostreatus*.

### 1.1. Generalidades de *Pleurotus ostreatus*

*Pleurotus ostreatus* es un basidiomiceto de hábitos saprótrofos perteneciente a la familia de Pleurotaceae, considerado de descomposición o pudrición blanca. En general, los hongos basidiomicetos de descomposición blanca son degradadores de la lignina y la denominación de

putredumbre blanca se debe a que dejan una coloración blanca sobre el sustrato durante el proceso de asimilación de los polímeros estructurales de la madera (Goudopoulou y cols. 2010, Ordaz 2012). Dentro de las características morfológicas más generales que se les han conferido, se encuentra la presencia de himenio con láminas o pliegues, pie lateral y esporas blancas. Se conoce bajo los nombres comunes de seta de ostra, seta de concha, orellana o pleuroto ostreado. Es un hongo comestible muy apreciado y en los últimos años se ha difundido mucho su consumo al cultivarse a gran escala (Díaz 2013). La importancia de esta especie de hongo se extiende más allá de su riqueza nutricional y organoléptica, debido a que los cuerpos fructíferos además de ser consumidos por el humano, poseen cualidades para biodegradar, vía enzimática, materiales recalcitrantes y xenobióticos (Cohen 2002).

Los hongos del género *Pleurotus* y por lo tanto *P. ostreatus*, excretan al medio extracelular enzimas tales como proteasas, peroxidasas, lacasas, xilanasas y celulasas. Se dice que este complejo enzimático, sin precisar si en su totalidad, es el responsable de su capacidad degradadora (Mendoza 2012, Giardina y Sannia 2015). Dichas enzimas son de gran interés por sus muchas aplicaciones en el campo industrial, por ejemplo, en el desarrollo y producción de diferentes fármacos o en el campo de los alimentos, entre otras (Strong y Claus 2011). Sin embargo, a pesar de su importancia, los estudios básicos sobre la fisiología de los microorganismos en cuanto a su producción de enzimas extracelulares son pocos, por ejemplo, aquéllos que tratan sobre los mecanismos de regulación de la producción enzimática, es decir, mucho se desconoce de la forma en que algunas enzimas son reguladas por otro tipo de enzimas. Existen pocas investigaciones acerca de las proteasas extracelulares producidas por basidiomicetos y de su participación en la degradación de enzimas ligninolíticas (Dorneles y cols. 2014). Éste es el caso de las lacasas, ampliamente estudiadas por su acción enzimática sobre una gran variedad de sustratos, sobre las que se ha sugerido en algunos estudios, son degradadas por proteasas extracelulares.

## **1.2. Generalidades de las lacasas**

Las enzimas son proteínas que dirigen las transformaciones de sustratos a productos metabólicos necesarios en los sistemas biológicos, gracias a su capacidad para catalizar

reacciones químicas. Algunas enzimas de importancia en los miembros del género *Pleurotus* son las lacasas (EC 1.10.3.2), oxidasas que contienen cuatro átomos de cobre (distribuidos en tres sitios diferentes) y que utilizan oxígeno molecular como oxidante (Claus 2003, 2004, Jones y Solomon 2015, Manavalan y cols. 2015). Son ampliamente estudiadas por su relevancia en diversas aplicaciones industriales, incluyendo el blanqueo de papel, reducción de color, eliminación de compuestos fenólicos en el vino, la biorremediación de ambientes contaminados, en la revalorización de residuos industriales y en el tratamiento de aguas residuales (Montazer y Sadeghian 2008, Bertrand y cols. 2013, Chandra y Chowdhary 2015). Las enzimas lacasas son producidas típicamente por hongos de podredumbre blanca y si bien son capaces de degradar compuestos ligninocelulósicos, su función fisiológica en este grupo de organismos no está clara, debido a que en ausencia de fuentes de carbono complejas, similares estructuralmente a la lignina, se encuentran presentes, lo que cuestiona su función sólo como biodegradadores de la lignina (Balachandra y cols. 1995, Piscitelli y cols. 2011, Kumar y Singh 2013, Giardina y Sannia 2015, Munk y cols. 2015).

Las lacasas son secretadas dependiendo de las especies fúngicas y las condiciones del medio, esta variedad se relaciona con la diversidad de sus funciones propuestas, por ejemplo la degradación de lignina, desarrollo de cuerpos fructíferos, producción de pigmento, desintoxicación de la célula, aunque algunas de ellas no son precisamente atribuidas al género *Pleurotus* (Missall y cols. 2005, Piscitelli y cols. 2011, Rivera-Hoyos y cols. 2013). Se ha reportado, a lo largo de muchos estudios, que *P. ostreatus* expresa lacasas a partir de múltiples genes que codifican diferentes isoenzimas con diferentes propiedades. Por su gran potencial de aplicación, han sido distintivos los estudios en cuanto a producción de estas enzimas, en los que se evalúan distintas condiciones para incrementar su producción. Las condiciones en las que se han realizado pruebas incluyen diferentes valores de pH inicial y temperatura del medio de cultivo, adición de compuestos inductores para incrementar su producción y actividad. Asimismo, se han probado distintos sustratos y diversos medios de cultivo (Téllez-Téllez y cols. 2008, Grace y cols. 2012, Mendoza 2012, Díaz 2013, Dhakar y cols. 2015, Grace y cols. 2015, Kuhar y cols. 2015, Yildirim-Aksoy y cols. 2015). Del mismo modo, se han sobre-expresado genes de lacasa para el mismo fin y en algunos de los estudios se reportan



resultados poco favorables, cuando son comparados con la cepa parental, por lo que se siguen probando diferentes técnicas y condiciones con la finalidad de incrementar la producción de estas enzimas-(Rodríguez y cols. 2008, Gu y cols. 2014, Wu y cols. 2014, Coconi-Linares y cols. 2015). En este sentido, algunos autores han reportado que el abatimiento de la actividad de lacasas en extractos extracelulares de los cultivos puede deberse a la presencia y acción de proteasas extracelulares (Palmieri y cols. 2000, 2001). Esta condición podría ser desfavorable para incrementar la producción de lacasas, incluso cuando se utilizan estrategias moleculares (Rodríguez 2006, Cañas 2009). Por tanto, el estudio de las proteasas que afectan a las lacasas, podría sugerir la existencia de algún fenómeno relacionado con algún tipo de regulación enzimática y que, al estudiarlo y comprenderlo, podría promover el establecimiento de otro tipo de estrategias, que a nivel bioquímico o molecular contribuyan a incrementar dicha actividad para fines aplicados.

### **1.3. Generalidades de las proteasas**

Las proteasas se encuentran en todos los organismos, participan en procesos metabólicos y son de gran importancia en diversas funciones fisiológicas como las de regulación, por ejemplo, en la regulación del metabolismo, inhibiendo o potenciando la actividad enzimática. Un caso particular de este tipo de regulación es de las proteasas pancreáticas que se activan mediante ruptura proteolítica. Un claro ejemplo, son las enzimas digestivas elastasa, tripsina, carboxipeptidasa y quimotripsina, que con el objeto de evitar su actividad degradativa en el interior de la célula se sintetizan en forma de sus respectivos zimógenos (forma inactiva) y sólo se activan una vez secretadas al medio extracelular por proteólisis. En general, las proteasas extracelulares catalizan la hidrólisis de proteínas grandes en moléculas más pequeñas para la absorción subsiguiente por la célula, muchas veces con fines nutricionales (North 1982, Watkinson y cols. 2001, Zañon y cols. 2005, Marcial 2011, Dorneles y cols. 2014). Las proteasas tienen una enorme diversidad de mecanismos de acción y estructuras, por lo que no se ajustan con facilidad a un solo sistema de nomenclatura de acuerdo con Rao y cols. (1998), por lo que existen diferentes enfoques mediante los que se pueden clasificar.

### 1.3.1. Clasificación de proteasas

De acuerdo con el comité de nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, las proteasas están clasificadas dentro del grupo de las hidrolasas. Dependiendo de su sitio de acción, las proteasas están subdivididas en dos grandes grupos: exopeptidasas y endopeptidasas. Las primeras actúan cerca de los extremos de las cadenas polipeptídicas, que además, según su sitio de acción, cerca del amino o cerca del carboxilo terminal, se pueden clasificar en: aminopeptidasas y carboxipeptidasas, respectivamente. Las endopeptidasas se caracterizan por su acción preferencial sobre los enlaces peptídicos de las regiones internas del polipéptido (Marcial 2011, Yin y cols. 2014). Para llegar a esta clasificación se han tenido que realizar numerosas investigaciones, con el fin de determinar los sitios de acción de las proteasas. Muchos de estos análisis han resultado costosos y sólo se han obtenidos después de periodos largos de tiempo, por lo que ha sido un sistema muy complejo de clasificación. Esto, aunado a la diversidad de funciones que realizan las proteasas, hace más difícil su nomenclatura.

Por otro lado, la mayoría de las enzimas presentan un pH óptimo para el cual su actividad es máxima; por encima o por debajo de este pH, la actividad disminuye, lo que se debe a que la mayoría de las enzimas son extremadamente sensibles a los cambios en el pH de su entorno. Conceptualmente, la protonación de un grupo básico en una enzima es simplemente el caso especial de la unión de un modificador en un sitio específico. En primer lugar, prácticamente todas las enzimas son afectadas por los protones, de modo que el protón es mucho más importante que cualquier otro modificador. En segundo lugar, la concentración de protones se puede medir y controlar durante un intervalo que es mayor que el disponible para cualquier otro modificador. Por último, los protones normalmente se unen a muchos sitios en una enzima, por lo que a menudo es suficiente para considerar la unión en un sólo sitio (Leskovac 2003, Huang y cols. 2005). Por lo tanto, el pH juega un papel importante en la clasificación y actividad de las proteasas. De esta forma, las proteasas se pueden clasificar de acuerdo con el pH óptimo de su actividad catalítica y se pueden distinguir las de tipo ácido, neutro y alcalino.

Dentro de la clasificación de las endopeptidasas, se encuentran las proteasas de tipo ácido. Tienen un pH óptimo de entre 2.0 y 4.5, pero llegan a ser estables a valores de pH de 2.5 y 6.0.

Su masa molecular oscila aproximadamente de los 30 a los 45 kDa, pero se han reportado proteasas de este tipo con un peso molecular incluso de 11.5 kDa en cultivos de *Pleurotus eryngii* (Wang y Ng 2001). Están ampliamente distribuidas entre los organismos vivos. Por lo general, necesitan de la presencia de dos residuos de ácido aspártico para su reacción (Rao y cols. 1998, Mayerhofer y cols. 2015).

A las proteasas que se caracterizan por tener su actividad óptima a un pH de 7, se les ha denominado como neutras, de las cuales destacan las serín proteasas, que presentan residuos de serina en su centro activo y con base en su similitud estructural se han agrupado en 20 familias. Algunas son inhibidas por reactivos tiol y su masa molecular oscila entre los 18 y 35 kDa y su punto isoeléctrico se encuentra entre pH 4 y 6 (Rao y cols. 1998, Hu y Leger 2004).

Otras proteasas que se han estudiado son las cisteín proteasas, de las cuales se han reconocido cerca de 20 familias, su actividad depende de una asociación de los residuos de histidina y cisteína. Generalmente son activas sólo en la presencia de un agente como HCN o cisteína y a pH neutro (Rao y cols. 1998).

Un ejemplo más son las metaloproteasas, las cuales presentan su actividad óptima a un pH alcalino y en ocasiones a valores de pH neutro. Se caracterizan por un ion metálico divalente para su actividad. Se han reconocido alrededor de 30 familias de las cuales 17 son endopeptidasas, 12 exopeptidasas y uno que contiene tanto endo como exopeptidasas (Barret 1992, Rao y cols. 1998).

Aun cuando se han realizado diversos estudios para aumentar la producción de lacasas, son pocos los que han obtenido resultados significativos. En este sentido, son escasas las investigaciones en que se ha relacionado la actividad de proteasas con la disminución y regulación de la actividad de las lacasas extracelulares producidas en especies de hongos de podredumbre blanca (Palmieri y cols. 2000, 2001, Staszczak y cols. 2000). La dinámica de la participación simultánea de ambos tipos enzimáticos excretados por el hongo permite visualizar el incremento o disminución de las enzimas óxido-reductasas en función de la presencia de las proteasas. Sin embargo, en los pocos estudios existentes no se puntualiza que tipo de proteasas son las que directa o mayoritariamente afectan a la actividad de lacasas

extracelulares. Por lo tanto, sería importante conocer los tipos de proteasas producidas por *P. ostreatus* y de este modo analizar su efecto sobre la actividad de lacasas.

## 2. ANTECEDENTES

Las investigaciones realizadas respecto a las lacasas han permitido conocer a los organismos que las producen, el número de isoenzimas presentes en diferentes medios de cultivo y la producción en presencia o ausencia de inductores (Téllez-Téllez y cols. 2008, Goudopoulou y cols. 2010, Macellaro y cols. 2014). Así, por ejemplo, se han empleado diferentes hongos para caracterizar la producción de enzimas con actividad lacasa y determinar al mayor productor de éstas. Del mismo modo, se han sometido a diferentes condiciones de crecimiento (en medio de cultivo líquido y sólido), cambiando el pH del cultivo para optimizar la producción (Dhakar y cols. 2015, Grace y cols. 2015, Kuhar y cols. 2015, Yildirim-Aksoy y cols. 2015). En otros casos, se ha empleado la expresión heteróloga (Coconi-Linares y cols. 2014, Gu y cols. 2014, Wu y cols. 2014). Por ejemplo, en una investigación se utilizó a *Aspergillus niger* como anfitrión para la producción heteróloga de POXA1b (lacasa de *P. eryngii*) (Rodríguez y cols. 2008). En otro estudio se realizó la obtención de lacasas recombinantes y su mejora mediante el diseño por evolución molecular dirigida, siempre con el objetivo de aumentar la producción de estas oxidasas, aun cuando no se han obtenido resultados favorables (Cañas 2009). Por esta razón, algunos autores han optado por abordar desde otras perspectivas esta área de estudio, en este caso algunos trabajos sugieren que las proteasas juegan un papel importante en la regulación de las enzimas lacasa en extractos extracelulares (Macellaro y cols. 2014, Viswanath y cols. 2014, Wu y cols. 2014).

Dentro de los trabajos en los que ya se propone a las proteasas como un factor de regulación en la actividad de lacasa, se encuentra el reportado por Palmieri y cols. (2000), quienes demostraron que el cobre resultó ser un inductor eficiente de la actividad de las isoformas POXA1b, POXA2, POXC y otras tres isoformas. En este estudio se reportó que el rompimiento específico de POXA1b se lleva a cabo durante la fase temprana de crecimiento del hongo. Los investigadores sugieren que esto es efecto de la acción de proteasas secretadas en los medios de cultivos. Para corroborar esta posible relación, un año más tarde, identificaron la acción de una proteasa en *P. ostreatus* (tipo Florida), a la que se le llamó PoSI, a través del empleo de inhibidores de proteasas. Con el fin de establecer si la pérdida de POXA1b se debía solamente a la acción de PoSI, POXA1b se incubó con PoSI. Después de 48

h, no se observó efecto alguno sobre la actividad de POXA1b, por lo que sugirieron que la pérdida de actividad de POXA1b se debe a otro tipo de proteasa presente en el medio y no a PoSI (Palmieri y cols. 2001).

Se encuentran otras investigaciones con hongos de otra especie, en las que también se están estudiando las relaciones de las proteasas con la actividad lacasa. En un estudio utilizaron como modelo a la cepa *Trametes versicolor* FCL 7 (ATCC 44308) y se encontró que una disminución en la actividad específica de proteasas extracelulares, después de la adición de fluoruro de fenil metil sulfonil (PMSF), estuvo acompañada por un aumento significativo en las actividades de lacasa y peroxidasas extracelulares (Staszczak y cols. 2000). Este hecho permitió pensar que las proteasas neutras podrían estar involucradas en la regulación de estas enzimas, en la especie anteriormente mencionada.

Resultados similares obtuvieron Wu y cols. (2014) cuando, en una solución, mezclaron proteasas (proteasa purificada de *Bacillus*) y lacasas de *T. versicolor* [Sigma Aldrich (CAS 80498-15-3, polvo)]. Dicha mezcla se mantuvo en agitación durante 16 h a 25 °C y los extractos para medir la actividad enzimática se obtuvieron en diferentes tiempos. Los resultados mostraron que en presencia de las proteasas, las lacasas presentaron una disminución en actividad del 41% y 48% a las 16 h.

La actividad de las enzimas de acuerdo con su pH óptimo ha sido una herramienta muy útil para su estudio. De este modo, Sabotic y cols. (2009) midieron la actividad proteolítica de extractos extracelulares de *Clitocybe nebularis* a diferentes intervalos de pH (3.5, 7.0 y 11.0) y la mayor actividad enzimática se observó a pH ácido. Posteriormente, utilizando inhibidores más específicos, indicaron la presencia de proteasas ácidas. Del mismo modo, Yin y cols. (2014) observaron una disminución notable en la actividad proteasa al utilizar Pepstatin A (inhibidor de proteasas ácidas) y de este modo sugirieron la presencia de proteasas ácidas extracelulares en cultivos con *P. ostreatus*.

Se han realizado estudios con el fin de aumentar la producción de lacasas y del mismo modo identificar aquellos factores que estén afectando su actividad. No obstante, existen pocas investigaciones sobre la relación de la actividad de proteasas con respecto a la actividad de

enzimas lacasa (Palmieri y cols. 2000, Grace y cols. 2012). Debido a esto, el presente trabajo pretende aportar conocimiento sobre la presencia de los tres tipos de proteasas extracelulares, utilizando la clasificación de pH óptimo de actividad, y de su efecto sobre la actividad de lacasas extracelulares producidas por una cepa de *P. ostreatus* cultivada en medio líquido.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Por su enorme capacidad catalítica, las lacasas son empleadas en importantes procesos industriales, por lo que son una de las enzimas fúngicas más estudiadas. Los estudios en cuanto a su producción son bastos y en ellos se han evaluado distintas condiciones para incrementar su producción sin conseguirlo en ocasiones. En este sentido, diferentes autores han reportado que el abatimiento de la actividad de lacasas en extractos celulares de los cultivos con *Pleurotus ostreatus* puede deberse a la presencia y acción de proteasas extracelulares (en un posible sistema de regulación enzimática). Así pues, los pocos estudios que se encuentran no puntualizan que tipo de proteasas, según su actividad óptima dependiente del pH (ácido, neutro o alcalino), son las que afectan particularmente a las lacasas.

No obstante, esta condición podría ser desfavorable para incrementar la producción de lacasas. Por tanto, el contribuir con conocimiento acerca del tipo de proteasas (según su pH óptimo de actividad) que afectan a la actividad de las lacasas utilizando extractos extracelulares producidos por la cepa PoB de *P. ostreatus*, permitirá mostrar algunas interacciones enzimáticas que posteriormente puedan estudiarse para determinar si forman parte de algún mecanismo de regulación presente entre ellas. Finalmente, en el caso de que exista dicho sistema de regulación, puede permitir el diseño de estrategias, tanto a nivel bioquímico como molecular que contribuyan a incrementar la producción de lacasas.



#### 4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- ❖ ¿Cuántas isoenzimas de lacasas producirá la cepa PoB de *Pleurotus ostreatus* en cultivo en medio líquido?
- ❖ ¿Qué tipo de proteasas (ácido, neutro o alcalino) extracelulares produce la cepa PoB de *P. ostreatus*?
- ❖ ¿De qué manera afecta la disminución de la actividad proteasa a la actividad de lacasas extracelulares producidas por *P. ostreatus*?

#### 5. HIPÓTESIS

La actividad de proteasas está implicada en la regulación de la actividad de lacasas.

#### 6. PREDICCIÓN

La adición de inhibidores de la actividad de proteasas en el cultivo líquido de *Pleurotus ostreatus* cepa PoB incrementará la actividad de sus lacasas extracelulares.

## **7. OBJETIVOS**

### **7.1. Objetivo general**

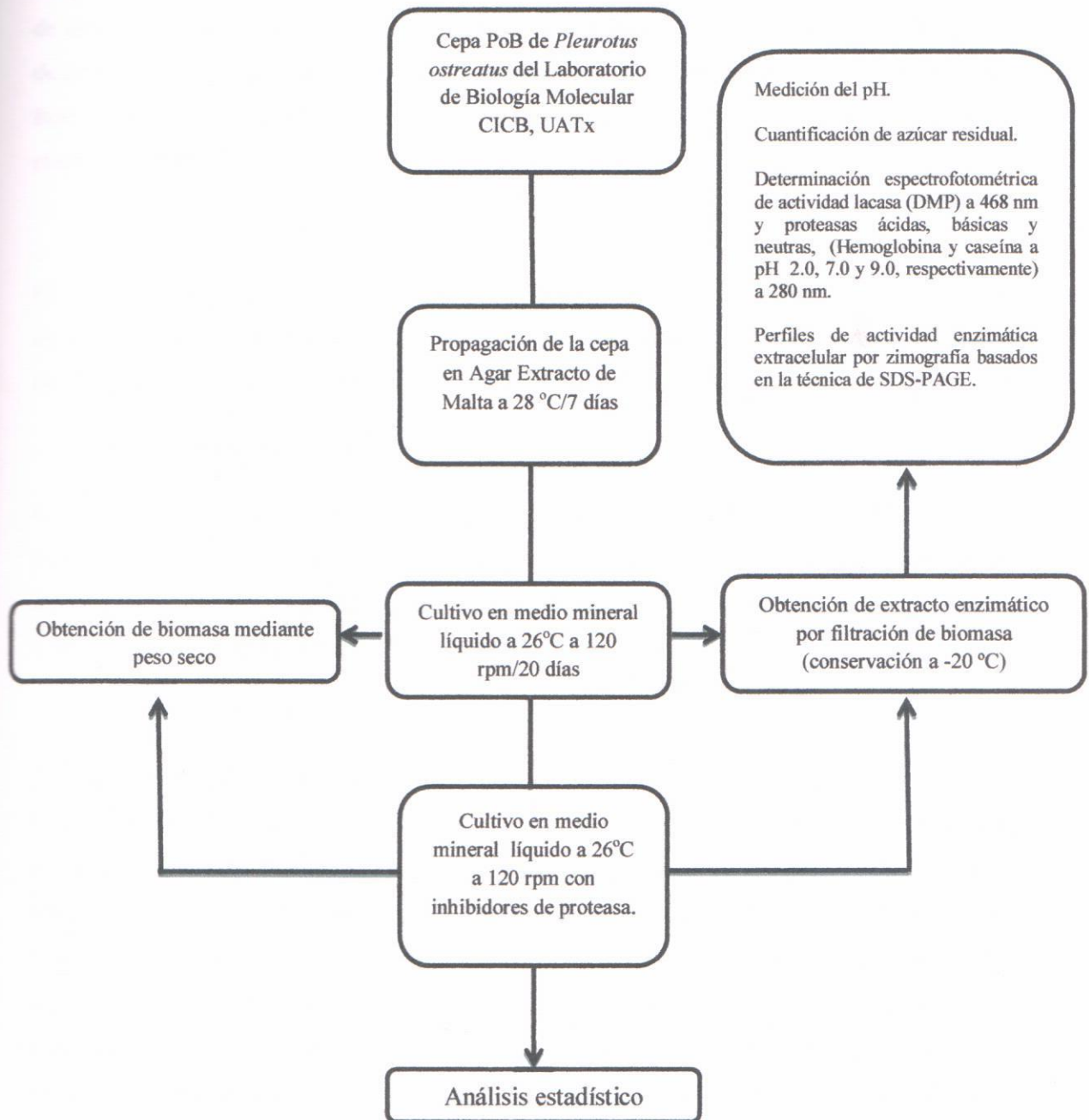
Identificar el tipo de proteasas (ácidas, neutras o alcalinas) y evaluar su efecto sobre la actividad de lacasas extracelulares producidas por la cepa PoB de *P. ostreatus*.

### **7.2. Objetivos específicos**

- ❖ Caracterizar la producción de lacasas por la cepa PoB de *P. ostreatus* en cultivo en medio líquido.
- ❖ Caracterizar la producción de proteasas de tipo ácido, neutro o alcalino extracelulares de la cepa PoB de *P. ostreatus*.
- ❖ Evaluar el efecto de la inhibición de proteasas ácidas, neutras y alcalinas sobre la actividad extracelular de lacasas producidas por la cepa PoB de *P. ostreatus*.

## 8. METODOLOGÍA

### 8.1. Diagrama de árbol de la metodología



## **8.2. Primera fase experimental (caracterización)**

La primera fase se realizó para caracterizar la producción de lacasas y proteasas extracelulares de una cepa seleccionada de *P. ostreatus*. Esto con la finalidad de obtener datos sobre el tipo de proteasas (ácidas, neutras o alcalinas) producidas en medio de cultivo líquido. Esta primera fase, permitió la selección de los inhibidores de proteasas para los cultivos en una segunda etapa experimental.

### **8.2.1. Organismo**

El organismo de estudio fue la cepa PoB de *P. ostreatus* del laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. Dicho organismo es una donación del Laboratorio de Hongos Comestibles de la Universidad Autónoma de Chapingo.

### **8.2.2. Propagación de la cepa**

El medio de cultivo para propagar al hongo fue Agar Extracto de Malta (EMA) (Bioxon). La preparación se realizó de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Para este fin, se inocularon cajas de Petri (conteniendo 30 mL de medio EMA) con discos de agar con micelio y se incubaron durante 7 días a 28°C.

### **8.2.3. Condiciones del cultivo líquido**

El cultivo en medio líquido de la cepa PoB de *P. ostreatus* se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 125 mL. A cada uno de éstos se le agregaron 50 mL de medio mineral líquido, el cual se preparó con (en gramos por litro): glucosa, 10; extracto de levadura, 5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.6;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.4;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.05;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.05;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.001 (Téllez-Téllez y cols. 2008). Los medios de cultivo preparados se esterilizaron en autoclave a 121 libras de presión durante un lapso de 15 min. Posteriormente, los matraces fueron inoculados con 3 círculos de micelio de 5 mm de diámetro tomado de la periferia de la colonia desarrollada en la propagación. Al final, todas las unidades experimentales fueron incubadas a 26 °C con agitación orbital (120 rpm en incubadora orbital INO 650V-7) y el cultivo se llevó a cabo durante 20 días.

#### **8.2.4. Determinación de biomasa y obtención del extracto enzimático**

La biomasa se cuantificó mediante el método de peso seco para cada una de las muestras obtenidas. Para este fin, se seleccionaron de manera aleatoria 3 matraces, cada 24 h, por cada toma de muestra. El extracto se filtró a través de círculos de papel de filtro Whatman No. 1 de 90 mm de diámetro. Una vez separada (con una bomba de vacío) la biomasa retenida fue colocada en charolas de aluminio y secada en horno a 45°C durante 48 h. Posteriormente se registró el peso de la biomasa en gramos, obtenida con una balanza analítica (Denver Instrument). Al final se obtuvo un peso constante, que al restarle el peso inicial de la charola, nos proporcionó el peso real de la biomasa producida.

En el mismo momento, se recuperó el sobrenadante (extracto crudo enzimático ECE), una parte se utilizó para las evaluaciones enzimáticas y la otra se conservó a -20 °C para análisis posteriores.

#### **8.2.5. Determinación de pH**

Las lecturas de pH se realizaron directamente en el ECE obtenido con un potenciómetro (Oakton, Eutech Instruments).

#### **8.2.6. Cuantificación del consumo de sustrato**

El consumo de sustrato fue evaluado considerando la cantidad inicial de la fuente de carbono (glucosa) y restándole la cantidad residual de la misma en las unidades experimentales de cada punto de muestreo. La cantidad de glucosa residual se determinó mediante el método de DNS, el cual se fundamenta en la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) por la glucosa y/o fructosa al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (Bello-Gil y cols. 2006). La concentración de azúcar en la muestra se valoró empleando una curva patrón de glucosa con concentraciones conocidas. La mezcla de reacción se llevó a cabo en tubos de vidrio de 10 mL, en los que se agregaron 50 µL del ECE, 450 µL de agua estéril (dilución a 1:10) y 500 µL de reactivo DNS. Posteriormente, los tubos se colocaron en baño María a 95 °C durante 5 minutos. Una vez enfriados a temperatura ambiente, se añadieron 5 mL de agua estéril y se agitaron con

ayuda de un vórtex. A continuación, se tomaron las medidas de absorbancia en un espectrofotómetro (SmartSpect™ Plus, BIO-RAD) a 540 nm.

Finalmente, empleando la curva patrón elaborada, se estimó la cantidad de azúcar restante en el ECE utilizando la ecuación

$$x = \left( \frac{y + b}{m} \right) \text{ factor de dilución}$$

Dónde:

y = Absorbancia.

b = Ordenada al origen.

m = Pendiente de la recta.

### 8.2.7. Determinación de actividad de lacasas por espectrofotometría

La actividad de lacasas extracelulares se determinó en cada punto de muestreo del cultivo. En la mezcla de reacción correspondiente con cada muestra, se siguió una cinética de reacción durante 1 min a 39 °C, para posteriormente ser leída en un espectrofotómetro Uv/Vis (SmartSpect™ Plus, BIO-RAD). Se utilizó como sustrato para lacasas al 2,6-dimetoxifenol (DMP). La mezcla de reacción contenía: 900 µL de DMP 2 mM en buffer de fosfatos 0.1 M pH 6.5 y 100 µL del ECE. El producto de oxidación fue valorado espectrofotométricamente como el incremento de la absorbancia a 468 nm (Haars y cols. 1981). La actividad enzimática es expresada en unidades internacionales (UI), donde 1 UI se define como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 µM de sustrato en producto por minuto y se estimó utilizando la siguiente ecuación (basada en la Ley de Lambert-Beer):

$$UI/L = \frac{\Delta Abs \times Vt}{t \times \epsilon \times \lambda \times Vm} (1000000)$$

Dónde:

$\Delta Abs$  = Absorbancia final - Absorbancia inicial.

$t$  = Tiempo de reacción en minutos.

$\epsilon$  = Valor del coeficiente de extinción molar del sustrato.

$d$  = Espesor de la cubeta.

$V_r$  = Volumen total de reacción en mL.

$V_m$  = Volumen de la muestra en mL.

### 8.2.8. Determinación de actividad proteasa por espectrofotometría

Para esta determinación se utilizó caseína como sustrato para proteasas neutras y básicas, y hemoglobina para proteasas ácidas. La solución de caseína (al 1% p/v) se preparó en buffer de fosfatos pH 7.0 (cuantificación de proteasas neutras) y en buffer Tris-HCl pH 9.0 (cuantificación de proteasas alcalinas). Para facilitar la disolución del reactivo, la mezcla se calentó a una temperatura de entre 80-90°C y se mantuvo en agitación durante 30 min. Asimismo, se preparó la solución de hemoglobina al 1% p/v en buffer glicina-HCl pH 2.0 y se mezcló con ligera agitación a 60°C durante 20 minutos.

La mezcla de reacción se realizó agregando 500  $\mu$ L de sustrato y 300  $\mu$ L del ECE, se mezclaron y se incubaron a 37°C durante 25 min (como blanco se empleó el medio sin inocular y como control positivo se utilizaron proteasas de *Rhizopus* al 1% p/v en acetato de calcio 2.0 mM). Para detener la reacción se agregaron 300  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) al 10% y se dejó reposar durante 15 minutos a 4 °C. Una vez transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 13,200 rpm durante 25 minutos. Posteriormente, el sobrenadante se empleó para la medición de la absorbancia a 280 nm con un espectrofotómetro (SmartSpect<sup>TM</sup> Plus, BIO-RAD) (Anson 1938, Walter 1984).

La actividad enzimática de proteasas fue expresada en U/L, donde una unidad de actividad enzimática se define como 1  $\mu$ g de producto liberado por un determinado tiempo de reacción. Se utilizó un coeficiente de extinción molar de 0.005 con ayuda de la siguiente fórmula (Uscanga-Martínez y cols. 2011):

$$U/L = ((\Delta\text{Abs} \times V_t) \times (\epsilon \times t \times V_m)) \times 1000$$

Dónde:

$\Delta\text{Abs}$  = Absorbancia final

$V_t$  = Volumen total de la reacción en mL

$\epsilon$  = Valor del coeficiente de extinción molar

$t$  = Tiempo de reacción en minutos

$V_m$  = Volumen de la muestra en mL.

#### 8.2.9. Perfiles de isoenzimas con actividad enzimática lacasa extracelular por zimografía

La actividad de lacasas también se detectó por zimografía basada en la técnica de SDS-PAGE. El gel de separación contenía 12% de acrilamida y 2.7% de bis-acrilamida. El gel de empaquetamiento contenía 4% de acrilamida y 2.7% de bis-acrilamida. La concentración de dodecilsulfato sódico (SDS) fue de 0.1% en el gel. La muestra de reacción se llevó a cabo con 30  $\mu\text{L}$  del ECE y 10  $\mu\text{L}$  de buffer de muestra comercial (Zymogram Sample Buffer BIO-RAD). Las muestras de los ECE se corrieron en geles de 0.75 mm de espesor en un sistema de electroforesis Mini PROTEAN Tetra cell (BioRad) a 150 V durante 100 min. Después de la corrida, los geles se lavaron con agua destilada con ayuda de un agitador orbital (20-30 rpm) durante una hora, con un cambio de agua cada 15 min para eliminar el SDS y re-naturalizar a las proteínas (Williams y Reisfeld 1964, Laemmli 1970). Posteriormente, los geles se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente, en 50 mL (por cada gel) de DMP 2 mM en buffer de fosfatos 0.1 M a pH 6.5.



### **8.2.10. Perfiles de isoenzimas con actividad enzimática proteasa extracelular por zimografía**

Como sustrato para proteasas neutras y básicas se preparó caseína al 5% en buffer de fosfatos pH 7.0 y en buffer Tris/HCl 50 mM con un valor de pH 9.0. La hemoglobina se disolvió en buffer glicina-HCl 0.1 M con un valor de pH 2.0 para revelar proteasas con actividad a pH ácido.

Para determinar la actividad proteasa por zimografía, los geles de separación, empaquetamiento y la mezcla de reacción se prepararon de igual manera que para la determinación de isoenzimas de lacasas. Las muestras de los ECE se corrieron en geles de 0.75 mm de espesor en un sistema de electroforesis Mini PROTEAN Tetra cell (BioRad) a 150 V durante 90 min a 4°C (Laemmli 1970).

Después de la corrida, los geles se lavaron con agua destilada desionizada estéril (H<sub>2</sub>O dd) en un agitador orbital (20-30 rpm) durante una hora, con un cambio de agua cada 15 min para eliminar el SDS y re-naturalizar a las proteínas. Después de esto, los geles se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con los sustratos respectivos (caseína al 5% y hemoglobina al 1%). En seguida, se incubaron (incubadora Labnet international, Inc. Problot 12s) a 37 °C durante 90 minutos. Transcurrido el tiempo, los geles se lavaron con H<sub>2</sub>O dd, se agregó TCA al 10% y se dejaron reposar 15 min a 4 °C. En seguida, los geles se lavaron y se tñieron con PageBlue™ (Protein Staining Solution de Fermentas Life Sciences) durante una hora (Uscanga-Martínez y cols. 2011). Finalmente, los geles se lavaron con H<sub>2</sub>O dd hasta la revelación de las bandas en un periodo máximo de 24 h.

### **8.3. Segunda fase experimental**

Para cumplir con el tercer objetivo se llevó a cabo un segundo cultivo. En estos medios se agregaron diferentes inhibidores de acuerdo con el tipo de proteasas cuya actividad se deseaba abatir. Se corrieron dos experimentos (por bloques) con un total de tres réplicas para cada tratamiento. Para este fin se desarrolló el siguiente diseño experimental:

### 8.3.1. Diseño experimental

Diseño de dos factores completamente al azar en bloques. El primer factor lo constituyeron los tratamientos (A) y se consideró como segundo factor el tiempo en horas de cultivo (B).

A = factor con 5 niveles: cada nivel es el tratamiento (cultivo) con el inhibidor según el tipo de proteasa.

- ❖ Cultivo control: cultivo sin inhibidores de proteasa.
- ❖ Cultivo con coctel de inhibidores: cultivo con una mezcla de inhibidores de proteasas.
- ❖ Cultivo con EDTA: cultivo con inhibidor de proteasas con actividad a pH alcalino.
- ❖ Cultivo con PMSF: cultivo con inhibidor de proteasas con actividad a pH neutro.
- ❖ Cultivo con Pepstatin A: cultivo con inhibidor de proteasa con actividad a pH ácido.

B = factor con 5 niveles: en la primera fase experimental se observó actividad proteasa extracelular de los tres tipos (durante todo el cultivo), por lo que se seleccionaron las 0, 72, 192, 312 y 432 h para el análisis.

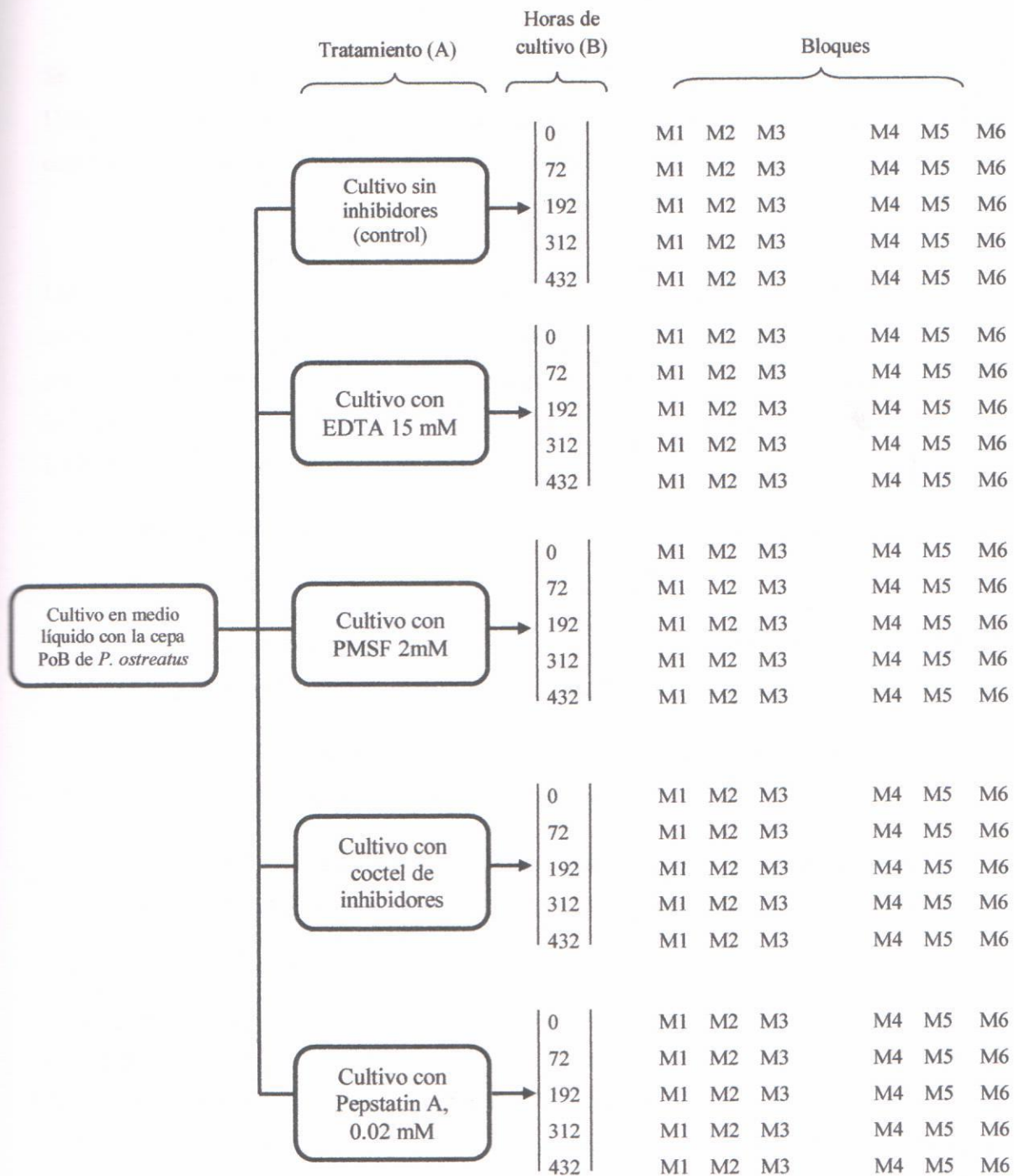


Figura 1: Diagrama del diseño experimental (M: Matraz inoculado)

### 8.3.2. Propagación de la cepa

Se propagó la cepa PoB de *P. ostreatus* del laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. Se inocularon cajas de Petri con 30 mL de medio EMA, con discos de agar con micelio y se incubaron durante 7 días a 28°C.

### 8.3.3. Condiciones de cultivo

Las condiciones de cultivo fueron las mismas que para la caracterización enzimática, con la cepa PoB de *P. ostreatus* empleando glucosa como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno (además de compuestos minerales en cantidades traza). Antes de la inoculación, se agregaron 100 µL de inhibidor de proteasas a cada unidad experimental. Los inhibidores empleados fueron los siguientes:

- Pepstatín A (0.02 mM) (Sigma-Aldrich): inhibidor de aspartato proteasas, consideradas de tipo ácido.
- Fluoruro de Metil Fenil Sulfonil (PMSF 2 mM) (Sigma-Aldrich): inhibidor de proteasas de serina, en su mayoría estas enzimas tienen un pH óptimo neutro.
- EDTA (15 mM) (J.B. Baker): agente quelante, inhibidor de metaloproteasas, enzimas que en su mayoría tienen actividad a un pH alcalino.
- Coctel de inhibidores (Sigma-Aldrich): es una mezcla de inhibidores de proteasas con una amplia especificidad para la inhibición de serina, cisteína, aspartato y metaloproteasas.

Fueron preparados de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Al mismo tiempo, se realizó un cultivo sin inhibidores el cual se tomó como control. Así pues, cada matraz contenía 50 mL de medio mineral líquido con 100 µL de inhibidor. Finalmente, la inoculación se realizó con 3 discos de micelio de 5 mm de diámetro tomados de la periferia de la colonia desarrollada en la propagación y la incubación se llevó a cabo a 26 °C con agitación orbital a 120 rpm.

#### **8.3.4. Determinación de biomasa y obtención del extracto enzimático**

La biomasa se cuantificó mediante el método de peso seco y al mismo tiempo se obtuvo el ECE. A éste se le determinó el pH directamente con un potenciómetro. Esto se realizó a las 0, 72, 192, 312 y 432 h de cultivo. A los extractos obtenidos, se les determinó la actividad lacasa y proteasa por espectrofotometría. Asimismo, el consumo de sustrato y los perfiles zimográficos con los procedimientos descritos en la primera fase experimental.

#### **8.3.5. Análisis estadísticos.**

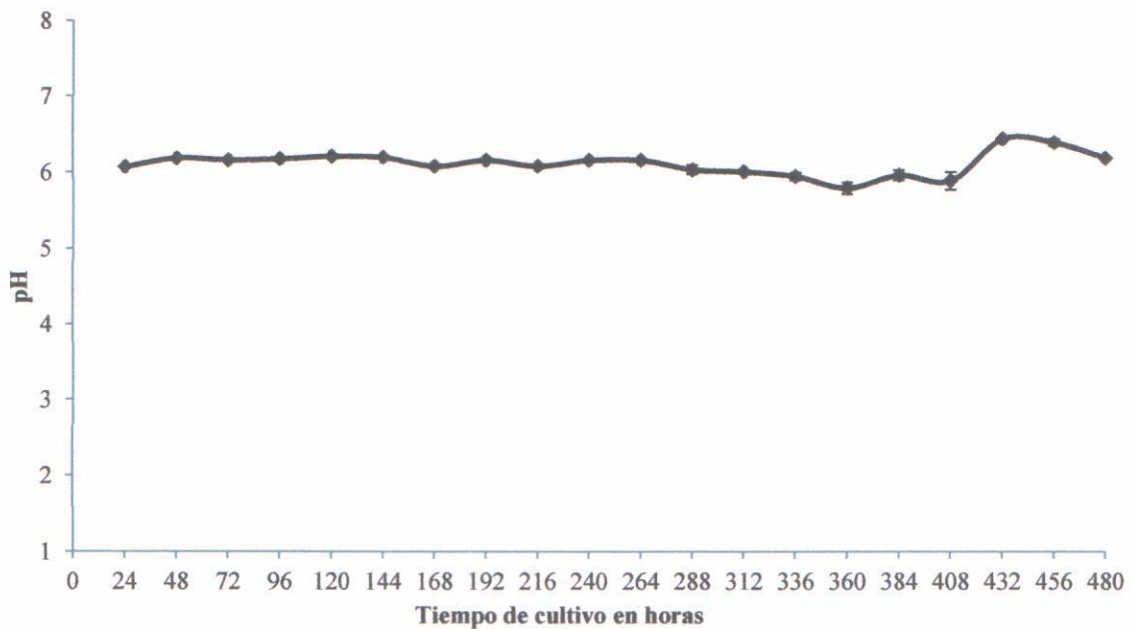
Los parámetros cuantitativos estimados de esta segunda etapa experimental fueron analizados por medio de un análisis de varianza de dos factores ( $\alpha= 0.05$ ) para un diseño de bloques y se llevó a cabo con ayuda del paquete estadístico Sigma Plot. Para determinar las diferencias, entre los grupos estudiados, se utilizó la prueba de Tukey.

## 9. RESULTADOS

### 9.1. Primera fase experimental (caracterización)

#### 9.1.1. Determinación de pH

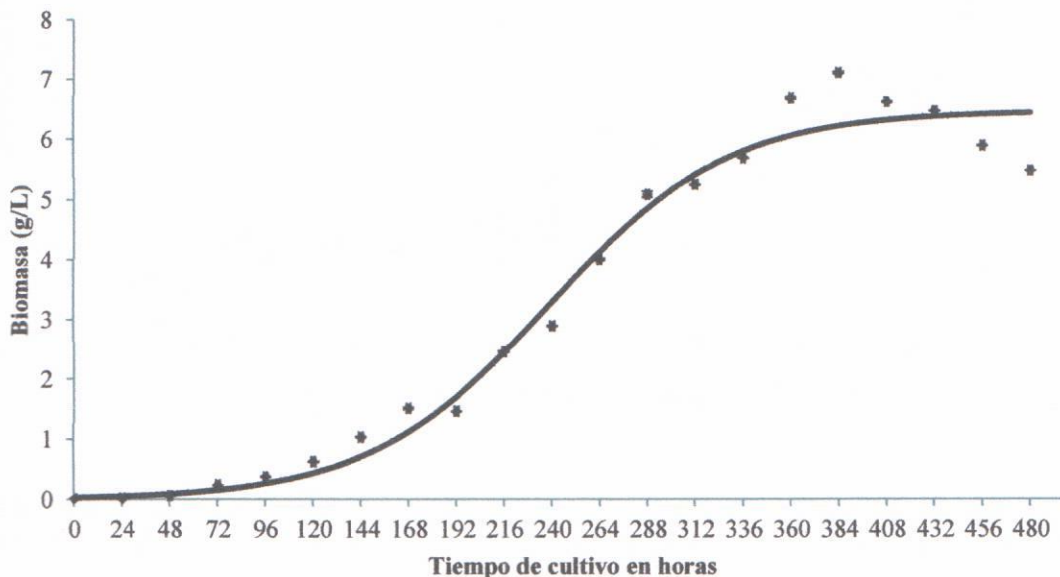
Se ha descrito que el pH está implicado en las variaciones de la producción y actividad de las enzimas excretadas por los hongos. Por tal motivo y con la intención de no incluir en el diseño experimental variaciones debidas a este factor, el medio de cultivo fue amortiguado con una solución de fosfato de potasio monobásico y dibásico, lo que permite mantener constante el pH durante el cultivo. Para verificar lo anterior, se monitoreó el pH del cultivo y se midió en cada punto de muestreo. Los resultados muestran que el pH se mantuvo constante durante todo el cultivo, datos que se observan en la gráfica 1.



**Gráfica 1.** Cinética de pH del cultivo líquido con la cepa PoB de *P. ostreatus*. Cada punto representa la media de tres réplicas,  $\pm$  su error estándar.

### 9.1.2. Producción de biomasa

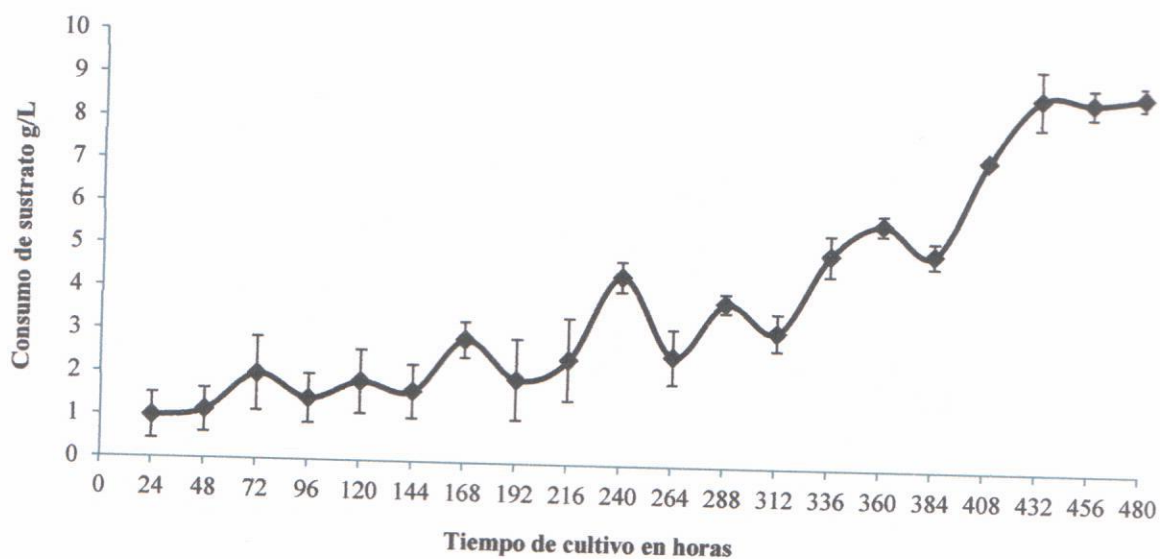
Se determinó la producción de biomasa con la finalidad de analizar el comportamiento del organismo durante el tiempo de cultivo en cuanto a velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y en cuanto a producción máxima de biomasa ( $X_{\max}$ ). Asimismo, permitió observar las tres fases de desarrollo del microorganismo. Se observó que la fase de adaptación duró aproximadamente 120 h, lo cual resultó ser un tiempo menor al reportado en otros estudios realizados, ya que otras cepas han mostrado una fase adaptativa hasta las 200 h. Después de este tiempo, inició la fase exponencial de crecimiento la cual se mantuvo hasta las 384 h, momento en el que probablemente iniciaría la fase estacionaria de crecimiento del hongo. La  $X_{\max}$  fue de 6.465 g/L y se observó a las 384 h mientras que la  $\mu$  fue de  $0.02 \text{ h}^{-1}$ . En la gráfica 2, se pueden observar las tres etapas de crecimiento de la cepa PoB de *P. ostreatus* cultivado en medio mineral líquido.



**Gráfica 2.** Cinética de crecimiento de la cepa PoB de *P. ostreatus* en medio mineral líquido. Cada punto representa la media de tres réplicas,  $\pm$  su error estándar.

### 9.1.3. Determinación del consumo de sustrato

La determinación del consumo de sustrato permitió relacionar este parámetro con el de crecimiento del organismo. Se puede observar que el organismo realizó un consumo de glucosa a una tasa mayor, a partir de las 168 h. Esto concuerda con el inicio de la fase exponencial del organismo (gráfica 2). Se observa que durante las primeras horas, la diferencia entre el valor de glucosa inicial y el de la glucosa residual es mínimo (menor a 1 g/L, etapa de adaptación del organismo). A partir de las 432 h las concentraciones de glucosa consumida muestran valores constantes, lo que puede deberse a la escasa actividad metabólica que realiza el hongo en la fase estacionaria. Los resultados se pueden apreciar en la gráfica 3. Al final del cultivo el 88.17 % del sustrato fue consumido.



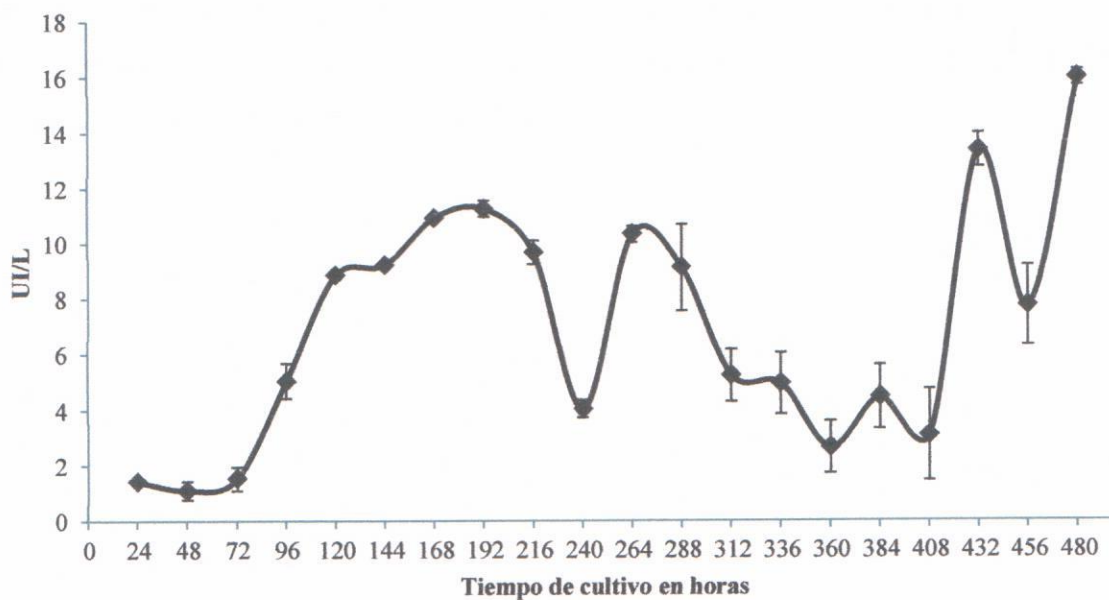
**Gráfica 3.** Consumo de sustrato (g/L) en cada punto de muestreo del cultivo líquido con la cepa PoB de *P. ostreatus*. Cada punto representa la media de tres réplicas,  $\pm$  su error estándar.

### 9.1.4. Determinación de actividad lacasa

Se monitoreó por espectrofotometría, la actividad total de lacasas extracelulares. Los resultados obtenidos muestran la existencia de actividad en una muy baja magnitud desde las 24 h y hasta las 72 h. Asumiendo que el organismo se encuentra en la fase de adaptación,



podemos sugerir que estos valores de actividad pueden ser en parte residuales, contenidos en el cilindro de agar del inóculo. La actividad comienza su aumento a partir de las 96 h, aproximadamente 24 h antes de iniciar el crecimiento exponencial de la biomasa. Durante el tiempo correspondiente a la fase de crecimiento exponencial, la actividad total de lacasa es fluctuante, alcanzando los mayores valores a las 168 y 192 h de cultivo. 72 h antes de iniciar la fase estacionaria (312, 336, 360 h), se obtuvieron valores de los más bajos de actividad de lacasas (5.24, 4.95 y 2.66 UI/L). Finalmente, la actividad enzimática vuelve a presentar un incremento al final del cultivo, aunque fluctuante, alcanzando su mayor valor (15.97 UI/L) a las 480 h, como se muestra en la gráfica 4.

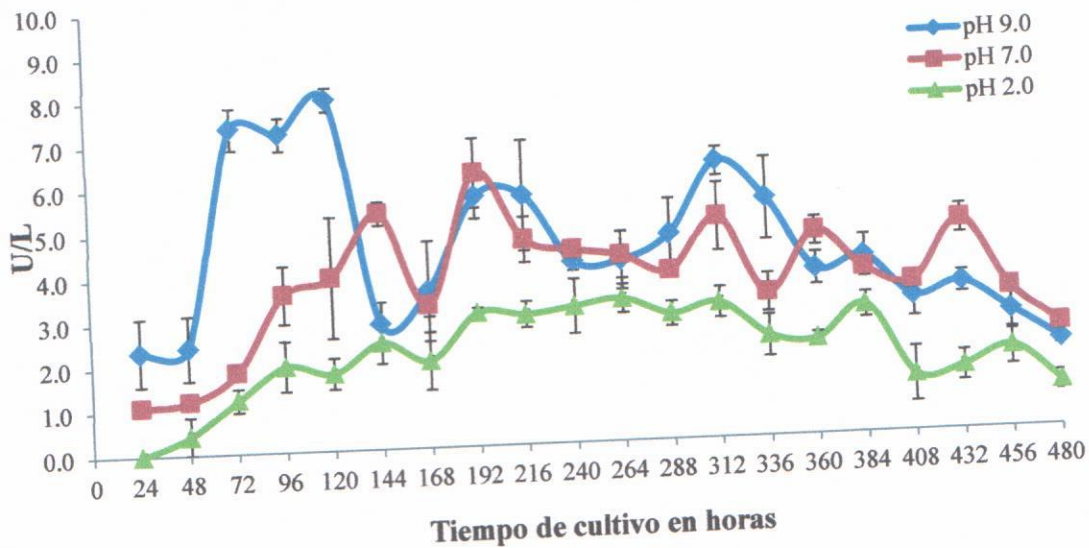


**Gráfica 4.** Actividad lacasa (UI/L) extracelular durante el cultivo. Cada punto representa la media de tres réplicas,  $\pm$  su error estándar.

#### 9.1.5. Determinación de actividad proteasa

Con los datos obtenidos al evaluar la actividad de proteasas extracelulares, según su pH óptimo de actividad, se puede apreciar la presencia de la actividad de los tres tipos de proteasa evaluados (ácida, neutra y alcalina). En primer lugar, la actividad de proteasas a pH alcalino (pH 9.0) fue de las más altas, sobre todo entre las 72 y las 120 h del cultivo (con 7.335 y 7.943

U/L respectivamente). En segundo lugar, la actividad de proteasas a pH neutro (pH 7.0), inicia con valores bajos y alcanza su valor máximo a las 192 h de cultivo (6.17 U/L), las variaciones en actividad que muestra a lo largo del tiempo a partir de las 216 y hasta las 432 son mínimas, mientras que valores muy pequeños son observadas al final del cultivo. Finalmente, la actividad de las proteasas ácidas (pH 2.0) se presenta en menor magnitud, con un promedio de 3 U/L aproximadamente desde las 192 y hasta las 312 h. A partir de las 456 h, los tres tipos de proteasas tienden a disminuir su hidrólisis hasta el final del cultivo (gráfica 5). La actividad proteasa comienza a aumentar alrededor de las 96 h, momento en el que la actividad lacasa aumenta también. A partir de las 192 h la actividad lacasa registrada disminuye, correspondiendo con el momento en el que los tres tipos de proteasas permanecen con actividad alta y constante hasta las 432 h, punto en el que disminuye la actividad de los tres tipos de proteasas. Por el contrario la actividad oxidasa aumenta en este punto, lo cual sigue una correlación inversa entre los dos tipos de enzimas estudiadas.

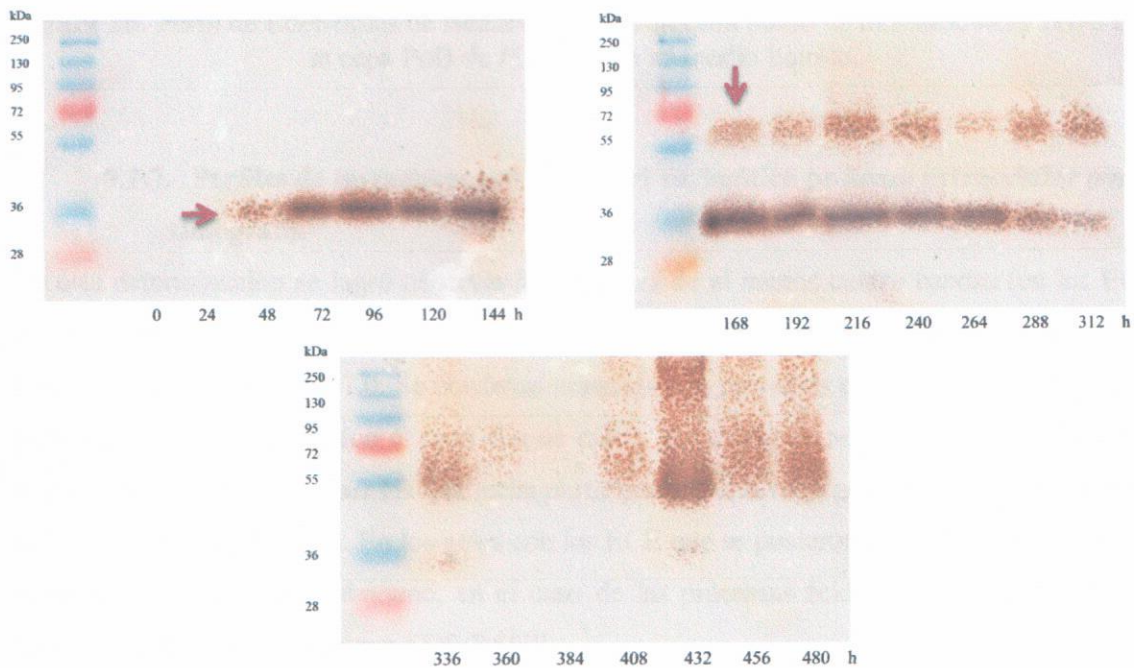


**Gráfica 5.** Actividad proteasa extracelular (U/L) a pH alcalino (pH 9.0), neutro (pH 7.0) y ácido (pH 2.0) de cada punto de muestreo del cultivo con la cepa PoB de *P. ostreatus* en medio líquido. Cada punto representa la media de tres réplicas,  $\pm$  su error estándar.

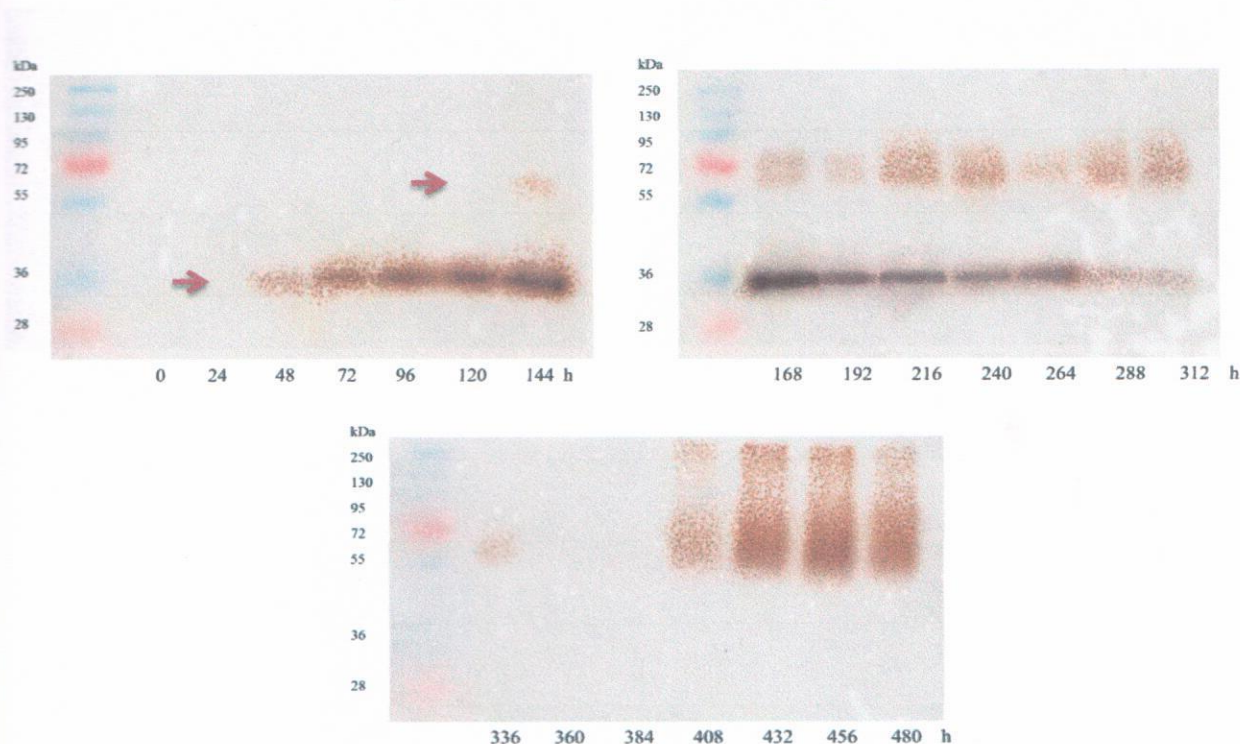
### 9.1.6. Perfiles de isoenzimas con actividad enzimática lacasa extracelular por zimografía

Se determinó la presencia de dos isoenzimas de lacasas de diferente peso molecular en los medios de cultivo por medio de zimografía. La primera (de aproximadamente 36 kDa, calculados por densitometría a partir del perfil de pesos moleculares del marcador) muestra su actividad a las 48 h de cultivo y deja de ser visible alrededor de las 336 h. La segunda isoenzima se encuentra entre las bandas de los marcadores moleculares de 55 y 72 kDa. Ésta aparece a partir de las 168 h y su presencia se mantuvo hasta las 336 h de cultivo. Ésta misma vuelve a mostrar actividad a las 408 h y dura hasta la última toma de muestra del ECE. Los resultados de esta prueba corroboran la presencia de lacasas en los medios extracelulares evaluados y se pudo observar (Figura 2a) que se presentan a diferentes horas durante el cultivo.

Se realizaron zimogramas de cada una de las réplicas del cultivo y se pudo observar que se mantiene el mismo perfil de isoenzimas. Los resultados obtenidos en las réplicas confirman la presencia de las dos isoenzimas de lacasa en el cultivo, mismas que se pueden apreciar en la figura 2b (flechas rojas indican número de isoenzimas).



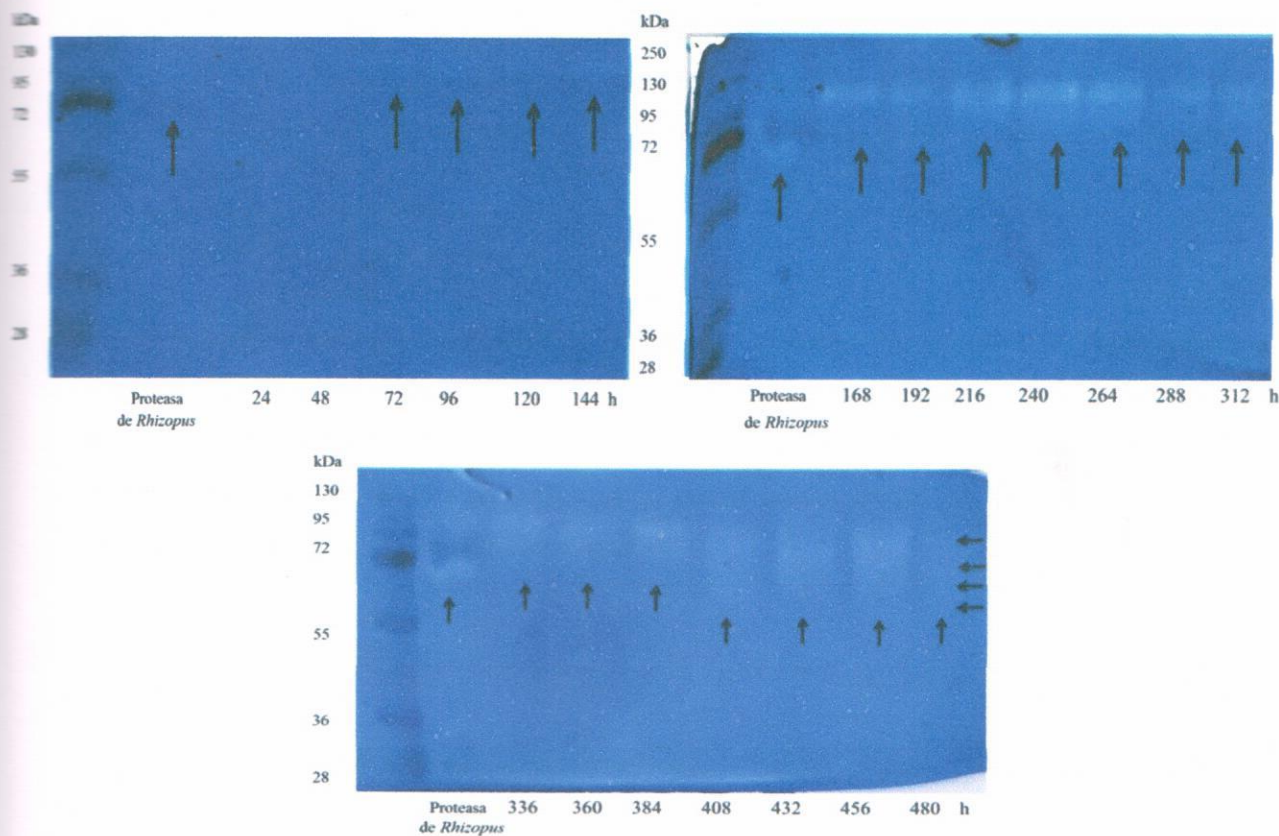
**Figura 2a.** Perfil de isoenzimas de lacasa obtenidos en cada punto de muestreo del cultivo con la cepa PoB de *P. ostreatus* en medio líquido.



**Figura 2b.** Perfil de isoenzimas de lacasa obtenidos en cada punto de muestreo del cultivo con la cepa PoB de *P. ostreatus* en medio líquido.

#### 9.1.7. Perfiles de isoenzimas con actividad enzimática proteasa extracelular por zimografía

En esta determinación se logró observar la presencia de al menos cuatro bandas (en los ECE del cultivo) entre los marcadores moleculares de 75 y 130 kDa, empleando caseína al 5% como sustrato, a un pH de 7.0. Se corrieron muestras con proteasas de *Rhizopus* como control positivo. Esto nos sugiere (en el caso de que exista el sistema de regulación enzimática) que estas isoenzimas pudieran ser las que están participando en la regulación de las isoenzimas de lacasa detectadas (figura 3). En los geles con los ECE que se pusieron a prueba a pH 9.0, no se observaron isoenzimas. Asimismo, en el caso de las proteasas ácidas, no se logró observar ninguna banda en el ensayo con SDS-PAGE.



**Figura 3.** Perfil de isoenzimas de proteasas (pH neutro 7.0) obtenidos en cada punto de muestreo del cultivo con la cepa PoB de *P. ostreatus* en medio líquido.

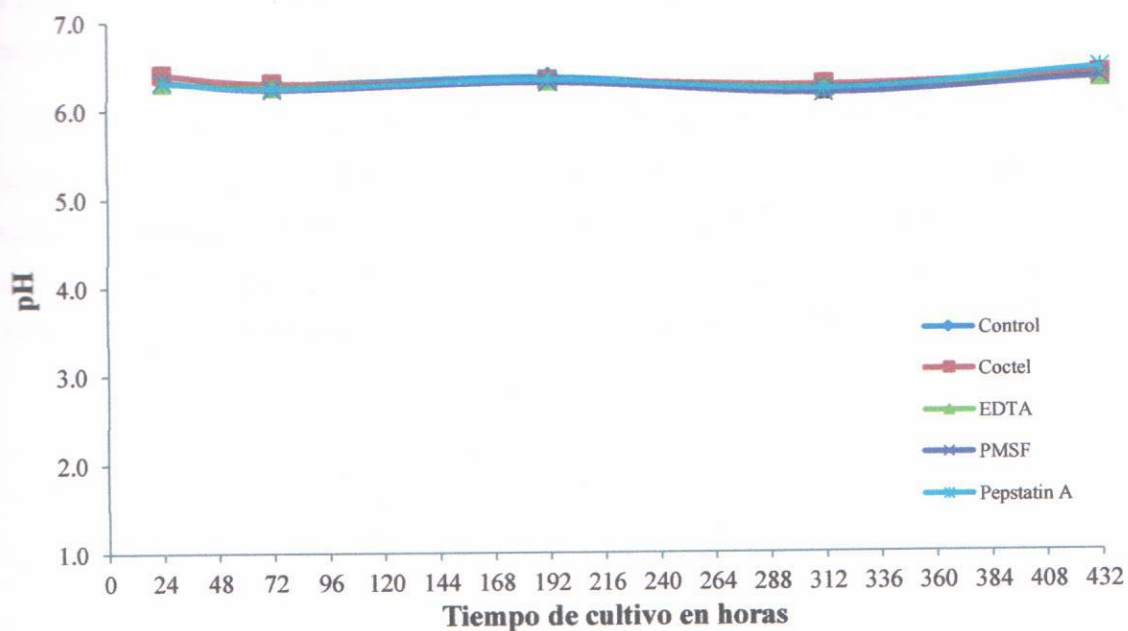
## 9.2. Segunda fase experimental

Los resultados de este segundo experimento corresponden con los cultivos en medio líquido de la cepa PoB de *P. ostreatus* bajo 5 tratamientos. El primero es un cultivo sin inhibidores, el cual se utilizó como testigo. El segundo, es un cultivo adicionado con un coctel de inhibidores (mezcla de inhibidores: AEBSF 100 milimolar, 1,10-fenantrolina 500 milimolar, 2.2 milimolar y E-64 1.4 milimolar). Asimismo, tres cultivos más, cada uno adicionado con el inhibidor específico para cada tipo de proteasa. Se empleó EDTA como inhibidor de proteasas con actividad óptima a pH alcalino. El PMSF se agregó para inhibir proteasas con actividad a pH

mentro. Por último, se realizó un cultivo con Pepstatin A, inhibidor de aspartato proteasas, las cuales hidrolizan a pH óptimo ácido. Cada tratamiento se realizó con 6 réplicas, en dos bloques experimentales (3 réplicas por bloque), tomando muestras a las 0, 72, 192, 312 y 432 h de cultivo. Los ECE se sometieron a las diferentes determinaciones analíticas previamente mencionadas.

### 9.2.1. Determinación de pH

El pH se midió directamente del ECE en el momento de cada toma de muestra. El pH inicial fue de 6.5 por lo que los valores de pH en los 5 tratamientos disminuyeron en promedio a 6.3. Los inhibidores no tuvieron efecto sobre el cambio de los valores de pH en el medio durante el cultivo. Por lo que podemos concluir que el amortiguador de pH en el medio, mantuvo constante los valores a través del cultivo (gráfica 7).



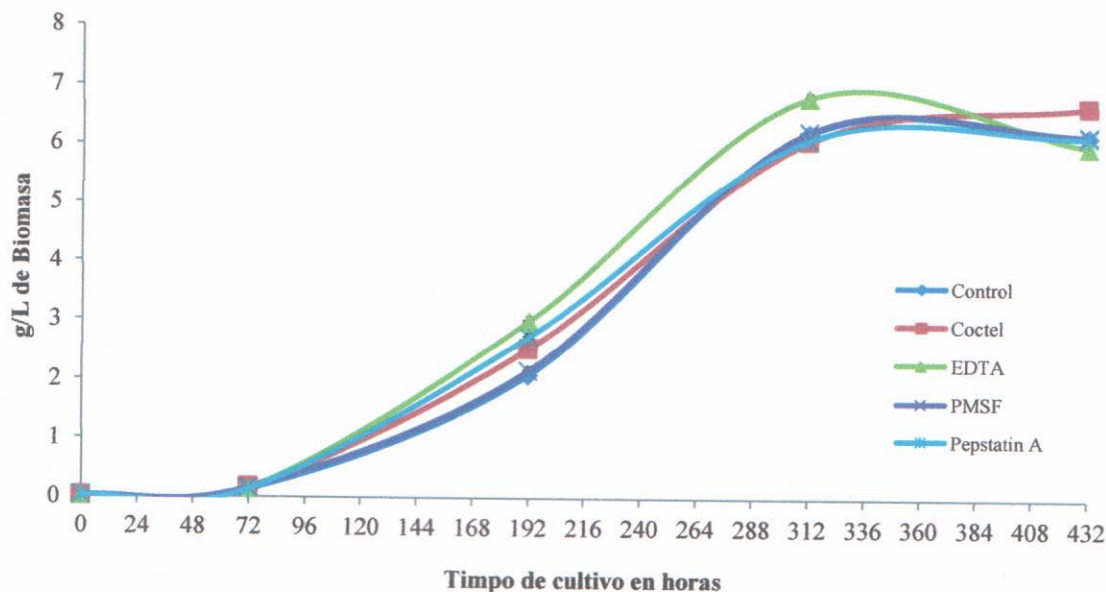
**Gráfica 6.** Cinética de pH del ECE del cultivo líquido (con inhibidores de proteasa) con la cepa PoB de *Pleurotus ostreatus*. Cada punto representa la media de seis réplicas,  $\pm$  su error estándar.

### 9.2.2. Producción de biomasa

El comportamiento de los datos en cuanto a la producción de biomasa fue similar en todos los tratamientos. Se lograron distinguir las tres fases de desarrollo del organismo (adaptación, exponencial y estacionaria).

En cuanto a la producción de biomasa máxima se notaron diferencias respecto a los tratamientos. En el cultivo con el coctel de inhibidores, el organismo produjo la mayor cantidad de biomasa con 6.688 g/L. En seguida, se encontró el tratamiento con EDTA (6.407 g/L). Los medios con PMSF obtuvieron una  $X_{\max}$  de 6.248 g/L. Asimismo, los valores con menor producción de biomasa fueron encontrados en los medios con Pepstatin A (6.202 g/L) y en el cultivo control (6.220 g/L). Las diferencias encontradas entre tratamientos no son estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ), lo cual indica que el factor tratamiento no afectó significativamente a la biomasa producida. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto del factor tiempo, excepto de la biomasa producida a las 312 y 432 h (en los 5 tratamientos), debido a que el organismo ya se encuentra en fase estacionaria en estos dos puntos (gráfica 6).

La velocidad específica de crecimiento se obtuvo directamente del análisis con la herramienta Solver (Excel). La  $\mu$  para el control fue de  $0.042 \text{ h}^{-1}$ , en tanto en el cultivo con la actividad proteasas inhibida con el coctel la  $\mu$  es de  $0.041 \text{ h}^{-1}$ . Asimismo, cuando se inhibió la actividad proteasa alcalina (EDTA), neutra (PMSF) y ácida (Pepstatin A) la  $\mu$  fue de 0.054, 0.042,  $0.033 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente sin diferencias estadísticas ( $\alpha=0.05$ ).



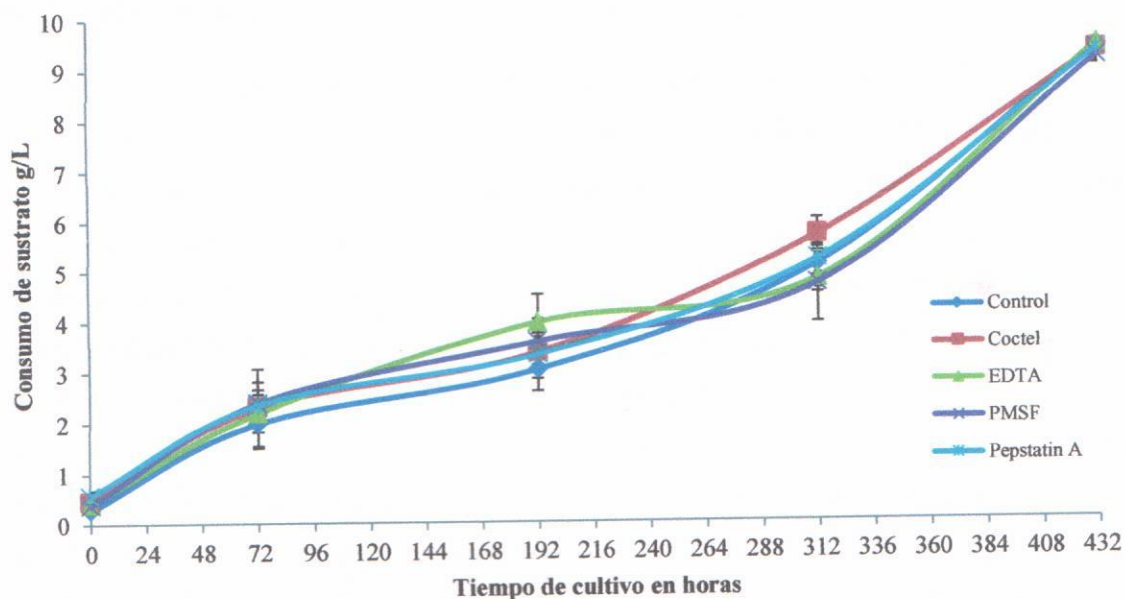
**Gráfica 7.** Cinética de crecimiento de la cepa PoB de *Pleurotus ostreatus* en medio mineral líquido con inhibidores de proteasa. Cada punto representa la media  $\pm$  su error estándar, de seis réplicas.

### 9.2.3. Determinación del consumo de sustrato

Al inicio del cultivo, en las dos primeras tomas de muestra, las concentraciones de sustrato consumido, entre tratamientos, no difieren estadísticamente ( $\alpha=0.05$ ). En el siguiente punto, a las 192 h, los resultados mostraron diferencias más notorias en la cantidad de azúcar residual en los medios evaluados, sin haber diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Asimismo, en los ECE tomados a las 312 h, se notó el consumo de glucosa más alto en los cultivos con el coctel de inhibidores de proteasas (5.68 g/L), seguido del tratamiento con Pepstatin A (5.19 g/L) y el control (5.09 g/L). En este punto, se observó menor consumo de glucosa en los cultivos tratados con EDTA (4.80 g/L) y con PMSF (4.70 g/L). Los resultados en este punto indican que el factor tratamiento no afectó significativamente el consumo de sustrato, además de que la interacción tratamiento x hora de cultivo resultó no significativa ( $\alpha=0.05$ ). No se aprecian diferencias estadísticamente significativas en el consumo de sustrato en los ECE tomados al final del cultivo. Finalmente, los resultados muestran evidencia de que no hay diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) en cuanto



al consumo de la fuente de carbono al inhibir la actividad de proteasas, como se muestra en la gráfica 8, lo cual indica que el factor tratamiento en esta determinación no está causando un efecto sobre los resultados obtenidos.



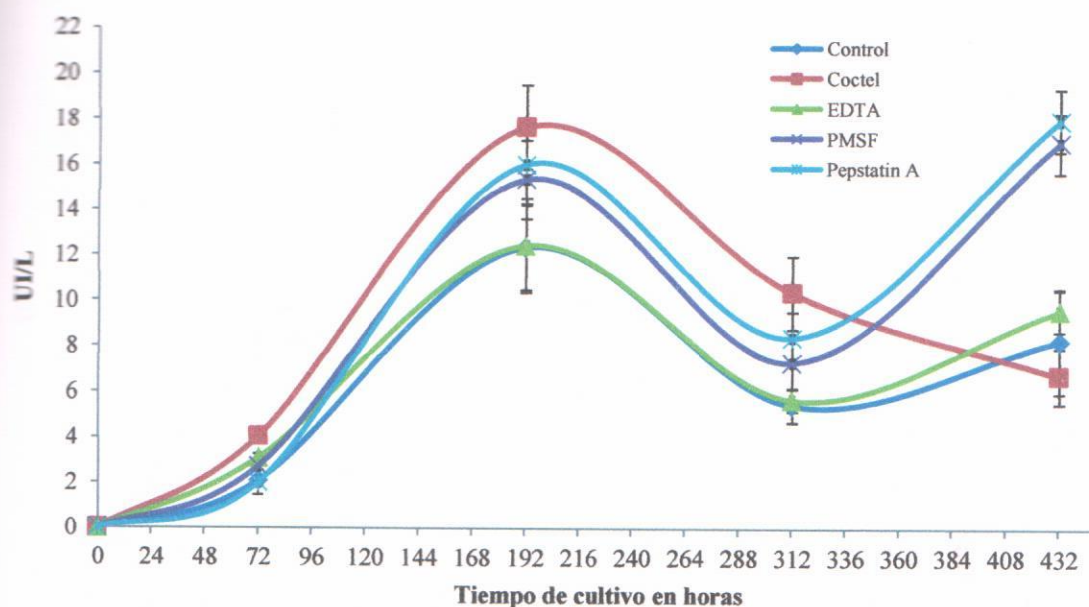
**Gráfica 8.** Consumo de sustrato (g/L) de cada punto de muestreo del cultivo líquido (actividad proteasa inhibida) con la cepa PoB de *P. ostreatus*. Cada punto representa la media de seis réplicas,  $\pm$  su error estándar.

#### 9.2.4. Determinación de actividad lacasa

La cuantificación de la actividad lacasa muestra que ésta aumenta, con respecto al control, en los tratamientos con la actividad proteasa inhibida. En primer lugar y como se esperaba, el medio adicionado con el coctel de inhibidores resultó con los valores de actividad más altos (17.66 UI/L pico más alto a las 192 h, hasta las 312 h con 10.37 UI/L). Esto debido a que esta mezcla contiene inhibidores para los diferentes tipos de proteasas, por lo que se esperaba la mayor actividad de lacasas en los ECE de este tratamiento. En segundo lugar, se encuentran los cultivos tratados con Pepstatin A (actividad proteasa ácida inhibida), en los cuales se

obtuvo el valor de actividad más alto al final del cultivo (18 UI/L). Se apreció el mismo efecto en los cultivos con PMSF (inhibidor de proteasas neutras) y también se mostró el pico más alto de actividad a las 432 h con un valor de 17.03 UI/L. En cuanto al cultivo con EDTA y el control se encontraron los valores más bajos de actividad (sin diferencias significativas durante todo el cultivo,  $\alpha=0.05$ ), lo cual indica que las proteasas inhibidas por EDTA no presentaron ningún efecto sobre la actividad de lacasas.

Los datos obtenidos de los cinco tratamientos muestran la mayor actividad lacasa a las 192 h, con diferencias estadísticas ( $\alpha=0.05$ ) entre los tratamientos con PMSF, Pepstatin A y coctel, con respecto al control. Asimismo, se encontraron diferencias estadísticas entre los cultivos con coctel comparado con los cultivos con PMSF y Pepstatin. El mismo efecto se presentó a las 312 h de cultivo. En el último punto evaluado, se muestra mayor actividad en los cultivos con inhibidores de proteasas neutras y ácidas, lo cual indica que las proteasas neutras y ácidas son las que mayor efecto tienen sobre la actividad de lacasas, debido a que estos dos tratamientos muestran el mismo efecto durante los puntos de cultivo evaluados sin presentar diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ). Al final del cultivo, los tratamientos con coctel de inhibidores, proteasa alcalina inhibida (EDTA) y el control no presentan diferencias estadísticas. El EDTA debido a que no mostró efecto alguno y el coctel quizás por la degradación de los inhibidores con el paso del tiempo. Finalmente, se puede notar el efecto de los tratamientos con inhibidores sobre la actividad de lacasa a través del tiempo, como se observa en la gráfica 9.

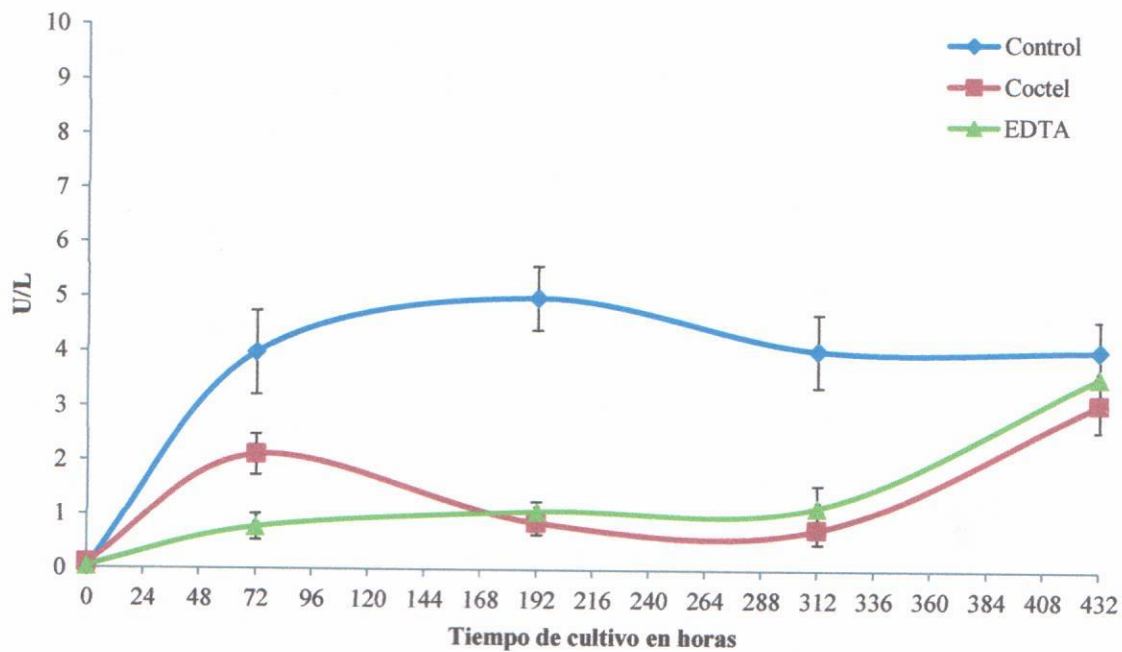


**Gráfica 9.** Actividad lacasa (UI/L) extracelular durante el cultivo con inhibidores de proteasas. Cada punto representa la media de seis réplicas,  $\pm$  su error estándar.

## 9.2.5. Determinación de actividades proteasa

### 9.2.5.1. Actividad proteasa a pH alcalino (9.0)

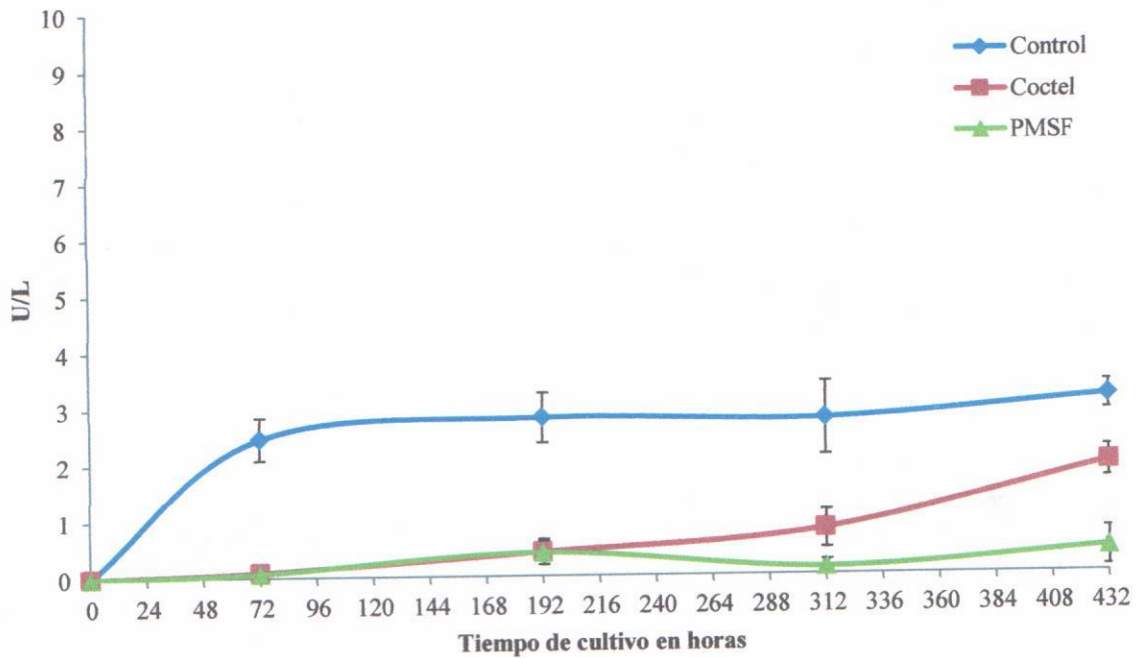
Se determinó la actividad proteasa a pH alcalino para los tratamientos con el coctel, EDTA y el cultivo control. En los ECE tomados a las 72 h de cultivo, el EDTA inhibe con más intensidad a la actividad proteasa. En este punto, el coctel disminuye la actividad aproximadamente en un 50%. En los dos puntos siguientes, la actividad en los tratamientos con los inhibidores, presenta el mismo patrón de inhibición y se puede notar que disminuyen 4.5 veces su actividad (gráfica 10). Al final del cultivo la actividad proteasa es similar en los tres tratamientos (1.38 U/mL). Se determinaron diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre los cultivos control y los adicionados con inhibidores (coctel y EDTA), excepto en el último punto analizado.



**Gráfica 10.** Actividad proteasa (U/L) extracelular, a pH alcalino 9.0, durante el cultivo con inhibidores de proteasas. Cada punto representa la media de seis réplicas,  $\pm$  su error estándar.

#### 9.2.5.2. Actividad proteasa a pH neutro (7.0)

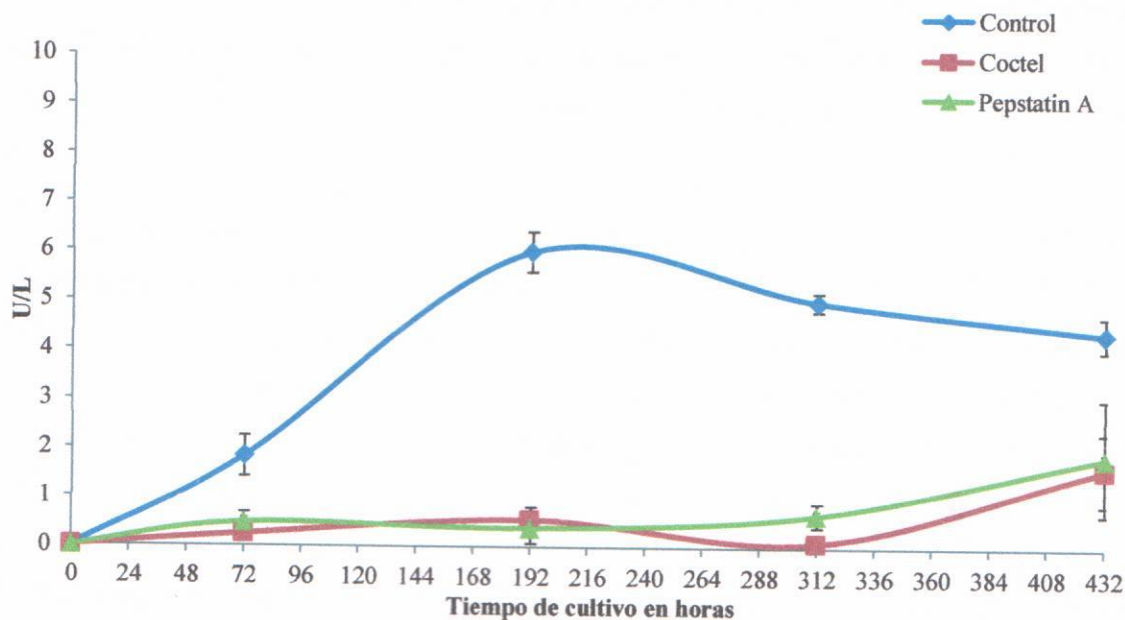
La actividad proteasa neutra se registró en los 4 puntos evaluados del cultivo y se determinó para los tratamientos con coctel, PMSF y el grupo control. Los resultados muestran una actividad constante (alrededor de 2.8 U/L) en el tratamiento control. Los cultivos con inhibidores disminuyen la actividad (7 veces) sin diferencias estadísticas entre ellos hasta las 192 h ( $\alpha=0.05$ ). A las 312 h, el experimento con coctel aumenta sus valores de actividad y el tratamiento con PMSF mantiene la actividad baja hasta el final del cultivo. Los resultados muestran que el PMSF es mejor inhibidor, comparado con el contenido en el coctel (para proteasas neutras), puesto que mantiene valores bajos de hidrólisis durante todo el cultivo, efecto que se puede observar en la gráfica 11.



**Gráfica 11.** Actividad proteasa (U/L) extracelular, a pH neutro 7.0, durante el cultivo con inhibidores de proteasas. Cada punto representa la media de seis réplicas,  $\pm$  su error estándar.

### 9.2.5.3. Actividad proteasa a pH ácido (2.0)

A continuación, se evaluó la actividad proteasa de tipo ácido y los datos fueron obtenidos de los ECE del cultivo control, cultivo con coctel de inhibidores y con Pepstatin A. Se observó actividad proteasa (control) en el punto de las 72 h con 1.83 U/L, el valor más alto registrado fue de 5.99 U/L (192 h). Posteriormente, la actividad comenzó a disminuir hasta el último punto evaluado (4.36 U/L, 432 h). Los tratamientos con inhibidores resultaron muy efectivos sobre las proteasas al disminuir la actividad durante todo el cultivo. No se registraron diferencias estadísticas entre los dos tratamientos con inhibidores ( $\alpha=0.05$ ) (gráfica 12).



**Gráfica 12.** Actividad proteasa (U/L) extracelular, a pH ácido 2.0, durante el cultivo con inhibidores de proteasas. Cada punto representa la media de seis réplicas,  $\pm$  su error estándar.

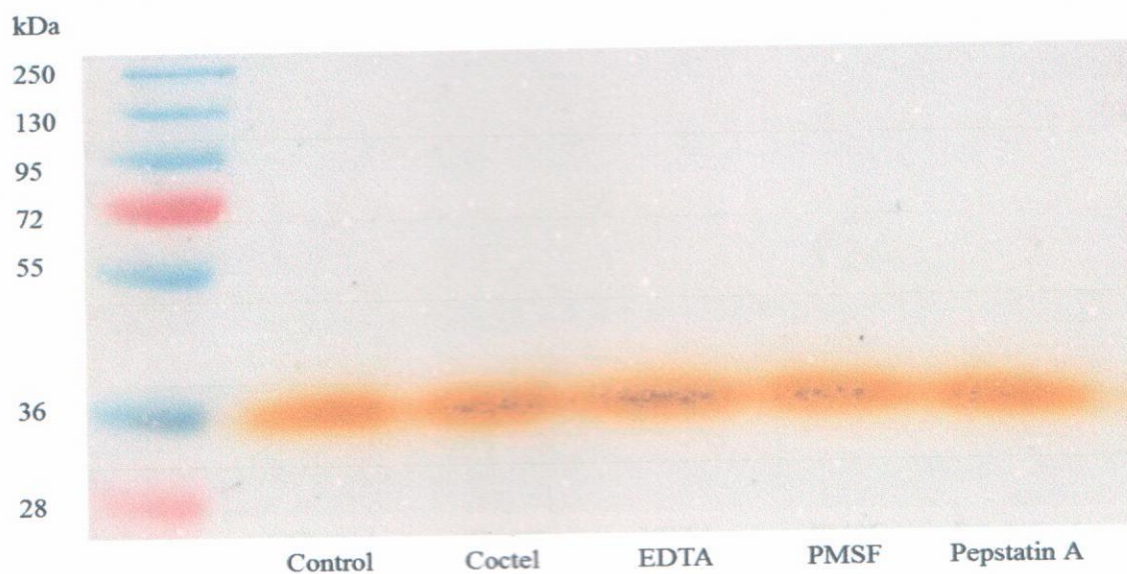
### 9.2.6. Perfiles de isoenzimas con actividad enzimática lacasa extracelular por zimografía

Los ECE obtenidos de los cultivos (72, 92, 312 y 432 h de cultivo) fueron corridos en geles de acrilamida, esto con la finalidad de comparar la presencia de isoenzimas de lacasa en cada punto de muestreo con respecto al tratamiento. Para este fin las muestras se corrieron de la siguiente manera: las columnas son cada tratamiento, Control: cultivo sin inhibidor; Coctel: cultivo con coctel de inhibidores; EDTA: cultivo con inhibidor de proteasas alcalinas; PMSF: cultivo con inhibidor de proteasas neutras y Pepstatin A: cultivo con inhibidor de proteasas ácidas.

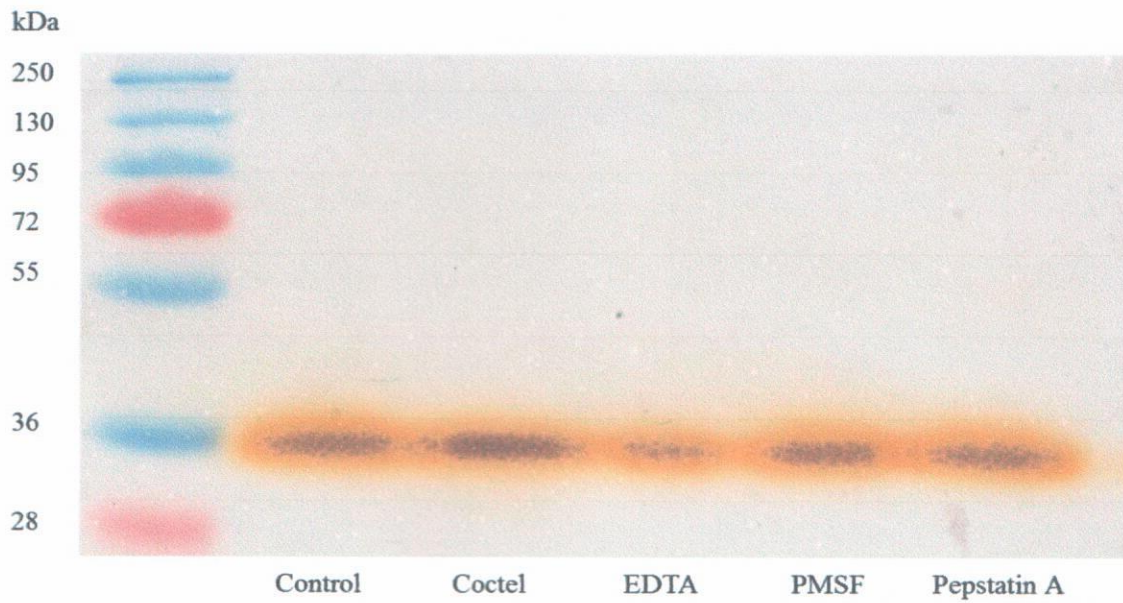
Los ECE obtenidos a las 72 h, permitieron detectar la presencia de una banda en cada tratamiento y se localizó a la altura del marcador molecular de 36 kDa (figura 4). Los ECE obtenidos a las 92 h de cultivo presentaron una banda en cada isoenzima de lacasa en cada tratamiento. Ésta se trata de la misma isoenzima de aproximadamente 36 kDa vista a las 72 h

de cultivo (figura 4). No obstante, se logran percibir diferencias en la intensidad oxidativa entre las bandas de cada tratamiento (unas bandas se notan más tenues). La banda de la isoenzima encontrada en los medios con el coctel es más intensa, tal y como se muestra en la figura 5.

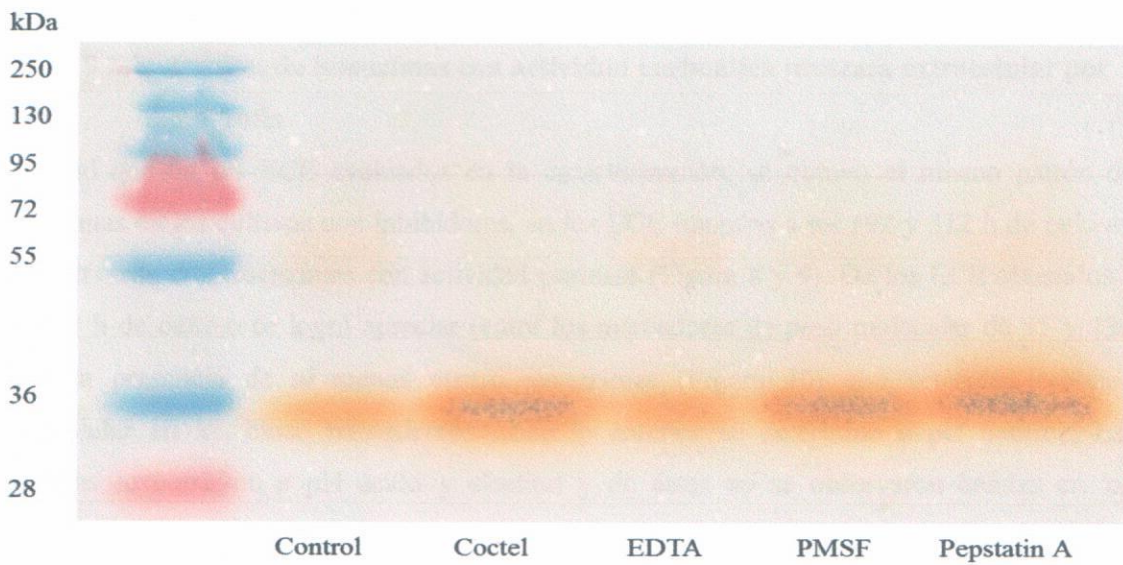
De las muestras tomadas a las 312 h de cultivo se logró detectar la presencia de dos isoenzimas de lacasa. La primera, con poca intensidad, a la altura del marcador molecular de 55 kDa y la segunda, con un peso molecular aproximado de 36 kDa. Un rasgo importante que se puede observar, es que las bandas obtenidas de los ECE con coctel, EDTA, PMSF y Pepstatin A son más intensas con respecto a la isoenzima en la columna del control (Figura 6). Estas mismas características presentaron las isoenzimas de los ECE obtenidos a las 432 h de cultivo, las cuales tienen una mayor intensidad de oxidación en los geles corridos (figura 7). Finalmente, los resultados muestran las diferencias en intensidad de las bandas con respecto al tratamiento.



**Figura 4.** Perfil de isoenzimas de lacasa obtenidos a las 72 h de cultivo con la cepa PoB de *P. ostreatus* en medio líquido con inhibidores.

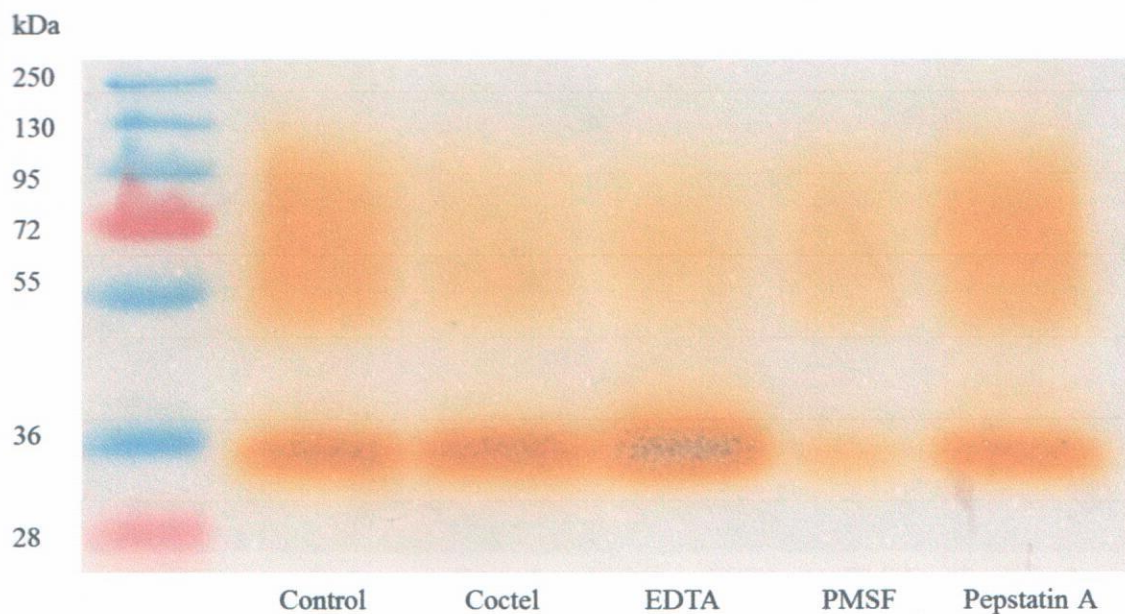


**Figura 5.** Perfil de isoenzimas de lacasa obtenidos a las 192 h de cultivo con la cepa PoB de *P. ostreatus* en medio líquido con inhibidores.



**Figura 6.** Perfil de isoenzimas de lacasa obtenidos a las 312 h de cultivo con la cepa PoB de *P. ostreatus* en medio líquido con inhibidores.

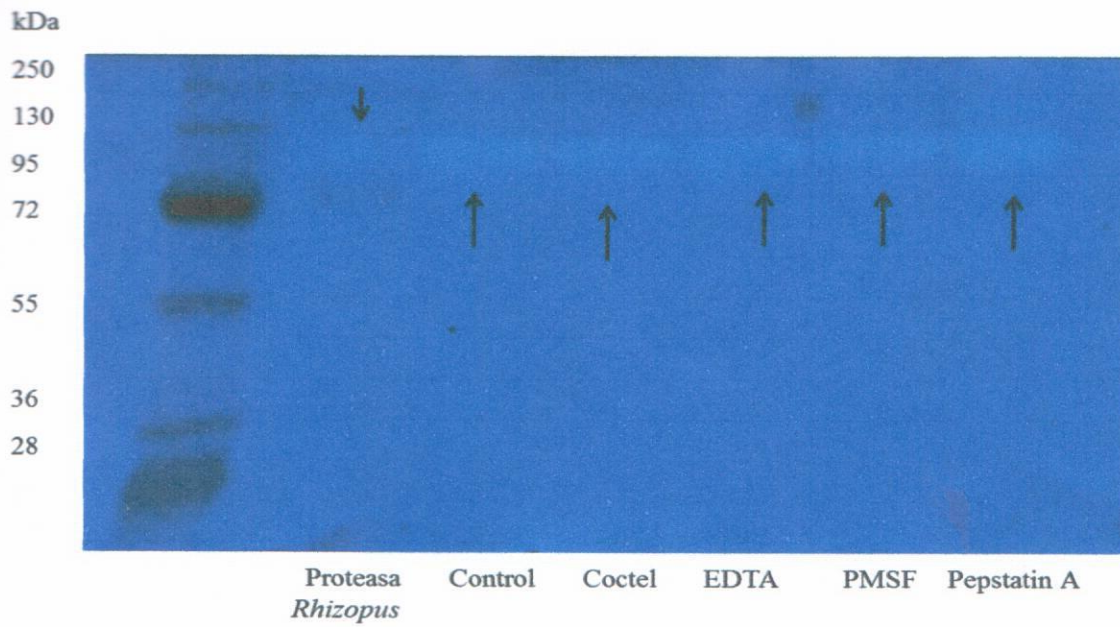




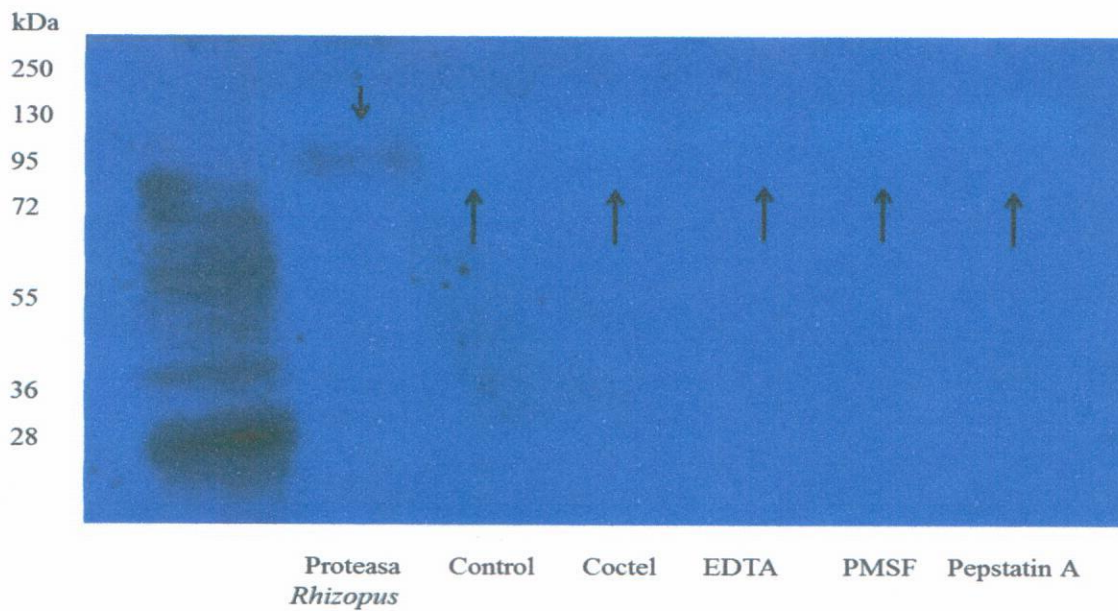
**Figura 7.** Perfil de isoenzimas de lacasa obtenidos a las 432 h de cultivo con la cepa PoB de *P. ostreatus* en medio líquido con inhibidores.

#### 9.2.7. Perfiles de isoenzimas con actividad enzimática proteasa extracelular por zimografía

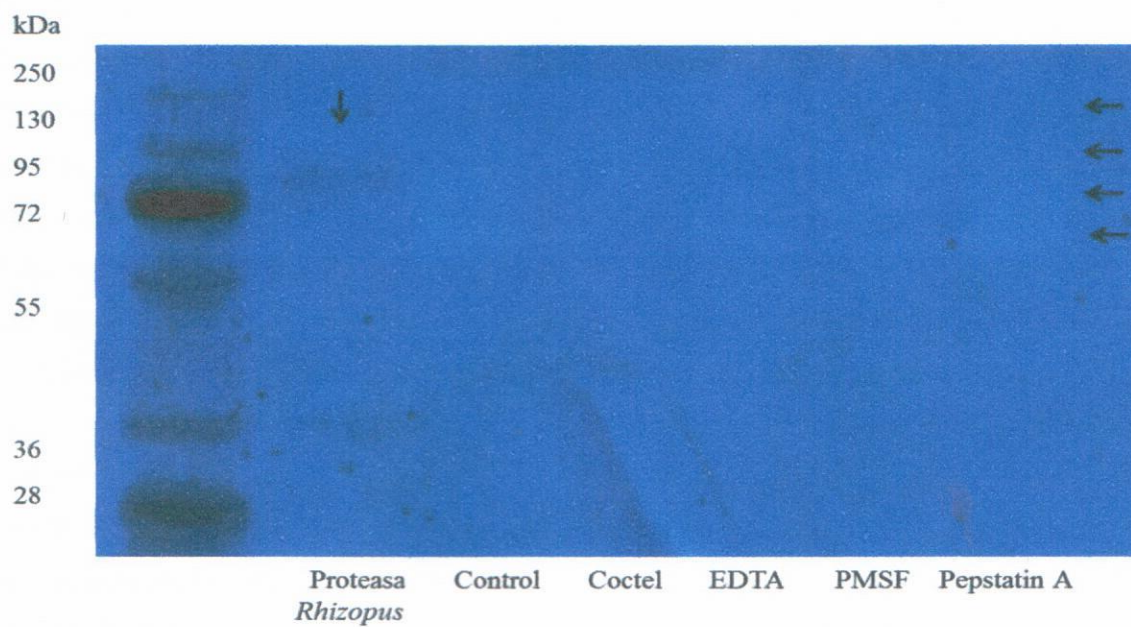
Al igual que en los ECE evaluados en la caracterización, se obtuvo el mismo patrón de isoenzimas en los cultivos con inhibidores, en los ECE tomados a las 192 y 312 h de cultivo, se observaron dos isoenzimas con actividad proteasa (Figura 8 y 9). De los ECE obtenidos a las 432 h de cultivo se logró apreciar (entre los marcadores de peso molecular de 55 y 130 kDa) la presencia de al menos cuatro isoenzimas (Figura 10) con actividad proteasa extracelular en los cinco tratamientos (todo lo anterior se determinó a pH neutro). Las muestras se corrieron a pH ácido y alcalino y de éstas no se observaron bandas en los zimogramas.



**Figura 8.** Perfil de isoenzimas de proteasas obtenidos a las 192 h de cultivo con la cepa PoB de *P. ostreatus* en medio líquido con inhibidores.



**Figura 9.** Perfil de isoenzimas de proteasas obtenidos a las 312 h de cultivo con la cepa PoB de *P. ostreatus* en medio líquido con inhibidores.



**Figura 10.** Perfil de isoenzimas de proteasas obtenidos a las 432 h de cultivo con la cepa PoB de *P. ostreatus* en medio líquido con inhibidores.

## 10. DISCUSIÓN

En primer lugar, se cuantificó la producción de biomasa durante el cultivo con lo que se observaron las tres fases de crecimiento del organismo. Dado que el modelo logístico empleado para el cálculo de la biomasa (Solver Excel) considera los tiempos de adaptación y estacionaria, el valor de la  $\mu$  refleja de manera integral los tiempos de retardo del crecimiento exponencial. La fase de adaptación duró hasta las 120 h. Por el contrario en otros estudios se han encontrado fases de adaptación que duran alrededor de las 200 h (Díaz 2012), por lo que el organismo empleado en este estudio presentó un periodo de adaptación más corto. En el caso de la velocidad específica de crecimiento, Tlecuítl-Beristain y cols. (2008) obtuvieron valores de  $0.02 \text{ h}^{-1}$  con una  $X_{\text{max}}$  de 7.8 con una cepa de hongos de la misma especie y en medio líquido. En comparación con nuestros resultados, la  $\mu$  obtenida fue similar y por el contrario la producción de biomasa fue menor. En los cultivos líquidos (pH 6.5) evaluados por Téllez-Téllez y cols. (2008) obtuvieron una  $\mu$  de  $0.018 \text{ h}^{-1}$ , menor a la obtenida en este estudio (0.02). Por tanto, el organismo evaluado en este estudio mostró una adaptación más rápida y con una velocidad específica de crecimiento similar a otras cepas de la misma especie puestas a prueba.

Salmones y Mata (2005) mencionaron que la enzima lacasa está asociada con la rápida adaptación del organismo al sustrato. Con relación a esto, en este estudio inició el incremento en los valores de actividad lacasa a partir de las 92 h de cultivo, momento aproximado en que termina la adaptación del organismo en nuestro estudio. Por el contrario, Téllez-Téllez y cols. (2008) determinaron valores altos de actividad lacasa al final del cultivo de *P. ostreatus*, alrededor de las 400 h. En cambio, Iandolo y cols. (2011) obtuvieron los picos más altos de actividad lacasa durante los primeros días de cultivo (día 3 y 4) con *P. ostreatus*. Sin embargo, en nuestro estudio se observaron valores altos durante la fase exponencial de crecimiento, alrededor de las 192 h de cultivo. No obstante, se determinaron los valores más altos de actividad, al final del cultivo, a las 432 y 480 h de cultivo.

En el presente estudio, se logró identificar actividad (por espectrofotometría) de los tres tipos de proteasas respecto a su pH óptimo de actividad durante todo el cultivo con la cepa PoB de *P. ostreatus*. Se lograron detectar mediante zimografía, a pH neutro (7.0), isoenzimas

de proteasas con diferente peso molecular (kDa) a partir de las 92 h de cultivo. Éstas permanecen constantes durante todo el cultivo aumentado la cantidad de bandas a partir de las 216 h (se observaron al menos dos bandas entre los marcadores de 95 y 130 kDa) y al final de cultivo se aprecian isoenzimas de proteasas (al menos 4 bandas) entre los marcadores de 55 y 130 kDa.

Existen pocos estudios en la literatura sobre las proteasas de *Pleurotus* spp. (Dorneles y cols. 2014). En este sentido, hay algunos estudios en los que se comparó la actividad proteolítica entre diferentes especies de hongos, puesto que se conoce de su efectiva producción de proteasas extracelulares. Por ejemplo, en un estudio realizado por Campos y cols. (2011) demostraron que *P. ostreatus*, a pesar de tener un sistema versátil capaz de adaptarse a diferentes sustratos con diferentes concentraciones de nitrógeno, produce menos proteólisis que *L. edodes*. Asimismo, se ha identificado, por diversos métodos, la presencia de proteasas en medios de cultivo con *Pleurotus*. Por ejemplo, Cui y cols. (2007) identificaron una única banda de proteasa de 28 kDa producida por *P. citrinopileatus*, la cual presentó la mayor actividad a pH alcalino.

Gran parte de las proteasas ácidas descritas presentan menor peso molecular con respecto a proteasas neutras (Dorneles y cols. 2014). Es el caso de una aspartato proteasa identificada en cultivos de *P. eryngii*, la cual fue descrita con una masa molecular de 11.5 kDa (Wang y Ng 2001). En este estudio no fue posible revelar bandas de proteasas ácidas (aun cuando se registró actividad proteasa ácida por espectrofotometría) por el método SDS PAGE, esto quizás por que poseen también un pequeño tamaño al igual que las proteasas ácidas reportadas en la literatura. Si bien es cierto que se están empleando métodos de purificación más efectivos para aislar proteasas de *Pleurotus*, en su mayoría son para aplicaciones industriales (Kumar y cols. 2005, Karimi 2015, Kumar y cols. 2015, Sethi y Gupta 2015, Sila y cols. 2015, Srilakshmi y cols. 2015). En definitiva, pocos trabajos se han dedicados al estudio de la participación de proteasas en procesos biológicos, por ejemplo en mecanismos de regulación enzimática como algunos autores han sugerido (Palmieri y cols. 2000, 2001, Rodríguez y cols. 2008). En este estudio se llevó a cabo un segundo experimento para evaluar el efecto de la actividad de proteasas sobre lacasas extracelulares producidas por la cepa PoB de *P. ostreatus*

cultivado en medio líquido y de esta manera generar información sobre esta interacción enzimática.

En la evaluación del efecto de la actividad proteasa sobre la actividad de lacasas extracelulares, la adición al cultivo de diferentes inhibidores de proteasas no tuvo diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la producción de biomasa, lo cual indica que el factor tratamiento no afectó la producción de biomasa. Por otra parte, el consumo de sustrato no presentó diferencias estadísticas ( $\alpha=0.05$ ) entre tratamientos de los ECE del cultivo. No hay reportes de estos parámetros evaluados cuando se usan inhibidores de proteasas, por lo que éste es uno de los primeros estudios en los que se determina si hay efecto de la inclusión de inhibidores de proteasas en cuanto a los parámetros de generación de biomasa y consumo de sustrato de la cepa PoB de *P. ostreatus*, cuando se cultiva en medio líquido.

La cuantificación de actividad lacasa muestra que ésta aumenta, con respecto al control, en los tratamientos con la actividad de proteasas inhibida. Sin embargo, los valores de actividad lacasa son diferentes en cada tratamiento. Entre los cultivos con PMSF y Pepstatin A (Actividades proteasa neutra y ácida inhibidas, respectivamente) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Estos dos grupos fueron diferentes estadísticamente con respecto al control y al cultivo con el coctel. El tratamiento con EDTA (inhibidor de metaloproteasas) mostró un comportamiento similar al del control, es decir, no hubo efecto alguno de este factor sobre la actividad de lacasas. Esto pudiera explicarse con el hecho de que la mayoría de las metaloproteasas reportadas tienen otro tipo de función, por ejemplo en la formación de micelio como lo menciona Dorneles y cols. (2014). Asimismo, en una investigación realizada por Datta (1992), determinó que no hay un aumento en la actividad de enzimas ligninolíticas respecto a la presencia de proteasas de tipo ácido. No obstante, en nuestro estudio se demostró que al emplear inhibidores de proteasas ácidas en los medio de cultivo, la actividad lacasa aumenta, más cuando las proteasas se inhiben utilizando un coctel de inhibidores. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Palmieri y cols. en el 2000, quienes utilizaron un coctel para disminuir la hidrólisis causada por proteasas y de este modo obtuvieron una mayor actividad lacasa. Palmieri y cols. (2000) identificaron y purificaron una isoenzima de lacasa de 75 kDa, que se pierde en la fase temprana de

crecimiento de *Pleurotus ostreatus*. Estos autores sugieren que dicha pérdida se debe a la presencia de proteasas extracelulares. Un año más tarde, el mismo grupo de investigación identificó la presencia de una proteasa en los medios extracelulares, la cual presentaba una actividad óptima a pH neutro. Shaba y Baba (2012) registraron valores altos de actividad proteasa a pH 7.0, por lo que sugieren la presencia de proteasas neutras en los cultivos de *G. sepiarum* y *P. ostreatus*. Asimismo, Hossain y cols. (2006) registraron un pH óptimo de 8 (alcalino) para proteasas producidas por *A. flavus* y *A. niger*. Por el contrario, Coral y cols. (2009) registraron actividad proteasa a pH ácido (3.0) y alcalino (9.0) en cultivos con *A. niger*. Wang y Ng (2001) identificaron una aspartato proteasa con actividad óptima a pH 5.0 en cultivos de *P. eryngii*. En los estudios anteriores no se reportó la presencia de los tres tipos de proteasas en los cultivos de hongos evaluados.

Como se observa en los resultados de actividad proteasa del presente estudio, los inhibidores la disminuyen en diferente proporción. El PMSF (inhibidor de proteasas neutras) disminuyó en un 50% la actividad, lo que sugiere la participación de proteasas de serina en la proteólisis de enzimas lacasa. El PMSF ha resultado ser buen inhibidor y, por ejemplo, Staszczak y cols. (2000) encontraron una disminución en la actividad específica de proteasas extracelulares, después de la adición de este compuesto. En consecuencia, la actividad de lacasas y peroxidasas extracelulares aumentó. En su estudio tomaron como factor la ausencia de una fuente de carbono y nitrógeno, pues sugieren que esta condición pudiera ser favorable para la producción de proteasas y así disminuir la actividad de lacasas. Al final reportan un aumento en la actividad de enzimas ligninolíticas. No obstante resulta confuso, pues no se determina si el aumento en la actividad de lacasas y peroxidasas es por la inhibición de proteasas o por la ausencia de nutrientes en el medio. A diferencia, en nuestro estudio sólo se consideró la inhibición de proteasas, y con esto se obtuvo un aumento estadísticamente significativo ( $\alpha=0.05$ ) en la actividad de lacasas en los tratamientos con el coctel, PMSF y Pepstatin A, con respecto al control.

## 11. CONCLUSIONES

- ❖ Se caracterizó la producción de lacasas y proteasas extracelulares en la cepa PoB de *Pleurotus ostreatus*. En dicha caracterización, la actividad extracelular de lacasa obtuvo los valores más altos durante la fase exponencial y se identificaron dos isoenzimas aparentemente de diferente peso molecular.
- ❖ En cuanto a la producción de proteasas se identificaron los tres tipos (con respecto a su pH óptimo de actividad) durante el tiempo que duró el cultivo. Se obtuvo la presencia de al menos cuatro isoenzimas de proteasas posicionadas entre los 70 y 130 kDa aproximadamente, con respecto al marcador de peso molecular, a pH neutro.
- ❖ La actividad de lacasas se ve afectada de manera positiva al inhibir a los diferentes tipos de proteasas, particularmente por las proteasas de tipo ácido y neutro, las cuales aumentan aproximadamente 1.33 veces la actividad de lacasas. Las proteasas inhibidas por EDTA (alcalinas) no presentan efecto sobre la actividad de lacasas.



## 12. PERSPECTIVAS

1. En este estudio se determinó la presencia de proteasas con respecto al pH óptimo de actividad. Sin embargo este método, sin la previa purificación de las enzimas, no permite visualizar a las proteasas específicas presentes en el medio, por lo que sería importante purificar e identificar a las proteasas presentes y ser más puntual en cuales están participando en la regulación de enzimas lacasa y confirmar el pH óptimo de actividad.
2. No fue posible determinar la presencia de proteasas ácidas por medio de zimografía, debido probablemente a que se han reportado como enzimas de muy bajo peso molecular, por lo que se sugiere otro método para su identificación (por ejemplo cromatografía de alta resolución).
3. La secuenciación de aminoácidos de proteasas ayudaría a su identificación y así se podría generar otro tipo de estrategias moleculares (silenciamiento génico o Knockout) para disminuir su actividad con la finalidad de aumentar más la actividad de lacasas, pues en este estudio se observó un aumento significativo al emplear inhibidores comerciales.

### 13. REFERENCIAS

- Anson ML. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J Gen Physiol* Sep 22: 79-89.
- Balachandra DS, Dosoretz GC, Adinarayana RC y Grethlein EH. 1995. Extracellular proteases produced by the wood-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* under ligninolytic and non-ligninolytic conditions. *Arch Microbiol* 163: 254-258.
- Barrett AJ. 1992. Classification of Peptidases. *Methods Enzymol* 244: 1-15.
- Bello-Gil D, Carrera-Bocourt E y Díaz-Maqueira Y. 2006. Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. *ICIDCA* 40(2): 45-50.
- Bertrand B, Martínez-Morales F y Trejo-Hernández MR. 2013. Fungal laccases: induction and production. *Rev Mex Ing Quim* 12(3): 473-488.
- Campos C, Dias DC, Santos MP, Medeiros C, Valle JSdo, Vieira ESN, Colauto NB y Linde GA. 2011. Seleção de Basidiomicetos Proteolíticos. *Arq Ciênc Vet Zool* 14(1): 45-49.
- Cañas PAI. 2009. Diseño de nuevos sistemas lacasa-mediador: empleo de mediadores de origen natural y mejora de lacasas por evolución dirigida. Memoria de Doctorado en Ciencias Ambientales. Universidad de Alcalá.
- Chandra R y Chowdhary P. 2015. Properties of bacterial laccases and their application in bioremediation of industrial wastes. *Environ Sci Processes Impacts* DOI: 10.1039/c4em00627e.
- Claus H. 2003. Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch Microbiol* 179: 145-150.
- Claus H. 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* 35 (1-2):93-96.
- Coconi-Linares N, Ortiz-Vazquez E, Fernandez F, Loske AM y Gomez-Lim MA. 2015. Recombinant expression of four oxidoreductases in *Phanerochaete chrysosporium* improves degradation of phenolic and non-phenolic substrates. *J Biotechnol* 209:76-84.

- Cohen R. 2002. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 58: 582-594.
- Coral G, Arikan B, Unaldi MN y Guvenmez H. 2009. Thermostable alkaline protease produced by *Aspergillus niger* strain. *J Microbiol* 53(4): 491-498.
- Cui L, Liu QH, Wang HX y Ng TB. 2007. An alkaline protease from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 75: 81-85.
- Datta A. 1992. Purification and Characterization of a Novel Protease from Solid Substrate Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*\*. *J Biol Chem* 267(2): 728-736.
- Dhakar K, Kooliyottil R, Joshi A y Pandey A. 2015. Recombinant expression of four oxidoreductases in *Phanerochaete chrysosporium* improves degradation of phenolic and non-phenolic substrates. *Indian J Biotechnol* 14: 81-86.
- Díaz GR. 2013. Patrones de lacasas de *Pleurotus ostreatus* desarrollado en fermentación sumergida a diferentes pH del medio de cultivo. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Dorneles IF, Ferreira OR, Vaz ACA, Brugnari T, Castoldi R, Marina PR y Marques SCG. 2014. Proteases of Wood Rot Fungi with Emphasis on the Genus *Pleurotus*. *Biomed Res Int* 2015: 1-11.
- Giardina P y Sannia G. 2015. Laccases: old enzymes with a promising future. *Cell Mol Life Sci* 72: 855-856.
- Goudopoulou A, Krimitzas A y Typas AM. 2010. Differential gene expression of ligninolytic enzymes in *Pleurotus ostreatus* grown on olive oil mill wastewater. *Appl Microbiol Biotechnol* 88: 541-551.
- Grace KS, Faraco V, Amore A, Birolo L, Giangrande C, Thomaz SV, Pandey A y Ricardo SC. 2012. Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse. *Bioresour Technol* 114: 735-739.

- Grace KS, Faraco V, Amore A, Junior LLA, Thomaz SV y Ricardo SC. 2015. Statistical Optimization of Laccase Production and Delignification of Sugarcane Bagasse by *Pleurotus ostreatus* in Solid-State Fermentation. *Biomed Res Int* 2015: 1-9.
- Gu C, Zheng F, Long L, Wang J y Ding S. 2014. Engineering the Expression and Characterization of Two Novel Laccase Isoenzymes from *Coprinus comatus* in *Pichia pastoris* by Fusing an Additional Ten Amino Acids Tag at N-Terminus. *PLOS ONE* 9(4): 1-11.
- Haars A, Chet I y Hüttermann A. 1981. Effect of phenolic compounds and tannin on growth and laccase activity of *Fomes annosus*. *Eur J For Pathol* 11: 67-76.
- Hossain T, Das F, Marzan LW, Rahman S y Anwar MN. 2006. Some properties of protease of the fungal strain *Aspergillus flavus*. *Int J Agric Biol* 8(2): 162-164.
- Hu G y Leger SRJ. 2004. A phylogenomic approach to reconstructing the diversification of serine proteases in fungi. *J Evol Biol* 17: 1204-1214.
- Huang X, Tian B, Niu Q, Yang J, Zhang L y Zhang K. 2005. An extracellular protease from *Brevibacillus laterosporus* G4 without parasporal crystals can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes. *Res Microbiol* 156: 719-727.
- Iandolo D, Piscitelli A, Sannia G y Faraco V. 2011. Enzyme Production by Solid Substrate Fermentation of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on Tomato Pomace. *Appl Biochem Biotechnol* 163: 40-51.
- Jones SM y Solomon EI. 2015. Electron transfer and reaction mechanism of laccases. *Cell Mol Life Sci* 72(5): 869-883.
- Karimi JM. 2015. Identification and functional characterization of proteases and protease inhibitors involved in virulence of fungal tomato pathogens. Thesis for the degree of doctor. Wageningen University.

- Kumar F, Castiglia V y Levin L. 2015. Enhancement of laccase production and malachite green decolorization by co-culturing *Ganoderma lucidum* and *Trametes versicolor* in solid-state fermentation. *Int Biodeterior Biodegrad* 104: 238-243.
- Kumar SA, Sharma V, Saxena J, Yadav B, Alam A y Prakash A. 2015. Isolation and Screening of Extracellular Protease Enzyme from Bacterial and Fungal Isolates of Soil. *IJSRES* 3(9): 334-340.
- Kumar S, Sharma SN, Saharan RM y Singh R. 2005. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. *Process Biochem* 40: 1701-1705.
- Kumar SR y Singh AD. 2013. Fungal degradation of lignocellulosic residues: An aspect of improved nutritive quality. *Crit Rev Microbiol* 1-9.
- Laemmli U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Leskovac V. 2004. *Enzyme Kinetics*. Editorial Kluwer Academic Publisher. New York.
- Macellaro G, Camilla B.M, Piscitelli A, Pezzella C, Fabrizi BF, Palmese A, Piumi F, Record E, Basosi R y Sannia G. 2014. Effective mutations in a high redox potential laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 10: 1-13.
- Manavalan T, Manavalan A y Heese K. 2015. Characterization of Lignocellulolytic Enzymes from White-Rot Fungi. *Curr Microbiol* 70: 485-498.
- Marcial AJ. 2011. Determinación y silenciamiento de Aspartato Proteasa producido por *Amylomyces rouxii* y su efecto sobre la actividad tirosina. Tesis de Doctorado en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Mayerhofer SM, Fraser E y Kernaghan G. 2015. Acid protease production in fungal root endophytes. *Mycologia* 107(1): 1-11.

- Mendoza ZG. 2012. Estudio de enzimas lignolíticas producidas por *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes* usando diferentes inductores. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Madrid.
- Missall TA, Moran JM, Corbett JA y Lodge JK. 2005. Distinct Stress Responses of Two Functional Laccases in *Cryptococcus neoformans* Are Revealed in the Absence of the Thiol-Specific Antioxidant Tsa1. *Eukaryot Cell* 4 (1): 202-208.
- Montazer M y Sadeghian M. 2008. Application of Laccases with Cellulases on Denim for Clean Effluent and Repeatable Biowashing. *J Appl Polym Sci* 110: 3121-3129.
- Munk L, Sitarz KA, Kalyani CD, Dalgaard MJ y Meyer SA. 2015. Can laccases catalyze bond cleavage in lignin? *Biotechnol Adv* DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.008.
- North JM. 1982. Comparative Biochemistry of the proteinases of eukaryotic microorganisms. *Microbiol Rev* 46(3): 308-340.
- Ordaz HA. 2012. Cambios en el crecimiento microscópico hifal y del patrón de secreción de enzimas durante la adaptación térmica del hongo de pudrición blanca *Fomes* sp. Tesis de Doctorado en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Fontanella B y Sannia G. 2000. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* 66: 920-924.
- Palmieri G, Bianco C, Cennamo G, Giardina P, Marino G, Monti M y Sannia G. 2001. Purification, characterization, and functional role of a novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* 67: 2754-2759.
- Pezzella C, Guarino L y Piscitelli A. 2015. How to enjoy laccases. *Cell Mol Life Sci* 72: 923-940
- Piscitelli A, Vecchio C, Faraco V, Giardina P, Macellaro G, Miele A, Pezzella C y Sannia G. 2011. Fungal laccases: Versatile tools for lignocellulose transformation. *C R Biol* 334: 789-794.

- Rao B.M, Tanksale AM, Ghatge MS y Deshpande VV. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol. Mol Biol Rev* 62(3): 597-635.
- Rivera-Hoyos CM, Morales-Álvarez ED, Poutou-Piñales RA, Pedroza-Rodríguez AM, Rodríguez-Vázquez R y Delgado-Boada JM. 2013. Fungal laccases. *Fungal Biol Rev* 27: 67-82.
- Rodríguez SE. 2006. Caracterización molecular de lacasas de *Pleurotus eryngii*: expresión heteróloga de estas enzimas y aplicaciones en la degradación de contaminantes aromáticos. Tesis de Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Rodríguez SE, Ruiz-Dueñas FJ, Kooistra R, Ram A, Martínez AT y Martínez MJ. 2008. Isolation of two laccase genes from the white-rot fungus *Pleurotus eryngii* and heterologous expression of the *pel3* encoded protein. *J Biotechnol* 134: 9-19.
- Sabotic J, Popovic T y Brzin J. 2009. Aspartic proteases from Basidiomycete *Clitocybe nebularis*. *Croat Chem Acta* 82(4): 739-745.
- Salmones D y Mata G. 2005. Efecto de la presencia de compuestos solubles de lignina y fenoles sobre la producción de lacasa y biomasa en cultivos de *Pleurotus* spp. *Rev Mex Mic* 21: 63-69.
- Sethi S y Gupta S. 2015. Optimization of protease production from fungi isolated from soil. *IJABPT* 6(3): 149-154.
- Shaba AM y Baba J. 2012. Screening of *Pleurotus ostreatus* and *Gleophyllum sepiarium* strains for extracellular protease enzyme production. *Bajopas* 5(1): 187-190.
- Sila A, Haddar A, Sayari N, Nasri M y Bougatef A. 2015. Digestive alkaline proteases from the Tunisian barbell (*Barbus callensis*): Characterization and application as a detergent additive, in chicken feather-degradation and as a dehairing agent. *Iran J Fish Sci* 14(3): 672-686.
- Srilakshmi J, Madhavi J, Lavanya S y Ammani K. 2015. Commercial Potential of Fungal Protease: Past, Present and Future Prospects. *J Pharm Chem Biol Sci* 2(4): 218-234.

- Staszczak M, Zdunek E y Leonowicz A. 2000. Studies on the role of proteases in the white-rot fungus *Trametes versicolor*: Effect of PMSF and chloroquine on ligninolytic enzymes activity. *J Basic Microbiol* 40(1): 51-63.
- Strong PJ y Claus H. 2011. Laccase: A Review of Its Past and Its Future in Bioremediation. *Crit Rev Environ Sci Technol* 41(4): 373-434.
- Téllez-Téllez M, Fernández FJ, Montiel-González AM, Sánchez C y Díaz-Godínez G. 2008. Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 81:675-679.
- Tlecuitl-Beristain S, Sánchez C, Loera O, Robson GD y Díaz-Godínez G. 2008. Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: Production of a novel laccase isoform. *Myc Res* 10.
- Uscanga-Martínez A, Perales-García N, Álvarez-González CA, Moyano FJ, Tovar-Ramírez D, Gisbert GE, Márquez-Couturier G, Contreras-Sánchez WM, Arias-Rodríguez L e Indy JR. 2011. Changes in digestive enzyme activity during initial ontogeny of bay snook *Petenia splendida*. *Fish Physiol Biochem* 37: 667-680.
- Viswanath B, Rajesh B, Janardhan A, Kumar PA y Narasimha G. 2014. Fungal laccases and their applications in bioremediation. *Enzyme Res* 2: 1-21.
- Walter HE. 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. En: *Methods of enzymatic analysis*. Bergmeyer HJ (eds.) Editorial Verlag Chemie, Weinham.
- Wang H y Ng TB. 2001. Pleureryn, a Novel Protease from Fresh Fruiting Bodies of the Edible Mushroom *Pleurotus eryngii*. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 750-755
- Watkinson CS, Burton SK y Wood AD. 2001. Characteristics of intracellular peptidase and proteinase activities from the mycelium of a cord-forming wood decay fungus, *Serpula lacrymans*. *Mycol Res* 105(6): 698-704.



- Williams DE y Reisfeld RA. 1964. Disc electrophoresis in polyacrylamide gels: extension to new conditions of pH and buffers. *Ann NY Acad Sci* 121: 373-381
- Wu Y, Jiang Y, Jiao J, Liu M, Hu F, Griffiths BS y Li H. 2014. Adsorption of *Trametes versicolor* laccase to soil iron and aluminum minerals: Enzyme activity, kinetics and stability studies. *Colloid Surf B-Biointerfaces* 114: 342-348
- Yildirim-Aksoy M, Lim C, Dowd MK, Wan PJ, Klesius PH y Shoemaker C. 2015. In vitro inhibitory effect of gossypol from gossypol-acetic acid, and (+)- and (-)-isomers of gossypol on the growth of *Edwardsiella ictaluri*. *J Appl Microbiol* 97: 87-92.
- Yin C, Zheng L, Chen L, Tan Q, Shang X y Ma A. 2014. Cloning, Expression, and Characterization of a Milk-Clotting Aspartic Protease Gene (Po-Asp) from *Pleurotus ostreatus*. *Appl Biochem Biotechnol* 172: 2119-2131.
- Zañón MJ, Armengol J, Vilaseca JC y Jordá C. 2005. Estudio del síndrome de decaimiento en el cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Jack.: Fr.) P. Kumm. *Bol San Veg Plagas* 31: 431-441.