



Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

“Caracterización de la expresión de los genes que codifican isoenzimas de lacasa producidas por *Pleurotus ostreatus* cultivado sobre paja de trigo”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Anahi Armas Tizapantzi

Comité Tutorial

Director: Dra. Alba Mónica Montiel González

Asesores: Dra. María Mercedes Rodríguez Palma
Dr. Octavio Loera Corral



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

“Caracterización de la expresión de los genes que codifican isoenzimas de lacasa producidas por *Pleurotus ostreatus* cultivado sobre paja de trigo”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Anahi Armas Tizapantzi

Comité Tutorial

Director: Dra. Alba Mónica Montiel González

Asesores: Dra. María Mercedes Rodríguez Palma
Dr. Octavio Loera Corral

Tlaxcala, Tlax.

Febrero, 2011



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



Maestría en Ciencias Biológicas

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

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que la **Anahi Armas Tizapantzi** 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 "Caracterización de la expresión de los genes que codifican isoenzimas de lacasa producidas por *Pleurotus ostreatus* cultivado sobre paja de trigo".

". Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A tentamente
Tlaxcala, Tlax., enero 21 de 2011

DRA. MARÍA MERCEDES RODRÍGUEZ
PALMA

DRA. MAURA TÉLLEZ TÉLLEZ

DR. FRANCISCO JOSÉ FERNÁNDEZ
PERRINO

DR. FRANCISCO CASTELÁN

DRA. ALBA MÓNICA MONTIEL
GONZÁLEZ

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL



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



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

AGRADECIMIENTOS

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

Al apoyo financiero otorgado por el fondo de Ciencia Básica SEP-CONACYT para el proyecto “Estudio de los patrones de expresión de los genes de lacasa en dos sistemas de fermentación y su implicación en la fisiología de *Pleurotus ostreatus*”, con folio 61796.

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

Al CONACYT por la beca otorgada para realizar estudios de maestría con número de registro 227719.

Al programa de movilidad estudiantil ECOES por la beca otorgada para la realización de una estancia de investigación.

A la Dra. Alba Mónica Montiel González por la confianza que en mí depositó, por las enseñanzas, la amistad y por todo el apoyo que he recibido siempre de su parte.

A la Dra. María Mercedes Rodríguez Palma por la asesoría, por la paciencia, por sus valiosos comentarios y por el apoyo incondicional recibido.

Al Dr. Octavio Loera Corral por la asesoría, por la paciencia, por todos los comentarios y por el apoyo brindado siempre.

Al Dr. Francisco José Fernández Perrino por las enseñanzas, por la confianza, por sus valiosos comentarios y por el apoyo incondicional recibido.

Al Dr. Francisco Castelán por los valiosos comentarios y por el apoyo recibido.

A la Dra. Maura Téllez Téllez por los comentarios y por el apoyo recibido.

Al Dr. Arturo Estrada Torres gracias por el apoyo recibido en todo momento, por las asesorías, por los comentarios, por toda la paciencia y la confianza depositada en mí.

A mi mamá gracias por tu ejemplo, por tus consejos, por guiarme siempre y comprenderme en todo momento.

A Daniel por todo el amor brindado.

A Lizeth por nuestra amistad, que ha perdurado con el tiempo y la distancia.

A mis hermanos y hermanas por el apoyo que siempre he recibido de cada uno de ustedes.

Y a todas las personas que me han ayudado a nivel profesional y personal.

RESUMEN

En la actualidad el empleo de enzimas de origen microbiano está teniendo mayor importancia debido a las múltiples aplicaciones a nivel industrial y en procesos de biorremediación tal es el caso de la enzima lacasa, la cual es capaz de degradar una gran variedad de compuestos tóxicos que se encuentran presentes en la mayoría de los efluentes industriales. Son diversos los organismos que producen esta enzima, no obstante, en numerosos estudios se ha reportado una buena producción de enzimas lacasas a partir de basidiomicetos, principalmente, en *Pleurotus ostreatus* donde éstas enzimas tienen mejores actividades. La producción de lacasas en hongos varía dependiendo de la especie, las condiciones de cultivo, incluso de la cepa con la que se trabaja y se presenta en múltiples isoenzimas con actividad variable, esto supone, una expresión diferencial de los genes que las codifican. En este trabajo se consideró importante evaluar en qué número y de qué manera se presentan las isoenzimas de lacasa producidas por *Pleurotus ostreatus* cultivado sobre paja de trigo como medio sólido biodegradable, un soporte que representa el ambiente natural de desarrollo del hongo, debido a que los estudios de producción de éstas enzimas se han hecho principalmente en medios líquidos sintéticos. Lo anterior con el objeto de obtener información que permita evaluar la conveniencia de producción de lacasas en fermentación en medio sólido. Además, conocer los patrones de expresión de los genes que codifican para enzimas lacasas bajo estas condiciones aporta conocimiento básico a estudios posteriores sobre la participación fisiológica de las enzimas lacasas en *Pleurotus ostreatus*, y la evaluación de la naturaleza de los genes. Durante su desarrollo se identificó la presencia de hasta 4 isoenzimas de aproximadamente 30, 34, 37 y 50 kDa que aparecen de manera diferencial en las distintas etapas de cultivo evaluadas tanto extracelular como intracelularmente y desde las primeras 24 h. A pesar de que no se establecen claramente las etapas de crecimiento del hongo se pudo observar que la isoenzima de mayor peso molecular se presenta de manera constante a partir de las 96 h y hasta el final del cultivo, es decir, durante la invasión acelerada y la invasión total de la paja por el micelio del hongo en los cristalizadores, lo que no sucede con el resto de ellas que se presentan principalmente durante el crecimiento acelerado del hongo. La máxima actividad de lacasas alcanzada por el extracto crudo enzimático fue de 4.821 U/g de sustrato seco a las 120 h lo que

refleja aparentemente una menor actividad con respecto a la actividad obtenida por el mismo hongo de una cepa IE8 pero cultivado sobre bagazo de caña que fue de 15.54 UI/g sustrato seco lo que puede deberse a la diferencia en la composición de los sustratos. La prueba de hibridación de sondas específicas para lacasas con Northern blot no reveló ningún resultado, en cambio con la obtención de ADNc a partir de RT-PCR con primers específicos para lacasas (Lac1 y Lac2), de cada uno de los puntos de muestreo se pudo observar un patrón de expresión de lacasas que mantuvo cierta correspondencia entre las bandas de ADNc con las isoenzimas en cada uno de los puntos de muestreo lo que sugiere que en estas condiciones de cultivo hay más de un gen responsable de la aparición de las isoenzimas. Este patrón de expresión obtenido debe ser validado mediante la obtención de las secuencias de las bandas de ADNc.

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Lacasas.....	4
1.2 <i>Pleurotus ostreatus</i>	7
1.3 Producción de enzimas lacasas	7
2. ANTECEDENTES.....	11
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. PREGUNTAS.....	14
5. OBJETIVOS.....	15
5.1 General.....	15
5.2 Particulares.....	15
6. METODOLOGÍA.....	16
6.1 Selección del microorganismo	16
6.2 Obtención del inóculo.....	16
6.3 Fermentación en medio sólido	16
6.4 Obtención del extracto enzimático extracelular del cultivo sólido.	17
6.5 Caracterización parcial	17
6.5.1 Determinación del pH.....	17
6.5.2 Determinación de proteína total soluble	17
6.5.3 Actividad enzimática	18
6.6 Recolección de la biomasa.....	18
6.7 Obtención del extracto enzimático intracelular del cultivo sólido.....	18
6.8 Perfiles de actividad de las isoenzimas extracelulares e intracelulares por zimografía ..	19
6.9 Extracción del ARN	19
6.9.1 Electroforesis de ARN en geles desnaturalizantes de agarosa-formaldehído.....	19
6.10 Obtención de los patrones de expresión	20
6.10.1 Northern blot	20
6.10.1.1 Diseño y validación de las sondas	20

6.10.1.2 Obtención de las sondas	21
6.10.1.3 Marcaje de las sondas para lacasas	22
6.10.1.4 Transferencia	22
6.10.1.5 Hibridación	23
6.10.1.5.1 Pre-hibridación, hibridación y lavados	24
6.10.1.6 Detección inmunológica de la sonda marcada.....	24
6.10.2 RT-PCR.....	25
6.10.2.1 Síntesis del ADNc por RT.....	25
6.10.2.2 Amplificación por PCR.....	26
6.10.3 Análisis de los patrones de expresión	26
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
7.1 Caracterización parcial	27
7.2 Obtención de los patrones de expresión de lacasas.....	38
7.3 Análisis de los patrones de expresión.....	44
9. CONCLUSIONES	48
10. PERSPECTIVAS	49
11. REFERENCIAS.....	50
12. PUBLICACIONES	57

1. INTRODUCCIÓN.

Concepto de genoma, gen y métodos de estudio de la expresión génica.

La naturaleza hereditaria de todos los organismos vivos esta definida por su genoma, el cual consiste en una larga secuencia de ácidos nucleicos que proveen la información necesaria para construir el organismo, es decir, el genoma es la secuencia de las subunidades individuales (bases) del ácido nucleico que determinan las características hereditarias. Mediante una compleja serie de interacciones, fragmentos de estas secuencias son usadas para producir todas las proteínas del organismo en el momento y el lugar oportuno. Las proteínas forman parte de y construyen la estructura del organismo, también tienen la capacidad de llevar a cabo las reacciones metabólicas necesarias para la vida. El genoma contiene el conjunto completo de información hereditaria para cualquier organismo. Físicamente, el genoma se divide en diferentes segmentos de moléculas de ácido nucleico y funcionalmente se divide en genes, y puede contener un gran número de ellos. El tamaño del genoma es muy variable entre especies en algunos casos puede ser tan pequeño con apenas 500 genes como es el caso de un tipo de bacteria llamado micoplasma o tan grande como el del humano que tiene entre 20,000 y 25,000 genes (Lewin 2007).

Un gen es un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) que produce ácido ribonucleico (ARN). El ADN tiene dos hebras de ácido nucleico y el ARN tiene sólo una hebra. La secuencia del ARN es determinada por la secuencia del ADN (de hecho, es idéntico a una de las cadenas de ADN). En muchos, pero no en todos los casos, el ARN, a su vez se utiliza para la producción directa de una proteína. Así, el gen es una secuencia de ADN que codifica para un ARN, en genes que codifican proteínas, el ARN, a su vez codifica para una proteína. Los genes no se traducen directamente en proteínas, se expresan a través de la producción de ARN mensajero (ARNm), que es utilizado para sintetizar la proteína. Al proceso mediante el cual un gen se expresa formando ARNm para producir una proteína, se le conoce como expresión génica (Lewin 2004).

La expresión génica no es un proceso automático una vez iniciado, sino que existen niveles de control intermedios que van desde la activación de la estructura del gen hasta procesos postraduccionales tales como la eliminación de secuencias peptídicas por acción de proteasas, o la glicosilación en las proteínas que lo requieren (Darnell 1982).

Estrictamente, el término expresión génica abarca desde la activación del gen hasta que la proteína madura se ha localizado en el lugar adecuado y realiza su función, de tal manera que dicha proteína contribuye a la expresión del fenotipo celular. Este proceso se puede analizar mediante diversas técnicas de análisis: cuando la proteína es una enzima se puede estudiar su grado de expresión titulando su actividad enzimática, la expresión del gen puede ser estudiada mediante la detección y/o cuantificación de los ARNm funcionales del citoplasma. Los métodos de estudio utilizados, como el Northern blot, protección de ARNasa, RT-PCR e hibridación *in situ*, se basan en la capacidad para detectar ARNm específicos y no productos proteicos y se describen a continuación (Hernández y cols. 1995):

- Northern blot: una vez que se ha extraído el ARN total, se debe separar mediante electroforesis en un gel desnaturalizante de agarosa-formaldehído, que impedirá la formación de estructuras secundarias. Posteriormente, el contenido en el gel se transfiere a un filtro de nylon o nitrocelulosa, que es hibridado con una sonda específica para la enzima que se desea identificar. Una vez lavado el filtro, y en caso de haberse marcado la sonda radiactivamente, se pone en contacto con una película con sensibilidad a rayos X. Actualmente existen alternativas al marcaje radiactivo, como lo son el marcado cromogénico o con fluorocromo.

- Protección de ARNasas. Este método se basa en dos principios: la obtención de sondas de ARN complementario (ARNc antisentido) mediante reacciones de transcripción *in vitro* y la digestión por ribonucleasas del ARN de una hebra. Por tanto, si una sonda de ARNc es hibridada en solución con el ARNm a analizar y posteriormente se digiere la mezcla con ARNasas, las moléculas de la sonda que hayan formado híbridos quedarán protegidas de la digestión con ARNasas. Si la hibridación se llevó a cabo en exceso

molar de sonda, el número de moléculas de ARNc protegidas será un fiel reflejo del número de moléculas de ARNm, por lo que este método es una prueba cuantitativa de análisis de ARN.

- RT-PCR: Tras la extracción de ARN es necesario fabricar ADNc que pueda servir de sustrato para la PCR. Esto se consigue mediante la enzima transcriptasa inversa, que utiliza como molde una molécula de ARN a la que se ha unido un pequeño fragmento de ADN que actúa como cebador. Para ello, en el caso de células eucariotas, se aprovecha la presencia de la cola poli(A) de los ARN mensajeros y se utiliza como cebador un oligonucleótido sintético de polideoxitimidina (oligo[dT]) que se une a las colas de poli(A). El ADNc sintetizado es posteriormente utilizado como molde en una reacción de PCR, utilizando una pareja de cebadores o «primers» específica del ARNm de interés. Si la elección de los primers y de las temperaturas del proceso han sido adecuadas, tendremos en torno a 10^6 moléculas de ADN idénticas correspondientes a un fragmento del ARNm específico que queremos detectar. La detección de este producto amplificado se realiza mediante electroforesis en gel.
- Hibridación *in situ*: Este ensayo permite localizar y cuantificar el ARNm en áreas de tejido.

Este tipo de análisis es sumamente importante en el estudio de microorganismos productores de metabolitos de interés industrial, ya que los genes que codifican para dichos metabolitos pueden estar expresándose o no dependiendo de las condiciones a las que se somete al microorganismo. Dicho análisis puede contribuir para entender la naturaleza de la producción de metabolitos particulares en un microorganismo y, como consecuencia, permitiría conocer el mejor camino para su producción.

Actualmente, son múltiples las áreas en las que metabolitos de origen microbiano son utilizados para proveer beneficios al hombre. Las enzimas, por ejemplo, son metabolitos de gran importancia debido a sus diversas aplicaciones a nivel industrial, entre las que destaca su

uso en la industria textil, alimentaria, farmacéutica, papelera y en la fabricación de jabones y detergentes (Kunamneni y cols. 2008). Asimismo, se ha presentado un creciente interés en producir enzimas que sean posibles de utilizar en procesos de biorremediación (destoxificación de desechos, transformación de colorantes y biocatálisis). Puesto que la contaminación es un problema que amenaza día a día la permanencia de nuestros recursos naturales, se realiza la búsqueda de enzimas capaces de incidir en el campo de la biorremediación. En este sentido, las enzimas lacasas han sido apreciadas gracias a las propiedades catalíticas que presentan sobre diversos compuestos xenobióticos (Galhaup y cols. 2002b).

1.1 Lacasas

Las lacasas (benzenodiol: oxígeno oxido-reductasas, E.C. 1.10.3.2) son enzimas que poseen la facultad de reducir el oxígeno molecular a dos moléculas de agua y a la par, actúan en la oxidación de un electrón de un cúmulo de sustratos aromáticos (Thurston 1994). Las lacasas fúngicas no tienen un sustrato específico, por lo que pueden transformar y algunas veces mineralizar por completo, gran variedad de contaminantes ambientales, así como degradar compuestos no fenólicos en presencia de mediadores redox apropiados (Li y cols. 1999).

Las lacasas son secretadas en forma de múltiples isoenzimas, dependiendo de la especie que las produce y las condiciones de desarrollo del microorganismo, lo que constituye una fuente de enzimas con cualidades catalíticas excepcionales (Giardina y cols. 1999). Heinzkill y cols. (1998) reportaron un intervalo de peso molecular para lacasas de 60 a 80 kDa. Sin embargo, existen otros estudios en donde el intervalo se extiende de 100 a 190 kDa (Thakker y cols. 1992, Edens y cols. 1999). Su punto isoeléctrico (pI) y su pH óptimo son ácidos (Bollag y Leonowicz 1984) y se han clasificado dentro del grupo de enzimas denominadas azul cobre oxidadas (Abadulla y cols. 2000). Se describen como glicoproteínas que utilizan cobre como cofactor y requieren para su actividad catalítica 4 átomos de cobre por cada proteína activa.

Los cuatro átomos de cobre que contienen este tipo de proteínas han sido clasificados en tres tipos por sus propiedades espectroscópicas (Solomon y cols. 1996; Claus 2004). En el espectro UV-visible, el cobre tipo 1 es el responsable del color azul intenso de la enzima, con un máximo de absorbancia a 610 nm provocada por la unión covalente cobre-cisteína. El cobre tipo 2 no exhibe señales de absorbancia en el rango visible. El cobre tipo 3 es un complejo binario formado por un par de iones Cu^{2+} - Cu^{2+} que se encuentran acoplados binuclearmente a través de un puente hidróxido, muestra un máximo de absorbancia a 330 nm (Solomon y cols. 1996). Los átomos de cobre tipo 1 y tipo 2 son detectables por resonancia electrónica paramagnética (EPR), mientras que los dos de tipo 3 no son detectables (Claus 2004).

El sitio activo de la lacasa es trinuclear y está formado por cobre de tipos 2 y 3 (Thurston 1994; Claus 2004). El cobre tipo 1 actúa como primer aceptor de electrones del sustrato y transfiere los electrones al centro del sitio activo trinuclear, que tras recibir cuatro electrones reduce una molécula de oxígeno a agua. Así, la oxidación monoelectrónica del sustrato va acoplada a la reducción por cuatro electrones del oxígeno molecular (Yaropolov y cols. 1994). Es por ello que la enzima requiere de cobre y oxígeno para oxidar fenoles, polifenoles, aminas aromáticas y diferentes sustratos no fenólicos, lo que permite que se lleve a cabo la polimerización, despolimerización, metilación y/o desmetilación de compuestos fenólicos (Claus 2004).

Los aminoácidos que se unen al cobre tipo 1 son dos histidinas, una cisteína y una metionina. Los primeros tres residuos son esenciales para la unión del cobre azul, formando un triángulo fuerte con el ión cobre, mientras el enlace con el cuarto residuo (una metionina axial) es más distante y débil, pudiendo ser reemplazado por otros aminoácidos, tales como leucina o fenilalanina. Los otros tres átomos de cobre están acoplados trinuclearmente junto con 8 residuos de histidina. El cobre tipo 2 se encuentra ligado a dos histidinas y una molécula de agua o a una molécula de oxígeno, en cambio el sitio binuclear de cobre tipo 3 contiene 3 histidinas ligadas a cada cobre (Nakamura y Go 2005).

Las lacasas presentan una amplia especificidad de sustrato, puesto que catalizan la oxidación de orto y para difenoles, amino fenoles, dímeros de lignina fenólicos e incluso compuestos no fenólicos en presencia de algunos intermediarios (Kawai y cols. 1987; Hatakka y cols. 1991). La oxidación puede estar controlada por las diferencias en potencial redox entre los sustratos reductores y el cobre tipo 1 de la lacasa (Thurston 1994). En general, las lacasas tienen baja especificidad por estos sustratos en relación con el oxígeno. La oxidación monoelectrónica de un sustrato por la lacasa implica la formación de un radical libre. Estos radicales posteriormente pueden ser oxidados a quinonas por la enzima o bien sufrir reacciones no enzimáticas variadas. La oxidación de fenoles frecuentemente produce reacciones de acoplamiento carbono-carbono y carbono-oxígeno entre los radicales, lo que origina productos de mayor peso molecular que los sustratos, es decir, reacciones de polimerización. La tendencia de esta enzima de provocar polimerización no es una desventaja en biorremediación, ya que la polimerización oxidativa de los contaminantes puede ser un método aceptable para su eliminación (Rodríguez-Rincón 2006).

Inicialmente, las lacasas se obtuvieron del exudado del árbol de laca japonés (*Rhus vernicifera*) y fueron descritas por Yoshida en 1883. Laborde en 1986 proporcionó el primer reporte sobre la presencia de lacasas en hongos. También se han encontrado en insectos y en algunas plantas y bacterias (Guillén y cols. 2000). Se ha reportado que el propósito fisiológico de las lacasas en plantas es biosintético, mientras que en los hongos su función es degradativa (Giardina y cols. 1995). La producción de lacasas en hongos se debe a que están altamente involucradas en la degradación de la lignina y en la eliminación de fenoles potencialmente tóxicos que surgen durante la morfogénesis, patogénesis y virulencia del hongo (Mansur y cols. 1997). Por esa razón, las lacasas han sido más estudiadas en los hongos (Maller y cols. 1993) y en especial en hongos de pudrición blanca (Guillén y cols. 2000; Galhaup y cols. 2002b; Palonen y cols. 2003). Entre los géneros más usados y ampliamente estudiados a nivel de laboratorio se encuentran *Trametes*, *Pleurotus*, *Lentinula*, *Pycnoporus*, *Phanerochaete* y *Agaricus*, debido a la facilidad con que se cultivan *in vitro* y a que sus enzimas son excretadas al medio de cultivo.

Una de las especies en las que ha sido estudiada la producción de lacasas, debido a las altas actividades enzimáticas que presenta, es *Pleurotus ostreatus*, también de gran interés por su producción mundial como alimento. Perteneció a la división de los basidiomicetos y se encuentra distribuido en Europa, Asia, África, Australia, Estados Unidos, Canadá y Latinoamérica (Guinberteau 1990).

1.2 *Pleurotus ostreatus*

Pleurotus ostreatus es un hongo saprófito, en su ambiente natural suele crecer sobre ramas y troncos de árboles caídos o en proceso de descomposición, e incluso en el suelo sobre raíces podridas. Es un hongo comestible y se cultiva sobre diversos sustratos lignocelulósicos, como pajas de cereales, bagazo de caña de azúcar y pulpa de café, entre otros residuos del tipo agroindustrial. Esto es posible porque dicho hongo produce enzimas lacasas, las cuales forman parte del complejo enzimático encargado de la degradación de la lignina. Las enzimas que conforman dicho complejo enzimático son la lignina peroxidasa (EC. 1.11.1.14), manganeso peroxidasa (EC. 1.11.1.13) y las lacasas (EC. 1.10.3.2) (D'Souza y cols. 1999). Los hongos ligninolíticos, como *Pleurotus ostreatus*, son los principales productores de estas enzimas y, por consiguiente, su utilidad en el reciclaje del carbono de la lignina es trascendental.

1.3 Producción de enzimas lacasas

Las enzimas lacasas se han producido por fermentación a partir de hongos de pudrición blanca. La fermentación es el proceso mediante el cual ocurren cambios químicos en las sustancias orgánicas producidos por la acción de las enzimas. Esta definición general incluye prácticamente todas las reacciones químicas de importancia fisiológica (Fraume 2007). Básicamente, se ha trabajado con dos tipos de fermentación: la fermentación líquida o sumergida y la fermentación en medio sólido, tanto con la utilización de soportes inertes tales como la espuma de poliuretano y la amberlita (Romero-Gómez y cols. 2004) o vermiculita (Roussos y Perraud-Gaime 1996), como de soportes biodegradables que funcionan como sustratos complejos y naturales. Éstos soportes son generalmente residuos agroindustriales

que, de no ser utilizados pueden constituir una fuente de contaminación ambiental por la cantidad de lignina contenida, cuyas características estructurales proveen rigidez, impermeabilidad al agua y resistencia al ataque microbiano hacia las paredes vegetales, lo que impone una barrera física y química que restringe su degradabilidad (Cohen y cols. 2002).

Se ha observado que algunos hongos ectomicorrízicos como *Lactarius*, *Pisolithus* y *Suillus*, así como los hongos saprótrofos de los géneros *Lentinus* y *Pleurotus*, crecen bien en medio sólido sobre diferentes sustratos agrícolas (Robinson y Nigam 2003). Esto puede deberse a que para la mayoría de especies de hongos el medio natural sobre el cual se desarrollan es un medio sólido; su crecimiento ocurre en la superficie o dentro del sustrato, dependiendo de su porosidad natural (Gervais y Molin 2003). Por esta razón, dichos hongos pueden adaptarse al cultivo en medio sólido y desarrollarse tolerando condiciones extremas de temperatura, pH, disponibilidad de agua y oxígeno. Entre los sustratos agrícolas más empleados se encuentran el salvado de trigo, el bagazo de caña, la harina de yuca, la cáscara de remolacha, la paja de cereales y el aserrín de madera, entre otros (García y Torres 2003).

La fermentación en Medio Sólido (FMS) se refiere al cultivo aerobio o anaerobio de microorganismos que crecen en la superficie o al interior de una matriz sólida porosa. Esta matriz puede estar constituida por un sustrato humidificado o por un soporte inerte capaz de absorber los nutrientes que se encuentran disueltos en una solución sin escurrimiento de líquidos (Lonsane y cols. 1992).

El sistema de FMS tiene como principales ventajas las siguientes: baja demanda de agua (y por ende baja actividad de agua, que es de gran ayuda para evitar las contaminaciones, especialmente por bacterias y levaduras), provee alta concentración de producto final, los medios de cultivo son simples (generalmente subproductos agrícolas que presentan un alto contenido de los nutrientes necesarios), la aireación es facilitada por la porosidad del soporte, lo que permite una alta transferencia de oxígeno al microorganismo y los residuos generados son utilizados integralmente como alimento animal, compostaje y vermicompostaje, entre otros (Doelle y cols. 1992, Viniegra-González y cols. 2003 y Hölker y cols. 2004). Entre

las principales desventajas del sistema están las siguientes: su aplicación se limita a microorganismos que crecen con bajos contenidos de humedad, la extracción del calor metabólico se complica sobre todo cuando se trabaja a gran escala y no se controla el proceso, la naturaleza sólida del sustrato trae problemas al medir y controlar los parámetros de la fermentación tales como el pH, la temperatura, el contenido de humedad, la concentración de sustrato y de productos, además los procesos de transferencia de masa son limitados por la baja difusión (Doelle y cols. 1992). Resulta evidente que las condiciones intrínsecas de cada sistema promueven diferentes estímulos en el organismo cultivado, favoreciendo los cambios en la expresión de muchos de sus metabolitos.

En cuanto al tipo de inóculo, se reconocen dos tipos fundamentales, tanto a nivel laboratorio como a nivel industrial: el micelio (Moore y Prior 1993; Jenkins y cols. 1998) y las esporas (Domenech 2000). Las principales ventajas del uso de micelio como inóculo son una mejor competitividad del hongo, una reducción de la posible colonización del sustrato por microorganismos contaminantes y la colonización más rápida, debido a que se reducen los tiempos de incubación (la fase de latencia o de adaptación, principalmente). En cambio, en el uso de la suspensión de esporas destaca, como ventaja principal, la reducción de los costos en la etapa de propagación del microorganismo (Bosch y cols. 1995, Dorta y cols. 1996 y Booth y Shanks 1998).

En lo que respecta a la producción de enzimas lacasas por *Pleurotus ostreatus*, se han utilizado diferentes sistemas, organismos y sustratos, por lo que se han obtenido diversos datos de su actividad y del número de isoenzimas que se excretan. Sin embargo, hasta el momento son pocos los trabajos orientados hacia el estudio de los mecanismos internos mediante los cuales el organismo está produciendo dicho metabolito. Por ejemplo, se ha llegado a la conclusión de que la diversidad de isoenzimas de lacasas y sus características físico-químicas dependen tanto de la diversidad de sustratos como de las especies capaces de producirlas, así como de los diferentes inductores usados en su producción. Esto es natural, puesto que alude a lo que nos diferencia como individuos: cada uno se desarrolla según las condiciones que le rodean. Lo mismo sucede con las enzimas, se producirán según las condiciones lo requieran. En el caso

de los hongos, por ejemplo, en condiciones adversas deben excretar las enzimas necesarias para poder alimentarse y crecer. Al contrario, cuando las condiciones son muy favorables, la producción de enzimas puede no ser tan buena pues no resulta necesario el desgaste que ocasiona su producción al estar los nutrimentos tan disponibles.

Pero ¿cómo se puede observar el efecto que está ocasionando el entorno en cualquier organismo vivo?, es decir, la respuesta producida ante una condición en particular en un momento en particular. Esto se puede saber gracias a la expresión génica, que es el proceso mediante el cual todos los organismos vivos transforman la información contenida en los ácidos nucleicos en las proteínas necesarias para su desarrollo y crecimiento.

Se ha observado en el caso particular de las lacasas que puede cambiar el perfil de isoenzimas producidas, dependiendo de la especie, la cepa y el medio en el cual se desarrolla el microorganismo. Esto puede reflejar la activación de genes distintos, es decir, dependiendo de las condiciones se encienden los genes que contienen la información necesaria para adaptarse a cada situación a la que se somete al organismo. De esta forma, las enzimas a pesar de poseer actividad sobre los mismos sustratos, pueden cambiar significativamente, no sólo en la magnitud de su actividad enzimática y su tamaño, sino también en las propiedades que poseen. Por ello, los organismos están preparados para actuar bajo ciertas condiciones en el sistema en el cual han sido producidos, cambiando incluso la transcripción de los genes en las diferentes etapas de su desarrollo en el cultivo.

Por tanto, el profundizar en el estudio de la producción de estas enzimas en los organismos a nivel expresión génica ayudará a entender cuáles son las mejores estrategias que se deben seguir para incrementar, no sólo la cantidad de enzima, sino la isoenzima más adecuada para aplicarse a un proceso en particular. Por esta razón, en el presente estudio se propuso caracterizar la expresión de las isoenzimas de lacasa del hongo *Pleurotus ostreatus* (hongo de pudrición blanca) cultivado sobre paja de trigo.

2. ANTECEDENTES

Hasta el momento, las investigaciones realizadas respecto a las lacasas se han realizado con el fin de conocer a los organismos que las producen, el número de isoenzimas intra y extracelulares presentes en diferentes medios de cultivo y la producción en presencia o ausencia de inductores. En los últimos años, diversos investigadores en Italia han obtenido cuatro secuencias de genes que codifican para enzimas lacasas a partir del hongo *Pleurotus ostreatus* var. *florida*. Existen pocos estudios en los que se evalúe la expresión génica de las enzimas lacasas producidas por *Pleurotus ostreatus*, y los trabajos realizados han evaluado la inducción de estas enzimas por metales como el cobre en cultivos líquidos. Sin embargo, hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio acerca de los perfiles de isoenzimas de lacasa desarrolladas sobre paja de trigo o un reporte referido al patrón de expresión de genes de enzimas lacasas en otras cepas de *Pleurotus ostreatus*. Por ello, el conocimiento obtenido en el presente estudio puede contribuir al conocimiento general de la expresión de los genes de lacasas en esta especie.

Entre los trabajos existentes, se encuentran el de Palmieri y cols. (1997) en el que caracterizaron dos isoenzimas de *Pleurotus ostreatus* var. *florida*, POXA1 Y POXA2 con masas moleculares de 61 y 67 kDa, respectivamente. Durante la purificación de las isoenzimas se obtuvieron 5 diferentes fracciones de fenol oxidasas, nombradas POXA1, POXA2, POXB1, POXB2 y POXC. En el mismo año, Das y cols. hallaron dos lacasas, L1 y L2, en *Pleurotus ostreatus* var. *florida*, empleando diferentes sustratos para determinar la afinidad de ambas isoenzimas. Después, en 1999, Giardina y cols. caracterizaron una isoenzima de lacasa y la denominaron POXA1b. En 2003, Palmieri y cols. purificaron y caracterizaron otras dos isoenzimas de lacasas provenientes de *Pleurotus ostreatus* var. *florida*, denominadas POXA3a y POXA3b.

En lo que respecta al estudio de inductores, en el trabajo realizado por Giardina y cols. en 1999 se indujo la producción de la isoenzima POXA1b de lacasa en *Pleurotus ostreatus* var.

florida, al adicionar cobre al medio de cultivo. Palmieri y cols. (2000) realizaron un estudio usando cobre como inductor sobre *Pleurotus ostreatus* var. *florida*, y también se lograron inducir algunas isoenzimas. En un estudio realizado por Tlecuitl-Beristain (2005) se encontraron cuatro isoenzimas por zimografía durante la fase estacionaria de *Pleurotus ostreatus* desarrollado en fermentación líquida en un medio mineral con cobre como inductor (con una máxima actividad de 12.196 U/mL, evaluada usando 2,6-dimetoxifenol (DMP)), mientras que en otro estudio realizado por Juárez (2005), utilizando el mismo medio y cobre como inductor en una fermentación líquida, se encontraron tres isoenzimas de lacasas producidas por *Pleurotus ostreatus* (con una máxima actividad de 37.5 U/mL, usando el mismo compuesto como sustrato).

Entre los estudios relacionados con la producción de lacasas en fermentación sólida, utilizando sustratos biodegradables, se encuentra el de De Souza y cols. (2002) quienes trabajaron con *P. pulmonarius* crecido sobre paja de trigo, en el que se evaluó la máxima producción de lacasas del extracto crudo enzimático (8.6 U/mg de sustrato a los cinco días de crecimiento). Por su parte, Ramírez y cols. (2003) cultivaron *Pleurotus ostreatus* en fermentación líquida y en fermentación en medio sólido usando salvado de trigo enriquecido con vinaza, hallando una actividad de 20 U/mL y 10 U/mL, respectivamente, empleando ABTS (ácido 2'2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-6-sulfónico]) como sustrato. Los autores aislaron 2 isoenzimas del cultivo líquido y 3 isoenzimas a partir del cultivo en medio sólido de 52, 46 y 30 kDa. Otro estudio relacionado es el de Stajić y cols. (2004), en el cual se utilizó cáscara de mandarina en polvo para enriquecer la fermentación líquida y cáscara de uva enriquecida con medio sintético como soporte para la fermentación sólida. En este trabajo se obtuvieron actividades de 0.341 U/mL y 2.14 U/mL, respectivamente, usando siringaldazina como sustrato. Márquez-Araque y cols. (2007) trabajaron con *Pleurotus ostreatus* incubado sobre bagazo de caña, obteniendo una actividad de 15.54 UI/g de materia seca con ABTS como sustrato. Por su parte, Téllez-Téllez y cols. (2008) evaluaron la actividad de lacasas y el número de isoenzimas producidas, en fermentación líquida y en fermentación sólida usando espuma de poliuretano como soporte inerte. Los autores encontraron actividades de 13 U/mL y 2.43 U/mL, respectivamente, usando

2,6-dimetoxifenol (DMP) como sustrato; en fermentación líquida se observaron cuatro isoenzimas y en fermentación sólida tres.

Los estudios existentes en el campo de la biología molecular comienzan con la identificación y caracterización de los genes que codifican para algunas isoenzimas, su clonación y secuenciación e incluso la sobreexpresión, tanto homóloga como heteróloga. Entre dichos estudios se encuentra el realizado por Giardina y cols. en 1995 en el que clonaron y secuenciaron un gen de lacasa al que denominaron *pox1* a partir de *Pleurotus ostreatus* var. *florida* desarrollado en un medio líquido. En 1996, Giardina y cols. caracterizaron un segundo gen de lacasa de *Pleurotus ostreatus* var. *florida* nombrado *pox2*, a partir de un segundo ADNc aislado en el estudio realizado en 1995 (secuencia que mostró un 84% de similitud con respecto a la del primero mencionado). Los correspondientes clones genómicos truncados demostraron la existencia de una familia multigénica para isoenzimas de lacasa en *Pleurotus ostreatus* (Giardina y cols. 1995). Después, en 1999, Giardina y cols. identificaron clonaron y secuenciaron el gen *pox1b* de *Pleurotus ostreatus* var. *florida*; la comparación de su estructura con la de los genes *pox1* y *pox2* sugiere que provienen de dos subfamilias diferentes. En 2003, Palmieri y cols. identificaron el gen *poxa3* de *Pleurotus ostreatus* var. *florida* junto con sus correspondientes ADNc. Okamoto y cols. en 2003 obtuvieron la secuencia completa del gen *lccK* a partir de ADN genómico de *Pleurotus ostreatus*. En 2005, Piscitelli y cols. realizaron la expresión heteróloga de las lacasas POXC y POXA1b en *Kluyveromyces lactis* y *Saccharomyces cerevisiae*; por una parte las actividades específicas de las proteínas nativas y recombinantes de POXA1b resultaron similares, por otra parte la actividad específica de la proteína recombinante de POXC fue mucho menor que la de la proteína nativa. Finalmente, Pezzella y cols. identificaron y describieron en 2009 tres nuevos genes de lacasa (*pox3*, *pox4* y *pox5*) derivados de *Pleurotus ostreatus* cepa *florida* MYA-2306. No se han realizado aún estudios acerca de los patrones de expresión de las isoenzimas de lacasa, provenientes del hongo *Pleurotus ostreatus*, en un sistema de fermentación con una fuente de carbono compleja.

3. JUSTIFICACIÓN

Para poder manipular de una mejor manera la producción de enzimas lacasas, particularmente en el hongo *Pleurotus ostreatus*, resulta indispensable realizar un estudio a nivel de expresión, con la finalidad de conocer qué genes son activos para la producción de enzimas lacasas en una condición en particular. Dado que las enzimas lacasas forman parte del complejo enzimático que se encarga de la degradación de la lignina (Marzullo y cols. 1995, Mansur y cols. 1997), la cual es utilizada por *Pleurotus ostreatus* como fuente de carbono para su desarrollo, y que este hongo ha sido cultivado, entre otros sustratos, sobre paja de trigo para su producción como alimento (Hadar y cols. 1992), en el presente trabajo se propuso caracterizar las isoenzimas de lacasa producidas de manera intracelular y extracelular por *Pleurotus ostreatus* cultivado sobre paja de trigo. Para complementar el estudio, se trató de analizar sus patrones de expresión con el fin de verificar si existe alguna correspondencia entre las isoenzimas producidas y los ácidos ribonucleicos obtenidos (ya que la variabilidad de respuestas que despliega un espécimen en su genoma se puede observar gracias a la obtención y análisis de sus patrones de expresión). De esta manera se puede determinar si las diferencias se están produciendo desde el nivel de expresión, con la activación de distintos genes, o se deben a modificaciones pos-traduccionales. Esto aportaría conocimiento básico a estudios posteriores sobre la participación fisiológica de las enzimas lacasas en *Pleurotus ostreatus*.

4. PREGUNTAS

- 1.- ¿Cuál es el perfil de isoenzimas de lacasa que produce *Pleurotus ostreatus* cuando se cultiva sobre paja de trigo?
- 2.- ¿Cuántos ARNm expresados durante el cultivo corresponden a lacasas?
- 3.- ¿Existe correspondencia entre el número de ARNm expresados y el número de isoenzimas?

5. OBJETIVOS

5.1 General

Caracterizar la expresión de los genes que codifican isoenzimas de lacasa de *Pleurotus ostreatus* cultivado sobre paja de trigo.

5.2 Particulares

- Determinar los momentos, pre-expresión, expresión y post-expresión de las isoenzimas de lacasa de *Pleurotus ostreatus*.
- Obtener los perfiles de producción de isoenzimas de lacasa de *Pleurotus ostreatus* intra y extracelulares.
- Obtener los patrones de expresión de las isoenzimas de lacasa.
- Determinar la correspondencia entre el número de ARNm que codifican para lacasas y el número de isoenzimas producidas por *Pleurotus ostreatus* sobre paja de trigo.

6. METODOLOGÍA

Para cumplir los objetivos planteados se estableció la siguiente metodología:

6.1 Selección del microorganismo

Se utilizó la cepa de *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783, que fue propagada en agar extracto de malta a 25°C, utilizando extracto de paja como sustrato. Se almacenó a 4°C, resemebrándose cada mes.

6.2 Obtención del inóculo

El inóculo para la fermentación se obtuvo con fragmentos de micelio de 4 mm de diámetro, tomados de la periferia de una colonia de *Pleurotus ostreatus* y libres de agar, colocándolos en agua estéril. Posteriormente, con la ayuda de un agitador mecánico (batidora para café convencional) se procedió a fragmentar el micelio hasta obtener una suspensión homogénea del hongo.

6.3 Fermentación en medio sólido

Se realizó en cristalizadores de 9 cm de diámetro × 5 cm de altura, con 35 g de paja de trigo y un 70 % de humedad. Se inocularon bajo condiciones estériles con 0.05 g de micelio de hongo homogeneizado en 2 mL de agua destilada. Los cultivos fueron incubados a 25°C y se llevaron a cabo por quintuplicado. La toma de muestras se realizó cada 24 h durante 20 días.

El experimento se dividió en dos etapas para poder alcanzar los objetivos planteados:

La primera etapa consistió en la obtención de los extractos enzimáticos extracelulares, a partir de los cuales se realizó una caracterización parcial para determinar los momentos pre-

expresión, expresión y pos-expresión de las isoenzimas de lacasa de *Pleurotus ostreatus* y la obtención de los perfiles de actividad de las isoenzimas extracelulares por zimografía.

La segunda etapa consistió en la recolección de la biomasa en los tiempos determinados tras la caracterización parcial, una fracción de la biomasa de cada tiempo fue utilizada en la obtención de los extractos enzimáticos intracelulares (y la obtención del perfil isoenzimático) y el resto de la biomasa se empleó para la extracción del ARN y la obtención de los patrones de expresión.

6.4 Obtención del extracto enzimático extracelular del cultivo sólido.

El extracto enzimático extracelular (EEE) se obtuvo por lixiviación del soporte sólido tras la adición de 75 mL de agua destilada, manteniendo agitación orbital a 300 rpm durante 30 min. Después de este tiempo, el sobrenadante obtenido fue recuperado por extrusión y se conservó en refrigeración a 4°C.

6.5 Caracterización parcial

6.5.1 Determinación del pH

Se determinó el pH del EEE en todos los tiempos de muestreo, a partir de las 24 horas, con un potenciómetro Conductronic P-100.

6.5.2 Determinación de proteína total soluble

La proteína total soluble contenida en los extractos extracelulares se determinó por el método de Bradford (Bradford 1976), usando seroalbúmina bovina como proteína estándar. A 100 µL de EEE se le adicionaron 200 µL del reactivo de Bradford (Bio-Rad), el volumen se ajustó a 1 mL con agua destilada y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro Jemway 6405 Uv/Vis a 595 nm.

6.5.3 Actividad enzimática

La actividad de lacasas extracelulares se determinó en cada punto de la fermentación, siguiendo una cinética de reacción durante 1 min a 39°C en una Celda Peltier del espectrofotómetro Jemway 6405 Uv/Vis, utilizando como sustrato 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 de EEE. El producto de oxidación fue valorado espectrofotométricamente como incremento de la absorbancia a 468 nm (Haars y cols. 1981).

Una unidad de actividad de lacasa (U) se consideró como la cantidad de enzima que provoca el incremento de una unidad de absorbancia por minuto en la mezcla de reacción (Téllez-Téllez y cols. 2005).

6.6 Recolección de la biomasa

Tras la caracterización parcial de la fermentación se determinaron los tiempos en los que se recolectaría la biomasa que sería utilizada para la extracción del ARN y la obtención de los extractos enzimáticos intracelulares. Para ello, las muestras se maceraron en un mortero de porcelana previamente lavado con cloroformo y etanol, conservándolo en todo momento frío con nitrógeno líquido (que proporciona una temperatura de -170°C y no permite la actividad de las ARNasas). El macerado se recuperó en tubos Eppendorf de 1.5 mL libres de ARNasas con aproximadamente 100 mg de cada muestra, almacenándose a -20°C hasta su uso para la extracción del ARN total.

6.7 Obtención del extracto enzimático intracelular del cultivo sólido.

Para obtener el extracto enzimático intracelular (EEI) se utilizó uno de los tubos obtenidos del macerado de la biomasa en cada tiempo de muestreo, adicionándose 500 µL de buffer de fosfatos pH 6.5; se sometió a agitación durante 30 min y se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min. El sobrenadante obtenido se consideró como EEI y se conservó en refrigeración a 4°C.

6.8 Perfiles de actividad de las isoenzimas extracelulares e intracelulares por zimografía

La actividad de lacasas se detectó *in vitro*, usando zimogramas basados en la técnica modificada de SDS-PAGE de Laemmli (1970). 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 SDS fue de 0.1% en el gel. La composición del buffer de muestra fue: 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 35% glicerol, 0.01% de azul de bromofenol y 10% de SDS. Las muestras de los EEE y EEI se corrieron en geles de 0.75 mm de espesor en un sistema de electroforesis Mini PROTEAN Tetra cell (BioRad) a 150 voltios durante 2-2.3 h. Después de la corrida, los geles se lavaron con agua destilada y desionizada con ayuda de un agitador orbital (20-30 rpm) durante 1-1.5 h, con un cambio de agua cada 15 min para eliminar el SDS y renaturalizar las proteínas. Posteriormente, los geles se incubaron durante 18-24 h, a temperatura ambiente, en 50 mL de DMP 2 mM en buffer de fosfatos 0.1 M a pH 6.5.

6.9 Extracción del ARN

Las muestras de micelio almacenadas a -20°C resultantes de la maceración se procesaron para la extracción de ARN total utilizando el RNeasy Plant Mini Kit de Qiagen[®], siguiendo el protocolo del fabricante. Se almacenaron a -20°C para su uso en procedimientos posteriores.

6.9.1 Electroforesis de ARN en geles desnaturalizantes de agarosa-formaldehído

El ARN total se separó por electroforesis en un gel de agarosa-formaldehído, siguiendo el método descrito por Sambrook y Russell en 2001. En dicha técnica se añade formaldehído como agente desnaturalizante, con el fin de eliminar y/o evitar la formación de estructuras secundarias. Durante todo el proceso la integridad del ARN se ve amenazada por la acción de las ARNasas, por lo que el agua y las soluciones usadas para realizar la electroforesis se trataron con dietil pirocarbonato (DEPC). Para ello, se añadió el 0.2 % (v/v) de DEPC a la solución que se deseó tratar, se mezcló por agitación con una barra magnética durante 2-4 horas y se esterilizó en autoclave. Esta generalidad no se cumplió con aquellas soluciones que

contenían Tris-base, porque el DEPC reacciona con los grupos amino del tris y los carboximetila, perdiendo los dos compuestos su función. Todo el material de electroforesis que estuvo en contacto con el gel fue lavado previamente con H₂O₂ y etanol absoluto (Fernández 1997).

6.10 Obtención de los patrones de expresión

Para obtener los patrones de expresión y detectar los ARNm específicos para enzimas lacasas a partir del ARN total extraído se realizó la hibridación de sondas por la técnica de Northern Blot y la síntesis de ADNc específico para lacasas mediante el método de RT-PCR.

6.10.1 Northern blot

La hibridación Northern o Northern blot se emplea principalmente para obtener información sobre el tamaño de los ARNs y sobre el modelo de expresión de genes específicos (Luque y Herráez 2002), permitiendo estimar su abundancia. Este método es capaz de obtener esta información para un gran número de preparaciones de ARN al mismo tiempo, lo que es fundamental en los estudios de expresión génica.

La electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes se utiliza para separar ARN según su tamaño y es la primera etapa en la hibridación Northern (Sambrook y Russell 2001). Este método involucra además distintas etapas que se describen a continuación.

6.10.1.1 Diseño y validación de las sondas

Una sonda se define como un fragmento de oligonucleótidos de secuencia conocida y complementaria a un segmento de la secuencia diana de ADN (Luque y Herráez 2002). Generalmente el diseño de una sonda que se pretende utilizar para identificar secuencias que codifican para una enzima involucra el uso de secuencias características del sitio activo, tales como el sitio de unión a algunos cofactores metálicos, por ejemplo. Las enzimas lacasas tienen cobre unido en su sitio activo, aunque existen otras enzimas que también poseen uniones a cobre (como las tirosinasas, que son monofenol oxidasas que también contienen cobre en su

centro activo). Considerando que se carecen de estudios que descarten la existencia de tirosinasas en *Pleurotus ostreatus*, fue necesario usar como control negativo un organismo que produjera tirosinasas y no lacasas, para lo cual se utilizó la planta *Lactuca sativa var. capitata for. iceberg*. Dicho control se sometió al Northern blot al mismo tiempo que *Pleurotus ostreatus* para validar la sonda seleccionada. Otra medida para evitar la unión inespecífica de la sonda con secuencias que no corresponden a lacasas fue la siguiente:

1. Se realizó una búsqueda de las secuencias reportadas para lacasas de *Pleurotus ostreatus* con el fin de hacer un alineamiento e identificar secuencias conservadas que permitieran obtener una sonda específica para estas enzimas dentro de la especie.
2. Se procuró obtener el mayor número de secuencias de organismos que producen enzimas lacasas, entre los que se incluyeron hongos basidiomicetos, ascomicetos, bacterias y plantas, para realizar un alineamiento en busca de secuencias conservadas entre los organismos productores de estas enzimas, con el fin de tener una sonda universal para la prueba.

6.10.1.2 Obtención de las sondas

Las secuencias usadas en el alineamiento para obtener la sonda específica para lacasas de *Pleurotus ostreatus* reportadas en Gen Bank fueron:

- GI: 296764. *Pleurotus sp.* 'Florida' P.ostreatus diphenol oxidase gene.
- GI: 9955726. *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom) POX2 gene for diphenol oxidase.
- GI: 28812188. *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom) lccK gene for laccase, complete cds.
- GI: 21693018. *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom) poxa3 gene for laccase.
- GI: 9843772. *Pleurotus sp.* 'Florida'poxA1b gene for laccase.

El alineamiento de dichas secuencias se realizó utilizando el programa Megalign de DNASTAR[®]. En primer lugar se alinearon las secuencias de aminoácidos, de esta manera se podrían seleccionar aquellas regiones conservadas que incluyeran los aminoácidos

involucrados en la unión a Cu (sitio activo de la enzima lacasa). En segundo lugar, se alinearon las secuencias de nucleótidos y se ubicó la región seleccionada para detectar los tripletes o codón de nucleótidos que codifiquen para cada aminoácido en todas las secuencias. En los casos donde el aminoácido está codificado por más de un codón, los nucleótidos que no coincidieron en el alineamiento pero que codifican para el mismo aminoácido fueron reemplazados por una letra según la siguiente clave: R=A,G; Y=C,T; M=A,C; K=G,T; S=G,C; W=A,T; H=A,C,T; B=G,T,C; V=G,C,A; D=G,A,T y N=A,C,T,G. El procedimiento de alineamiento y selección de la región conservada fue el mismo para ambas sondas, la específica y la universal de lacasas.

6.10.1.3 Marcaje de las sondas para lacasas

El marcaje de las sondas para lacasas se realizó utilizando el kit DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit 2nd Generation de Roche[®], siguiendo el protocolo del fabricante. Los oligonucleótidos fueron marcados enzimáticamente en su extremo 3' con transferasa terminal, mediante la incorporación de una molécula de digoxigenina marcada con didesoxiuridina-trifosfato (DIG-ddUTP).

6.10.1.4 Transferencia

Una vez realizada la electroforesis del ARN total en el gel de agarosa-formaldehído, se introdujo en un tampón de transferencia SSC 20X (tratado con DEPC y preparado con citrato trisódico 0.3M y NaCl 3M, pH 7) durante 1 h., mientras se preparaba el sistema de transferencia. Se colocó una pila de papel absorbente de las mismas dimensiones que el gel y de unos 5 cm de grosor sobre una bandeja limpia y sobre éste se colocaron 2 láminas de papel Whatman 3MM del mismo tamaño del gel, previamente humedecidas en el tampón de transferencia SSC 10x. A continuación se colocó el gel, y sobre él se colocó el filtro de nylon (Immobilon-Ny+ MILLIPORE[®]) de un centímetro mayor en longitud y anchura que el gel y previamente sumergido en agua destilada y en el tampón de transferencia. Sobre el filtro de

nylon se colocaron 2 láminas de papel Whatman 3MM humedecidas en tampón de transferencia, de las mismas dimensiones del gel, y sobre ellas una nueva pila de papel absorbente de unos 10 cm de grosor. En la parte superior del sistema se colocó un objeto de unos 500 g de peso. Se añadió el tampón de transferencia SSC 10x a la bandeja hasta que alcanzó casi el límite superior de la pila de papeles depositados en la parte inferior del conjunto y se mantuvo en reposo 16 h. Se evitó en todo momento la formación de burbujas entre las capas de papel, el gel y el filtro ya que interfieren en el desarrollo normal de la transferencia.

Transcurrido el tiempo se dejó secar el filtro y se fijaron covalentemente los ácidos nucleicos mediante irradiación con luz ultravioleta durante 5 min.

6.10.1.5 Hibridación

El ARN transferido a la membrana de nylon se complementó con la sonda marcada para lacasas siguiendo el método descrito por Sambrook y Russell, en 2001. La hibridación involucra 3 procesos distintos (Fernández 1997):

1. La pre-hibridación, que tiene como finalidad bloquear los sitios activos del filtro donde no se han unido ácidos nucleicos (ADN o ARN) durante la transferencia. Si no se bloquean estos sitios podrían unir de forma inespecífica los fragmentos de ADN utilizados como sonda; además sirve para equilibrar el filtro con el tampón de hibridación.
2. La hibridación, que en sentido estricto permite la unión de la sonda marcada con los ácidos nucleicos fijados en el filtro. La especificidad de esta unión depende tanto de las condiciones utilizadas durante la incubación (temperatura de hibridación, concentración de formamida, sales y detergentes en el tampón de hibridación) como de las utilizadas en los lavados posteriores.

3. Por último, los lavados permiten la eliminación selectiva de la unión inespecífica que haya podido producirse entre la sonda marcada y los ácidos nucleicos. La disminución de la unión inespecífica puede conseguirse mediante la modificación de varios factores, como la disminución de la concentración de sales en el tampón de lavado, el aumento de la concentración de detergentes en el tampón de lavado o bien el aumento de la temperatura y la duración del lavado.

6.10.1.5.1 Pre-hibridación, hibridación y lavados

La membrana se incubó durante 2 h a 68°C en 50 mL de una solución de pre-hibridación (fosfato de sodio 0.5M pH 7.2, dodecil sulfato de sodio (SDS) 7% (w/v) y ácido etilen diamino tetraacético (EDTA) 1mM pH 7) dentro de frascos de hibridación. La sonda marcada fue desnaturalizada por calentamiento durante 5 minutos a 100°C e inmediatamente se colocó en agua helada. La sonda desnaturalizada se agregó directamente al frasco con la solución de pre-hibridación y la hibridación se realizó con la incubación durante 16 h a una temperatura de 40°C en un horno de hibridación ProBlot™ 12S de Labnet International. Después de la hibridación, se procedió con los lavados de la siguiente manera: se removió la membrana del frasco y se transfirió rápidamente a un recipiente plástico limpio que contenía 200 mL de una solución compuesta de SSC 1X y SDS 0.1% a temperatura ambiente. El recipiente cerrado se colocó sobre una plataforma y se agitó suavemente durante 10 minutos. Posteriormente, la membrana fue transferida a otro recipiente de plástico limpio con 200 mL de SSC 0.5X y SDS 0.1% precalentado a 68°C, agitando el fluido suavemente durante 10 min a 68°C. El lavado anterior se repitió hasta tener un total de tres lavados a 68°C.

6.10.1.6 Detección inmunológica de la sonda marcada

Una vez realizada la hibridación de la sonda marcada con el ARN contenido en la membrana, se procedió a su detección utilizando el kit DIG Nucleic Acid Detection de Roche® siguiendo el protocolo del fabricante. Las sondas marcadas con digoxigenina pueden ser detectadas o

reveladas con alta especificidad con anticuerpos anti-digoxigenina (Anti-DIG) conjugados con fosfatasa alcalina. Durante el procedimiento se usó azul de tetrazolio (NBT) y bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP), sustrato de la fosfatasa alcalina. Al liberarse BCI por acción de la enzima, reacciona con el NBT dando lugar a un compuesto de color violáceo.

6.10.2 RT-PCR

El método RT-PCR, llamado así por el paso de transcripción reversa previo a la PCR, parte de la extracción del ARN en las condiciones en las que se desea estudiar la expresión de un ARNm. El siguiente paso es la síntesis de una cadena de ADN complementario (ADNc) a partir del ARNm mediante una reacción de transcripción reversa (RT). La transcriptasa reversa es una enzima capaz de generar una cadena de ADN complementaria al ARNm, usando como cebador una secuencia de poli-dT que hibrida con la secuencia de poli-dA de la mayoría de los ARNm eucarióticos. El resultado de la RT es una muestra de ADNc representativa de los ARNm expresados bajo determinadas condiciones. A continuación, se toma una alícuota de la RT y se somete a una reacción en cadena de la polimerasa (PCR convencional), usando una pareja de primers o cebadores específicos del ARNm de interés. Si la elección de los primers y de las temperaturas del proceso han sido adecuadas, se obtendrán varios millones de copias de ADN idénticas correspondientes a un fragmento de ARN específico que es detectado por electroforesis en geles de agarosa. La posibilidad de detectar con gran sensibilidad un ARNm mediante la estrategia RT-PCR representa la mayor aportación de esta técnica al estudio de la expresión génica (Hernández y cols. 1995).

6.10.2.1 Síntesis del ADNc por RT

La RT-PCR se realizó a partir del ARN total obtenido y se retomaron los primers usados por Giardina y cols. en 1996 para obtener el ADNc de genes de lacasas de *Pleurotus ostreatus*. Para realizar la síntesis de la ADNc por RT se utilizó el RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit de Fermentas® siguiendo el protocolo del fabricante.

6.10.2.2 Amplificación por PCR

La mezcla de reactivos para la reacción en cadena de la polimerasa fue la siguiente:

5 μ L	ADNc producto de la reacción RT
5 μ L	Tampón Taq 10X con KCl
5 μ L	25 mM MgCl ₂
5 μ L	Primer sentido (20 pmol)
5 μ L	Primer anti-sentido (20 pmol)
1 μ L	10 mM dNTP Mix
23.5 μ L	Agua libre de nucleasas
0.5 μ L	Taq DNA polimerasa (5 u/ μ L)
50 μ L	Volumen total

La PCR se realizó en el termociclador My cycler de Bio-Rad[®] usando las siguientes condiciones:

Etapa	Temperatura °C	Tiempo	Numero de ciclos
Desnaturalización inicial	95	4 min	1
Desnaturalización	95	1 min	30
Alineamiento o hibridación	60	1 min	
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	7 min	1
	4	∞	

La detección del producto resultante se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X y los productos observados fueron enviados para su secuenciación, con el fin de verificar su correspondencia con genes de lacasas.

6.10.3 Análisis de los patrones de expresión

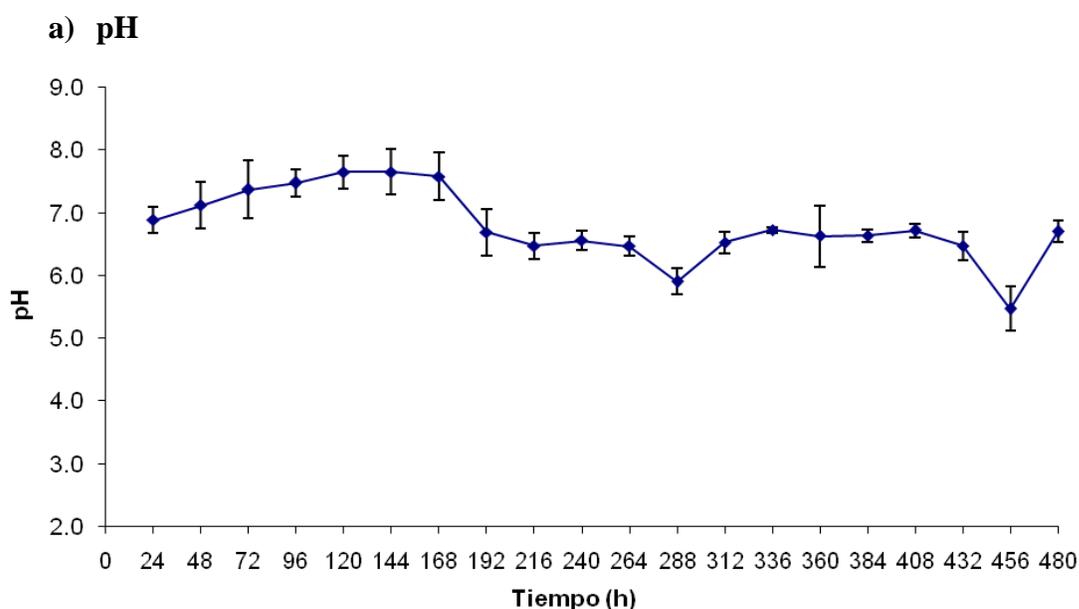
De manera general, los patrones obtenidos (ya sea por Northern Blot o por RT-PCR) fueron comparados con el perfil de isoenzimas obtenidas por zimografía, de tal manera que se analizó la correspondencia existente entre las isoenzimas de lacasa producidas y el número de ARNm detectados.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primera etapa

7.1 Caracterización parcial

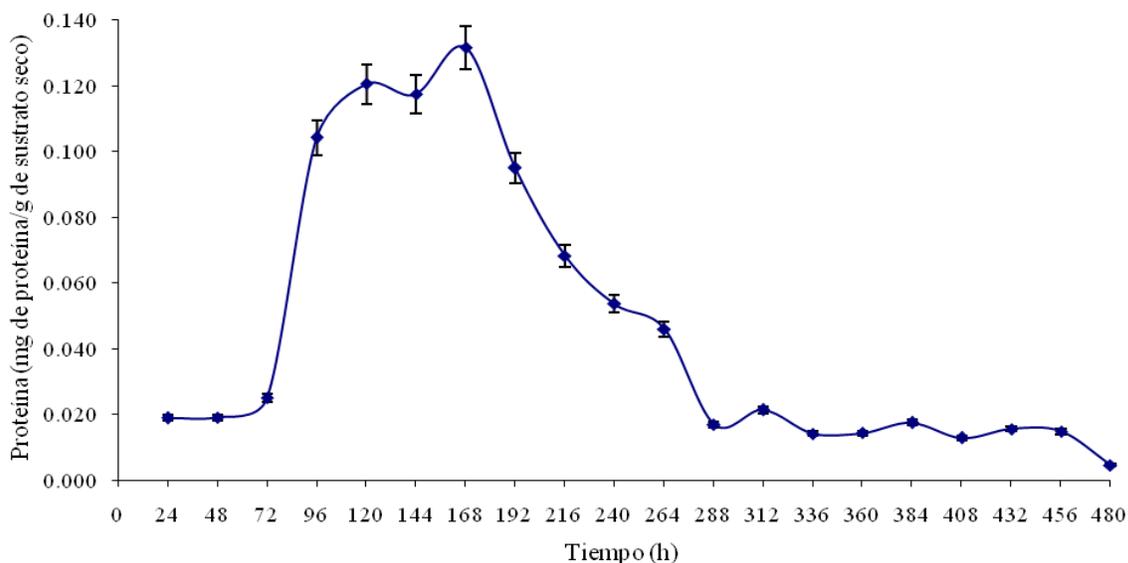
La determinación de variables tales como el pH, la actividad volumétrica y la proteína total soluble se realizaron usando sólo el EEE, pues la mayoría de las caracterizaciones se realizan a partir de las enzimas producidas de manera extracelular.



Gráfica 1. Perfil de pH de la fermentación.

En la gráfica 1 se puede observar que existe un aumento en los valores de pH respecto al valor inicial, alcanzándose un máximo a las 144 horas y descendiendo a partir de ese tiempo. La mayoría de los valores se mantuvo en el intervalo de entre 5.9 y 7.6, aproximadamente. Este fenómeno de incremento en el pH coincide con la detección del crecimiento vigoroso y rápido del hongo en el cultivo y probablemente el descenso se debe a que el sistema de fermentación no se encuentra amortiguado, además de que los productos del consumo de azúcares (complejos o simples) por el metabolismo del hongo, como pueden ser algunos ácidos orgánicos, pueden acidificar el medio al ser excretados.

b) Proteína total soluble

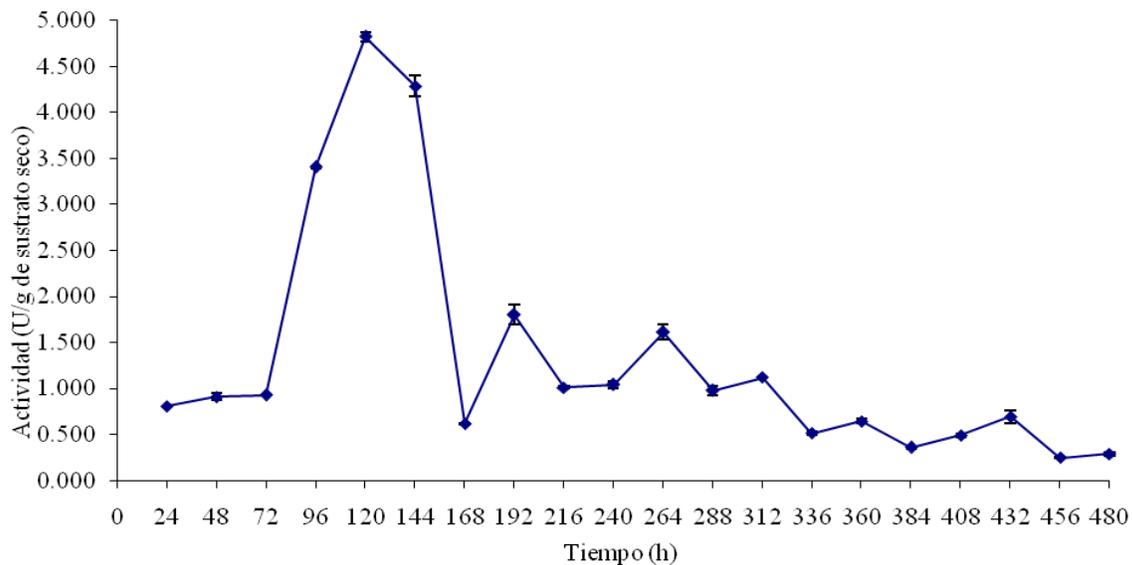


Gráfica 2. Determinación de la concentración de proteína total soluble en la fermentación.

En la gráfica 2 se puede observar el comportamiento de la concentración de proteína total soluble, la concentración inicial fue de 0.0188 mg de proteína/g de sustrato seco, a las 72 h se observó un aumento y se alcanzó un máximo de 0.1316 mg de proteína/g de sustrato seco a las 168 h. A partir de ese tiempo disminuyó paulatinamente hasta una concentración de 0.0046 mg de proteína/g de sustrato seco.

Hasta el momento, la mayoría de estudios que han reportado la producción de enzimas lacasas por *Pleurotus ostreatus* sobre sustratos ligninocelulósicos utilizan medios líquidos naturales o sintéticos para enriquecer el cultivo en sólido, por lo que el hongo obtiene su fuente de carbono tanto del soporte sólido biodegradable como del líquido que rodea al soporte. No obstante, existe un trabajo en el que las condiciones son similares a las del presente trabajo, Márquez-Araque y cols. en 2007, realizaron el cultivo de la cepa IE8 de *Pleurotus ostreatus* empleando bagazo de caña de azúcar como soporte biodegradable, con una humedad del 80%. En dicho trabajo la máxima cantidad de proteína obtenida fue de 0.122 mg/g de materia seca (MS) a las 336 h, inferior a los 0.1316 mg de proteína/g de sustrato seco a las 168 h obtenidos en el presente trabajo.

c) Actividad



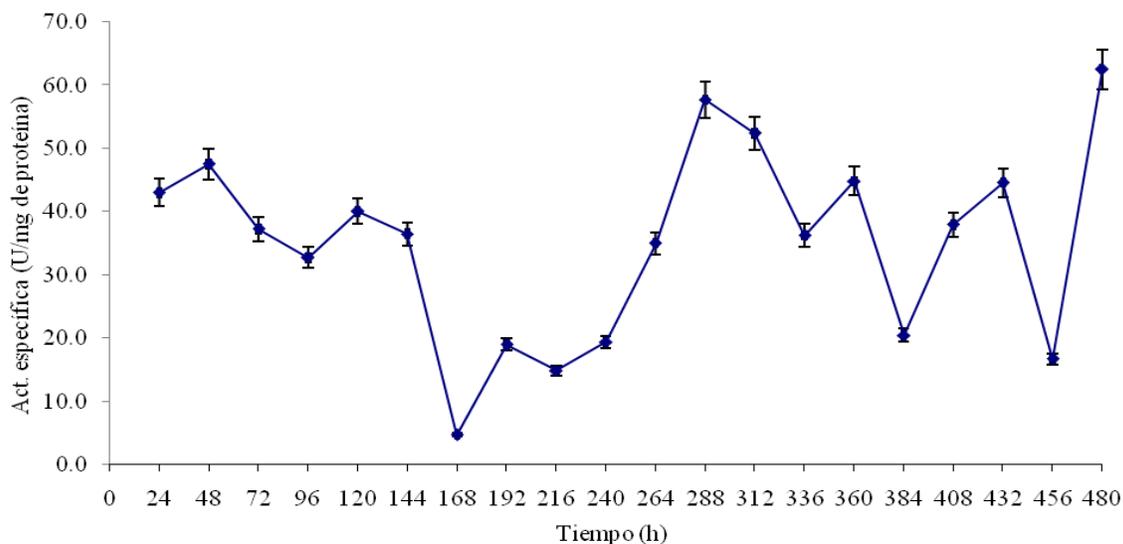
Gráfica 3. Perfil de actividad de lacasas extracelulares en la fermentación.

Respecto a la actividad de lacasas por gramo de sustrato, se observó un incremento sustancial a partir de las 72 h, que alcanzó un máximo de 4.821 U/g de sustrato seco a las 120 h y tuvo una caída relevante a las 168 h, obteniéndose 0.619 U/g de sustrato seco. A las 192 h se observó un valor de 1.8 U/g de sustrato seco tiempo a partir del cual la actividad fue disminuyendo de manera paulatina hasta un valor alrededor de 0.25 U/g de sustrato seco.

La actividad de lacasas de la misma cepa del hongo *Pleurotus ostreatus* obtenida en el estudio de Téllez-Téllez y cols. en 2008, en el que se realizó una fermentación en medio sólido usando como soporte inerte espuma de poliuretano y un medio sintético adicionado con cobre, fue de 2.43 U/mL a las 312 h usando DMP como sustrato. Cabe señalar que en el presente estudio se alcanzó casi el doble de actividad en un tiempo menor, aunque hay que tener en cuenta que las unidades son diferentes.

d) Actividad específica

Para conocer la cantidad de proteína total soluble que tiene actividad catalítica específica de lacasa se construyó la gráfica en la que se relacionó la actividad de lacasas con la cantidad de proteína en función del tiempo. El resultado se muestra a continuación en la gráfica 4.



Gráfica 4. Actividad específica extracelular de la fermentación.

Los valores de actividad específica que se obtuvieron entre las 24 h y las 144 h oscilan entre 32 y 47 U/mg de proteína. A las 168 h se obtuvo el valor mínimo, que fue de 4.7 U/mg de proteína, y a partir de las 192 h y hasta las 456 h los valores de actividad específica fluctúan entre 15 y 57 U/mg de proteína. A las 480 h se alcanzó un máximo de 62.5 U/mg de proteína.

La máxima actividad específica para DMP obtenida en el presente trabajo fue de 62.5 U/mg de proteína a las 480 h, lo que representa apenas la mitad de la actividad específica obtenida (128.75 UI/mg de proteína para ABTS (2,2 azino bis (3 etilbenzotiazolina-6-sulfonato))) en bagazo de caña por Márquez-Araque y cols. 2007. Sin embargo, representa el doble de la actividad específica de lacasas obtenida por Téllez-Téllez y cols. en 2008 (30 U/mg de proteína a las 312 h).

Segunda etapa

Los resultados hasta ahora obtenidos son evidencia del desarrollo de *Pleurotus ostreatus* sobre paja de trigo y de la producción de enzimas lacasas, por lo que se procedió a realizar la segunda etapa del estudio. Esta etapa consistió en:

- la obtención de los perfiles de actividad de las isoenzimas de lacasa producidas tanto de manera extracelular como intracelular, puesto que el ARN total producido engloba tanto las enzimas excretadas al medio como las enzimas que aún no se han excretado y
- la obtención de los patrones de expresión de lacasas, tanto por hibridación Northern como por RT-PCR.

A continuación se presentan los resultados obtenidos.

a) Perfiles de actividad de las isoenzimas

i. Perfiles de actividad de las isoenzimas extracelulares por zimografía

En la figura 1a se observa el perfil de isoenzimas de lacasas obtenidos a partir de los extractos extracelulares.

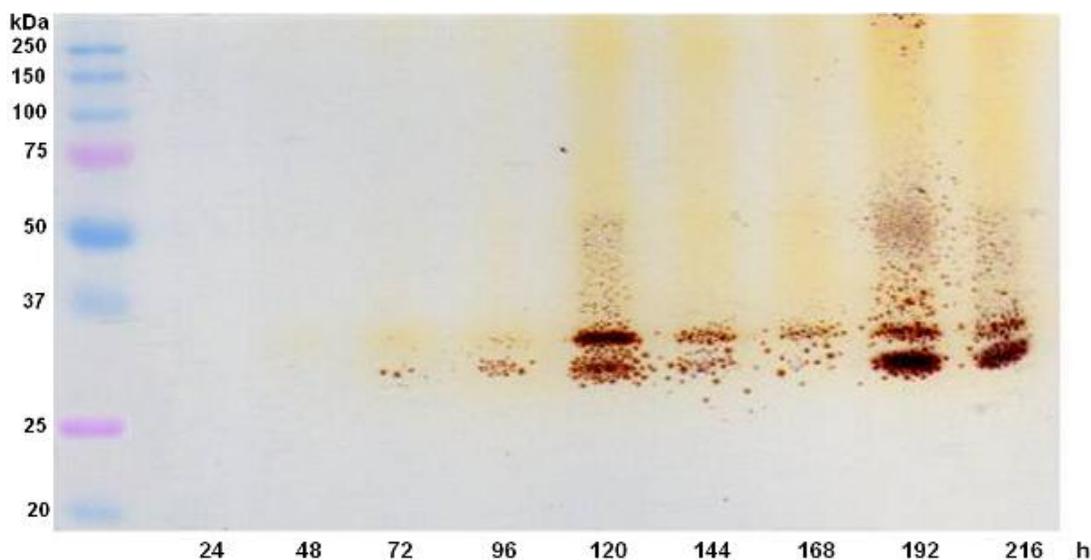


Fig. 1a Perfil de isoenzimas de lacasas provenientes de los extractos extracelulares.

Continuación de la figura 1a

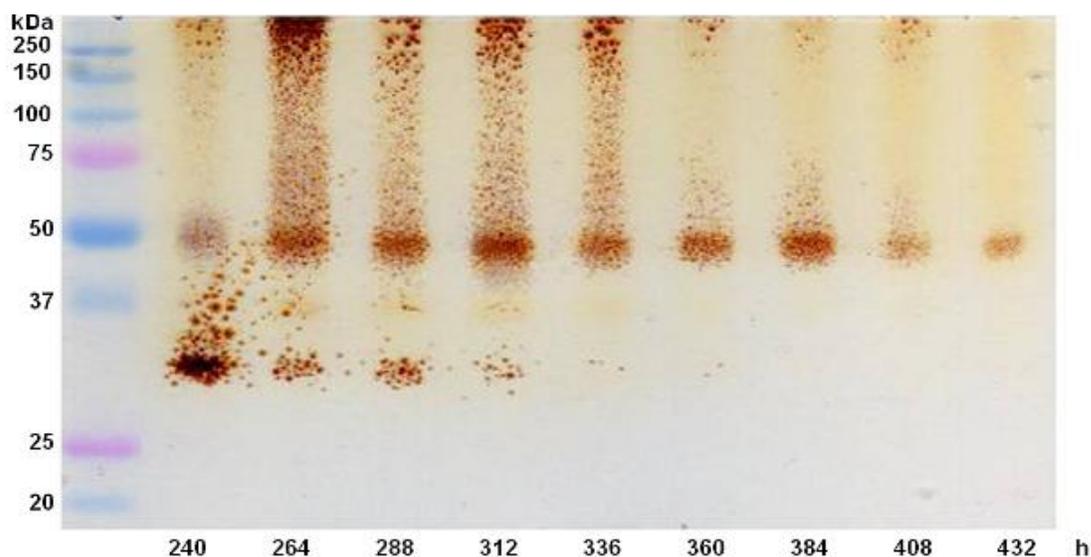


Fig. 1a Perfil de isoenzimas de lacasas provenientes de los extractos extracelulares.

En la figura 1a se observan dos isoenzimas a partir de las 72 h, de aproximadamente 31 y 34 kDa. La isoenzima de 31 kDa se mantiene hasta las 360 h de la fermentación, mientras que la isoenzima de 34 kDa desaparece completamente a las 240 h. A las 120 h aparece otra isoenzima, de aproximadamente 50 kDa, que comienza a incrementar su actividad, se mantiene hasta las 384 h y en seguida desciende. También se puede observar que a las 192 h aparece una isoenzima de aproximadamente 37 kDa, que permanece hasta las 336 h.

Réplicas de los zimogramas en la segunda y tercera fermentación:

Como ya se ha mencionado, se carece de referencias que ayuden a evaluar que tan buena fue la producción que se obtuvo de enzimas lacasas en el presente trabajo. No obstante, lo más importante en este estudio es observar los cambios que por algún motivo se están reflejando en los perfiles de las isoenzimas. Por tal razón, se realizaron 2 réplicas de la fermentación en tiempos independientes para verificar dichos patrones.

Las figuras 1b y 1c representan las réplicas del perfil de isoenzimas de lacasas provenientes de los extractos extracelulares producidas por *Pleurotus ostreatus* incubado sobre paja de trigo. Podemos observar que existe el mismo perfil en las réplicas de la fermentación en las figuras 1b y 1c respecto a la figura 1a, la poca percepción de algunas de las bandas en los tiempos finales del zimograma de la segunda fermentación se pueden deber a una menor actividad mostrada por la muestra.

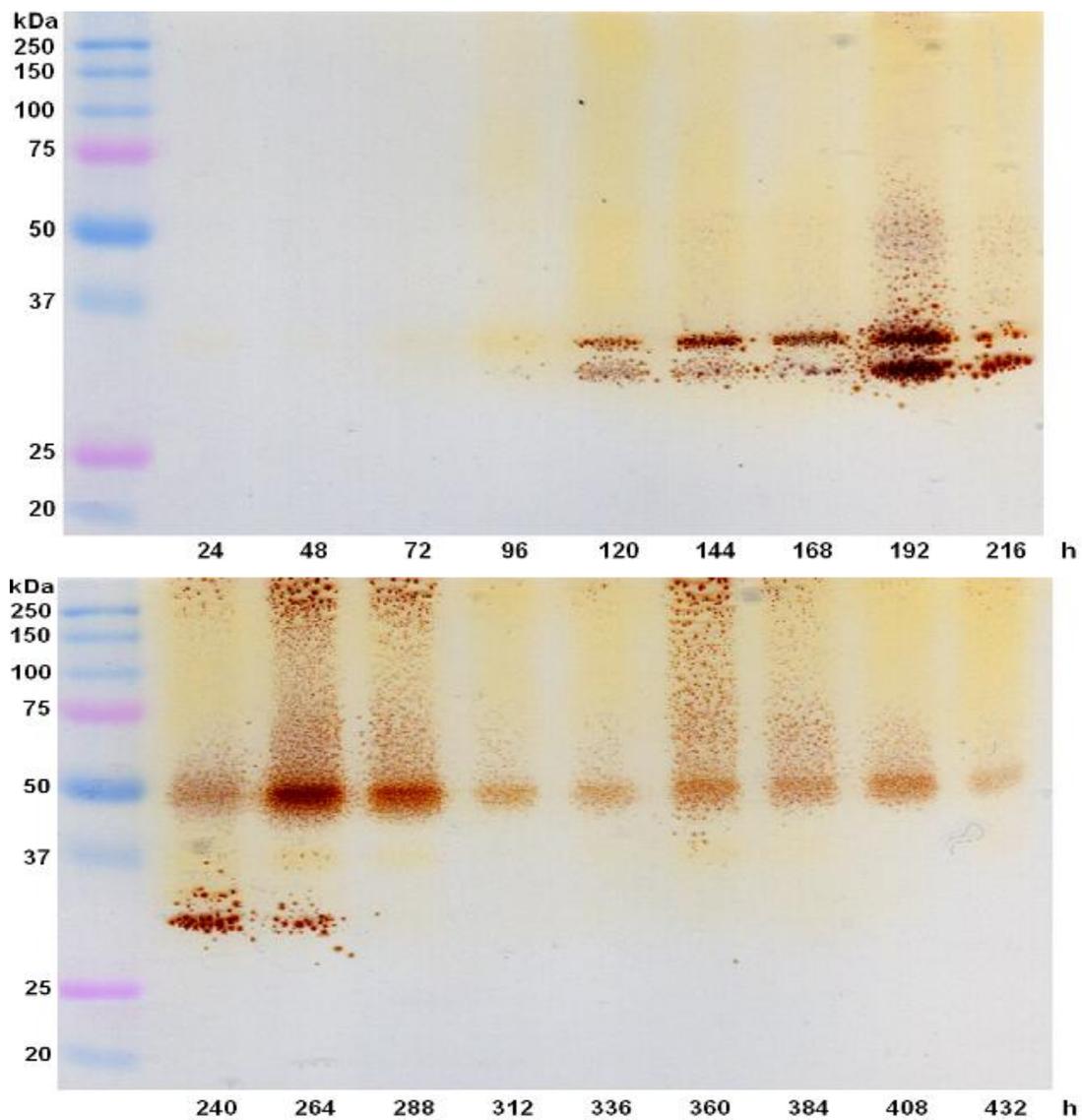


Fig. 1b Perfil de isoenzimas de lacasas provenientes de los extractos extracelulares.

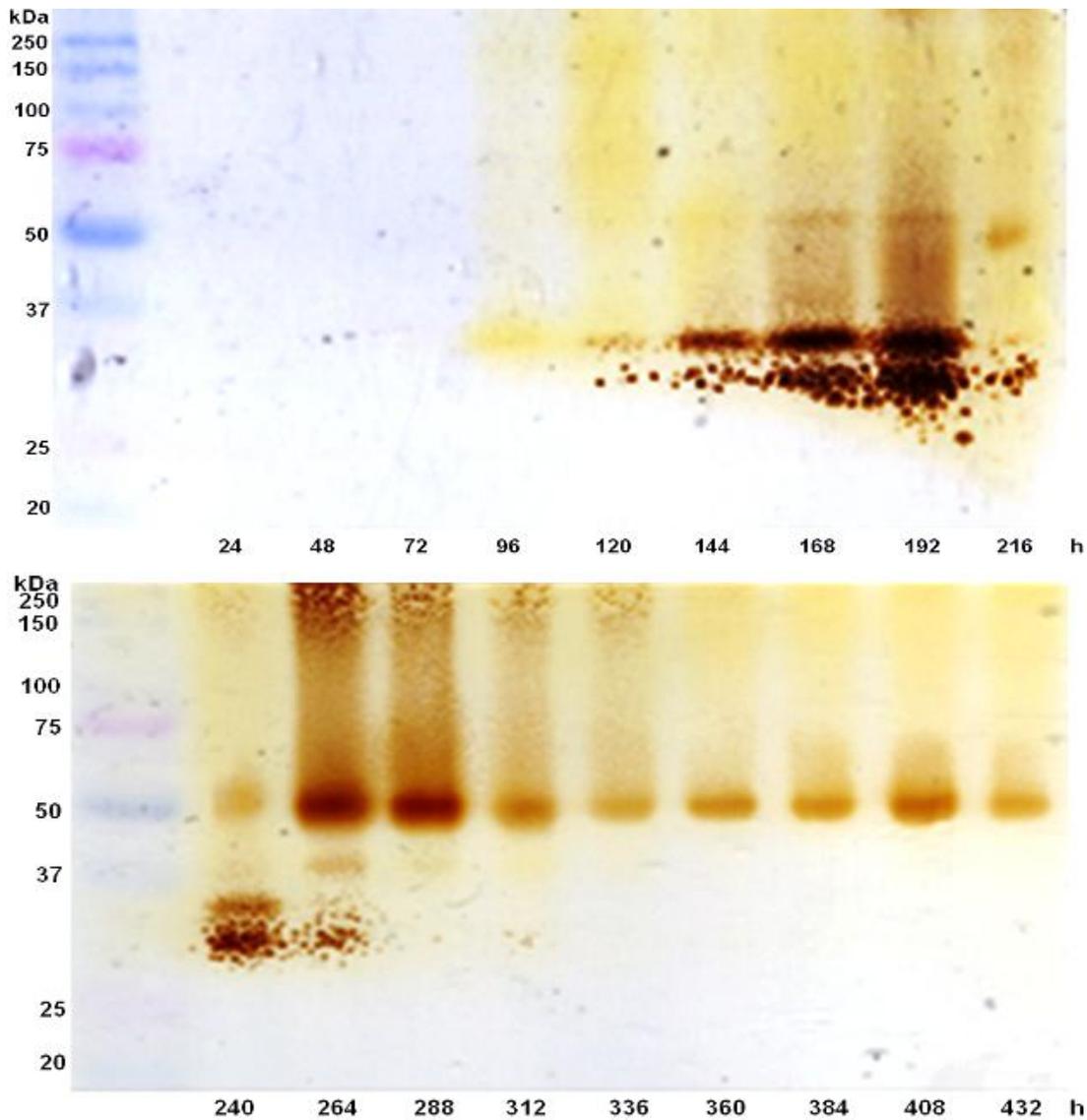


Fig. 1c Perfil de isoenzimas de lacasas provenientes de los extractos extracelulares.

Estos resultados dan evidencia de que el comportamiento observado para las isoenzimas es constante en cada fermentación y es independiente de las variaciones en actividad que se registraron en cada muestra durante los 20 días de cultivo.

En los estudios realizados por Ramírez y cols. en 2003 se purificaron y se determinó el peso molecular de 3 isoenzimas de lacasa de la cepa Chiapas, México de *Pleurotus ostreatus* obteniéndose bandas de aproximadamente 30, 46 y 52 kDa, usando como cultivo sólido

salvado de trigo enriquecido con vinaza 1:1, los pesos aproximados de las isoenzimas obtenidas en el presente estudio son parecidos. En cuanto al número de isoenzimas obtenido en el presente trabajo, es mayor que en el trabajo realizado por Téllez-Téllez y cols. 2008, quienes obtienen hasta 3 isoenzimas en el cultivo sólido con un soporte inerte y un medio sintético de la misma cepa.

Existen reportes en cuanto al número de isoenzimas extracelulares de lacasa obtenidas en esta cepa empleando diferentes condiciones en cultivo líquido. Juárez en 2005 obtuvo 3 isoenzimas de lacasa a partir de un medio líquido adicionado con cobre y 4 isoenzimas de lacasa de un medio líquido sin adicionar con cobre. El comportamiento del sistema empleado en nuestro estudio se asemeja en el número de isoenzimas obtenidas en el cultivo sin adición de cobre. Téllez-Téllez y cols. en 2008 obtuvieron, por el contrario, 4 isoenzimas de lacasa en el mismo cultivo adicionado con cobre que empleó Juárez en 2005, por lo que se puede decir que en ambos cultivos se obtienen hasta 4 isoenzimas con y sin adición de cobre. Estos datos podrían resumirse como que la cepa *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783 produce hasta 4 isoenzimas tanto en cultivo sólido empleando como soporte biodegradable paja de trigo como en cultivo líquido con y sin adición de cobre y sólo 3 isoenzimas en cultivo sólido empleando un soporte inerte.

Cabe resaltar que el perfil de isoenzimas que muestran los zimogramas para la cepa *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783 es diferente a lo que se ha reportado en otros sistemas de cultivo tanto en líquido (Juárez 2005) como en sólido (Téllez-Téllez y cols. 2008).

ii. Perfiles de actividad de las isoenzimas intracelulares por zimografía

El perfil de las isoenzimas de lacasas provenientes de los extractos intracelulares producidas por *Pleurotus ostreatus* incubado sobre paja de trigo se muestran en la figura 2.

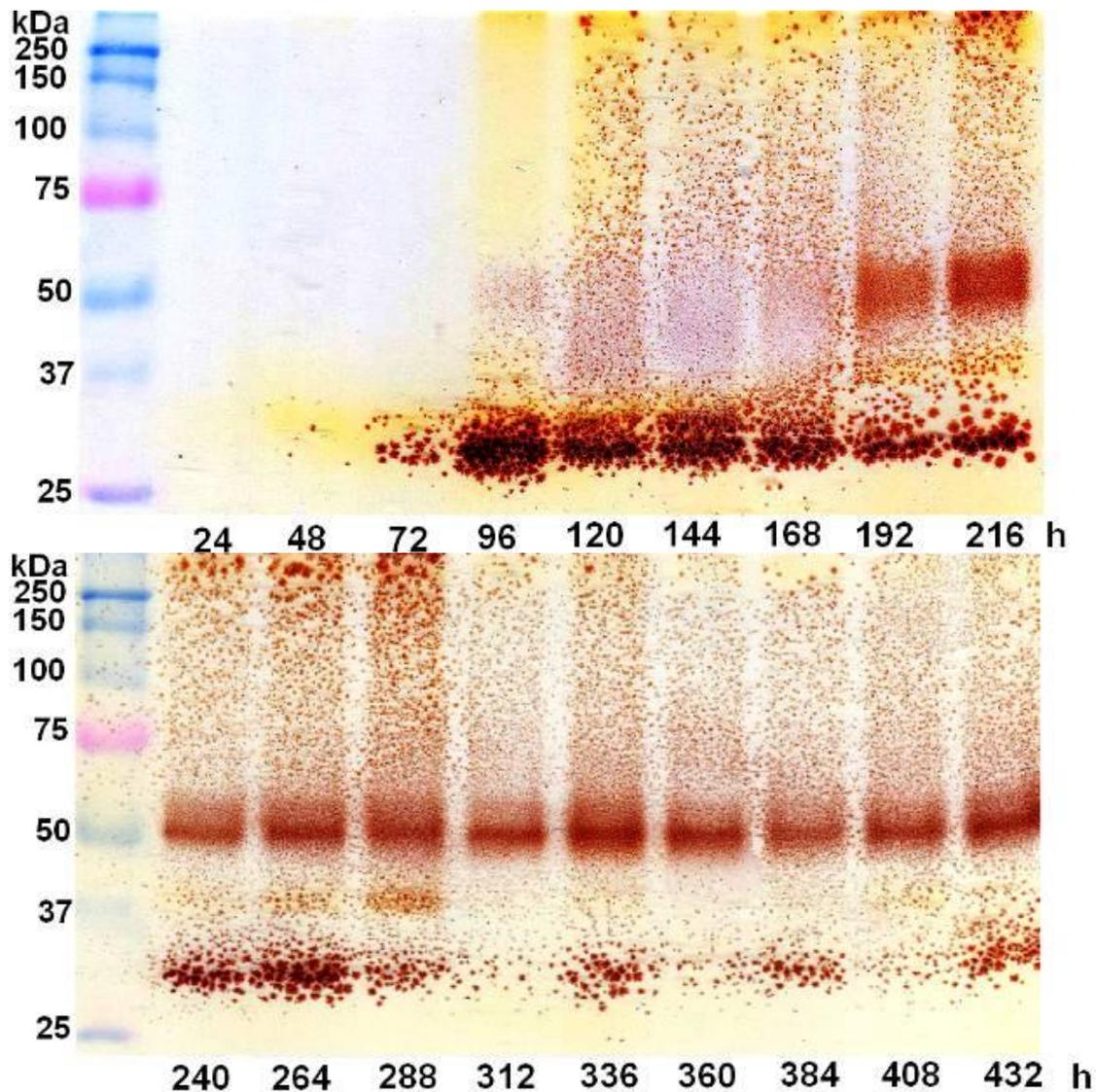


Fig. 2 Perfil de isoenzimas de lacasas provenientes de los extractos intracelulares.

En el extracto enzimático intracelular se observaron nuevamente dos isoenzimas a las 72 h, de 30 y 34 kDa. La isoenzima de 34 kDa desapareció a las 264 h y la de 30 kDa se mantuvo hasta el final del estudio. A las 192 h surgieron las otras 2 isoenzimas, de 37 y 50 kDa. La de 37 kDa permaneció hasta las 288 h y la de 50 kDa persistió hasta el final. Con estos resultados podemos deducir que el perfil de isoenzimas lacasas tanto intra como extracelular es similar y revelaron la presencia de 4 isoenzimas que mostraron expresión diferencial respecto al tiempo. Debido a esta semejanza con los perfiles extracelulares, ya no se consideró necesario realizar otra réplica. Estos resultados son evidencia de que las isoenzimas intra y extracelulares son las

mismas y tal vez las de menor tamaño no se alcanzaron a detectar en los zimogramas de los extractos extracelulares debido a que se encontraban en el tránsito al ambiente extracelular, especialmente en las muestras de los tiempos finales donde la banda de menor tamaño sí se presenta aunque con una actividad muy atenuada.

Es preciso señalar que los tamaños de las isoenzimas referidos en los zimogramas anteriores son aproximados, calculados a partir del marcador de peso molecular.

b) Electroforesis de ARN en geles de agarosa-formaldehído

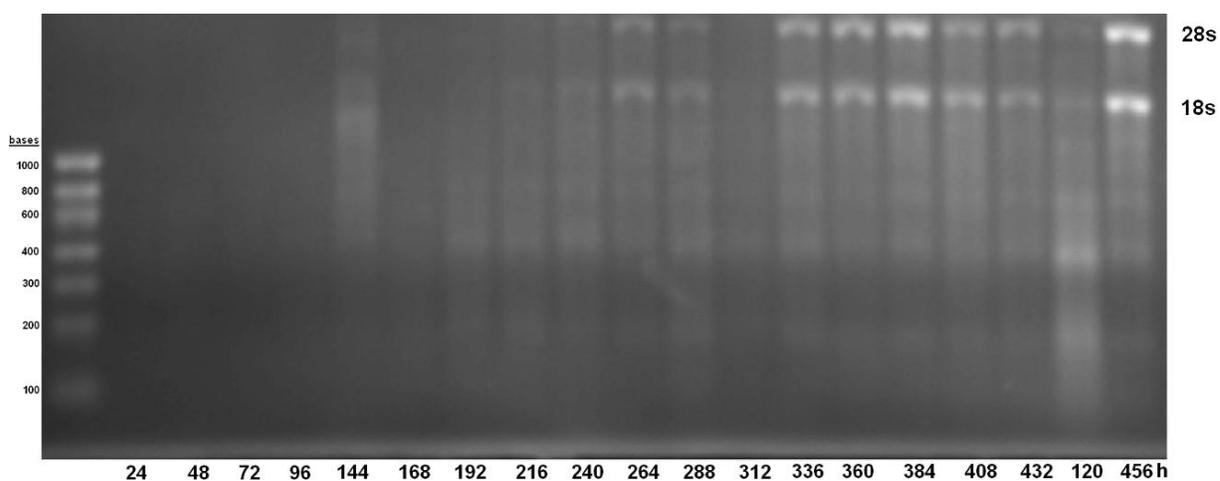


Fig. 3 Electroforesis del ARN extraído de *Pleurotus ostreatus* desarrollado sobre paja de trigo.

En la figura 3 se observa la electroforesis del ARN total obtenido a partir del cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre paja de trigo en geles de agarosa-formaldehído. En el gel se puede observar el ARN ribosomal (ARNr) en la parte superior en algunos puntos de muestreo, sobre todo el ARNr 28S y el ARNr 18S. S es el coeficiente de sedimentación medido en Svedbergs (Luque y Herráez, 2002). El ARNr representa el 75% del total del ARN, el ARN de transferencia (ARNt) el 20% y el 5% restante representa el ARN mensajero (ARNm), por lo que la ubicación del ARNt y del ARNm en el gel resulta difícil de distinguir, sin embargo se sabe que se ubican en el barrido de cada carril. Con la comprobación de la obtención de ARN total se pudo continuar con la obtención de los patrones de expresión.

5'ACCHGGAGAVTCDGGRAGRGRATYACBCARCTTTCRACVCTRACRATGGTRTT
YCAKGGTCGYACRAGNCCCTGRAACTTCAGRATDTCRTT 3'

(31 AA, 93 nucleótidos)

Para obtener la sonda universal de lacasas, también se realizó un alineamiento que incluyó la mayoría de secuencias posibles de alinear por el programa Megalign de DNASTAR[®] de organismos que según las bases de datos de GEN BANK producen enzimas lacasas (figura 5). En el alineamiento se incluyeron 36 secuencias de especies de hongos basidiomicetos, 12 de ascomicetos, 2 de bacterias y 1 de plantas, es decir se tomó una especie de cada organismo que según las bases de datos de GEN BANK contiene genes de lacasa. Aunque hay distintas cepas de una misma especie que producen lacasas, el programa no nos permitió realizar un alineamiento tan grande.

En el alineamiento consenso para la sonda específica se resalta una zona en color amarillo, señalando la región que contiene los aminoácidos que presentan unión con cobre. El procedimiento para la obtención de la secuencia final de la sonda fue el mismo descrito anteriormente, los resultados de la región de aminoácidos seleccionada y de la secuencia final de la sonda se muestran a continuación:



Fig. 5 Alineamiento consenso de las secuencias en aminoácidos de lacasas presentes en una especie de cada organismo con el programa Megalign de DNASTAR®.

Los aminoácidos que representan la región consenso del alineamiento para obtener la sonda universal son:

T D N P G P W F L H C H I D W H L E A G L A V V F (aminoácidos)

A continuación se muestra la secuencia final de la sonda universal de lacasa, ya con la degeneración según la clave antes vista:

5'RTTSTGVTGNCGVTCBGGNCGYAGNTCRACGGTRAGRTARACRGTRACVTCCTT
GGTYCCDGGCCCCAARAGRCA3'

(25 AA, 75 nucleótidos)

En la figura 6 se observa el gel de agarosa-formaldehído usado para la transferencia a la membrana Immobilon-Ny+. Se incluyó como control negativo (-) ARN de *Lactuca sativa var. capitata (Iceberg)* y como control positivo (+) la sonda universal de lacasas. La misma imagen fue transferida por el método de Northern blot a la membrana Immobilon-Ny+, siguiendo el método descrito por Sambrook y Russell, en 2001.

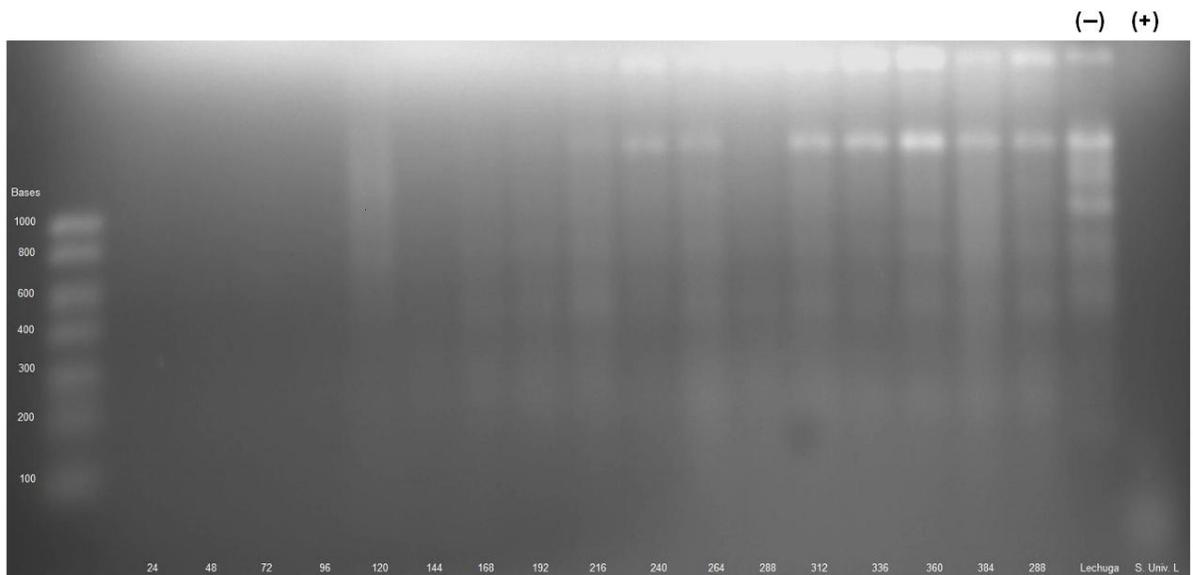


Fig. 6 Electroforesis del ARN extraído de *Pleurotus ostreatus* desarrollado sobre paja de trigo, control negativo (-) y control positivo (+).

ii. Detección de la hibridación por inmunoensayo enzimático

En la figura 7 se observa el resultado obtenido de la hibridación de la membrana con la sonda universal de lacasa.



Fig. 7 Membrana resultante de la hibridación con la sonda universal de lacasa.

A pesar de que se diseñaron dos sondas para realizar el experimento por cuestiones técnicas durante el procedimiento la hibridación de la membrana con la sonda específica para lacasas se realizó sin éxito por lo que no se obtuvo un resultado con ella. Con la membrana mostrada en la figura 7 resulta complicado realizar un análisis del patrón de expresión, lo único que se alcanza a observar en la membrana es la hibridación de la sonda con su control que se ubicó en la parte inferior derecha. A continuación se realizó la síntesis de ADNc específico de lacasas para la obtención de los patrones de expresión.

b) RT-PCR:

i. Primers específicos para lacasa usados para la RT-PCR

Durante la búsqueda para la selección de los primers se encontró el reporte de primers específicos para enzimas lacasas y un oligo (dT) también específico, por lo que se decidió usar dichos primers antes probados para realizar la RT-PCR. Los primers y el oligo(dT) se muestran a continuación:

Lac1: 5'-CGCTCTAGACTCGTCATTGAAGCAGCAGATG-3'

Lac2: 3'-CTGTTTCCACCACCGTATCGAATCGACGTCGCG-5'

dTNot1: 5'-AATTCGCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

La distancia entre Lac1 y Lac2 es de 750 pares de bases (pb), por lo que se esperan posibles productos de ese tamaño. Los resultados obtenidos usando dTNot1 en la reacción de RT-PCR no fueron los esperados, debido a que los amplicones eran de tamaño muy pequeño (< 100 pb). Por ello se realizó una transcripción reversa usando el primer Lac1; al realizar PCR se obtuvo el siguiente resultado:

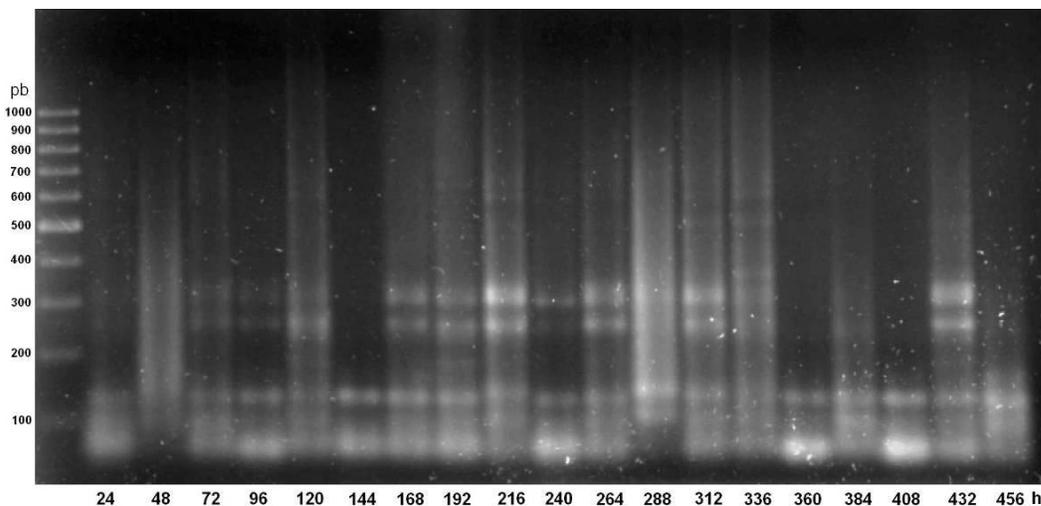


Fig. 8 Electroforesis en gel de agarosa del producto obtenido por RT-PCR.

En la figura 8 se observa la obtención de fragmentos específicos correspondientes a lacasas. Aunque no son de los tamaños esperados (750 pb) se alcanzan a observar diversas bandas que surgen de manera intermitente conforme avanza el tiempo. Entre las 72 y las 120 h se observan 4 bandas, de tamaños aproximados a 310 pb, 270 pb, 140 pb y la última menor a 100 pb. A las 144 h solo se observa sólo la banda de 140 pb, a las 168 h se observan las tres bandas de mayor tamaño, de manera constante hasta las 264 h. A las 288 h sólo se observan dos bandas, una de aproximadamente 150 pb y otra de 100 pb. A las 312 h se definen 3 bandas de aproximadamente 310, 270 y 140 pb. A las 336 h se observan varias bandas, pero ninguna definida con precisión. A las 360 h se observa una banda, de aproximadamente 150 pb, y a las 384 h se observa de nuevo la banda de 150 pb y una de 100 pb. A las 408 h se observa de nuevo una sola banda de 150 pb y a las 432 h se presentan tres bandas, de 310 pb, 270 pb y 140 pb. Por último, a las 456 se observan dos bandas, una de 150 pb y otra de 100 pb, poco definida.

7.3 Análisis de los patrones de expresión

Resulta complicado comparar el perfil de isoenzimas de lacasas obtenido por zimografía con el patrón obtenido por la hibridación Northern, así que dicho análisis se realizó comparando el número de isoenzimas observadas en los zimogramas con el patrón obtenido por RT-PCR, es decir, el número de ADN complementarios específicos de lacasas.

Como puede observarse en los 2 primeros tiempos de muestreo, 24 y 48 h, no es posible apreciar bandas en los zimogramas y tampoco se perciben claramente bandas amplificadas de ADNc en estos tiempos. Esto puede deberse a la poca sensibilidad de los métodos o a la baja concentración de la enzima obtenida en el cultivo. A partir de las 72 h y hasta las 168 h se observan dos bandas en los zimogramas, en contraste con las cuatro bandas de ADNc en los mismos tiempos (excepto a las 144 h, donde hay solo una banda de 140 pb). Entre las 192 y las 312 h se pueden ver tres bandas en los zimogramas (a excepción de las 240 h, tiempo en el que se aprecian cuatro bandas); algo similar se observa en cuanto a las bandas de ADNc presentes pues a partir de las 192 h y hasta las 312 h se observan tres bandas (a excepción de las 288 h donde sólo se observan dos bandas). Finalmente, de las 336 h y hasta el final del cultivo se observa de manera constante la banda de mayor tamaño en los zimogramas y de forma intermitente la de menor tamaño y en el patrón de ADNc no se alcanza a definir ninguna banda; a las 360 h se observa una banda, al igual que en los zimogramas; a las 384 h se observan dos bandas de ADNc y dos bandas en los zimogramas; a las 408 h se observa una banda de ADNc y una banda en los zimogramas y, por último, a las 432 h se observan tres bandas de ADNc y dos bandas en los zimogramas. Se puede observar que existe cierta correspondencia entre el patrón de ADN complementarios y el de los zimogramas en cuanto al número de bandas, pero no en cuanto al tamaño. La banda de 140 pb permanece constante durante todo el cultivo en el patrón de ADNc, algo que no ocurre con las bandas de mayor tamaño (que aparecen de manera intermitente). Por su parte las bandas dominantes en los zimogramas son las bandas de mayor y de menor tamaño, que permanecen presentes en la mayor parte de los puntos de muestreo.

DISCUSIÓN

Para la realización del presente estudio se consideró importante evaluar en qué número y de qué manera se presentan las isoenzimas de lacasa producidas por *Pleurotus ostreatus* cultivado sobre paja de trigo como medio sólido biodegradable, un soporte que representa el ambiente natural de desarrollo del hongo, con el objeto de obtener información que permita evaluar la conveniencia de producción de lacasas en este sistema y poder compararla con el sistema líquido o con soportes sólidos inertes. Además, conocer los patrones de expresión de los genes que codifican para estas enzimas permitiría saber si durante un cultivo la expresión de los genes es diferencial, es decir, si hay más de un gen que codifica para las isoenzimas en un momento determinado del cultivo o si es sólo un gen el responsable de la aparición de todas las isoenzimas.

Estos estudios se han llevado a cabo con muy poca frecuencia y por lo general la evaluación del cultivo suele hacerse antes de los 10 días de fermentación; en cultivos líquidos, por ejemplo, se realiza a los 8 días de cultivo. La cepa que se utilizó en este estudio presenta en medio líquido las mayores actividades entre los 13 y 16 días de cultivo, lo que supone que las diferencias pueden presentarse entre cepas de la misma especie. Las evaluaciones realizadas en el presente trabajo se hicieron hasta los 20 días de cultivo, que es el tiempo en el que el hongo invade completamente el soporte dentro del recipiente de cultivo. A pesar de que no fue posible evaluar el crecimiento del hongo a través de la determinación de la biomasa generada respecto al tiempo de cultivo, visualmente se llevó a cabo un monitoreo de la invasión del sustrato por el micelio del hongo.

De acuerdo con los datos de actividad obtenidos y el perfil mostrado en los zimogramas se puede observar que entre las 120 y las 140 h la actividad enzimática se encuentra en el nivel máximo; en estos tiempos la isoenzima con mayor intensidad es la de aproximadamente 34 kDa. Por otro lado, las mayores actividades específicas se encontraron a las 288 y 480 h. En los zimogramas se puede apreciar que a las 288 h se encuentran bandas de aproximadamente 50, 37 y 34 kDa, mientras que a las 480 h sólo aparece la banda de mayor peso molecular. La

banda de aproximadamente 34 kDa se encuentra presente en los puntos de mayor actividad, en algunos casos con mayor intensidad que otras que aparecen con ella, por lo que puede pensarse que es la más activa de las isoenzimas que produce el hongo (algo que podría verificarse con su purificación).

A pesar de que se desconoce el tamaño preciso de las isoenzimas producidas por esta cepa de *Pleurotus ostreatus*, es notorio que los tamaños aproximados que se resolvieron en los geles de poliacrilamida son mucho más pequeños que los reportados para esta especie, que oscilan entre los 60-80 (Heinzkill y cols. 1998) y hasta 190 kDa (Thakker y cols. 1992, Edens y cols. 1999). Esto podría explicar que los ADNc sintetizados sean menores a los esperados, de acuerdo con los primers utilizados por Giardina y cols. (1996) para el gen *pox2*.

Las isoenzimas que se presentan durante todo el cultivo son las de 50 y 34 kDa, aproximadamente, aunque en los primeros tiempos no logran apreciarse en los zimogramas. Mientras, el ADNc que está presente durante todo el cultivo es el de aproximadamente 140 pb. La aparición de los demás ADNc no sigue un patrón claro de aparición o desaparición que permita evidenciar la correspondencia entre isoenzima y ADNc. Cabe señalar que parece que el perfil de isoenzimas es diferente dependiendo de la etapa de crecimiento en la que se encuentra el hongo, mientras que el patrón de expresión se mantiene aparentemente estable.

De acuerdo a los estudios de obtención de genes de *Pleurotus ostreatus* var. *florida* hasta el 2003 se contaba con las secuencias de cuatro genes de lacasa y ocho isoenzimas derivadas de tres genes, por lo que se podría concluir que sólo tres de los cuatro genes obtenidos producen isoenzimas con actividad. Estos resultados fueron obtenidos en cultivo con un medio líquido y pueden hacer referencia a que sin importar el sistema en el que se encuentre creciendo el hongo sólo se da la expresión de tres genes, puesto que aún no existen referencias de la isoenzima producida por el gen *pox1*. Del gen *lccK*, obtenido por Okamoto y cols. en 2003 tampoco hay referencias de la(s) isoenzima(s) producida(s). En 2009, Pezzella y cols. obtuvieron las secuencias de otros tres genes a partir de la cepa ATCC MYA-2306 de

Pleurotus ostreatus var. *florida*, pero aún no se ha descrito un producto proteico funcional para cada uno de ellos.

9. CONCLUSIONES

En cuanto al análisis de los perfiles zimográficos, se puede observar que los perfiles obtenidos son diferentes a los que se han obtenido en líquido y en sólido con soportes inertes para esta misma cepa. A diferencia de éstos, en los perfiles obtenidos en el presente trabajo se puede determinar cual de las isoenzimas tiene mayor actividad y en qué etapa de cultivo se está produciendo. Por ejemplo, las actividades de algunas isoenzimas de lacasa se presentan desde las 24 h, aunque muy tenues, lo que quiere decir que están presentes desde el inicio. Por otro lado, existen 3 etapas bien definidas: en la primera sólo se involucra a las dos isoenzimas de menor tamaño 37 kDa y 30-31 kDa aproximadamente; en la segunda etapa, que parece de transición, llegan a estar presentes hasta 4 isoenzimas y en la última aparece de forma dominante la isoenzima de 50 kDa. Este patrón implicaría aparentemente una participación diferencial de cada una de las isoenzimas en la fisiología del hongo. Se observó cierta correspondencia entre los diferentes ADNc obtenidos en este estudio y las isoenzimas obtenidas en los zimogramas. Sin embargo, no se pudo hallar la correspondencia en tamaño, ya que implica otro tipo de estudios, como la secuenciación de las bandas de ADNc obtenidas y la purificación de las isoenzimas producidas.

10. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos no contestan todas las preguntas que se plantearon. Como es de esperarse en cualquier trabajo de investigación lo obtenido ofrece más incógnitas que deberán contestarse con trabajos futuros, por lo que en este trabajo se pueden dar las siguientes recomendaciones:

- La evaluación de la biomasa en este tipo de cultivos ayudaría a establecer las etapas de desarrollo del hongo y así relacionarlas de manera más acertada con el perfil de isoenzimas.
- Debido a que los tamaños de los ADNc obtenidos no fueron los esperados según los primers utilizados (750 pb) es necesario corroborar que corresponden a lacasas a través de la secuenciación de las bandas.
- Durante la revisión realizada para llevar a cabo este estudio se encontraron las secuencias de cuatro genes que codifican para lacasas correspondientes a una cepa de *Pleurotus ostreatus* var. *florida*. En sus reportes, los autores mencionan que las diferencias entre los genes demuestran la existencia de una familia multigénica y dos subfamilias distintas. Sin embargo no se sabe el grado de variación en estos genes con respecto a otras cepas de la misma especie, ya que sólo se encontró una secuencia más de lacasa de *Pleurotus ostreatus*, obtenida por Okamoto y cols. en 2003, quienes no hacen mención de la cepa específica usada. Por tales motivos, la amplificación y secuenciación de los genes completos de lacasas de la cepa usada en éste trabajo contribuiría al enriquecimiento de la información en la base de datos.
- Sería interesante purificar y caracterizar las isoenzimas producidas con el fin de mostrar si pueden encontrarse lacasas con pesos moleculares menores a los reportados.
- La clonación de los genes que se expresan en esta condición de cultivo en organismos que son incapaces de producir lacasas ayudaría a encontrar el(los) gen(es) responsable(s) de la aparición de las diversas isoenzimas producidas y definiría a los genes con potencial para trabajos de sobreexpresión.

11. REFERENCIAS

- Abadulla E, Tzanov T, Costa S, Robra KH, Covaco-Paulo A y Gübitz. 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsute*. *Appl Environ Microbiol* 66: 3357-3362.
- Bollag JM y Leonowicz A. 1984. Comparative studies on extracellular fungal laccase. *Appl Environ Microbiol* 48: 849-854.
- Booth SR y Shanks JR. 1998. Potential of a drier rice/mycelium formulation of entomopathogenic fungi to suppress subterranean pest in small fruits. *Biocontrol Sci Technol* 8: 197-206.
- Bosch A, Marona RA y Yantono OM. 1995. A single descriptive model of filamentous fungi spore germination. *Process Biochem* 30(7): 599-606.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Cannel E y Moo-Young M. 1980. Solid state fermentation. *Process Biochem*. 15: 2-7.
- Claus H. 2003. Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch Microbiol*. 179: 145-150.
- Claus H. 2004. Laccases: Structure, reactions, distribution. *Micron*. 35: 93-96.
- Cohen R., Persky L. y Hadar Y. (2002). Biotechnological applications and potential of wood degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 8: 37-45.
- Collins PJ y Dobson ADW. 1997. Regulation of lacasse gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl Environ Microbiol* 63: 3444-3450.
- D'Souza TM, Merritt SC y Reddy A. 1999. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Appl Environ Microbiol* 65(12): 5307-5313.
- Darnell JE. 1982. Variety in the level of gene control in eukaryotic cells. *Nature* 297: 365-371.
- Das S, Sengupta S y Mukherjee M. 1997. Importance of laccase in vegetative growth of *Pleurotus florida*. *Appl Environ Microbiol* 63: 4120-4122.

- De Souza C, Zilly A y Peralta R. 2002. Production of laccase as the sole phenoloxidase by a Brazilian strain of *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation. *J Basic Microbiol* 42: 83-90.
- Doelle HW, Mitchell DA y Rolz CE. 1992. Solid substrate cultivation. Elsevier Appl Science. London, N. York, Chapter 3, 35.
- Domenech F. 2000. Obtención de un biopreparado a partir de *Metarhizium anisopliae* por fermentación en estado sólido para su empleo como control biológico de insectos en la agricultura. Trabajo presentado en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Técnicas. Subdirección de Biotecnología, Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar. Ciudad Habana, Cuba.
- Dorta B, Arcas JA y Ertola RJ. 1996. Characterization of growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid substrate fermentation. *Enzyme Microb Technol* 19: 434-439.
- Edens WA, Goins TQ, Dooley D y Henson JM. 1999. Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Appl Environ Microbiol* 65: 3071–3074.
- Fernández Perrino FJ. 1997. Caracterización de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de penicilina: Reacción enzimática catalizada por el producto del último gen (*penDE*) de la ruta de biosíntesis de penicilina. Tesis Doctoral. Universidad de León, España.
- Fraume NJ. 2007. Diccionario ambiental. Editorial ECOE Ediciones. México DF. pp. 203.
- Fukushima Y y Kirk K. 1995. Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispora* lignin degrading system. *Appl Environ Microbiol* 61: 872-876.
- García AM y Torres RG. 2003. Producción de enzimas ligninolíticas por *Basidiomycetes* mediante la técnica de fermentación en sustrato sólido. *Rev Col Biotecnol*. 5: 56-64.
- Galhaup C, Goller S, Peterbauer CK, Strauss J y Haltrich D. 2002a. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiol* 148:2159-2169.

- Galhaup C, Wagner H, Hinterstoisser B y Haltrech D. 2002b . Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme Microb Technol* 30: 529-536.
- Gervais P y Molin P. 2003. The role of water in solid-state fermentation. *Biochem Eng J* 13: 85-101.
- Gervais P, Marechal PA y Molin P. 1996. Water relations of solid state fermentation. *J Sci Ind Res* 55: 343-357.
- Giardina P, Cannino R, Martirani L y Marzullo L. 1995. Clonig and sequencing of the laccase gen from the lingnin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* 61(6): 2408-2413.
- Giardina P, Aurillia V, Cannio R, Marzullo L, Amoresano A, Siciliano R, Fucci P, y Sannia G. 1996. The gene, protein and glycan structures of laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Eur J Biochem* 235: 508-515.
- Giardina P, Palmieri G, Scaloni A, Fontanella B, Faraco V, Cennamo G y Sannia G. 1999. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochem J* 341: 655-663.
- Guillén F, Muñoz C, Gómez-Torbio V, Martínez AT y Martínez MJ. 2000. Oxygen activation during oxidation of methoxyhydroquinones by laccase from *Pleurotus eryngii*. *Appl Environ Microbiol* 66: 170-175.
- Guinberteau J. 1990. Definition and taxonomical place of the genus *Pleurotus* in the mushrooms classification. *Bulletin de la Federation Nationale des Syndicats Agricoles de Cultivateurs de Champignons* 48: 261-264.
- Haars A, Chet I y Hüttermann A. 1981. Effect of phenolic compounds and tannin on growth and laccase activity of *Fomes annosus*. *Eur J Forest Pathol* 11: 67-76.
- Hadar Y, Kerem Z, Gorodecki B y Ardon O. 1992. Utilization of lignocellulosic waste by the edible mushroom *Pleurotus*. *Biodegradation* 3: 189-205.
- Hatakka A, Lundell T, Tervilawilo A y Brunow G. 1991. Metabolism of non-phenolic β -O-4 lignin model compounds by the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 36: 270-277.

- Heinzkill M, Bech L, Halkier T, Schneider P y Anke T. 1998. Characterization of laccase and peroxidases from wood-rotting fungi (family *Coprinaceae*). *Appl Environ Microbiol* 64: 1601-1606.
- Hernández A, Martín Vasallo P, Torres A y Salido E. 1995. Análisis del RNA: Estudio de la expresión génica. *Nefrología*. 15(2): 67-84.
- Hölker U, Höfer M y Lenz J. 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*. 64: 175-186.
- Jenkins NE, Heviefo G, Langewald J, Cherry AJ y Lomer CC. 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News Info* 19(1): 21-31.
- Juárez J. 2005. Estudios de las condiciones de fermentación sumergida para la producción de lacasas de *Pleurotus ostreatus*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Kawai S, Umezawa T e Higuchi T. 1987. p-Benzoquinone monoketals, novel degradation products of β -O-4 lignin model compounds by *Coriolus versicolor* and lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett* 210: 61-87.
- Kunamneni A, Camarero S, García-Burgos C, Plou FJ, Ballesteros A y Alcalde M. 2008. Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microb Cell Fact* 7: 32.
- Laborde J. 1896. Sur laccases des vins. *CR Hebd Seances Acad Sci*. 123: 1074-1075.
- Laemmli U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lewin B. 2004. *Genes VIII*. Pearson Education, Prentice Hall, EEUU.
- Li K, Xu F y Eriksson LK. 1999. Comparison of fungal laccase and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Appl Environ Microbiol* 65: 2654-2660.
- Lonsane, BK, Saucedo-Castañeda G, Raimbault M, Roussos S y Viniestra-Gonzalez G, Ghildhyal NP, Ramakrishna M, y Krishnaiah MM. 1992. Scale-up strategies for solid state fermentation systems. *Process Biochem* 27: 259-273.

- Luque J y Herráez A. 2002. Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética: conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Elsevier España, Madrid, 2001.
- Maller D, Whetten R, Bao W, Chen CL y Sederoff R. 1993. The role of laccase in lignification. *Plant J* 4: 751-757.
- Mansur M, Suárez T, Fernández-Larrea J, Brisuela M y González A. 1997. Identification of a laccase gene family in the new lignin-degrading basidiomycete CECT 20197. *Appl Environ Microbiol* 63: 2637-2646.
- Márquez-Araque AT Mendoza GD, González SS Buntinx SE y Loera O. 2007. Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes sp.* EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *aspergillus niger* AD96.4 en fermentación sólida. *Interciencia* 32(11): 780-785.
- Marzullo L, Canio R, Giardina P, Sartini MT y Sania G. 1995. Veratryl alcohol oxidase from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevent polymerization of laccase-oxidized substrates. *J Biol Chem* 270: 3823-3827.
- Mitchell DA, Berovic M. y Krieger N. 2002. Overview of solid state bioprocessing. *Biotechnol Annu Rev* 8: 183-225.
- Moore D. y Prior C. 1993. The potencial of mycoinsecticides. *Biocontrol News Info* 14 (2): 31-40.
- Nagai M, Sato T, Watanabe H, Saito K, Kawata M y Enei H. 2002. Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes* and decolorization of chemically different dyes. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 327-335.
- Nakamura K y Go N. 2005. Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. *CMLS Cell Mol Life Sci.* 62(18): 2050-66.
- Okamoto K, Ito Y, Shigematsu I, Yanagi SO y Yanase H. 2003. Cloning and characterization of a laccase gene from the white-rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Mycoscience* 44: 11-17.
- Oriol E, Raimbault M, Roussos S y Viniegra G. 1988. Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol* 27: 498-503.

- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Scaloni A, Capasso A y Sannia G. 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *J Biol Chem* 272: 31301-31307.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B. y Sannia, G. 2000. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl and Environ Microbiol* 66 (3):920-924.
- Palmieri G, Cennamo G, Faraco V, Amoresano A, Sannia G y Giardina P. 2003. Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme Microb Technol* 33: 220-230.
- Palonen H, Saloheimo M, Viikari L y Kruus K. 2003. Purification, characterization and sequence analysis of a laccase from the ascomycete *Mauginiella sp.* *Enzyme Microb Technol* 33: 854-862.
- Pezzella C, Autore F, Giardina P, Piscitelli A, Sannia G y Faraco V. 2009. The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: isolation and heterologous expression of new family members. *Curr Genet* 55: 45-57.
- Raimbault M. 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electron J Biotechnol*. 1(3): 174-188.
- Raimbault M y Alazard D. 1980. Culture Method to study fungal growth in solid state fermentation. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 9: 199-209.
- Ramírez NE, Vargas MC, Ariza JC y Martínez C. 2003. *Rev Col Biotecnol* 2: 64-72.
- Robinson T y Nigam P. 2003. Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. *Biochem Eng J* 13(2,3): 197-203.
- Rodríguez-Rincón F. 2006. Análisis molecular de la lacasa de *Phanerochaete flavid-alba*: Caracterización del gen y regulación por fenoles y metales. Tesis doctoral. Universidad de Granada, España.
- Romero-Gómez SJ, Augur C y Viniestra-González C. 2004. Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnol Lett* 22(15): 1255-1258.
- Roussos S y Perraud-Gaime I. 1996. Fisiología y bioquímica de microorganismos utilizados en procesos de fermentación en medio sólido. Enrique Galindo Ediciones. *Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería*: 341-348.

- Sambrook J y Russell DW. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Solomon E, Sundaram U y Machonkin T. Multicopper oxidases and oxygenases. 1996. Chem Rev 96(7): 2563-2605.
- Stajić M, Persky L, Friesem D, Hadar Y, Wasser SP, Nevo E y Vukojević J. 2004. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. Enzyme Microb Technol 38: 65-73.
- Szewczyk KW y Myszk L. 1994. The effect of temperature on the growth of *A. niger* in solid state fermentation. Bioprocess Biosyst Eng 10: 123-126.
- Téllez-Téllez M, Sánchez C, Montiel-González AM y Díaz-Godínez G. 2005. Laccases activity of the peripheral and central zones of the vegetative mycelium of colonies of *Pleurotus spp.* Agro Food Ind Hi-Tech. 2: 38-40.
- 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.
- Thakker GD, Evans CS y Rao KK. 1992. Purification and characterization of laccase from *Monocillium indicum* Saxena. Appl Microbiol Biotechnol 37: 321–323.
- Thurston CF. 1994. The structure and function of fungal laccases. Microbiol 140: 19-26.
- Tlecuitl-Beristain S. 2005. Purificación y caracterización parcial de una enzima lacasa extracelular de *Pleurotus ostreatus*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Viniegra-González G, Favela-Torrez E, Aguilar C, Romero-Gómez S, Díaz-Godínez G. y Augur C. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid-state over liquid fermentation systems. Biochem Eng J 13: 157-167.
- Yaropolov AI, Skorobogatko OV, Vartanov SS y Varfolomeyev SD. 1994. Laccase-properties, catalytic mechanism and applicability. App Biochem Biotech. 49: 257-280.
- Yoshida H. 1883. Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. J Chem Soc 43: 472-486.

12. PUBLICACIONES



Congreso Nacional
de Biotecnología y Bioingeniería



VII Simposio Internacional de
Producción de Alcoholes y Levaduras

EVALUACIÓN DE LAS ISOFORMAS DE LACASAS PRODUCIDAS POR *Pleurotus ostreatus* SOBRE PAJA DE TRIGO

Anahí Armas Tizapantzi^{1,2}, María Mercedes Rodríguez Palma¹, Octavio Loera⁴, Gerardo Díaz-Godínez³, Francisco J. Fernández⁴ y Alba Mónica Montiel-González¹.

¹Laboratorio de biología molecular. Centro de Investigación en Ciencias Biológicas. Univ. Autónoma de Tlaxcala. ²Maestría en Ciencias Biológicas, UATx. ³Lab. de biotecnología, CICB, UATx. ⁴UAM-Iztapalapa, Depto. de Biotecnología.

Km. 10.5 autopista Texmelucan-Tlaxcala. Tel/Fax. (01) 248 4815482. amonicamg@yahoo.com

Palabras clave: Perfil de isoformas de lacasa, *Pleurotus ostreatus*, paja de trigo.

Introducción. El creciente interés en obtener de manera masiva recursos de origen microbiano ha potenciado el estudio del comportamiento de los microorganismos en respuesta a cambios en el medio de cultivo y ambientales. Las lacasas (E.C. 1.10.3.2, *p*-oxígeno oxido-reductasas) participan en el mecanismo de degradación de lignina por especies de hongos de pudrición blanca, como *Pleurotus ostreatus*, y tienen la capacidad de polimerizar, despolimerizar, metilar y/o desmetilar compuestos fenólicos (1). Existen estudios acerca de la producción de lacasas en varias condiciones, usando tanto medio líquido como medio sólido con soportes inertes, aunque hasta el momento se ha observado mejor actividad en los cultivos líquidos (2). Sin embargo, el tipo de soporte, es importante para desplegar la producción diferencial de estas enzimas, no sólo en su actividad sino también en el tipo de isoformas (3). En este sentido, el uso de soportes biodegradables puede cumplir con dos objetivos: obtener patrones de isoformas de lacasas distintos a los reportados y con buena actividad enzimática y permitir usar residuos agroindustriales como sustrato.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el perfil de isoformas de *Pleurotus ostreatus* incubado sobre paja de trigo, como estrategia para seleccionar las isoformas más adecuadas en proyectos posteriores.

Metodología. Se utilizó la cepa de *Pleurotus ostreatus* ATCC-32783 incubada en medio sólido (utilizando 35 g de paja de trigo al 70% de humedad) a 25°C durante 20 días. La presencia de las isoformas y su actividad se determinaron mediante el método modificado de actividad enzimática *in situ*, descrito por Laemmli (1970).

Resultados y discusión. En la Fig. 1 se muestra el perfil de isoformas de lacasa producidas por el hongo incubado sobre paja de trigo. Se observan dos isoformas, de aproximadamente 31 y 34 kDa a partir de las 72 h. A las 120 h aparece otra isoforma de alrededor de 50 kDa, que empieza a incrementar su actividad hasta las 384 h, decayendo a continuación. A las 192 h aparece una isoforma de aproximadamente 37 kDa, que permanece

hasta las 336 h. A diferencia de los perfiles muy similares observados en cultivos líquidos o sólidos con espuma de poliuretano como soporte, el perfil de isoformas sobre paja se caracteriza por la aparición de una isoforma de mayor peso (50 kDa) y la desaparición de la actividad de las tres isoformas de menor tamaño.

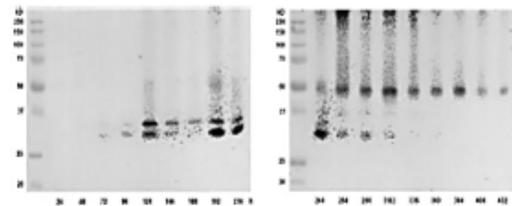


Fig. 1. Perfil de isoformas de lacasas producidas por *Pleurotus ostreatus* crecido sobre paja de trigo.

Conclusiones. Se encontró una isoforma nueva (50 kDa) con buena actividad y estabilidad, siendo la única presente al final de la fermentación. Esto favorece su posterior estudio para efectos de purificación y manipulación mediante estudios de ingeniería genética.

Agradecimientos. Al CONACyT por el financiamiento del proyecto No. 61796 y por la beca de posgrado de la I.Q. Anahí Armas Tizapantzi. Al PROMEP por el apoyo a la reincorporación de exbecarios.

Bibliografía.

- 1.- Edens W., Goins T., Dooley D y Henson J. (1999). Purification and characterization of secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *trilici*. *Appl. Env. Microb.* 65:3071-3074.
- 2.- Téllez-Téllez M, Fernández F.J., Montiel-González AM, Sánchez C. and Díaz-Godínez G. (2008). Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Appl. Microb. Biotech.* 81:675-679.
- 3.- Giardina P, Palmieri G, Scaloni A, Fontanella B, Faraco V, Cennamo G y Sanna G. (1999). Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Bioch. J.* 341: 655-663.