



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA *Iztapalapa*

**“Determinación de patrones de inducción de lacasas en  
el hongo *Trametes sp.* EUM1”**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de Especialización en Biotecnología

**P R E S E N T A**

**I.B.I. Angel Eduardo Márquez Ortega**

**Director de Tesis**

**Dr. Octavio Loera Corral**

**Asesores**

**Dra. Ainhoa Arana Cuenca**

**Dr. Gustavo Viniegra González**

**México, D.F.**

**Marzo 2004**

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa aprobó la comunicación idónea de los resultados que presentó el alumno Angel Eduardo Márquez Ortega de la Especialización en Biotecnología.

Comité Tutorial:

Director:

  
**Dr. Octavio Loera Corral**  
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

Asesores:

  
**Dra. Ainhoa Arana Cuenca**  
Universidad Politécnica de Pachuca

  
**Dr. Gustavo Viniestra González**  
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

Sinodal:

  
**Dr. Alejandro Téllez Jurado**  
Universidad Politécnica de Pachuca

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa aprobó la comunicación idónea de los resultados que presentó el alumno **Angel Eduardo Márquez Ortega** de la Especialización en Biotecnología.

Comité Tutorial:

Director:



**Dr. Octavio Loera Corral**  
**Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa**

Asesores:



**Dra. Ainhoa Arana Cuenca**  
**Universidad Politécnica de Pachuca**



**Dr. Gustavo Viniegra González**  
**Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa**

Sinodal:



**Dr. Alejandro Téllez Jurado**  
**Universidad Politécnica de Pachuca**

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gustavo Viniegra González por la oportunidad que me brindo para la realización de esta especialización en su grupo de trabajo. También por el apoyo económico proporcionado mientras duro el postgrado.

Al Dr. Octavio Loera Corral por su amistad, su confianza, su asesoría y dirección de tesis durante la realización de la especialización.

A la Dra. Ainhoa Arana Cuenca por su amistad, su asesoría y paciencia, en la realización de este proyecto.

A los compañeros de laboratorio: Javier, Francisco, Myrna, Marisol, Víctor, Alejandro, Cesar, Diana , Ruth por brindarme su amistad y apoyo.

A Juan, Leticia, Juan Manuel, Ivonne, Pablo, Omar, Jessica, Sufro, Vianey, Gustavo, Fernando y a los profesores Francisco Cruz Sosa y José Angel Lechuga Corchado. A todos ellos les agradezco su amistad, apoyo y confianza que me han brindado durante el tiempo que tengo de conocerlos.

Agradezco también a mi familia por el apoyo que me brindaron al tomar la decisión de continuar mis estudios con la realización de este postgrado.

A todos los compañeros y amigos que tuvieron la confianza de apoyarme en todo este tiempo de conocerlos.

## RESUMEN

Las lacasas son polifenoloxidasas (*p* difenol oxidasas), producidas por plantas, bacterias y hongos. Participan en procesos biológicos, tales como producción de pigmento y degradación de lignina, entre otros. Se utilizan en la industria para la degradación de compuestos fenólicos y lignina o en eliminación de compuestos tóxicos. Algunas lacasas son inducibles, ya que utilizan compuestos con estructuras muy similares a los sustratos de la enzima y que sirven como señal a la célula para que se produzcan. Se han extraído a partir de cultivos de microorganismos realizados en medios líquido y sólido. Los hongos del género *Trametes*, son considerados como parásitos de los bosques y algunos de ellos crecen en forma de laminas horizontales sobre la madera. En la presente investigación, se propago la cepa de *Trametes sp.* EUM1, en medio Kirk (medio definido) sólido con 2,2'-Azino-bis(ácido 3-etilbenzo-tiazolino-6-sulfónico) (ABTS) como sustrato para verificar la presencia de la enzima. En la determinación de la actividad Enzimática por halos de oxidación, se observó que la edad del micelio y el método de inoculación tienen efecto sobre la detección de las lacasas, teniendo mejores resultados con el micelio maduro y la inoculación con pellet. El crecimiento radial del hongo tuvo una velocidad radial aproximada de 0.1783 mm/h en el medio Kirk sin inductores. Los compuestos probados como posibles inductores fueron: alcohol verátrico, ácido ferúlico, catecol, ácido tánico, ácido 3,4-dimetoxibenzoico o ácido verátrico, 2,6 dimetoxifenol, D-fenilalanina, ácido gálico, el sulfato de cobre a una concentración de 0.37 mM y sirigaldazina a concentración de 0.037 mM; se obtuvo que el sulfato de cobre y el alcohol verátrico no tuvieron capacidad para inducir la actividad lacasa del hongo; mientras que el ácido tánico y el catecol inhibieron la producción de las lacasas; por otro lado, el ácido ferúlico y el ácido verátrico fueron los inductores más potentes y que no afectaron la velocidad radial de crecimiento. Estos dos compuestos se utilizaron en fermentación líquida sin agitación para ver el efecto de inducción en una cinética. Los resultados mostraron que al combinar la temperatura (39°C), un pH controlado (4.7-5.4) y con el ácido ferúlico, se obtuvieron extractos que mantienen el 85% de la actividad después de incubarse a 60°C durante una hora, debido a la producción de lacasas termotolerantes. Confirmando así que la producción de las lacasas cambian durante el proceso de crecimiento y los compuestos inductores tienen efectos distintos según la especie analizada.

**INDICE GENERAL**

|  |    |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN .....                                   | 1  |
| ANTECEDENTES .....                                   | 3  |
| Características del genero <i>Trametes sp.</i> ..... | 5  |
| Degradación de lignina .....                         | 7  |
| Microorganismos Termofílicos .....                   | 10 |
| Enzimas Ligninolíticas .....                         | 12 |
| Las lacasas .....                                    | 13 |
| Inducción de lacasas .....                           | 14 |
| JUSTIFICACIÓN .....                                  | 17 |
| HIPÓTESIS .....                                      | 18 |
| OBJETIVO GENERAL .....                               | 18 |
| OBJETIVOS ESPECIFICOS .....                          | 18 |
| MATERIALES Y METODOS .....                           | 19 |
| Microorganismo .....                                 | 19 |
| Medio de Cultivo .....                               | 19 |
| Propagación de la cepa .....                         | 20 |
| Compuestos para los ensayos .....                    | 20 |
| Ensayos Cualitativos en Placa .....                  | 22 |
| Ensayo de Fermentación Líquida sin agitación .....   | 24 |
| Determinaciones analíticas .....                     | 24 |

## *Índice General*

|  |    |
|--|----|
| RESULTADOS Y DISCUSIONES .....   | 27 |
| Propagación de la cepa .....   | 27 |
| Efecto de la edad del micelio sobre la detección de las lacasas .....          | 27 |
| Crecimiento del micelio a 28°C .....   | 29 |
| Halos de oxidación .....   | 31 |
| Índice de potencia .....   | 35 |
| Efecto de la temperatura en el micelio sobre la detección de las lacasas ..... | 37 |
| Fermentación líquida sin agitación .....                                       | 43 |
| <br>   |    |
| RESUMEN DE LOS RESULTADOS.....   | 52 |
| <br>   |    |
| CONCLUSIONES .....   | 54 |
| <br>   |    |
| BIBLIOGRAFÍA .....   | 55 |

## **INTRODUCCION**

Uno de los grandes problemas que enfrentan las ciudades, es la contaminación, debido a la explosión demográfica y nos ha llevado hacia la contaminación del agua, el aire y el suelo. Por lo que en los últimos años, los investigadores se han enfocado a descubrir o perfeccionar procesos que puedan disminuir la contaminación. Dentro de esta remediación se encuentran los procesos físicos y químicos, que tienen la desventaja de resolver un problema y crean otro. Estos procesos pueden eliminar un tipo de contaminación, pero crear algún otro tipo de contaminación (Aburto y Quintero, 2001).

Entre los problemas más frecuentes de contaminación, en las corrientes de origen industrial se encuentran los productos de tipo aromático, es decir que están formados de anillos con dobles ligaduras resonantes. Por ejemplo: los colorantes derivados de la industria textil y los polifenoles presentes en los licores negros de la industria de la celulosa y el papel.

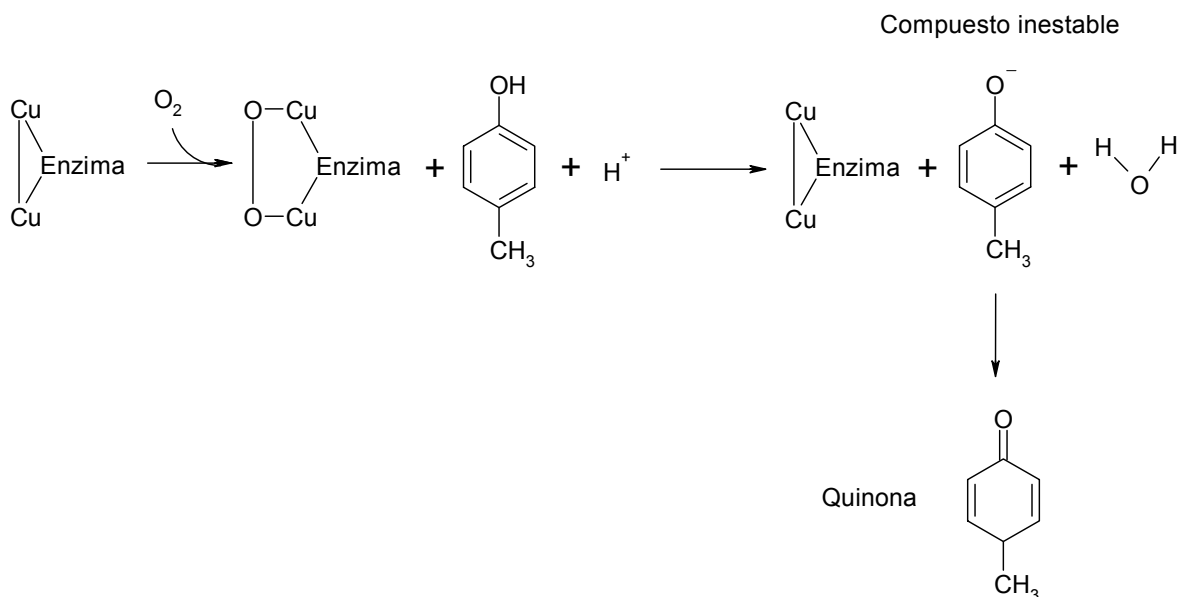
La oxidación de esos compuestos pueden realizarse con facilidad usando hipoclorito de sodio pero la reacción produce cloro-bencenos que son cancerígenos y por tanto, peores contaminantes que los compuestos aromáticos originales.

Otra alternativa es usar el peróxido de hidrógeno como oxidante que no genera contaminación pero tiene un cierto costo pues se va como reactante no catalítico.

Una tercera alternativa es usar enzimas oxidasas que utilizan el oxígeno como aceptor de hidrógenos y genera peróxidos y superóxidos de cobre en los sitios de esas enzimas. A su vez estos superóxidos pueden oxidar compuestos orgánicos como los poli-fenoles o también, las peroxidasas pueden oxidar compuestos mediadores, que al elevarse su concentración pueden oxidar compuestos que no son oxidados por el sitio activo de la enzima según el esquema siguiente (Thurston, 1994):



## Introducción



En este trabajo se pretende caracterizar la capacidad de producción de un hongo del género *Trametes sp.*, aislado en la Mérida, Yucatán por Medina (2003) y productor de activados de lacasas, resistentes a temperaturas mayores de 60°C. Para ello se realizó un estudio de crecimiento del basidiomiceto y del efecto de diversos inductores de las enzimas lacasas bajo condiciones de laboratorio.

En particular se pretende seleccionar un compuesto inductor de la síntesis de lacasas por una cepa de *Trametes sp.*

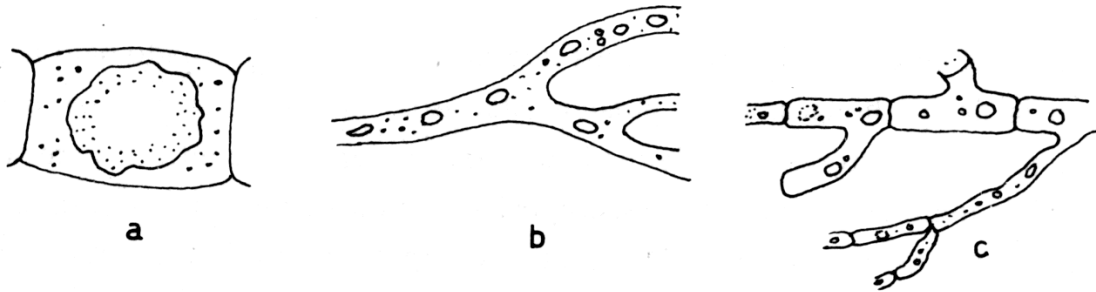
## **ANTECEDENTES**

Desde el tiempo de Aristóteles se habían clasificado a los hongos dentro del reino vegetal, ya que para los biólogos era más fácil clasificar a los seres vivos solo en dos reinos (animal y vegetal). Sin embargo, en 1969 Whittaker ( Herrera y Ulloa, 1998 ), fundamentó el nivel de organización celular y el tipo de nutrición de los seres vivos, sirviendo así al sistema sostenido por Nolan y Margoliash (1968), en el cual se contemplaban los cinco reinos en los que se clasificarían los seres vivos (Monera, Protista, Fungi, Plantae y Animalia), en donde los hongos fueron colocados en el reino Fungi porque sus características morfológicas, fisiológicas y taxonómicas son diferentes a las contempladas en el reino vegetal y animal.

Por otro lado, los hongos se encuentran ampliamente distribuidos por toda la tierra y viven en cualquier sitio que presente materia orgánica, agua y temperaturas apropiadas, comprendidas generalmente entre 4 y 60°C ( Herrera y Ulloa, 1998 ).

Los hongo se encuentran clasificados como saprobios, parásitos y simbioses. Los saprobios utilizan sustancias orgánicas inertes, muchas de ellas en descomposición, que pueden ser reservas de otros organismos, productos de excreción y excrementos de los mismos, o restos de vegetales y animales. Los hongos parásitos se desarrollan en otros organismos vivos en los cuales son sus huéspedes y se nutren de las sustancias que hay en sus células vivas. Por último, los simbioses se asocian con otros seres, prestándose mutua ayuda en sus funciones ( Herrera y Ulloa, 1998 ).

En la clasificación más simple de los hongos se divide en micromicetos y macromicetos, estos últimos se diferencian de los micromicetos por presentar cuerpos fructíferos. Los hongos producen micelio, los cuales están formados por un conjunto de hifas o filamento que son la estructura fundamental y pueden ser de tipo cenocítico, si no presenta tabicaciones o septos, o puede ser micelio con tabicaciones, como se muestra en la figura 1 (Castillo, 1987 ).



**Figura 1.** a) Estructura plasmodial de hongos inferiores dentro de una célula hospedera.  
b) hifas conocíticas. c) Hifas septadas o tabicadas.

La clase de los basidiomicetos pertenecen a la división Eucomycota (hongos verdaderos con pared) en el reino Fungí (Singer y Harris, 1987), estos incluyen a las setas y los hongos, que forman cuerpos fructíferos en forma de repisas sobre la madera; estas características también incluyen producción de esporas sexuales en una célula especial llamada basidio y la reproducción asexual se realiza por conidios o esporas cuando existen estos dos tipos de estructuras (Deacon, 1993). Los basidiomicetos a su vez se dividen en los siguientes ordenes: Auriculariales, Aphyllophorales, Agaricales y Gasteromicetos (Guzmán y col., 1993).

El hongo *Trametes sp.*, en la actualidad se le adscribe dentro de esta clase de los basidiomicetos en el orden Aphyllophorales y la familia Polyporacea.

Una de las propiedades de los hongos del genero *Trametes*, es la degradación de la lignina para facilitar la digestión de la celulosa (Henzkill y col., 1998) y entre las enzimas que emplean estos hongos para ese fin se encuentran las llamadas lacasas. Porque tienen la capacidad de oxidar a la lignina por medio de la acción de diversos mediadores(Young y col., 1995).

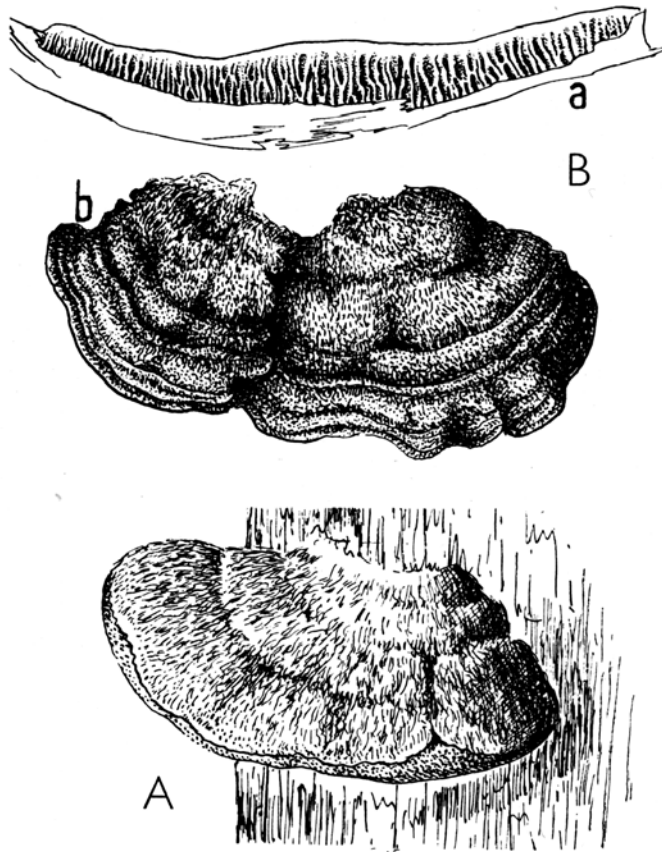
**Características del genero *Trametes* sp.**

Este hongo pertenece al orden de los Aphyllophorales superiores, se encuentran dentro de los macromicetes, y como todos los de su orden goza de una mala reputación, ya que son considerados como hongos parásitos o patogénicos de los bosques; crecen atacando a varias especies de árboles. Son imputrescible, conservando su integridad y algunos de ellos crecen en forma laminar sobre la madera, por lo cual son conocidos como repisas de la madera. En el género *Trametes* frecuentemente su receptáculo es estacionario, la trama espesa y clara; los tubos huecos son de dimensiones considerables, frecuentemente lameloides, separados por tabiques algo espesos. Sus esporas son hialinas, lisas y sin cistides. Se pueden clasificar este genero según el color de su trama:

- Rojo, siendo característico *Trametes cinnabarium* con los poros rojo bermellón, produce una podredumbre blanca sobre numerosos árboles frondosos.
- Leonado, de olor anisado, principalmente el *Trametes odorata*, cuyo sombrero vellosa, rojizo, pardo y con un margen de color vivo, este es de podredumbre parda, el cual destruye abetos y alerces de la montaña.
- Pardo-ocre, inodoro, involucra al *Trametes trabea*, con sombrero abollado y fomentoso, leonado con himenio color gamuza común sobre todos los bosques muertos.
- Blanco, este se encuentra en numerosas especies, entre las cuales se encuentran: *Trametes hispida* (figura 2), con sombrero gris pardo, erizado, leonado, propio de bosques frondosos. *Trametes gibosa*, muy común, el cual tiene sombrero pubescente, con zonas blanquecinas, poros frecuentemente alargados.

## *Antecedentes*

- *Trametes rubescens* que tiene su sombrero menos espeso y oscuro, lo que permite que se distinga menos, se identifica bien por el color y la forma plana del sombrero con poros encarnados rosas o rojizos propiamente se encuentran sobre sauces y alisos.
- Los *Lenzites* son otro tipo de hongos que pertenecen a la familia de los polyporaceae y tienen la apariencia muy semejante a *Trametes sp.*; *Lenzites tricolor* se encuentran sobre los cerezos, los poros son alargados, con desviaciones lameloides lineares, su sombrero es pardo púrpura, frecuentemente con franjas más claras y triple carácter (hymenia, pileique y estacional) que lo distingue del *Trametes rubescens*, pero que muestra la proximidad estrecha al genero *Trametes*.
- *Lenzites sapiaria* (figura 2) cosmopolita y fuerte se encuentra comúnmente en los bosques de coníferas, producen una podredumbre parda y ceniza se reconoce por su bello color azafranado o leonado, marrón y su sombrero erizado con algunas zonas desnudas, en sus laminas rígidas, aserradas, dentadas, estriadas a lo ancho, azafranadas, su carne es herrumbrosa, la distingue de su especie vecina *L. abietina* en las fructificaciones por otras partes menos vivas y coloreadas, por la ausencia de cistides emergentes y al parecer espesas que es lo último que revela.
- El *Trametes* del roble (*T. quercina*) es una de los poliforos más comunes en los robledales de Europa pero no daña los postes de las casas y los bosques. Son propios de los bosques muertos y los castaños, es reconocido por sus almohadillas espesas, distones ramificados y sus diversas formas, se puede colocar, ya sea en los *Trametes* o en los *Lenzites*.
- *Lenzites* del abedules muestra con las laminas bien dibujadas, blanquecinas, el sombrero espeso, de un gris pálido uniforme fomentoso ( Heim, 1957).



**Figura 2.**  
**A:** *Trametes hispida*  
**B:** (a) y (b): *Lenzites saepiara*. A  
peine réd.

### **Degradación de lignina**

La lignina es un polímero aromático complejo, no es lineal, heterogéneo y es un compuesto no estéreo regular compuesto por unidades de fenilpropano y es constituyente de muchas fibras vegetales. Los hongos de podredumbre blanca son organismos capaces de degradar completamente la lignina a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . En la figura 3, se presenta la lignina que comprende 16 unidades de fenilpropano unidas en forma de C-O o en forma de C-C (López, 2001). Uno de los hongos que degradan lignina y que han sido más estudiados es el hongo *Phanerochaete chrysosporium*, siendo este trabajo ampliamente revisado (Buswell y Odier, 1987; Alic y Gold, 1991; Kuan y col., 1991; Cullen y Kersten, 1992, 1996).

## *Antecedentes*

El sistema ligninolítico de *Phanerochaete chrysosporium* no es inducido por la lignina pero aparece dentro del metabolismo secundario, es decir, cuando el crecimiento primario cesa por el consumo de algunos nutrientes (Kirk y col., 1978). El metabolismo secundario es activado por el nitrógeno, carbono y limitaciones de sulfato pero no por limitaciones de fosfato (Jeffries y col., 1981). Aparentemente, la regulación del metabolismo secundario, incluyendo la degradación de la lignina, es conectada con el metabolismo del glutamato (Kirk, 1981). Estos medios se pueden ver afectados por la limitación del nitrógeno, para que ocurra la degradación de la lignina. Por lo cual, Kirk y Fenn (1982) especulan que la degradación de la lignina es un evento del metabolismo secundario por el contenido muy bajo de nitrógeno de la madera (Merrill y Crowling, 1966). Después de que el hongo invade la madera, el nitrógeno es limitante para el metabolismo secundario, incluyendo la degradación de la lignina.

A través del ayuno del nitrógeno, se produce el estímulo para la degradación de la lignina en los hongos de podredumbre blanca es común, pero no siempre es una regla (Leatham y Kirk, 1983). Algo que sí es cierto cuando se adiciona nitrógeno al medio donde crece el hongo, éste puede incrementar la eficiencia para degradar la lignina o compuestos relacionados con la lignina sirviendo para muchas de las aplicaciones en biotecnología.

Otro aspecto importante en la degradación de la lignina es la temperatura, ya que se ha observado que por ser un polímero la lignina es muy difícil de degradar y se ha encontrado que grupos de microorganismos mesófilos y termófilos muestran la capacidad de degradar ampliamente a la lignina (Rosenberg, 1978).

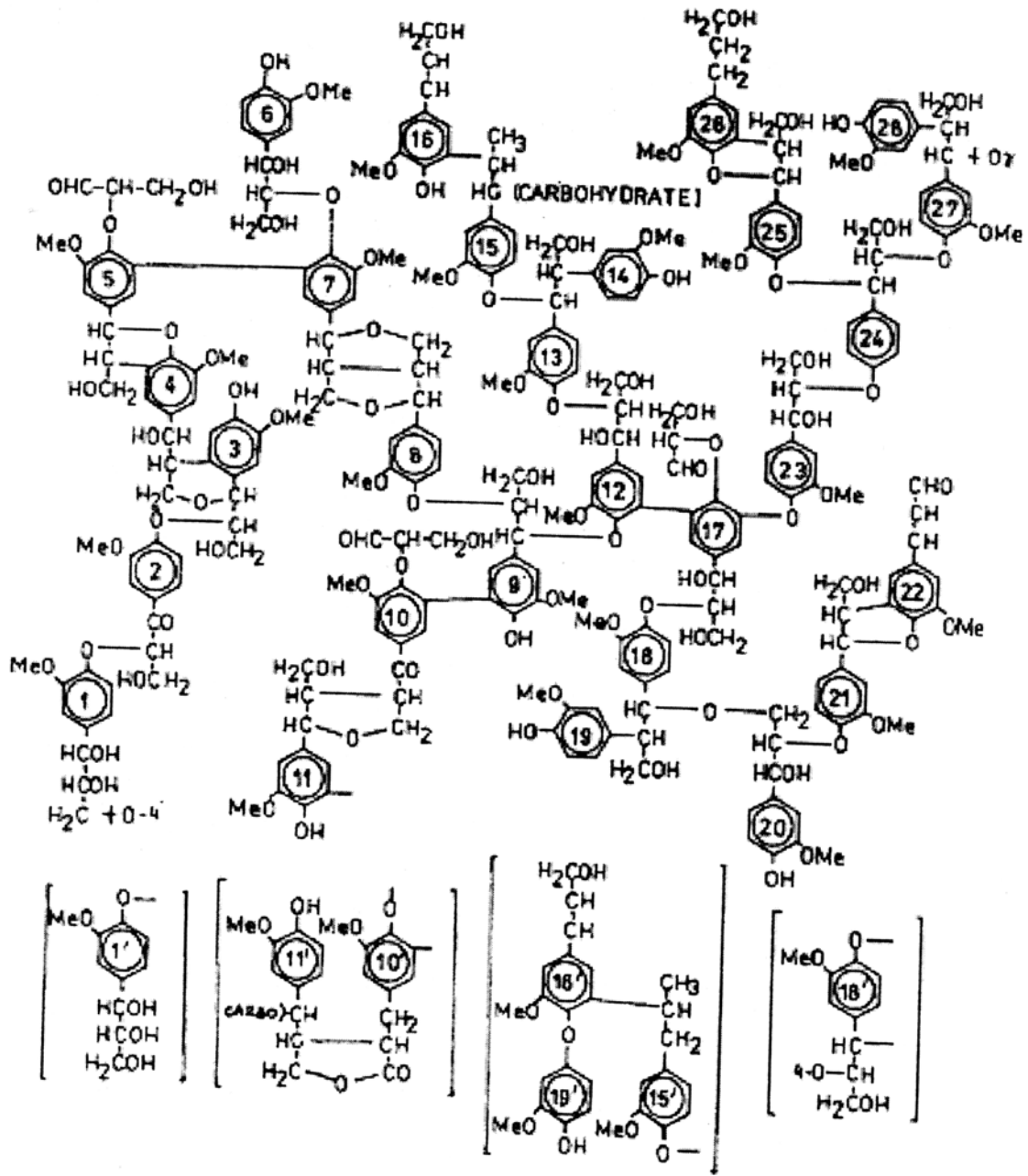


Figura 3. Modelo estructural de la lignina en la madera (Leowonicz y col., 1999).



## **Microorganismos Termofílicos**

Los microorganismos pueden ser clasificados de acuerdo a la óptima temperatura de su crecimiento y su temperatura máxima. Pero, la clasificación de los termofílicos no es muy precisa y depende de los diferentes grupos de microorganismos (Kristjansson, 1989). La temperatura de crecimiento de estos microorganismos está en un intervalo de 45 a 80°C (Madigan y Martinko, 1998).

Por más de un siglo se ha tenido la interrogante del origen de los microorganismos termofílicos. Dos hipótesis han sido propuestas: i) los primeros microorganismos se originaron en medios ambientes a altas temperaturas, y a partir de éstos subsecuentemente se derivaron otros microorganismos y ii) los primeros microorganismos no fueron termofílicos pero se fueron adaptando a condiciones de temperatura moderada, y se originaron secundariamente a partir de los tipos psicofílicos y mesofílicos (Brock, 1985).

La aplicación de microorganismos termofílicos en procesos biotecnológicos tiene varias ventajas (Weigel y Ljunghdal, 1984), las cuales son necesarias para procesos a distintas temperaturas y no precisamente a altas temperaturas:

- Aumenta la velocidad de formación de producto por su alta actividad metabólica.
- Disminuye la contaminación del cultivo, debido a que la temperatura limita el crecimiento de otros microorganismos.
- Se eliminan o disminuyen los sistemas de enfriamiento durante el cultivo.
- Para detener el cultivo no es necesario enfriar por debajo de 20°C.
- Incrementan las velocidades de difusión, ionización y solubilidad de químicos.
- Disminuye la densidad, la tensión superficial y la viscosidad del cultivo.

## *Antecedentes*

- Fácil recuperación de productos volátiles directamente desde el cultivo y durante el proceso de fermentación.
- Producción de proteínas termoestables.
- Baja producción de biomasa pero alta velocidad de conversión de sustrato a producto.

Los hongos termofílicos juegan un papel importante en el composteo de la materia orgánica. Estos organismos crecen óptimamente a temperaturas de más de 40°C. Las temperaturas óptimas de muchas especies están entre 45 y 50 °C, y la máxima temperatura es observada a los 60°C para casi todas las especies, a través de esporas pueden sobrevivir a altas temperaturas. Los hongos termofílicos crecen masivamente durante la última fase del proceso de composteo, para que las esporas que sobreviven al proceso de pasteurización; esto eleva la calidad de la composta. Por lo tanto estos tipos de microorganismos son utilizados ampliamente en la producción (Wiegant, 1992).

Todos los seres vivos llevan acabo su metabolismo mediante los procesos enzimáticos, y los microorganismos termofílicos no son la excepción, ya que estos producen enzimas y algunas de ellas resisten temperaturas relativamente altas llamadas enzimas termoestables.

La termoestabilidad es una propiedad buscada en estas nuevas enzimas debido a que presentan las siguientes ventajas en procesos industriales: a) algunas de estas enzimas son estables a altas temperaturas(60°C); b) se almacenan fácilmente; c) tienen un alto número de recambio que es estable cuando se aplican altas temperaturas, (Weigel y Ljunghdal, 1984); la velocidad de reacción aproximadamente se duplica al incrementar la temperatura 10°C, (Zamost y col. 1991); al incrementar la temperatura se evita la contaminación del sistema de reacción y aumenta la resistencia a los agentes desnaturizantes (Kristjansson, 1989). Otro aspecto que se ha observado es que algunas de estas enzimas tienen la capacidad de degradar a la lignina, por esto a estas enzimas termofílicas se les llama enzimas ligninolíticas (Rosenberg, 1978).

## **Enzimas Ligninolíticas**

Las enzimas ligninolíticas, son enzimas que tienen la capacidad de degradar la lignina. En la actualidad, existen dos teorías que tratan de explicar su modo de acción. La primera teoría fue planteada por Cullen (1997) la cual sostiene que el conjunto de enzimas ligninolíticas está formado por aquellas que están involucradas directamente en la degradación de la madera: diferentes tipos de oxidasas y enzimas productoras de peróxido de hidrógeno. En cambio, Leonowickz y colaboradores (1999) y proponen que el conjunto de enzimas ligninolíticas está formado por enzimas que actúan directamente sobre la madera (tanto sobre la lignina como sobre la celulosa y la hemicelulosa); y cooperan con las del primer grupo, pero que no atacan directamente a la madera por sí solas y, por último, enzimas de retroalimentación que enlazan las diferentes vías metabólicas durante la biodegradación de la madera (Arana y col., 2003).

Entre las enzimas que juegan un papel importante en la despolimerización de la lignina, se incluyen dos peroxidasas extracelulares: la lignino peroxidasa (LiP) y la manganeso peroxidasa (MnP) generando así  $H_2O_2$  en el sistema. Por otra parte, existen hongos que secretan una combinación de peroxidasas y oxidasas (Peri y Gold, 1991). Dentro de las oxidasas que se producen en estos hongos se encuentra las lacasas que no necesitan de  $H_2O_2$  para su acción. *Trametes versicolor* y *Phlebia radiata* que producen una o más lacasas junto con LiP y MnP (Fahreus y Reinhammar, 1967; Niku-Paavola y col., 1988) y así se pueden enumerar muchos más hongos de podredumbre blanca que secretan tanto oxidasas como peroxidasas para degradar a la lignina. Un componente esencial para el sistema ligninolítico es la fuente de  $H_2O_2$ . Las enzimas productoras de  $H_2O_2$  a partir de  $O_2$  donde NADH, NADPH o el glutatión están presentes y la glioxal oxidasa (GLOX) la cual, se produce durante el metabolismo secundario en *Phanerochaete chrysosporium* y es activada por LiP más alcohol veratrílico (Kersten, 1990). Las lacasas han sido caracterizadas como enzimas de baja especificidad de sustrato, que reducen el oxígeno molecular a agua y son capaces de oxidar monofenoles, difenoles, polifenoles, aminofenoles y diaminas (Arana y col., 2003).

## **Las lacasas**

Las lacasas son polifenoloxidasas (*p* difenol oxidasas), que generalmente están distribuidas en plantas, bacterias y hongos. Estas enzimas se pueden encontrar en distintos procesos biológicos tales como: la esporulación, la producción de pigmento, la formación de rizomorfos, y la degradación de la lignina. Estas enzimas se han utilizado en la industria para la degradación de los altos contenidos de compuestos fenólicos en sus efluentes, para la degradación de la lignina o la eliminación de compuestos tóxicos (Temp y Eggert, 1999). Como biosensores para la detección de compuestos aromáticos que tienen afinidad importante por dichas enzimas. Recientemente, se han encontrado sitios de mutagenesis que ejecutan o modulan la actividad y el potencial redox de las lacasas, permitiendo así, que se pueda manipular genéticamente la capacidad catalítica de las lacasas (Koroleva y col., 2001).

La reducción del oxígeno al agua por esta enzima, está acompañada por la oxidación típica de un sustrato fenólico. La reacción que lleva a cabo la lacasa incluye la oxidación de un compuesto fenólico generando un radical libre; y que es generalmente inestable. También, puede experimentar una segunda oxidación por catálisis enzimática para formar quinonas, o puede ocurrir una reacción no enzimática tal como una hidratación o desprotonación, y/o podría participar en una reacción de polimerización, dando un compuesto amorfo insoluble como la melanina (Thurston, 1994). Además, pueden oxidar a sustratos no fenólicos en presencia de mediadores apropiados. Estas enzimas tienen una amplia especificidad de sustrato así como de mediadores redox (Johannes, 2000)

Las reacciones oxidativas que pueden llevar a cabo las lacasas para despolimerizar la lignina incluyen: rompimiento entre enlaces  $C_{\alpha}$ -  $C_{\beta}$ , hidroxilación, rompimiento de estructuras aromáticas y desmetilación (Sariaslani, 1989).

Algunas lacasas de hongos basidiomicetes muestran una remarcada termoestabilidad cercana a los 70°C (Coll y col., 1994); existe ya en el mercado una lacasa que fue patentada y es producida por la industria de Novo Nordisk (Berka y col., 1997). Otra de las lacasas termotolerantes es la producida en la planta *Japanese Lacquer-tréeque*, la cual tolera temperaturas cercana a los 50°C. También se ha observado que algunas lacasas de hongos puede ser activada térmicamente por pre-incubación a temperatura de 60°C (Coll y col., 1993).

### **Inducción de lacasas**

Las lacasas fúngicas pueden ser constitutivas o inducibles y también, intracelulares o extracelulares (Sariaslani, 1989). Estas enzimas han sido detectadas y purificadas de distintas especies de hongos, y se ha observado que se producen múltiples isoenzimas (Palmieri y col., 2000). Varias lacasas encontradas son extracelulares y se asocian al crecimiento, por lo cual, se han controlado las condiciones de crecimiento de las especies de hongos utilizados y después, se ha buscado promover la producción de las enzimas mediante la utilización de inductores. Estos son usualmente compuestos que tienen estructuras muy similares o análogas a los sustratos de la enzima y sirven como una señal a la célula para que produzcan alguna enzima específica (López, 2001).

En la actualidad, se han estudiado compuestos que tienen la capacidad de funcionar como inductores para la síntesis de lacasas en varias especies de hongos. Por ejemplo: el hongo *Coriolus hirsutus*, ha sido inducido para la síntesis de lacasas extracelulares con un sustrato de la lacasa como es la siringaldazina a una concentración de 0.11 µM, teniendo un aumento cercano al 1000%. Obteniéndose así, dos isoformas de la enzima; las cuales son I<sub>1</sub> e I<sub>2</sub> con pesos moleculares de 69± 2 y 67±2 kDa, con puntos isoeléctricos de cada isoenzima de 3.5 y 4.2, respectivamente. Con un rango de pH óptimo entre 4.4 – 4.6, a una temperatura optima de 50°C, siendo así isoenzimas termoestables (Koroljova-Skorovogát'ko y col., 1998; Gorbatova y col., 2000).

## *Antecedentes*

En 1980, Gigi y colaboradores, obtuvieron resultados de producción y excreción máxima de lacasas en el hongo *Botrytis cinerea*, al adicionarle ácido gálico al medio de cultivo, ya que al probar otros inductores reportados fueron inefectivos. Marbach y colaboradores (1983), encontraron que al adicionarle ácido cumárico al mismo hongo, generó una acción de inducción a parte del ácido gálico y el jugo de uva, los cuales ya estaban reportados como inductores; por lo cual, sugirió que el hongo se adaptó a diferentes medios excretando así distintas lacasas.

Para el hongo de podredumbre blanca *Pycnoporus cinnabarium*, ocurrió un efecto de inducción al adicionarle 2,5 xilidina, para una isoenzima que tuvo una masa molecular por cromatografía de filtración en gel de aproximadamente de 81 kDa con un contenido de carbohidratos de 9%. El punto isoeléctrico fue de 3.7; siendo esta enzima típica de este hongo (Eggert y col., 1996).

Los compuestos aromáticos varían en su estructura principalmente por la disposición de los sustituyentes en el anillo aromático como lo menciona González (2001) en su trabajo, el cual consistió, en realizar un estudio con el hongo *Trametes sp.* I-62, en donde se aplican distintos compuestos aromáticos para inducir la síntesis de lacasas por el hongo, obteniendo en sus resultados que los isómeros del alcohol veratrílico (alcohol 3,4 – dimetoxibencílico), el alcohol 2,5- dimetoxibencílico y el alcohol 3,5- dimetoxibencílico (diferentes isómeros de un compuesto) tienen diferentes capacidades de inducción de la actividad de las lacasas. Otros dos compuestos, el ácido *p*-metoxifenol y el guayacol provocan también un máximo de inducción, pero éste varía en el momento en que éste ocurre y también sobre el crecimiento del hongo.

## *Antecedentes*

Por otro lado, se ha observado que al adicionar un exceso de cobre al medio de cultivo se provoca un efecto de inducción para la producción de lacasas (Hubert y Lerch, 1987). Como ocurrió con el hongo *Phanerochaete chrysosporium*, al cual se le agregó una cantidad de 0.4 mM de CuSO<sub>4</sub> en el medio, generando así un aumento en su actividad lacasa dentro de los días 2 y 3; tanto de lacasas intracelulares y extracelulares, se separaron en una columna de intercambio iónico. Al realizarles el análisis en una columna de filtración en gel, se obtuvo una lacasa extracelular con un peso aproximado de 100kDa (Dittmer y col., 1997).

En el hongo de *Neurospora crassa* se utilizó como inductor a la D-fenilalanina para producir lacasa, por medio del estudio de su ARNm. Se observó también su regulación de la transcripción. El resultado en los niveles de proteína de la actividad lacasa se incrementaron después de 30 horas, por lo que la D-fenilalanina actuó como inductor (Linden y col., 1991).

El cobre en *Pleurotus ostreatus* promueve la expresión de las isoenzimas *POXA1b* regulando así el nivel de la transcripción del gen; siendo el *poxa1b* ARNm el más abundante en la transcripción inducida a todos los tiempos de crecimiento analizados (Palmieri y col., 2000).

Sonden y Dobson (2001) utilizan varios compuestos (ácido ferúlico, ácido veratríco, 2,5 xilidina, e hidroxibenzotriazole) como inductores para el hongo *Pleurotus sajor-caju* y con la adición de cobre para la expresión de la secuencia de los genes *Psc lac 1, 2, 3 y 4*. Los resultados fueron: que con el ácido ferúlico y 2,5 xilidina se tuvo un nivel alto en la transcripción de los genes *Psc lac 1,2 y 4*, y el *Psc lac 3*, fue expresado constitutivamente

## JUSTIFICACIÓN

Por la gran importancia que tiene la aplicación de las lacasas en la industria para la oxidación de los compuestos aromáticos policíclicos encontrados, tanto en los efluentes, como en el suelo contaminado por estas industrias; se busca la manera de que estas enzimas se produzcan en mayor cantidad y por lo tanto, tengan una mayor aplicabilidad en muchos de los procesos biotecnológicos. También un factor que favorece para su actividad de las enzimas utilizadas es su termoestabilidad, ya que al aumentar su temperatura permite que su actividad aumente y así se reduce la cantidad de enzima a utilizar en el proceso (Kristjansson, 1989).

También se ha observado que las lacasas de los hongos *basidiomicetos* muestran una remarcada termoestabilidad (temperaturas cercanas a 70°C) comparadas con las lacasas de las plantas y la enzima puede ser activadas térmicamente por preincubación a elevadas temperaturas (arriba de 60°C). Se ha observado que estos hongos al aumentar la temperatura de crecimiento entre los 25°C y los 60°C, tienen un inusual incremento de la actividad enzimática (Koroleva y col., 2001).

Por último, en el hongo *Trametes sp.* EUM1 se han realizado estudios recientemente en la purificación, actividad enzimática y su estabilidad de las lacasas al incrementar su temperatura, su afinidad por algún sustrato, su energía de activación y determinación de parámetros cinéticos (Medina, 2003).

Por estas razones, se buscará inducir en el hongo *Trametes sp.* EUM1 una mayor cantidad de lacasas, utilizando varios compuestos que puedan aumentar los niveles de esta enzima, con las condiciones requeridas y conservando su termotolerancia.



## **HIPÓTESIS**

Es posible identificar los compuestos que favorecen la producción de lacasas termotolerantes en el hongo *Trametes sp.* EUM1 mediante estudios en placas de agar.

## **OBJETIVO GENERAL**

Seleccionar, al menos, un compuesto aromático que tenga la capacidad de inducir la síntesis de las lacasas en el hongo *Trametes sp.* EUM1 (Medina, 2003) y evaluar la termotolerancia de las isoenzimas.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Propagar la cepa *Trametes sp.* EUM1.
- Inducir la producción de lacasas con los distintos compuestos reportados.
- Seleccionar los mejores inductores por análisis en placa y medio definido.
- Analizar el efecto de la temperatura en la producción de las lacasas.
- Obtención de lacasas en FL sin agitación.
- Determinación de las variables (pH, Actividad Enzimática, Proteínas), durante la fermentación.
- Evaluar la producción de las lacasas termotolerantes a lo largo de la fermentación.

## MATERIALES Y METODOS

### Microorganismo

La cepa utilizada del hongo *Trametes sp.* EUM1, pertenece a la colección de la Universidad Autónoma – *Iztapalapa* y fue aislada por Medina (2003).

### Medio de Cultivo

Medio de Extracto de malta. Este medio es un medio complejo, el cual contiene:

| Medio Sólido        |          | Medio Líquido     |          |
|---------------------|----------|-------------------|----------|
| Extracto de malta   | 20.00 g  | Extracto de malta | 20.00 g  |
| Agar Bacteriológico | 20.00 g  |                   |          |
| Agua Destilada      | Hasta 1L | Agua Destilada    | Hasta 1L |

Medio Kirk (Kirk *et al.*, 1986). Este es un medio definido, limitado en nitrógeno, el cual contiene:

|                                       |          | Solución de elementos traza             |          |
|---------------------------------------|----------|---|----------|
|                                       |          | Ácido nitriloacético                    | 1.50 g   |
|                                       |          | MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O    | 0.50 g   |
|                                       |          | NaCl                                    | 1.00 g   |
| Glucosa                               | 10.00 g  | FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O   | 0.10 g   |
| Tartrato de Amonio                    | 0.20 g   | CoCl <sub>2</sub>                       | 0.10 g   |
| MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O | 0.50 g   | ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O   | 0.10 g   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | 2.00 g   | CuSO <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O   | 0.01 g   |
| CaCl <sub>2</sub>                     | 0.10 g   | AlKSO <sub>4</sub> * 12H <sub>2</sub> O | 0.01 g   |
| Tiamina * HCl                         | 1.0 mg   | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>          | 0.01 g   |
| Sol. de Elementos Traza               | 10.0 mL  | NaMO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O   | 0.01 g   |
| Agar Bacteriológico*                  | 20.00 g  | H <sub>2</sub> O Destilada              | Hasta 1L |
| Agua destilada                        | Hasta 1L |   |          |

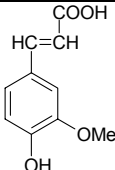
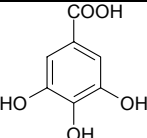
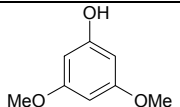
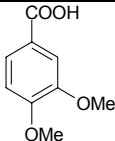
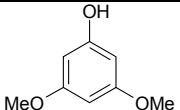
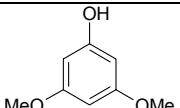
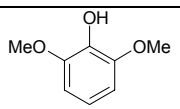
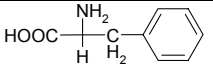
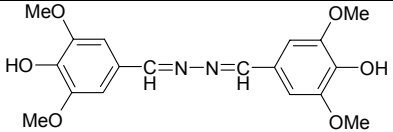
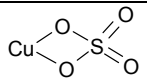
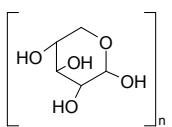
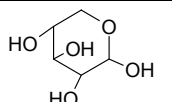
\* Solo para medio Kirk sólido.

### **Propagación de la cepa**

La propagación de la cepa, se realizó teniendo un cultivo inicial del cual se tomó un trozo de agar (aprox. 6mm de diámetro), que se colocó en el medio de extracto de malta sólido y se dejó en incubación a 28°C hasta su crecimiento. En este proceso se realizaron mediciones, cada 24 horas de los radios del micelio para conocer su velocidad radial.

### **Compuestos para los ensayos**

Para el estudio de inducción de la actividad de las lacasas en el hongo *Trametes sp.* EUM1 se utilizaron los siguientes 11 compuestos, ya reportados como inductores de actividad lacasa para otro microorganismos (véase la Tabla 1): alcohol veratrílico (Rodríguez y col., 2002); ácido ferúlico (Collins y Dobson, 1997; Soden y Dobson, 2001), catecol, ácido tánico, ácido 3,4-dimetoxibenzoico o ácido verátrico (Soden y Dobson, 2001; Collins y Dobson, 1997), 2,6 dimetoxifenol, D-fenilalanina (Linden y col., 1991), ácido gálico (Galhaup y col., 2002), sirigaldazina (Koroljova-Skorobogal-ko y col., 1998; Gorvatova y col., 2000), xilano, xilosa y además de estos compuestos aromáticos el sulfato de cobre (Collins y Dobson, 1997; Palmieri y col., 2000). Los compuestos se agregaron a los medios a una concentración final de 0.37 mM (excepto la sirigaldazina, ya que es poco soluble en agua y se agregó a la concentración de 0.037mM).

| Compuesto         | Estructura  |
|-------------------|---|
| Ácido Ferúlico    |    |
| Ácido Gálico      |    |
| Ácido Tánico      |    |
| Ácido Verátrico   |    |
| Alcohol Verátrico |   |
| Catecol           |  |
| 2,6-Dimetoxifenol |  |
| Fenilalanina      |   |
| Siringaldazina    |   |
| Sulfato de Cobre  |  |
| Xilano            |  |
| Xilosa            |  |

**Tabla 1.** Estructuras químicas de los compuestos utilizados para los ensayos cuantitativos en placas.

### **Ensayos Cualitativos en Placa.**

**Método.** Se realizaron pruebas por triplicado para los distintos compuestos en cajas Petri, utilizando el medio de cultivo Kirk; además del testigo, sin compuesto alguno. A este medio de cultivo se les agregó ABTS (2,2' Azino-bis(ácido 3-etilbenzo-tiazolino-6-sulfónico, P.M. 548.7 g/mol) a una concentración final de 1 mM, el cual se utilizó para observar halos de oxidación debido a la actividad de las lacasas. Las placas fueron inoculadas en la zona central con discos de agar o pellet, en los cuales había crecido, el micelio del hongo *Trametes sp.* EUM1.

Las condiciones de incubación en las que se mantuvo el ensayo, fueron a una temperatura de 28°C y 39°C. Se le realizaron mediciones de los radios de crecimiento para determinar su velocidad radial, así como los halos de coloración como consecuencia de la actividad lacasa.

*Preparación del pre-inóculo.* Para la preparación del inóculo se utilizó agua estéril a la que se le agregó micelio que previamente creció en un medio de extracto de malta en cajas de Petri, en trozos de aproximadamente de 2 cm<sup>2</sup>. Este se dejó incubar a 28°C a 300 rpm durante 3 días con el fin de que el micelio se separara del agar.

*Obtención del Pellet (Pelotitas de micelio).* El medio de cultivo líquido para la producción del pellet utilizado, fue el medio de extracto de malta, realizándolo en matraces Erlenmeyer de 250 mL. A este medio se le agregó el 10% de pre-inóculo, incubándose a 28°C con agitación, durante 5 días hasta la formación de los pellets. Después de formado los pellets se enjuagaron con agua destilada estéril para eliminar la enzima producida que pudiera contener el medio de extracto de malta; y se colocaron en las placas para los ensayos.

## ***Materiales y Métodos***

***Obtención del disco de agar.*** El medio de cultivo sólido para la producción del disco de agar fue el medio Kirk sólido, el cual se realizó en cajas Petri. A este medio se le agregó un trozo de micelio (el micelio se creció en medio de extracto de malta sólido), incubándose a 28°C, durante 10 días. Después de crecido el micelio se cortaron los discos de agar de aproximadamente 1cm de diámetro y se colocaron en las placas para los ensayos.

***Medición de los radios de crecimiento y los halos de oxidación.*** Para estas mediciones se utilizó un Vernier, tomándose los radios de crecimiento de las colonias formadas, así como los diámetros de coloración formados de cada una de las placas de los ensayos. Las mediciones se realizaron cada 24 horas.

***Velocidad radial.*** La velocidad radial es la pendiente que se obtiene al realizar una regresión lineal; la cual se determina, al graficar el crecimiento radial del micelio en cada tiempo de la medición y llegar a la ecuación lineal:

$$y = V_r * t + b$$

en donde

$V_r$  = velocidad radial de crecimiento (mm/ h).

$y$  = radio de la colonia para cada tiempo (mm).

$t$  = tiempo al que se realizó la medición (h).

***Índice de Potencia.*** El índice de potencia (IP) se calculó dividiendo el diámetro del halo de oxidación entre el diámetro de crecimiento del micelio, indicándonos así, la relación del halo de oxidación con respecto al crecimiento del microorganismo a un tiempo determinado.

### **Ensayo de Fermentación Líquida en Estado Estacionario.**

**Método.** Se realizaron pruebas por duplicado para los distintos compuestos en matraces Erlenmeyer de 500mL, utilizando el medio de cultivo Kirk suplementado con los compuestos ensayados a la concentración ya mencionada; además del testigo, sin compuesto alguno. A este medio, se le agregó un pre-inóculo el cual contenía el micelio del hongo *Trametes sp.* EUM1 del 10% del volumen total del medio de cultivo. Las condiciones de incubación en las que se mantuvo el ensayo, fueron: a una temperatura de 28°C ó 39°C, sin agitación, durante 32 días. Se tomaron muestras de 5mL cada 24 horas para determinar en ellas, las variables de pH, proteínas y la actividad enzimática de las lacasas durante la fermentación.

### **Determinaciones analíticas**

A continuación se presentan las metodologías para determinar las variables de pH, proteínas y actividad enzimática. Las muestras que se tomaron fueron de 5mL por cada uno de los matraces

*Determinación del pH.* Una vez que se extrajo la muestra de cada uno de los matraces, se filtró y se midió el pH con un potenciómetro, el cual fue previamente calibrado.

*Proteínas.* Se uso el método de Bradford (Método de micro-ensayo); el cual, se basa en el acoplamiento del colorante azul de coomasie con la proteína y se determina colorimetricamente, existiendo así, una relación directa entre el desarrollo del color y la concentración de las proteínas (Bradford, 1976).

## ***Materiales y Métodos***

Para la determinación de proteína en las muestras, se agregaron 800 µl del extracto de cada muestra en tubos de ensayo de 10 mL de capacidad, por duplicado. Se adicionaron a cada tubo 200 µl de reactivo de Bradford (Sigma). Posteriormente, se agitaron con un vórtex y después de 5 min, se leyeron en un espectrofotómetro a 595 nm. Para el cálculo de la cantidad de proteína, se tomó como base una curva estándar con solución de seroalbúmina bovina de 5, 10, 15, 20 y 25 µg/mL.

*Curva Estándar.* Se preparó una solución patrón de seroalbúmina bovina de 1 mg/mL, a partir de esta solución se tomaron las muestras para preparar los estándares de referencia. Con ellos se construyó la curva de referencia o curva estándar, la cual tiene valores conocidos y con los que se compararon las muestras experimentales para determinar en ella la concentración de proteína total. A continuación, se presenta la curva estándar con sero albúmina bovina (Tabla 2):

| No. de Muestras | BSA*<br>(µL) | Buffer o H <sub>2</sub> O<br>desionizada (µL) | Reactivo de Bradford<br>(µL) |
|-----------------|--------------|---|------------------------------|
| <b>Blanco</b>   | 0            | 800   | 200                          |
| 1               | 5            | 795   | 200                          |
| 2               | 10           | 790   | 200                          |
| 3               | 15           | 785   | 200                          |
| 4               | 20           | 780   | 200                          |
| 5               | 25           | 775   | 200                          |

**Tabla 2.** Curva estándar de seroalbúmina bovina para el método Bradford

La formula de regresión obtenida a partir de la curva patrón fue:

$$y = 0.0506x + 0.4682$$

con un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de: **0.9953**

la cual se utilizó para calcular la cantidad de proteína obtenida durante la cinética en la fermentación líquida sin agitación.



## ***Materiales y Métodos***

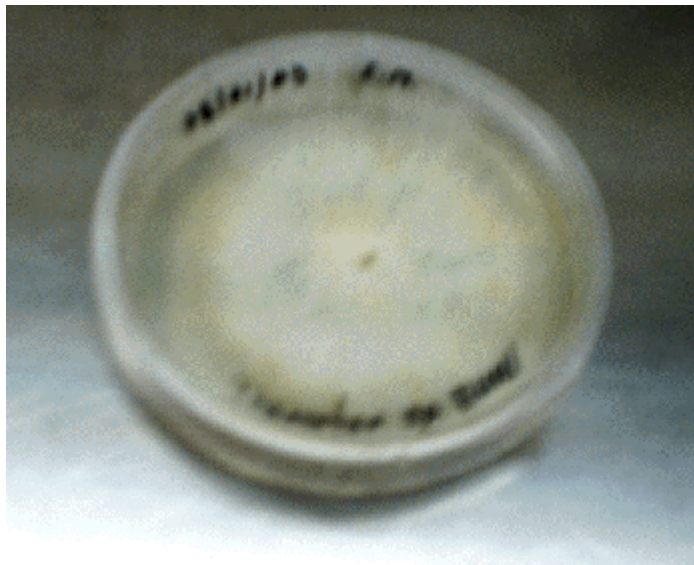
*Actividad Enzimática.* Se determinó usando ABTS 5mM como sustrato en 100 mM de buffer de acetato de sodio (pH= 4.5) a temperatura ambiente. La medida de absorbancia se realizó a una longitud de onda de 436 nm, durante 1 minuto. El coeficiente de extinción molar del producto (radical catiónico del ABTS) es  $E_{MAX} = 2.93 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Wolfenden, 1982); una unidad enzimática se define, como la cantidad de enzima que forma 1.0  $\mu\text{mol}$  de producto por minuto bajo condiciones ensayadas.

*Determinación de la termotolerancia.* Se extrajeron muestras de 15 mL cada cinco días de cada uno de los matraces y se filtraron para eliminar el micelio presente. Después de la filtración, se tomó una muestra de 5mL de cada una de las muestras originales, la cual se colocó en tubos de ensayo con rosca y en un baño María con temperatura controlada de 60°C y se sumergieron los tubos durante una hora.

Luego de haber transcurrido el tiempo, se sacaron las muestras del baño María y se enfriaron a temperatura ambiente. Por último, se determinó el pH, proteínas y actividad enzimática, tanto las muestras que se sometieron a temperatura de 60°C durante una hora, como a las muestras originales. Esto sirvió para obtener el porcentaje de la enzima que conserva su actividad enzimática y si existe un cambio de pH al someterla a la temperatura elevada (60°C).

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

**Propagación de la cepa.** En los experimentos realizados para la propagación del hongo *Trametes sp.* EUM1 con las condiciones de incubación a 28°C, su crecimiento fue a una velocidad radial de 0.1783 mm/h. En la Figura 4, se muestra el crecimiento del hongo *Trametes sp.* EUM1 después de 14 días de incubación.

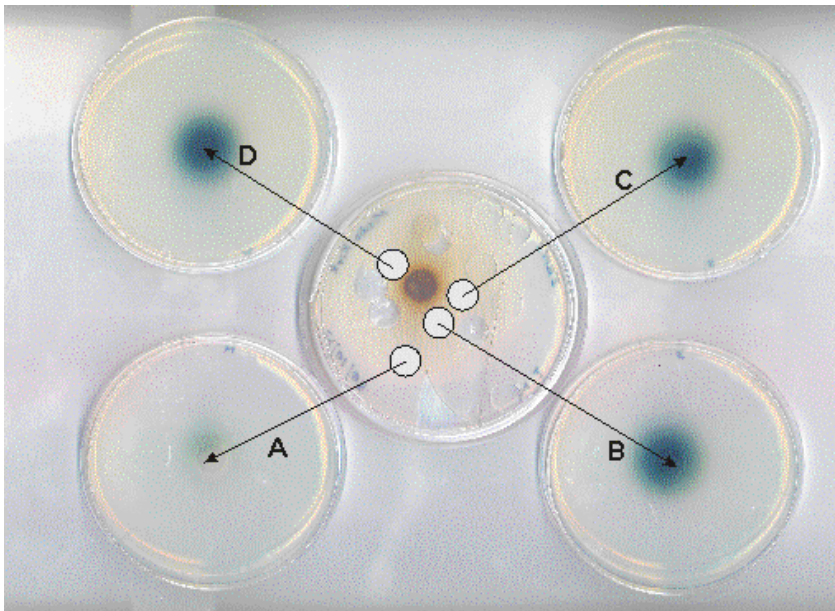


**Figura 4.** Crecimiento de hongo *Trametes sp.* EUM1 después de 14 días de incubación a 28°C.

**Efecto de la edad del micelio sobre la detección de las lacasas.** En la figura 5, se muestran cuatro placas inoculadas con micelio de diferentes edades; las cuales se tomaron a partir del centro de la placa a diferentes distancias de la misma colonia; la coloración del ABTS lo cual corresponde, probablemente, a la actividad lacasa es más intensa en la placa D que es la placa que contiene el micelio con una edad mayor; mientras que la placa A tiene una coloración débil y corresponde al micelio de menor edad, la observación se realizó el mismo día de crecimiento.

## Resultados y Discusiones

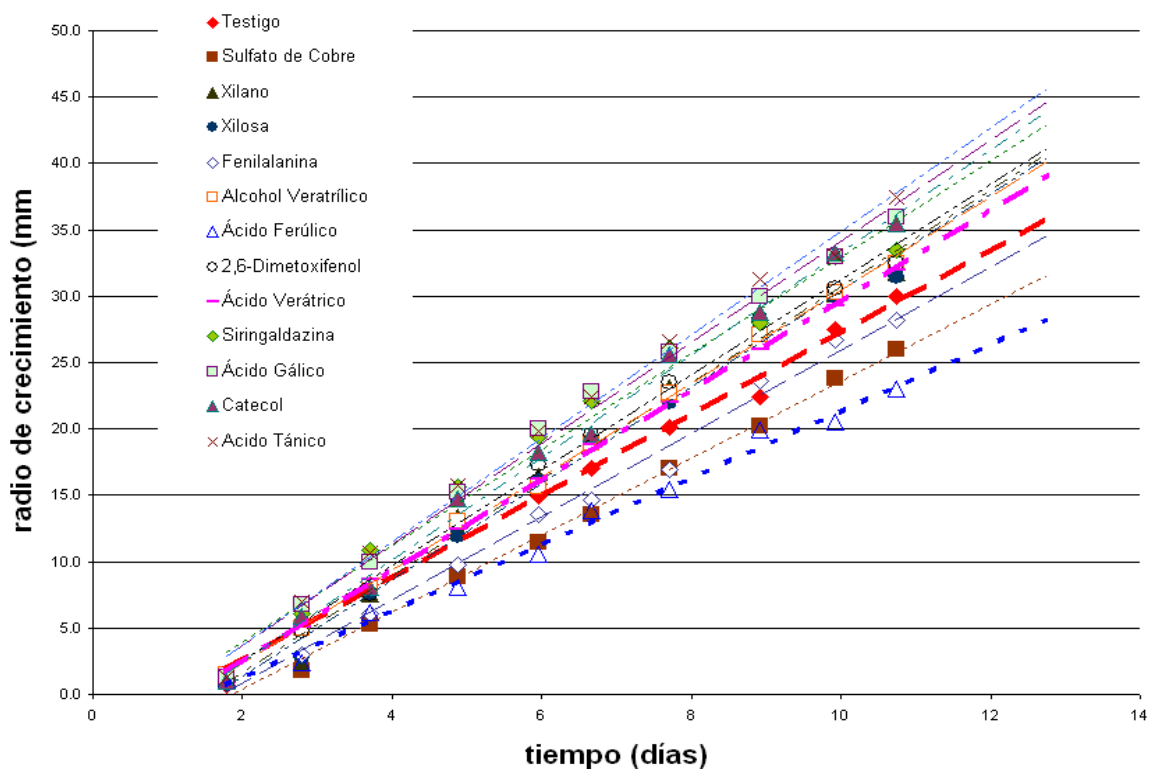
La edad del micelio es un factor que se debe de considerar para la producción de las lacasas en el hongo *Trametes sp.* EUM1; ya que la edad influye sobre la detección de las lacasas cuando se toman discos de agar con micelio, este resultado concuerda con lo obtenido por López (2001), el cual observó que la máxima actividad enzimática (actividad lacasa) en dos cepas de *Pleurotus*, se mostró en el micelio que se encontraba en la etapa de madurez; por lo tanto, al hacer el análisis en placa, el micelio debe ser aproximadamente de la misma edad para que no exista interferencia alguna en los resultados y una opción es utilizar pellets.



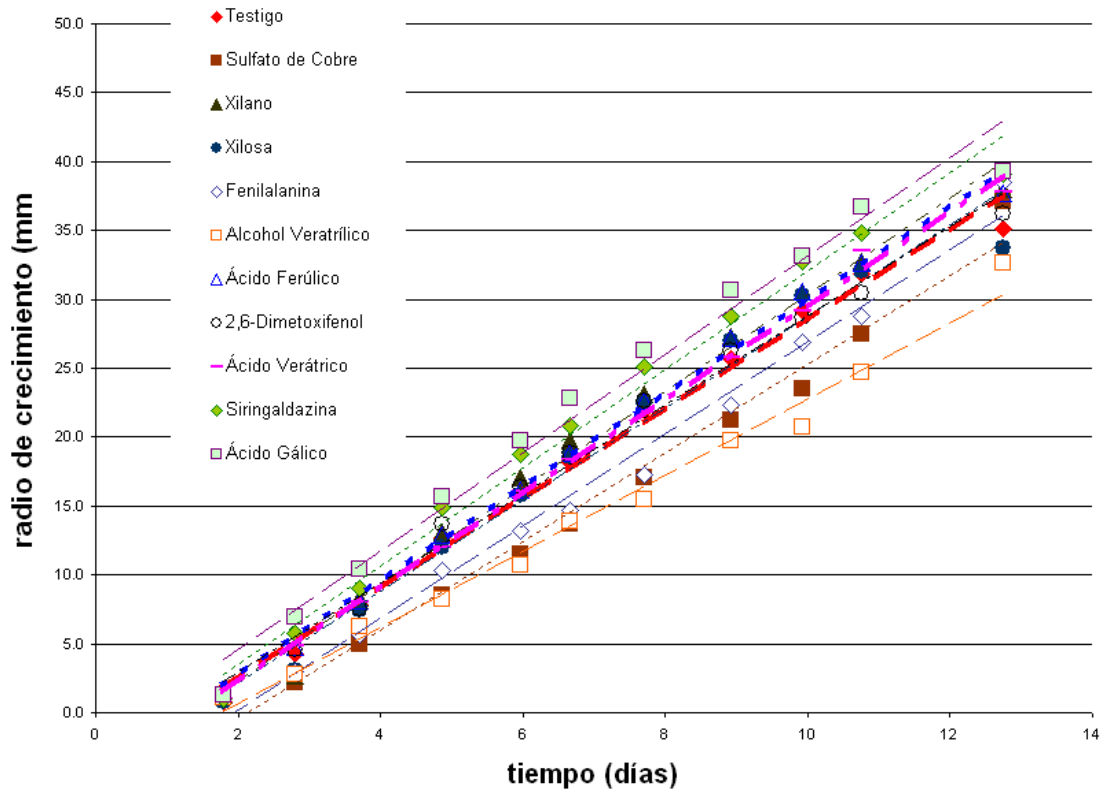
**Figura 5.** Efecto de la edad del micelio en la producción de actividad lacasa. A Micelio de 24 a 48 h; B y C Micelio de 5 a 7 días; D Micelio de 12 a 14 días a temperatura de 28°C.

## Resultados y Discusiones

**Crecimiento del micelio a 28°C.** Para el crecimiento del micelio se tomaron mediciones con un Vernier de los radios producidos en cada una de las placas con los distintos compuestos tanto para los inoculados con el disco de agar como para los inoculados con el pellet teniendo como resultados los que se muestran en las Gráficas 1 y 2. Como se observa en las gráficas, las colonias que crecieron más con respecto al testigo (sin compuesto) fueron las suplementadas con ácido tánico y ácido gálico, por lo tanto, podemos decir que estos compuestos promueven de cierta manera el crecimiento. Por otro lado, las colonias con menor crecimiento fueron las que contenían cobre y ácido ferúlico, por lo cual podríamos mencionar que estos compuestos pueden tener un efecto tóxico o de inhibición para el crecimiento del micelio. Las diferencias entre el crecimiento con disco de agar y pellet no fueron muy notables, ya que el crecimiento del micelio fue muy parecido en las dos metodologías.



**Gráfica 1.** Crecimiento del micelio, del ensayo con los distintos compuestos donde se utilizó disco de agar como inóculo a 28°C..



**Gráfica 2.** Crecimiento del micelio con los distintos compuestos y usando pellet como inóculo a 28°C..

En la tabla 3, se presentan las velocidades radiales de crecimiento con los distintos compuestos utilizados para este ensayo; donde se observa claramente las diferencias de crecimiento del micelio, con respecto al testigo.

## Resultados y Discusiones

| Compuesto           | Velocidad radial (Agar)* | R <sup>2</sup> | Velocidad radial (Pellet)* | R <sup>2</sup> |
|---------------------|--------------------------|----------------|----------------------------|----------------|
| Testigo             | 0.1320                   | 0.9939         | 0.1362                     | 0.9915         |
| Ácido Tánico        | 0.1662                   | 0.9941         | ***                        | ***            |
| Catecol             | 0.1642                   | 0.9901         | ***                        | ***            |
| Ácido Gálico        | 0.1622                   | 0.9928         | 0.1485                     | 0.9819         |
| Xilano              | 0.1548                   | 0.9850         | 0.1340                     | 0.9909         |
| Xilosa              | 0.1545                   | 0.9886         | 0.1382                     | 0.9775         |
| Siringaldazina      | 0.1543                   | 0.9851         | 0.1483                     | 0.9888         |
| 2,6-Dimetoxifenol   | 0.1525                   | 0.9851         | 0.1349                     | 0.9914         |
| Alcohol Veratrílico | 0.1497                   | 0.9955         | 0.1420                     | 0.9868         |
| Ácido Verátrico     | 0.1456                   | 0.9981         | 0.1427                     | 0.9975         |
| Fenilalanina        | 0.1330                   | 0.9820         | 0.1393                     | 0.9887         |
| Sulfato de Cobre    | 0.1235                   | 0.9912         | 0.1340                     | 0.9853         |
| Ácido Ferúlico      | 0.1073                   | 0.9912         | 0.1151                     | 0.9961         |

**Tabla 3.** Valores de velocidades radiales en los ensayos con los distintos compuestos a 28°C y sus respectivos coeficientes de correlación.

\* la velocidad radial esta expresada en mm/h.

**Halos de oxidación.** Los halos de oxidación son los halos de coloración que se forman cuando las lacasas reaccionan con el ABTS y éste es oxidado. En la tabla 4, se observa que el ácido tánico y el catecol no produjeron halos de oxidación; mientras que algunos otros como el ácido ferúlico, el alcohol veratrílico, la siringaldazina, el 2,6-dimetoxifenol y la D-fenilalanina tuvieron una coloración tardía en comparación con el testigo, aunque su coloración fue mayor excepto con D-fenilalanina.

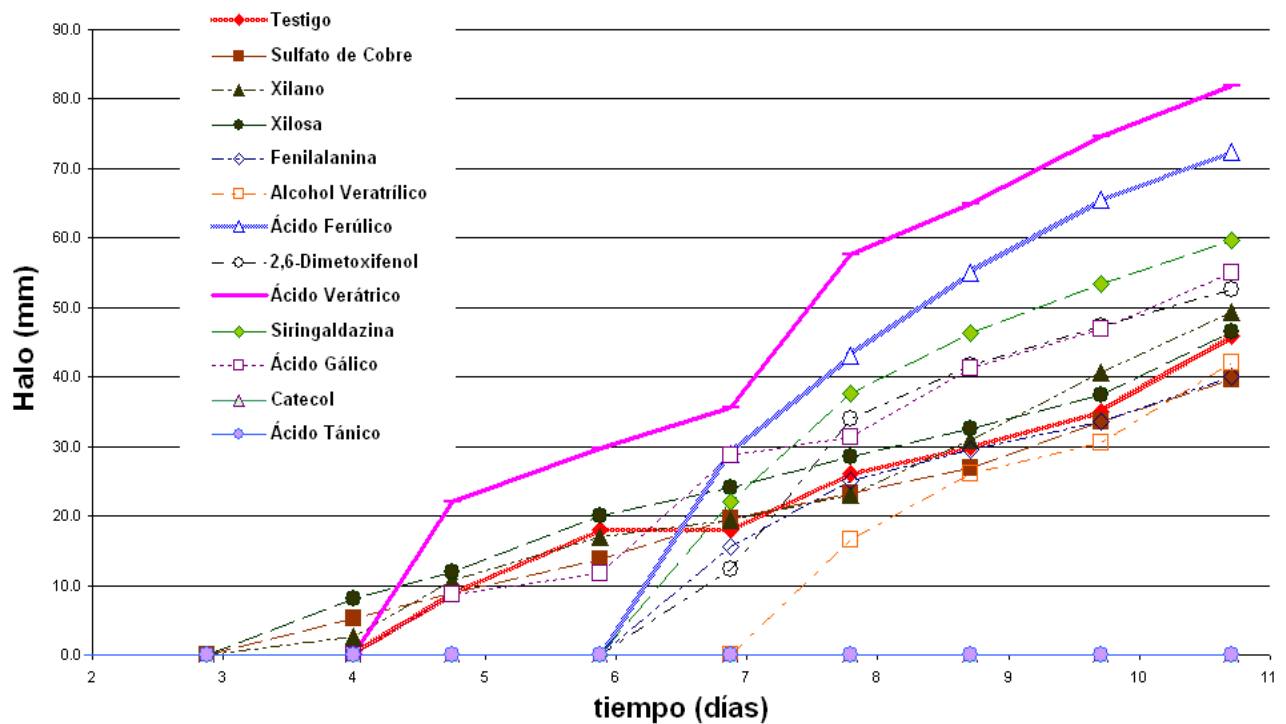
*Resultados y Discusiones*

| tiempo (días) | Testigo | Acido Verátrico | Ácido Ferúlico | Siringsaldazina | Ácido Gálico | 2,6-Dimetoxifenol | Xilano | Xilosa | Alcohol Verátrico | Sulfato de Cobre | Fenilalanina | Catecol | Ácido Tánico |
|---------------|---------|-----------------|----------------|-----------------|--------------|-------------------|--------|--------|-------------------|------------------|--------------|---------|--------------|
| 1             | *       | *               | *              | *               | *            | *                 | *      | *      | *                 | *                | *            | *       | *            |
| 2             | *       | *               | *              | *               | *            | *                 | *      | *      | *                 | *                | *            | *       | *            |
| 3             | *       | *               | *              | *               | *            | *                 | *      | *      | *                 | *                | *            | *       | *            |
| 4             | *       | *               | *              | *               | *            | *                 | 3      | 8      | *                 | 5                | *            | *       | *            |
| 5             | 9       | 22              | *              | *               | 9            | *                 | 11     | 12     | *                 | 9                | *            | *       | *            |
| 6             | 18      | 30              | *              | *               | 12           | *                 | 17     | 20     | *                 | 14               | *            | *       | *            |
| 7             | 18      | 36              | 29             | 22              | 29           | 12                | 19     | 24     | *                 | 20               | 16           | *       | *            |
| 8             | 26      | 58              | 43             | 38              | 31           | 34                | 23     | 29     | 17                | 23               | 25           | *       | *            |
| 9             | 30      | 65              | 55             | 46              | 41           | 42                | 31     | 33     | 26                | 27               | 30           | *       | *            |
| 10            | 35      | 75              | 66             | 53              | 47           | 47                | 41     | 38     | 31                | 34               | 34           | *       | *            |
| 11            | 46      | 82              | 73             | 60              | 55           | 53                | 49     | 47     | 42                | 40               | 40           | *       | *            |

**Tabla 4.** Diámetros de los halos de oxidación con los distintos compuestos. Los diámetros están dados en mm y el método utilizado fue con discos de agar.

## Resultados y Discusiones

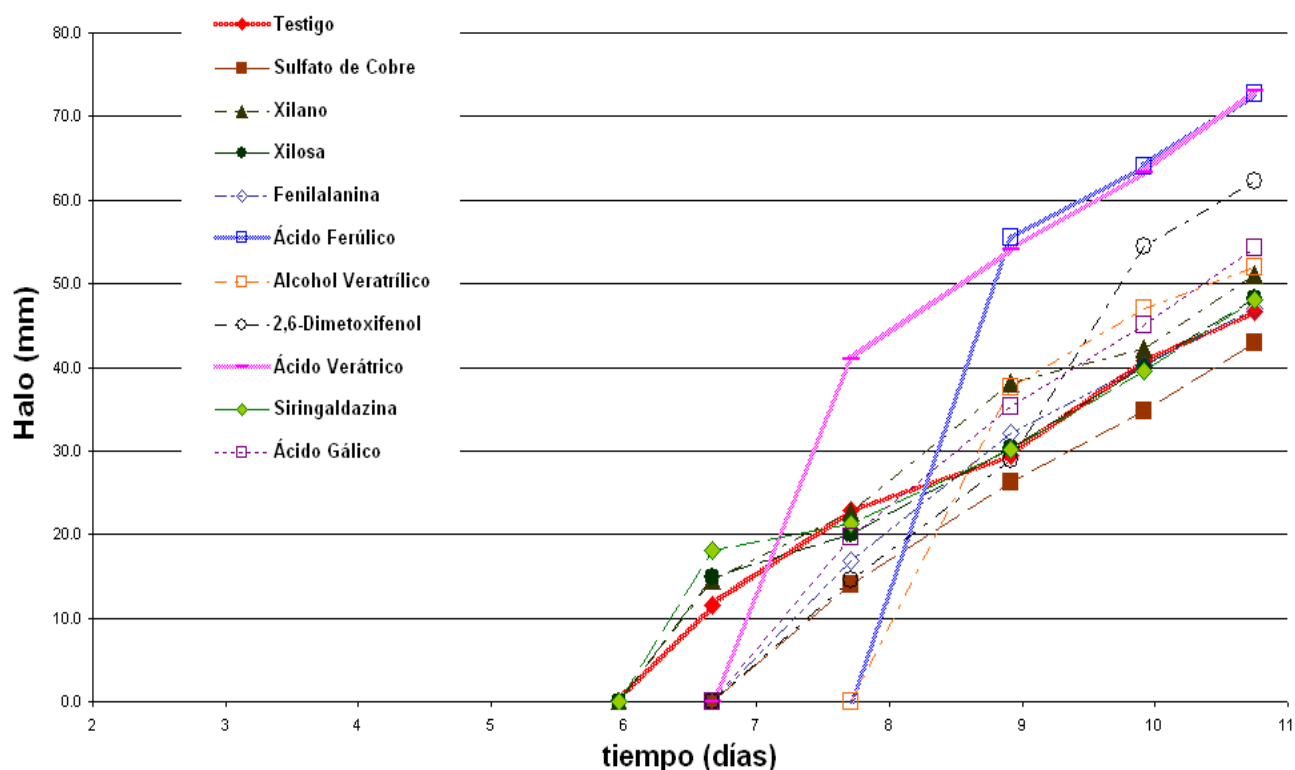
A continuación se presentan las gráficas obtenidas de los halos de oxidación con los distintos compuestos y con las dos metodologías ( discos de agar y pellet).



**Gráfica 3.** Halos de oxidación con respecto al tiempo con los 12 compuestos utilizados para la inducción en el método en el que se utilizó el disco de agar como inóculo.



## Resultados y Discusiones



**Gráfica 4.** Halos de oxidación a distintos tiempos de los compuestos utilizados con el método donde se utilizó el pellet como inóculo.

Como se puede observar en las gráficas 3 y 4 a los 11 días de haber comenzado el ensayo, el ácido verátrico tuvo halos de oxidación que fueron de 78% y 131 % mayor con respecto al testigo, usando discos de agar y pellet como inóculo, respectivamente. Mientras que para el caso de los medios con ácido ferúlico, el aumento de los halos de oxidación fueron de 58% para los inoculados con disco de agar y del 131% para los inoculados con pellet siendo comparados con el testigo. Por otra parte, algunos compuestos como es el caso del sulfato de cobre y el alcohol veratrílico sus halos de oxidación se mantuvieron por debajo del testigo, siendo que Collins y Dobson (1997), reportaron que el sulfato de cobre a una concentración de  $400\mu\text{M}$  fue capaz de inducir la producción de las lacasas en el hongo *Trametes versicolor*; por otro lado, Rodríguez y colaboradores (2002), utilizaron el alcohol veratrílico a una concentración de 2mM para causar el mismo efecto en el hongo *Trametes versicolor*.

## Resultados y Discusiones

En nuestro caso, la concentración adicionada de los compuestos, fue 0.37 mM, con esto se controló que no hubiese algún tipo de interferencia con el sustrato ABTS para la detección de la actividad lacasa; la misma concentración fue utilizada con anterioridad por González (2001) para el hongo *Trametes sp.* I-62, para algunos de los compuestos utilizados en el presente estudio.

**Índice de potencia.** Para el cálculo del índice de potencia se utilizaron los valores obtenidos en el crecimiento de micelio y los halos de oxidación, a los 11 días de incubación, teniendo como resultado, que para el caso de los medios con ácido verátrico, los índices de potencia fueron de 66% y 49%, mayores que el testigo, usando discos de agar y pellet como inóculos, respectivamente. Por otro lado para el caso de los medios con ácido ferúlico, el incremento en los índices de potencia fue de 105% para los medios inoculados con disco de agar y 52% para la inoculación con pellet en comparación con el testigo. Al comparar estos resultados se observa que existen diferencias entre el disco de agar y el pellet, lo cual podría deberse a la edad del micelio, ya que al estar en la etapa de maduración tiene una mayor actividad enzimática como ya se mencionó, provocando así, una interferencia en los resultados y por efecto, el aumento del índice de potencia; por otra parte, al tener estos índices mayores al testigo, se puede mencionar que se indujo una producción de enzima extracelular en el medio.

**Tabla 5.** Valores del índice de potencia de los distintos compuestos a los 11 días de haber comenzado los ensayos.

| Compuesto           | Índice de Potencia (Agar) (%) | Índice de Potencia (Pellet) (%) |
|---------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| Testigo             | 0.77 (100)                    | 0.73 (100)                      |
| Ácido Ferúlico      | 1.58 (205)                    | 1.11 (152)                      |
| Ácido Verátrico     | 1.28 (166)                    | 1.09 (149)                      |
| Siringaldazina      | 0.89 (116)                    | 0.69 (95)                       |
| 2,6-Dimetoxifenol   | 0.81 (105)                    | 1.02 (140)                      |
| Xilano              | 0.78 (101)                    | 0.78 (107)                      |
| Sulfato de Cobre    | 0.76 (99)                     | 0.78 (107)                      |
| Ácido Gálico        | 0.76 (99)                     | 0.74 (101)                      |
| Xilosa              | 0.74 (96)                     | 0.75 (103)                      |
| Fenilalanina        | 0.71 (92)                     | 0.82 (112)                      |
| Alcohol Veratrílico | 0.65 (84)                     | 1.05 (144)                      |

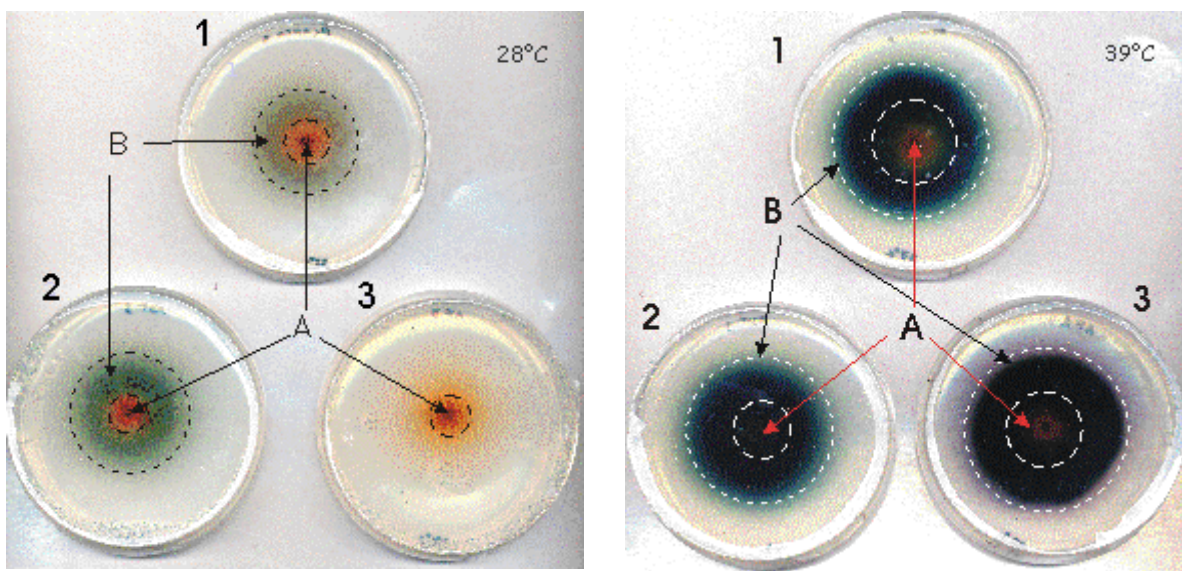
## ***Resultados y Discusiones***

Como se muestra en la tabla 5, los compuestos que tienen mayor índice de potencia son: el ácido verátrico y el ácido ferúlico. Manteniéndose, con pocas variaciones entre las dos metodologías utilizadas, lo cual concuerda así con algunos autores (Collins y Dobson, 1997; Soden y Dobson, 2001), que utilizan a estos compuestos como inductores, y realizan sus ensayos en medio sólido y en placa con inóculos de disco de agar; mientras, que el sulfato de cobre y el alcohol verátrico se mantienen con valores por debajo del testigo, por lo tanto estos compuestos no tienen la capacidad de inducir al hongo *Trametes sp.* EUM1 para la producción de lacasas. Esto concuerda con la literatura, ya que se ha demostrado que el poder de inducción de cada compuesto depende del microorganismo en estudio (Collins y Dobson, 1997; Palmieri y col., 2000; Rodríguez y col., 2002).

Con respecto a la forma de inoculación de las placas, se observaron diferencias entre la inoculación con disco de agar a la inoculación con pellet. Las placas inoculadas con disco de agar, tuvieron interferencias en los resultados obtenidos, debido a que el disco lleva una cierta concentración de enzima dentro de éste y el micelio es de diversas edades dependiendo la distancia a la que se tome el disco a partir del centro de la placa. Por otro lado, en las placas inoculadas con el pellet se controlaron más los factores antes mencionados, ya que al tomar los pellets se controló la edad del micelio por ser del mismo tamaño y al lavar el pellet con agua destilada estéril, se evitó la influencia de la enzima, estuviera arrastrada con el micelio. Por otra parte, se observó que hay compuestos que se comportan de la misma manera, tanto al inocularlos con discos de agar y en pellet, estos compuestos fueron el ácido ferúlico y el ácido verátrico. Por lo tanto, estos dos compuestos se utilizaron para realizar los ensayos del efecto de la temperatura sobre la producción o detección de lacasas en placas, así como en fermentación líquida sin agitación.

## Resultados y Discusiones

**Efecto de la temperatura en el micelio sobre la detección de las lacasas.** Otro factor a considerar es el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de micelio y sobre los halos de oxidación producidos por las lacasas de hongo *Trametes sp.* EUM1. Por lo cual, se realizaron los ensayos en placa tanto a 28°C como a 39°C y solamente con el ácido ferúlico y el ácido verátrico, los cuales fueron seleccionados a partir de una lista de compuestos con los que se realizaron ensayos previos.

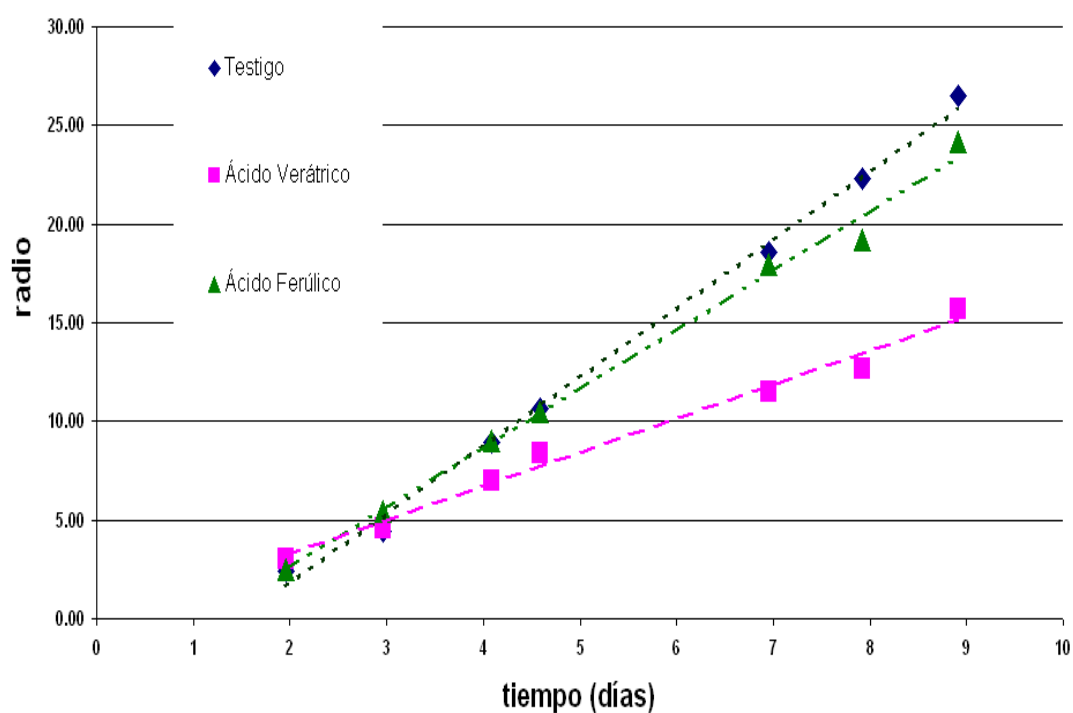


**Figura 6.** Ensayo para estudiar el efecto de la temperatura en el micelio y la producción de lacasas del hongo *Trametes sp.* EUM1 a temperaturas de 28°C y 39°C. El orden de las placas es como se presenta a continuación: 1. Placa con medio kirk (placa testigo), 2. Placa con medio kirk y ácido verátrico y 3. Placa con medio kirk y ácido ferúlico. Mientras que A es el Crecimiento radial del hongo y B son los Halos de oxidación. Fueron tomadas a los 2 días de haber comenzado el ensayo.

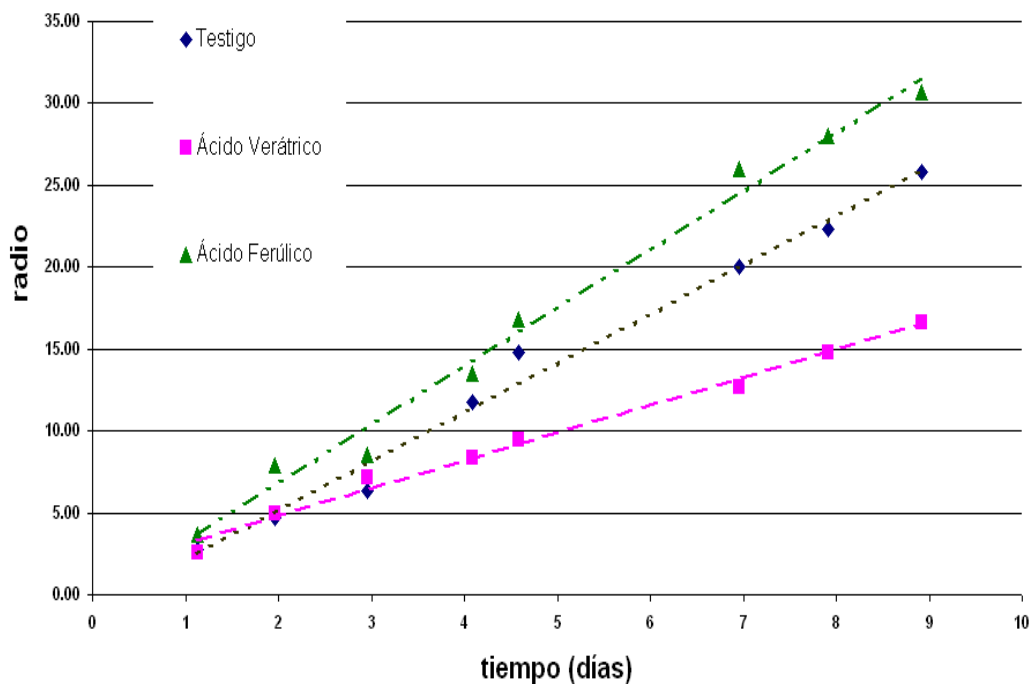
Como se observa en la figura 6, la temperatura es un factor importante a considerar durante los ensayos, ya que a temperatura de 39°C, el crecimiento del micelio fue mayor que a temperatura de 28°C; así como también los halos de oxidación fueron mayores viéndose reflejada en la coloración de la placa y su diámetro producido. A continuación se realizó un análisis más detallado del efecto de la temperatura en el micelio sobre la detección de las lacasas.

## Resultados y Discusiones

En las gráficas 5 y 6, se observa el crecimiento del micelio a 28°C y 39°C. Para la obtención de estas graficas se utilizó un Vernier, con el cual se determinaron los radios para el crecimiento del micelio en cada una de las placas con los compuestos seleccionados (ácido verátrico y ácido ferúlico) y la placa testigo, siendo estas mediciones cada 24 horas.



**Gráfica 5.** Crecimiento del micelio en placa a 28°C, de los compuestos seleccionados (ácido verátrico y ácido ferúlico), usando pellet como inóculo.



**Gráfica 6.** Crecimiento del micelio en placa a 39°C, de los compuestos seleccionados (ácido verátrico y ácido ferúlico), usando pellet como inóculo.

En las gráficas de crecimiento de micelio se observa el mismo comportamiento en cada una de ellas, tanto a 28°C como a 39°C, ya que a partir de los 2 días de haberse comenzado el ensayo, el hongo comienza su crecimiento tanto en las placas con los compuestos así como en la placa testigo. Ahora bien, la temperatura no fue un factor que influyera mucho en el crecimiento de micelio del hongo como se observa en la tabla 6, en la cual se tienen las velocidades radiales a las distintas temperaturas y con los compuestos seleccionados (ácido ferúlico y ácido verátrico), teniendo valores muy similares en las dos temperaturas utilizadas.

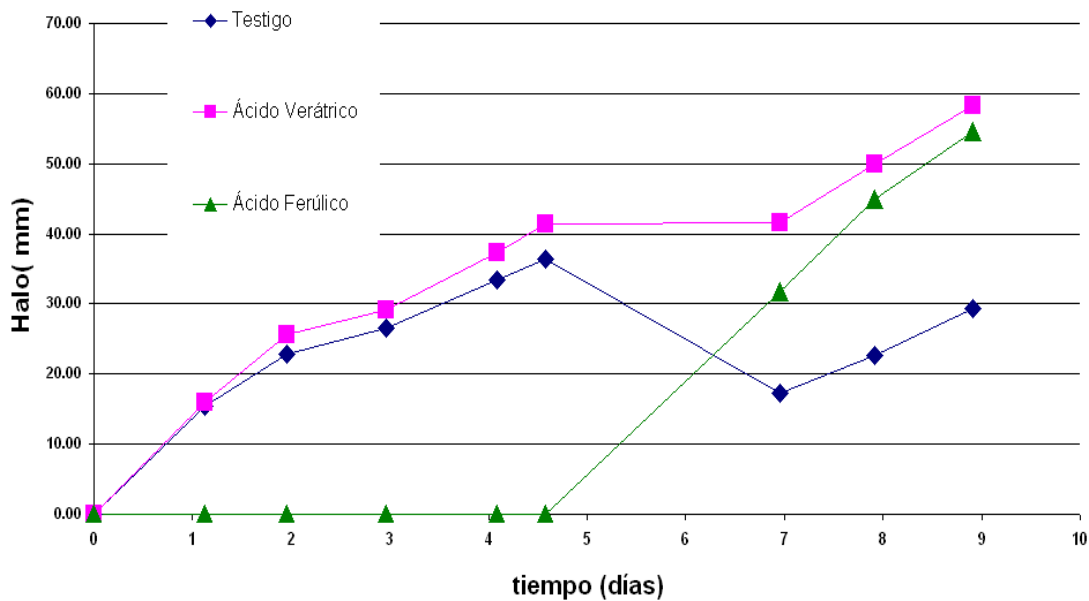
## Resultados y Discusiones

|                 | Velocidad radial | R <sup>2</sup> | Velocidad radial | R <sup>2</sup> |
|-----------------|------------------|----------------|------------------|----------------|
|                 | 28°C             | 28°C           | 39°C             | 39°C           |
| Testigo         | 0.1456           | 0.9966         | 0.1253           | 0.9863         |
| Ácido Verátrico | 0.0717           | 0.9870         | 0.0709           | 0.9906         |
| Ácido Ferúlico  | 0.1254           | 0.9939         | 0.1489           | 0.9801         |

**Tabla 6.** Valores de la velocidad radial con los compuestos seleccionados (ácido ferúlico y ácido verátrico) a distintas temperaturas y sus respectivos coeficientes de correlación.

\* la velocidad radial esta expresada en mm/h.

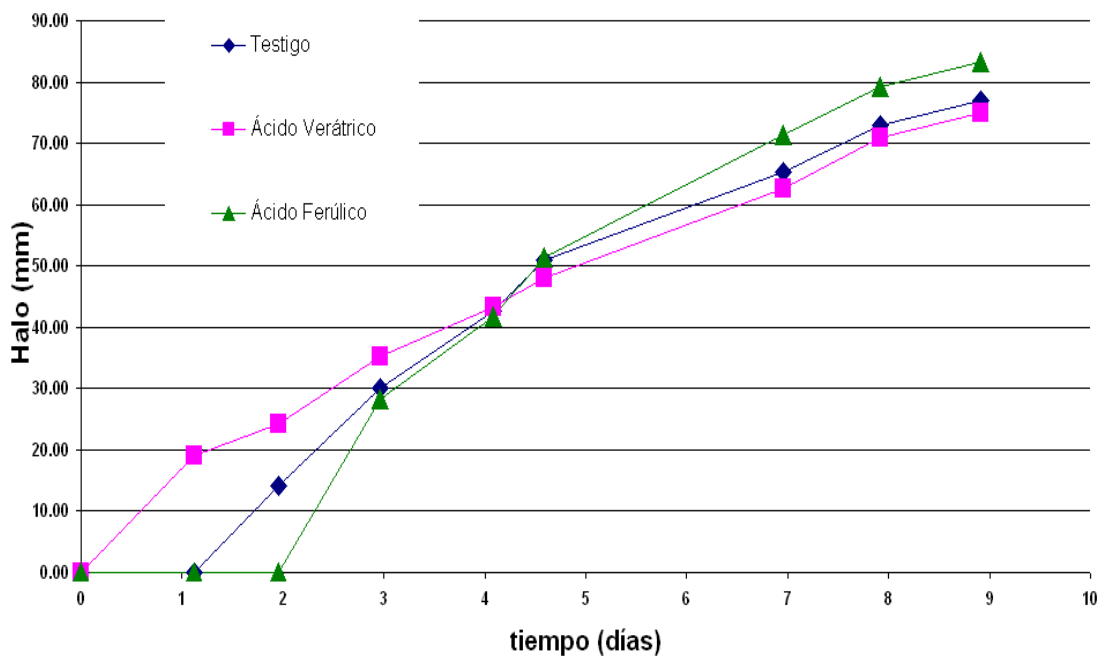
Ahora bien con respecto a los halos de oxidación a distintas temperaturas el efecto que se observó fue muy notable, ya que en las gráficas 9 y 10 se representa la formación de estos halos con cada una de las placas de los compuestos, así como también de las placas testigo.



**Gráfica 7.** Halos de oxidación en placa a 28°C, de los compuestos seleccionados (ácido verátrico y ácido ferúlico), usando pellet como inóculo.

## Resultados y Discusiones

En la gráfica 7, se tiene que a 28°C los halos de oxidación producidos por el testigo y el ácido verátrico son muy similares, ya que tienen un comportamiento inicial parecido, mientras que el halo de oxidación del ácido ferúlico comienza después del cuarto día de haberse comenzado el ensayo. Se observó una gran diferencia de la producción de los halos de oxidación con respecto al testigo, siendo mayor con los compuestos seleccionados muy notablemente a partir del día 7.



**Gráfica 8.** Halos de oxidación en placa a 39°C, de los compuestos seleccionados (ácido verátrico y ácido ferúlico), usando pellet como inóculo.



## Resultados y Discusiones

Realizando el análisis correspondiente de los halos de oxidación en las placas a 39°C como se muestra en la gráfica 8, el comportamiento es distinto para cada uno de los compuestos y el testigo, ya que el ácido verátrico tiene un efecto en la formación del halo desde el comienzo del ensayo, el testigo lo hace a partir del primer día de haberse comenzado el ensayo y con el ácido ferúlico, se observó su halo de oxidación después del segundo día y mantienen un comportamiento muy similar después del cuarto día de haberse comenzado el ensayo.

Analizando lo anterior se tiene que las placas que conservaron su comportamiento tanto a 28°C como a 39°C, fueron las que contenían el ácido verátrico, mientras que las placas testigo tuvieron modificaciones en la producción de sus halos, así como también el ácido ferúlico. Al finalizar los ensayos se obtuvieron los halos de oxidación representados en la tabla 7, en la cual se puede observar que a 39°C, los halos fueron mayores (en el testigo se obtuvo un 172%, en el ácido ferúlico un 52% y el ácido verátrico un 32% más, con respecto a la temperatura de 28°C) y para el ácido ferúlico su halo de oxidación fue 8% mayor a 39°C con respecto al testigo; mientras que para el ácido verátrico su halo de oxidación estuvo un 2.5% por debajo del testigo.

**Tabla 7.** Halos de oxidación con los compuestos ácido ferúlico, ácido verátrico) y el testigo a las distintas temperaturas, después del día 9.

|                 | Halos de Oxidación |      |
|-----------------|--------------------|------|
|                 | 28°C               | 39°C |
| Testigo         | 29.3               | 77   |
| Ácido Verátrico | 58.3               | 75   |
| Ácido Ferúlico  | 54.6               | 83   |

\* los halos de oxidación están expresados en mm.

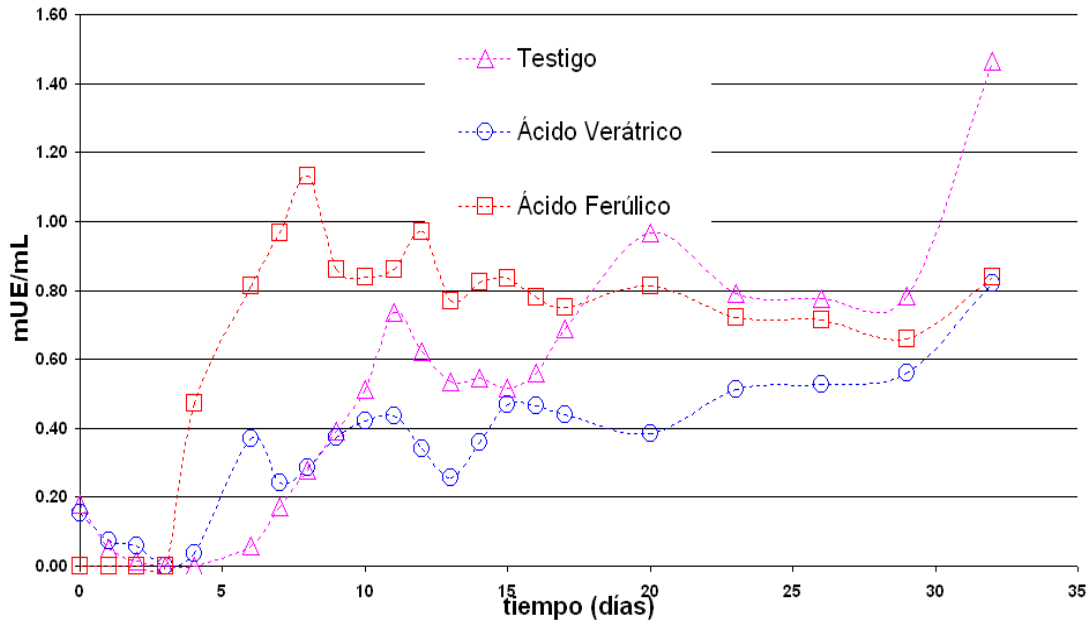
## **Resultados y Discusiones**

Teniendo todo lo anterior, se calculó el índice de potencia de las placas testigo y las placas de los compuestos seleccionados para el último tiempo medido; representándose en la tabla 8, en la cual se tiene que el ácido verátrico tuvo valores mayores de 51% y de 65% en el índice de potencia con respecto al blanco, tanto a 28°C como a 39°C respectivamente; mientras que el ácido ferúlico solo tuvo este índice de potencia mayor con respecto al testigo a temperatura de 28°C el cual fue 19%, ya que a 39 °C se observó un valor del 9% por debajo del testigo.

|                 | Índice de Potencia |      |
|-----------------|--------------------|------|
|                 | 28°C               | 39°C |
| Testigo         | 1.45               | 1.49 |
| Ácido Verátrico | 2.39               | 2.25 |
| Ácido Ferúlico  | 1.72               | 1.36 |

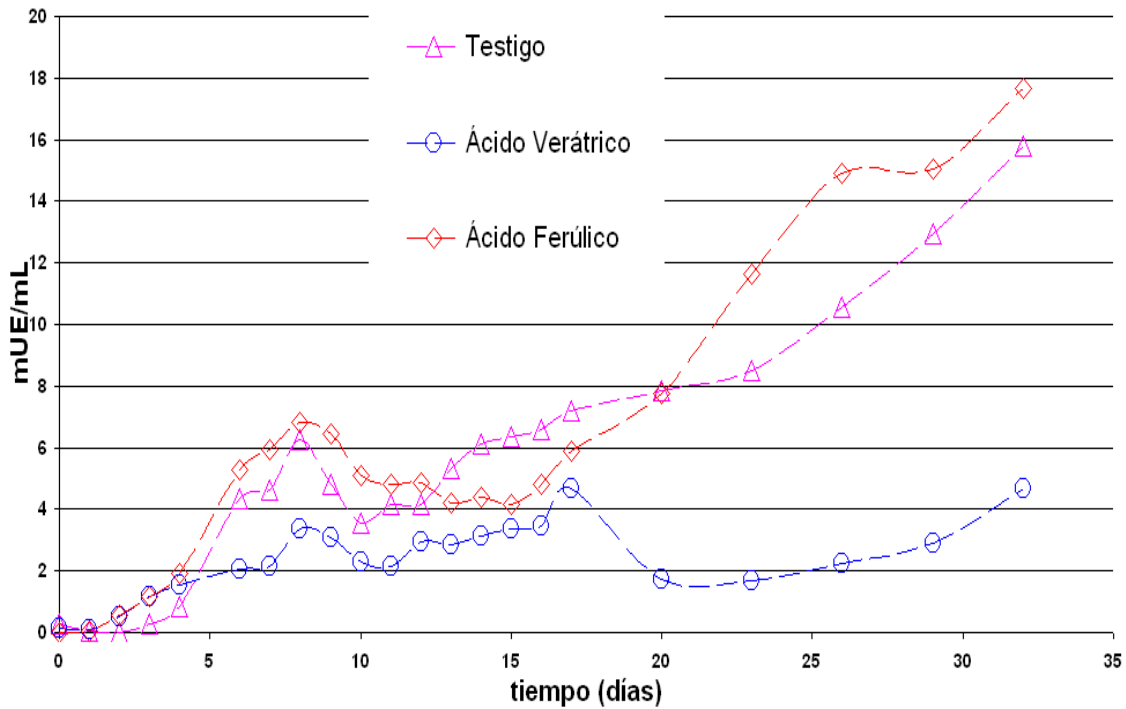
**Tabla 8.** Índices de potencia con los compuestos ácido ferúlico, ácido verátrico y el testigo a las distintas temperaturas, después del día 9.

**Fermentación líquida sin agitación.** En esta fermentación se obtuvieron los resultados correspondientes a la actividad enzimática volumétrica mencionadas en la metodología, cuando se suplementó el medio Kirk con ácido verátrico y ácido ferúlico a dos temperaturas diferentes (28°C y 39°C), teniendo un medio testigo.



**Gráfica 9.** Actividad volumétrica obtenida a los 28°C, con cada uno de los compuestos seleccionados (ácido verátrico y ácido ferúlico) y el testigo, en la fermentación líquida sin agitación

En la gráfica 9, se encuentran los valores de las actividades volumétricas de cada una de las fermentaciones líquidas realizadas a una temperatura de 28°C. En esta se observa que el ácido verátrico mantiene una actividad mayor al testigo durante los primeros 8 días de la cinética y luego disminuye. Con respecto al ácido ferúlico se tiene que su actividad se mantiene por encima del testigo durante un tiempo de 18 días. Por otra parte, las actividades volumétricas presentadas en la grafica 10 que corresponde a las fermentaciones realizadas a 39°C; tenemos que el ácido verátrico mantiene su actividad por arriba del testigo en los primeros 4 días de la cinética; mientras que la actividad de la fermentación que contenía el ácido ferúlico se mantuvo por un periodo de 13 días por encima del testigo.



**Gráfica 10.** Actividad volumétrica por mililitro obtenida a 39°C, con cada uno de los compuestos seleccionados (ácido verátrico y ácido ferúlico) y el testigo, en la fermentación líquida sin agitación

Comparando la actividades volumétricas a las dos temperaturas, observamos que a la temperatura de 39°C, existe una actividades volumétricas de aproximadamente 10 veces mayor a las que se obtuvieron en las fermentaciones llevadas acabo a 28°C como se observa en las gráficas; por lo que algunos autores (López, 2001) relacionan la actividad de las lacasas con el crecimiento del microorganismo y viceversa, ya que al colocar a los microorganismos termófilos que al crecer a su temperatura óptima ( Brock, 1967) degradan con mayor facilidad a la lignina y por consiguiente se puede regular la síntesis de enzima a partir de la variación de la temperatura.

## ***Resultados y Discusiones***

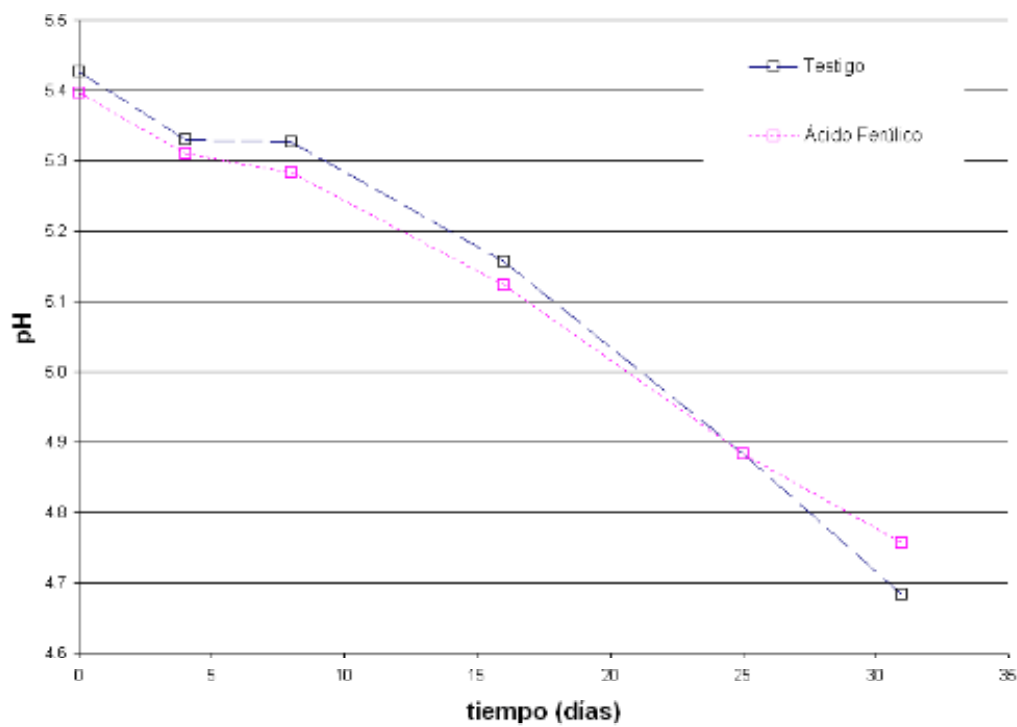
Coll y colaboradores(1993, 1994) obtuvieron una lacasa de un hongo, la cual llamó PM1 y era activada cuando se pre-incubaba a una temperatura de 60°C y mostraba un moderado incremento de su actividad de cerca del 10-20% entre las temperaturas de 25°C y 60°C; lo mismo ocurrió con Gianfreda y colaboradores (1998), el cual observó que la actividad de la lacasa se incrementaba gradualmente conforme se aumentaba la temperatura de 20°C a 70°C, por tanto, obtuvieron que la actividad de la lacasa dependía de la temperatura. Estos resultados son favorables, ya que lo que se busca en el presente trabajo es obtener la termotolerancia de las lacasas presentes.

A partir de los resultados obtenidos con anterioridad, se seleccionó la temperatura de 39°C para la producción de la lacasa y el ácido ferúlico, el cual presentó una mayor actividad enzimática al inicio de la cinética en las fermentaciones líquidas sin agitación. La temperatura se seleccionó debido a que se produjo una mayor actividad lacasa en comparación a la que se produjo en la temperatura de 28°C, correspondiendo con una temperatura más cercana a la temperatura a la cual se aisló el hongo *Trametes sp.* EUM1 en la naturaleza (Medina, 2003). Por otro lado, se selecciono al ácido ferúlico, ya que otros autores lo han utilizado como inductor de algunas especies de hongos termófilos, como es el caso de Sonden y Dobson (2001), ellos probaron varios compuestos como el ácido ferúlico, 2,5- xilidina, el ácido verátrico, entre otros, en el hongo *Pleurotus sajor-caju* y observaron que el ácido ferúlico y la 2,5 xilidina provocaron una mayor transcripción del gen y por tanto una mayor inducción.

Otros autores como Lenowicz y Trojanovsky (1975) también estudiaron el efecto del ácido ferúlico como inductor sobre el hongo *Pleurotus ostreatus*, obteniendo así isoenzimas específicas de lacasa y por último, Galhaup y colaboradores (2002) que también lo utilizaron, para inducir la producción de lacasas en *Trametes pubescence*.

## Resultados y Discusiones

Después de haber seleccionado al ácido ferúlico. Se realizó una nueva cinética donde se valoró actividad, pH, proteína y termotolerancia. En la gráfica 11, se tiene el comportamiento de su pH durante la cinética a 39°C; se observa que el pH del medio con ácido ferúlico mantiene una semejanza con respecto al pH del medio testigo.



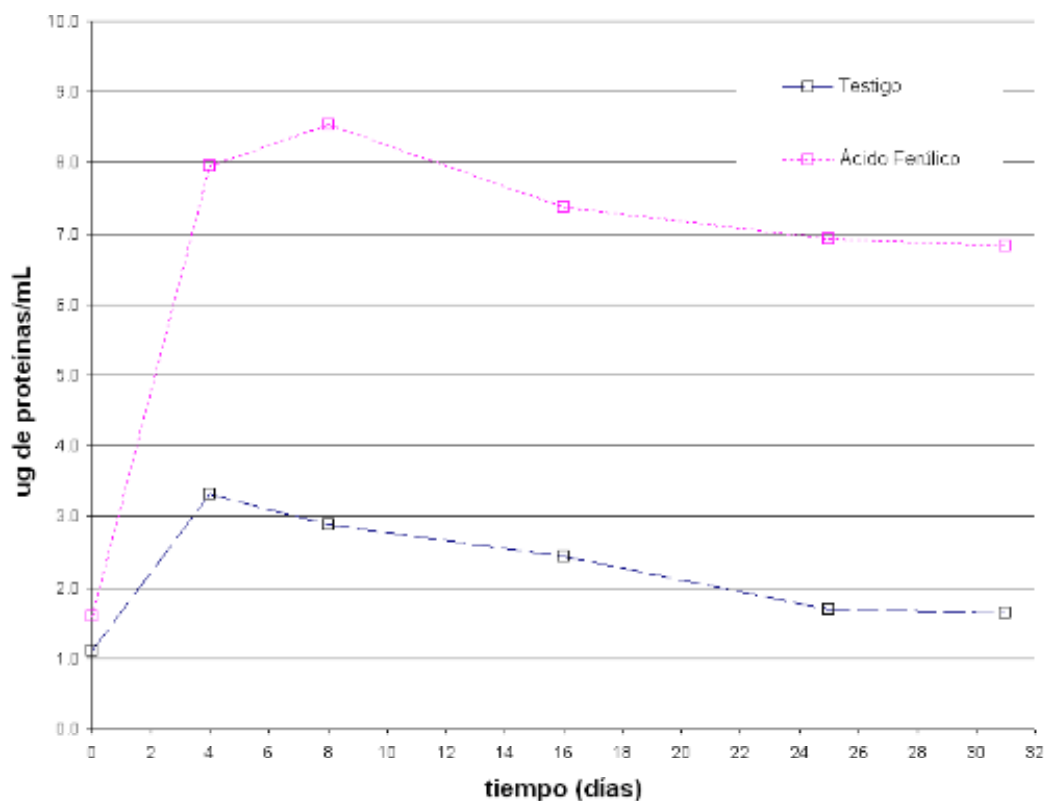
**Gráfica 11.** Resultados del pH en la fermentación líquida sin agitación a 39°C para los medios testigo y con ácido ferúlico.

## ***Resultados y Discusiones***

Por lo tanto, al comparar los valores obtenidos a la temperatura de 39°C, se observa que la variación debida al pH es mínima y que se mantiene dentro de los valores reportados por algunos autores, tales como Gorbatova y col.(2000) que obtuvieron isoenzimas de lacasa en los valores de pH 4.4. y 4.6 con el hongo *Botrytis cinerea*; otro trabajo desarrollado por Kanunfre y Zanca (1998) para obtener exolacasas en el hongo *Thelephora terrestris* señala que se tienen distintos valores de pH dependiendo del inductor que se le agrega al medio y los valores finales de pH que obtuvieron 5.0 cuando se usó siringaldazina, en el guayacol su pH fue de 4.8 y el pH del ABTS fue 3.4; por lo que mencionan que depende mucho del inductor que se utilice, para poder definir a qué pH se tendrá la mayor actividad de la enzima; por último, Gianfreda y colaboradores (1998), encontraron que conforme se va alcalinizando el medio (rango de pH entre 5.0-7.0) la actividad lacasa disminuye dependiendo mucho del sustrato y el microorganismo con el cual se trabaje. Por lo que, podemos decir, que el pH de los medios probados en el presente estudio, se encuentra dentro del rango reportado para la producción de lacasas

Por otra parte se midió la producción de proteína total cuyo resultado se representa en la gráfica 12. El comportamiento de la proteína dentro de estas fermentaciones es distinta, ya que el ácido ferúlico se mantuvo con una mayor producción de proteínas con respecto al testigo a lo largo de toda la cinética.

## Resultados y Discusiones



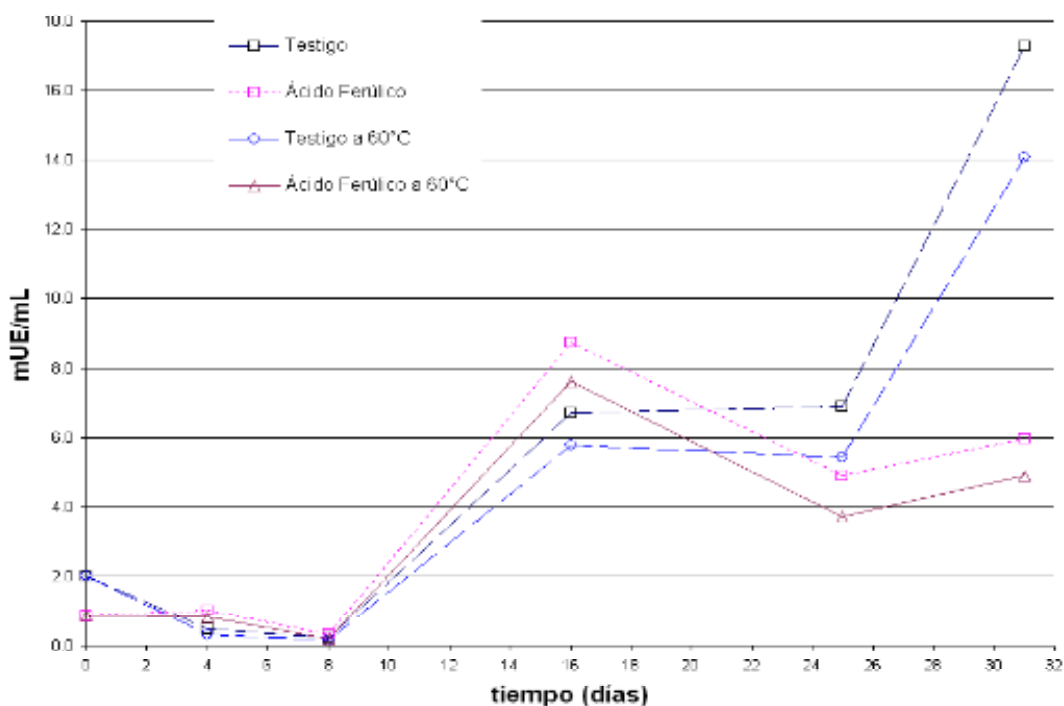
**Gráfica 12.** Contenido de proteína por mililitro obtenida a los 39°C, con el medio suplementado con ácido ferúlico y el testigo, en la fermentación líquida sin agitación.

Al comparar la producción de proteínas totales solubles en las fermentaciones líquidas a la temperatura de 39°C, se observa que el ácido ferúlico se comportó de una forma muy similar pero con una mayor producción de proteínas totales con respecto al testigo.

Con respecto a la gráfica 13 se observa la termotolerancia, la cual se realizó al colocar la muestra de medio que contenía la enzima en baño María con temperatura controlada a 60°C durante 1 hora.



## Resultados y Discusiones



**Gráfica 13.** Comparación de la actividad original y la actividad remanente luego de una incubación a 60°C por 1h, usando extractos obtenidos en la fermentación líquida sin agitación que se mantuvo a 39°C con ácido ferúlico y el testigo.

A partir de esta gráfica, se observa que se tiene un comportamiento similar con el ácido ferúlico así como el testigo en comparación a la cinética mostrada en la gráfica 10. Por otra parte al someterla a la prueba de termotolerancia, la actividad enzimática en el medio que contiene ácido ferúlico se mantiene durante casi toda la cinética entre el 75 y 90% del valor medido a 39°C (temperatura de la cinética); por lo que concuerda con Kanunfre y Zanca (1998), los cuales encontraron que la exolacasa de *T. terrestris* fue estable durante 3 horas a 60°C e inactivada después de 40 minutos al exponerla a 70°C; Gianfreda y col. (1997), que sometieron a temperaturas elevadas a la lacasa de *T. versicolor*, observando que entre los 50 y 85°C, la actividad fue cercana a 85% del valor medido a su temperatura óptima de 70°C.

## ***Resultados y Discusiones***

Eggert y colaboradores (1996), mostraron que la lacasa de *P. cinnabarinus* fue muy estable a 50°C, mientras que a 70°C la enzima perdió su actividad a los 60 minutos y a 80°C se inactivó completamente; Tinoco y colaboradores (2001), observaron que las lacasas de los hongos *Trametes* y *Coriolopsis* mostraron una actividad máxima a los 50°C y una actividad significativa a 70°C. Este fenómeno no ocurrió con los ensayos de estabilidad realizados por Muñoz y colaboradores (1996), los cuales sometieron a las lacasas de *Pleurotus eryngii* a la termotolerancia y observaron que a 25 y 55°C la enzima conservaba su actividad, mientras que al someterla a 60°C, se inactivaba por completo. Esto nos lleva a que en el hongo *Trametes sp.* EUM1 pueden existir diferentes lacasas, dentro de las cuales por lo menos una es termotolerante a 60°C. Por último, la mayor actividad mostrada durante la cinética fue con ácido ferúlico que se mantuvo un 33% de actividad por encima del testigo en los primeros días de haber comenzado la cinética.

## **RESUMEN DE LOS RESULTADOS**

- La edad del micelio tuvo un efecto sobre la inducción de las lacasas, medidas en cajas Petri, por lo que se recomienda el micelio maduro.
- El método de inoculación tiene efecto en la medición de los halos de oxidación, por lo que se recomienda inocular con Pellet.
- El sulfato de cobre y el alcohol veratrílico no tienen capacidad de inducción de actividad lacasa del hongo *Trametes sp.* EUM1 bajo las condiciones ensayadas.
- El ácido tánico y el catecol inhiben la producción de las lacasas en el hongo *Trametes sp.* EUM1 bajo las condiciones ensayadas.
- Los compuestos con los que se obtuvo mayor índice de potencia fueron el ácido ferúlico y el ácido verátrico.
- La temperatura tiene un efecto sobre la producción de las lacasas en *Trametes sp.* EUM1, teniendo un efecto favorable a los 39°C.
- La variación en la actividad lacasa responden a las diferencias en temperatura y a variaciones de los valores de pH.
- El efecto de inducción en Fermentación Líquida (FL) sin agitación se presenta en los primeros días de la cinética, aunque en los medios de ácido ferúlico se mantienen los valores de la actividad siempre por encima del testigo.
- Los compuestos con mayor índice de potencia y que se mantuvieron en las dos metodologías por encima del testigo (sin compuesto), fueron el ácido ferúlico y el ácido verátrico.

### ***Resumen de los resultados***

- La combinación de la temperatura (39°C) y el ácido ferúlico como inductor permitió obtener extractos que mantienen el 85% de la actividad después de incubarse a 60°C durante una hora.
- Se tienen las condiciones de producción de enzimas lacasas termotolerantes por *Trametes sp.* EUM1.

## **CONCLUSIONES**

Por lo anterior, podemos concluir que el ácido ferúlico favoreció la producción de lacasas en el hongo *Trametes sp.* EUM1 y por lo menos una es termotolerante a 60°C, teniendo en cuenta, algunas condiciones como el pH (4.7-5.4), la temperatura (39°C), la edad del micelio ( micelio maduro) y el medio de cultivo (medio Kirk) siendo este último, un medio definido.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Aburto, J. A., Quintero, R. 2001. En: *Prospectiva, Publicaciones. Biotecnología: Capitulo 6. IMP.* pp. 135-147.
- Alic, M. y Gold, M. 1991. En: *Genetics and molecular biology of the lignin-degrading basidiomicetes *Phanerochaete chrysosporum*. More gene manipulations in Fungi.* New York: Academy Press. pp. 319-341.
- Arana, A., Téllez, A., Gonzalez T. y Gonzalez A. 2003. Aspectos generales de la biodegradación de la madera: aplicaciones industriales de las lacasas. *Bio Tecnología. México.* 7. pp. 40-55.
- Berka, R. M., Schneider, P., Golightly, E. J., Brown, S. H., Madden, M., Brown, K. M., Halkier, T., Mondorf, K. and Xu, F. 1997. Characterization of the gene encoding and extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology.* 63. pp. 3151-3157.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72. pp. 248-254.
- Brock, T.D. 1967. Life at high temperatures. *Science.* 158. pp. 1012-1019.
- Brock, T. D. 1985. Life at high temperatures. *Science.* 230. pp. 132-138.
- Buswell, J. A. y Odier, E. 1987. Lignin biodegradation. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 1. pp. 1-60.

## ***Bibliografía***

- Castillo, J. 1987. En: *Micología General*. Primera edición. Editorial Limusa. México D.F. pp. 15-30.
- Coll, P.M., Perez, P., Villar, E. y Shnyrov, V.L. 1994. Domain structure of laccase I from the lignin-degrading basidiomycete PM1 revealed by differential scanning microcalorimetry. *Biochem Mol. Biol. Int.* 34. pp. 1091-1098.
- Coll, P.M., Fernandez-Avalos, J.M., Villanueva, J.M., Santamaria, R. y Perez, P. 1993. Purification and characterization of a phenoloxidase (laccase) From the lignin-degrading basidiomycete PM1 (CECT 2971). *Appl. Environ. Microbiol.* 59. pp. 2607-2613.
- Collins, P., Dobson, A. D. 1997. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63. pp. 3444-3450.
- Cullen, D. y Kersten, P. 1992. Fungal enzymes in lignocellulose degradation. En: *Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi*. London: Chapman and Hall. pp. 100-131.
- Cullen, D. y Kersten, P. J. 1996. Enzymology and molecular biology of lignin degradation. En: *The Mycota III*. Berlin: Springer-Verlang. pp. 297-314.
- Cullen D. 1997. Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. *J. Biotechnol.* 53. pp. 273-289.

## ***Bibliografía***

- Deacon, J.W. 1993. En: Introducción a la Micología Moderna. Editorial Limusa. Primera edición. México, D.F. pp. 13-41.
- Dittmer, J.K., Patel, N.J., Dhawale, S.W. y Dhawale, S.S. 1997. Production of multiple laccase isoforms by *Phanerochaete chrysosporum* grown under nutrient sufficiency. FEMS Microbiology Letters. 149. pp. 65-70.
- Fahraeus, G. y Reinhammar, B. 1967. Large-scale production and purification of laccase from cultures of *Polyporus versicolor* and some properties of laccase A. Acta Chem. Scand. 21. pp. 2367-2378.
- Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F.D. and Eriksson, K.E.L. 1996. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structure and synthetic lignin by laccase. FEBS Lett. 391. pp. 144-148.
- Galhaup, C., Wagner, H., Hinterstoisser, B., Haltrich, D. 2002. Increased production of laccase by the *Trametes pubescens*. Enzyme and Microbial Technology. 30. pp. 529-536.
- Gianfreda, L., Sannino, F., Filazzola, M.T. y Leonowes, A. 1998. Catalytic behavior and detoxifying ability of a laccase from the fungal strain *Cerrena unicolor*. Journal of Molecular Catalysis B. Enzymatic. 4 . pp. 13-23.
- Gigi, O., Marbach, I. y Mayer, A.M. 1980. Induction of laccase formation in *Botrytis*. Phytochemistry. 19(11). pp. 2273-2275.
- González, T. 2001. Aspectos fisiológicos y moleculares de la decoloración enzimática de efluentes de destilería con el basidiomiceto *Trametes sp.* I-62. Tesis Doctoral. Departamento de Microbiología, Universidad de Alcalá, España.



## ***Bibliografía***

- Gorbatova, O.N., Stepanova, E.U., Koroleva, O.V. 2000. Certain Biochemical and physicochemical properties of the inducible form of extracellular laccase from basidiomycetes *Coriolus hirsutus*. *Paia Biokhimiia i Mikrobiologiia*. 36. pp. 272-277.
- Guzman, G., Mata, G., Salmones, D., Soto-Velasco, C. y Guzmán-Dávalos, L. 1993. El cultivo de los hongos comestibles. Primera edición. Editorial IPN-SEP. México.
- Heim, R. 1957. Les Champignons d'Europe. Tome II: Partie descriptive: Basidiomycètes. Éditions N. Boubée y Cie. pp. 66-80.
- Heinzkill, M., Bech, L., Halkier, T., Schneider, P. y Anke, T. 1998. Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi: (family *Coprinaceae*). *Applied and Environmental Microbiology*. 64. pp. 1601-1606.
- Herrera, T. y Ulloa, M. 1998. Reino de los hongos: Micología básica y aplicada. Segunda edición. Fondo de Cultura Económica. México D.F. pp. 19-35.
- Huber, M. y Lerch K. 1987. The influence of copper on the induction of tyrosinase and laccase in *Neurospora crassa*. *FEBS Letters*. 219 (2). pp. 335-338.
- Jeffries, T.W., Choi, S. y Kirk, T.K. 1981. Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 42. pp. 290-296.
- Johannes, C. 2000. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(2). pp. 524-528.
- Kanunfre, C.C., Zancan, G.T. 1998. Physiology of exolaccase production by *Thelephora terrestris*. *FEMS Microbiology Letters*. 161. pp. 151-156.

## ***Bibliografía***

- Kersten, P: 1990. Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: its characterization and activation by lignin peroxidase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87. pp. 2936-2940.
- Kirk, K.T., Schultz, E., Connors, W.J., Lorenz, L.F. y Zeikus, J.G. 1978. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Microbiol. 117. pp. 277-285.
- Kirk, T.K. 1981. Toward Elucidating the mechanism of action of ligninolytic system in basidiomycetes. En: Trends in the Biology of Fermentations. New York: Plenum Press. pp. 131-149.
- Kirk, K.T. y Fenn, P. 1982. Formation and action of the ligninolytic system in basidiomycetes. En: Decomposer Basidiomycetes, British Mycological Society Symposium 4. Cambridge University Press. pp.67-90.
- Kirk, K.T., Croan, S., Tien, M., Murtagh, K.E. y Farrell, R.L. 1986. Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. Enz. Microbiol. Technol. 8. pp. 27-32.
- Koroleva, O.V., Stepanova, E.V., Binucov, V.I., Timofeev, V.P. y Pfeil, W. 2001. Temperature-induced changes in copper centers and protein conformation of two fungal laccases from *Coriolus hirsutus* and *Coriolus zonatus*. Biochimica et Biophysica Acta. 4. pp. 397-407.
- Koroljova-Skorovogatko, O., Stepanova, E.V., Gavrilova, V.P. y Morozova, O.V. 1998. Purification and characterization of the constitutive form of laccase from the basidiomycetes *Coriolus hirsutus* and effect inducer laccase synthesis. Biotechnol. Appl. Biochem. 28. pp. 47- 54.

## ***Bibliografía***

- Kristjansson, S. 1989. Thermophilic organisms as sources of thermostable enzymes. *Tibtech*. 7. pp. 349-353.
- Kuan, I.C., Cai, D. y Tien, M. 1991. The lignin-degrading system of the wood-destroying fungus *Phanerochaete chrysosporium*. En: *Active Oxygen/Oxidative Stress and Plant metabolism*. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologist. pp. 180-192.
- Leonowicz, A. y Trojanowsky, J. 1975. Induction of a new laccase from the fungus *Pleurotus ostreatus* by ferulic acid. *Microbios* 13. pp. 167-174.
- Leonowicz A., Matuszewska A., Luterek J., Ziegenhagen D, Wojtas-Wasilewska M., Cho N-S., Hofrichter M. and Rogalski J. 1999. Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 27. pp. 175-185.
- Leatham, G. y Kirk, T.K. 1983. Regulation of ligninolytic activity by nutrient nitrogen in white-rot basidiomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* 16. pp. 65-67.
- Linden, R.M., Schilling, B.C., Germann, U. y Lerch, K. 1991. Regulation of laccase synthesis in induced *Neurospora crassa* cultures. *Current genetics*. 19. pp. 375-381.
- López, J. 2001. Relación entre la actividad de las enzimas lacasa y la maduración de *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonaris*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa. México, D.F.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. 1998. En: *Biología de los Microorganismos*. Octava Edición. Prentice Hall . España. pp. 162-168.

## ***Bibliografía***

- Marbach, I., Harel, E. y Mayer A.M. 1983. Inducer and culture medium dependent properties of extracellular laccase from *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*. 22 (7). pp. 1535-1538.
- Medina, E. 2003. Caracterización de lacasas producidas por un hongo termofílico silvestre aislado a partir de desechos lignocelulósicos. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa. México, D.F.
- Merril, W. y Cowling, E. B. 1966. Rate of nitrogen in wood deterioration: amounts and distribution of nitrogen in tree stems. *Can. J. Bot.* 44. pp. 1555-1580.
- Muñoz, C., Guillen, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. 1996. Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Current Microbiology*. 34. pp. 1-5.
- Nakatsubo, F., Reid, I.D. y Kirk, K.T. 1982. Incorporation of <sup>18</sup>O<sub>2</sub> and absence of stereospecificity in primary product formation during fungal metabolism of a lignin model compounds. *Biochem. Biophys. Acta*. 719. pp. 284-291.
- Nolan, C. y Margoliash E.. 1968. Comparative aspects of primary structures of protein. *Annu. Rev. Biochem.* 37. pp. 727-750.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B., Sannia, G. 2000. Copper Induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66. pp. 920-924.
- Peri, F.H. y Gold, M.H. 1991. Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white-rot fungus *Dichomitus squalens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57. pp. 2240-2245.

## ***Bibliografía***

- Rodriguez, S., Gudin, M., Lorenzo, M. 2002. Screening of supports and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions. *Process Biochemistry*. 00. pp. 1-7.
- Rosenberg, S.L. 1978. Cellulose and Lignocellulose degradation by thermophilic and thermotolerant fungi. *Mycologia*. 70. pp. 1-13.
- Sariaslani, F. S. 1989. Microbial enzymes for oxidation of organic molecules. *Critical reviews in biotechnology*. 9. pp. 171-257.
- Singer, R. y Harris, B. 1987. Soluble and inmovilized laccase as catalysts for transformation of substituted phenol. *Enzyme Microbiology Technology*. 8. pp. 171-177.
- Soden, D.M., Dobson, A.D. 2001. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-cajn*. *Microbiology (Reading England)*. pp. 1755-1763.
- Temp, U. y Eggert, C. 1999. Novel Interaction between fungal laccase and cellobiose Dehydrogenase during Pigment Synthesis in the white rot fungus *Pleurotus*, *Applied and Enviromental Microbiology*. 65(2). pp. 389-395.
- Thurston, C. F. 1994. The structure and function of fungal laccase. *Microbiology*. 140. pp. 19-26.
- Tinoco, R., Pickard, M.A. y Vazquez-Duhalt, R. 2001. Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Letters in Applied Microbiology*. 32. pp. 331-335.

## ***Bibliografía***

- Young H.D., Kim K.J., Maeng J.S., Han Y.H., Jeong I.B., Jeong G., Kang S.O. and Hah Y.C. 1995. Single electron transfer by an extracellular laccase from the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Microbiology*. 141. pp. 393-398.
- Wiegant W.M.1992. Growth characteristics of the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* in relation to production of mushroom compost. *Applied and Environmental Microbiology*. 1. pp. 1301-1307.
- Wiegel, J. y Ljungdahl, L. G. 1984. The importance of thermophilic bacteria in biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*. 3. pp. 39-108.
- Wolfenden, R.S. y Wilson, D.L. 1982. Radical cation as reference chromogens in the kinetic studies of one electron transfer reaction. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*. pp. 605-812.
- Zamost, B. L.; Nielsen, H. K. y Starnes, R. L. 1991. Thermostable enzymes for industrial applications. *Journal of Industrial Microbiology*. 8. pp. 71-82.