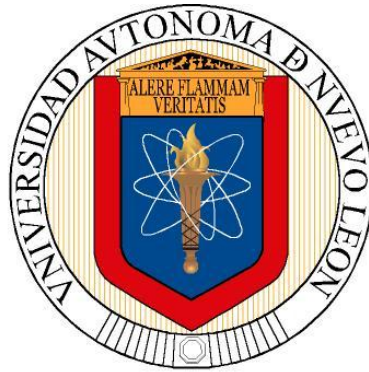


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**Purificación y Caracterización Parcial de las Lacasas de
Trametes maxima CU1 y su Aplicación en la
Degradación de Colorantes Textiles**

Por

M. C. JUANITA GUADALUPE GUTIERREZ SOTO

TESIS

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad
en MICROBIOLOGÍA

Purificación y Caracterización Parcial de las Lacasas de *Trametes maxima* CU1 y su Aplicación en la Degradación de Colorantes Textiles



Comité de Tesis

Dr. Carlos E. Hernández Luna
Director

Dra. Norma Laura Heredia Rojas
Secretario

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero
Vocal

Dr. José Santos García Alvarado
Vocal

Dra. Licet Villarreal Treviño
Vocal

Mayo 2009

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Enzimología del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de mis estudios (becario 191612).

Al Dr. Carlos E. Hernández Luna por su apoyo, su dirección, su tiempo, sus consejos y por su paciencia le agradezco profundamente.

A la Dra. Magda Iracheta por toda su disposición y ayuda.

Al Dr. Sergio Salcedo por su apoyo y amistad incondicional.

A toda mi Familia, en particular a mis papás y a Cony, por su apoyo y comprensión a lo largo de este proyecto.

En especial a Ibis, a mi gordo hermoso por ser la razón más importante para culminar esta etapa y por el sacrificio que significó.

TABLA DE CONTENIDOS

| Sección | Página |
|--|--------|
| AGRADECIMIENTOS..... | i |
| ÍNDICE..... | ii |
| LISTA DE TABLAS..... | v |
| LISTA DE FIGURAS | vi |
| LISTA DE ANEXOS..... | viii |
| NOMENCLATURA..... | ix |
| RESUMEN..... | xi |
| ABSTRACT..... | xii |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN..... | 3 |
| 3. HIPÓTESIS..... | 4 |
| 4. OBJETIVO..... | 5 |
| 4.1 Objetivo General..... | 5 |
| 4.2 Objetivos Específicos..... | 5 |
| 5. ANTECEDENTES | |
| CAPITULO I. Lacasa..... | 6 |
| 5.1. Generalidades..... | 6 |
| 5.2. Estudios de purificación..... | 8 |
| 5.3. Estructura..... | 10 |
| 5.4. Estructura de la lacasa de <i>Cerreña maxima</i> | 14 |
| 5.5. Caracterización molecular..... | 15 |
| 5.6. Lacasas constitutivas e inducidas..... | 16 |
| 5.7. Efecto de la composición del medio de cultivo sobre la producción de lacasa..... | 17 |
| 5.8. Inductores..... | 17 |
| 5.9. Propiedades catalíticas y operativas..... | 19 |
| 5.9.1. Mecanismo de reacción..... | 19 |
| 5.9.2. Rango de sustratos..... | 20 |
| 5.9.3. Constantes catalíticas..... | 20 |

| | |
|---|----|
| 5.9.4. Efecto del pH y temperatura..... | 21 |
| 5.10. Importancia Biológica..... | 21 |
| 5.10.1. Como enzima ligninolítica..... | 22 |
| 5.10.2. Su función en la morfogénesis de hongos..... | 23 |
| 5.10.3. Como factor de virulencia..... | 23 |
| 5.11. Importancia Industrial..... | 24 |
| 5.12. Estudios de prospección..... | 25 |
| | |
| CAPITULO II. Problemática asociada a los colorantes textiles..... | 26 |
| | |
| 5.13. Monterrey: Sector productor y consumidor de colorantes industriales..... | 28 |
| | |
| 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL..... | 29 |
| | |
| 7. METODOLOGÍA. | |
| 7.1. Material y Métodos..... | 30 |
| 7.2. Material biológico..... | 31 |
| 7.3. Medios de cultivo..... | 32 |
| 7.4. Protocolos de trabajo..... | 32 |
| | |
| 8. RESULTADOS | |
| 8.1. Selección del las Condiciones de Cultivo..... | 40 |
| 8.1.1 Selección del medio de crecimiento..... | 40 |
| 8.1.2. Efecto de algunos inductores..... | 41 |
| 8.1.3. Obtención del extracto crudo..... | 43 |
| 8.2. Purificación..... | 43 |
| 8.2.1. Estudios previos de purificación..... | 43 |
| 8.2.2. Protocolo final de purificación..... | 47 |
| 8.3. Análisis de componentes..... | 48 |
| 8.4. Análisis de secuencias..... | 51 |
| 8.4.1. Secuencias de Lac60 y Lac70..... | 51 |
| 8.4.2. Comparación de secuencias con <i>Cerrena maxima</i> | 52 |
| 8.4.3. Análisis de la secuencia animo terminal..... | 53 |
| 8.5. Estimación del peso molecular..... | 54 |
| 8.6. Espectro de Absorción..... | 56 |
| 8.7. Determinación del punto isoeléctrico..... | 58 |
| 8.8. Caracterización de los parámetros operativos..... | 58 |
| 8.8.1. Efecto del pH..... | 58 |
| 8.8.2. Efecto de la temperatura..... | 60 |
| 8.9. Caracterización de las propiedades catalíticas..... | 61 |
| 8.9.1 Constantes catalíticas..... | 61 |
| 8.9.2. Inhibidores..... | 62 |
| 8.10. Decoloración <i>in vitro</i> | 64 |
| 8.10.1 Colorantes textiles..... | 64 |

| | |
|---|----|
| 8.10.2 Mezcla de colorantes textiles..... | 65 |
| 9. DISCUSIÓN | |
| 9.1. Producción..... | 67 |
| 9.2. Purificación..... | 67 |
| 9.3. Análisis de secuencia | 69 |
| 9.4. Caracterización Bioquímica..... | 69 |
| 9.5. Actividad sobre colorantes textiles..... | 70 |
| 10. CONCLUSIÓN..... | 72 |
| 11. FUTURAS INVESTIGACIONES..... | 67 |
| ANEXOS..... | 74 |
| LITERATURA CITADA..... | 78 |
| RESUMEN BIBLIOGRÁFICO..... | 92 |
| ARTICULO 1 | |
| ARTICULO 2 | |

LISTA DE TABLAS

| | | Página |
|------------|--|--------|
| Tabla I | Métodos convencionales en la purificación de Lacasas. | 9 |
| Tabla II | Composición de aminoácidos de la Lacasa de <i>Trametes (Coriolus) hirsuta</i> . | 11 |
| Tabla III | Compuestos probados en la producción de lacasa como inductores. | 31 |
| Tabla IV | Colorantes textiles. | 26 |
| Tabla V | Purificación de la Lacasa de <i>T. maxima</i> CU1 | 48 |
| Tabla VI | Comparación entre los extremos amino terminal entre lacasa de diferentes especies de <i>Trametes</i> . | 54 |
| Tabla VII | Peso molecular de la Lacasa de <i>T. maxima</i> CU1 | 55 |
| Tabla VIII | Constantes cinéticas | 62 |
| Tabla IX | Efecto de inhibidores | 63 |
| Tabla X | Decoloración de colorantes industriales | 65 |

LISTA DE FIGURAS

| | | Página |
|----|--|--------|
| 1 | Esquema de los centros de cobre. | 12 |
| 2 | Comparación de secuencias de aminoácidos de algunas lacasas | 13 |
| 3 | Estructura terciaria de la lacasa de <i>C. maxima</i> | 14 |
| 4 | Ciclo catalítico de la Lacasa. | 19 |
| 5 | Producción de lacasa en medio Bran Flakes® y Dhouib modificado. | 41 |
| 6 | Efecto de algunos inductores sobre la producción de lacasas | 42 |
| 7 | Condiciones óptimas de cultivo | 43 |
| 8 | Perfiles cromatográficos característicos de la purificación de <i>T. maxima</i> CU1 | 46 |
| 9 | Separación típica en SDDS-PAGE | 47 |
| 10 | Análisis de componentes | 49 |
| 11 | Electroforesis en geles SDS-PAGE y nativos. | 49 |
| 12 | Purificación por SDS-PAGE. | 50 |
| 13 | Análisis por Western Blot. | 51 |
| 14 | Péptidos de las glicoformas de Lacasa | 52 |
| 15 | Comparación de secuencias entre cepas de <i>T. maxima</i> | 53 |
| 16 | Estimación de la talla molecular de la lacasa de <i>T. maxima</i> CU1 en Sephacryl S-200 | 56 |
| 17 | Espectro de absorción. | 57 |
| 18 | Cromatoenfoque. | 58 |
| 19 | Determinación del pH óptimo. | 59 |

| | | |
|----|---|----|
| 20 | Estabilidad a pH. | 60 |
| 21 | Efecto de la temperatura. | 61 |
| 22 | Decoloración enzimática de la mezcla de colorantes textiles | 66 |
| 23 | Espectros de decoloración de la mezcla de colorantes textiles | 66 |

LISTA DE ANEXOS

| | | Página |
|-----|---|--------|
| I | Datos de secuenciación de las glicoformas de <i>T. maxima</i> CU1 | 74 |
| II | Análisis cinético de la lacasa de <i>T. maxima</i> CU1 | 75 |
| III | Decoloración en medio sólido | 76 |
| IV | Decoloración en medio líquido | 77 |

NOMENCLATURA

| | |
|---------------|---|
| 2,4-DCP | 2,4-Diclorofenol |
| 2,6-DMOP | 2,6-Dimetoxifenol |
| 4-AAP | 4-Amino antipirina |
| TMB | 3,3',5,5' tetrametilbenzidina |
| MBTH | 3-metil-2-benzotiazolina hidrazona |
| Abs. | Absorbancia |
| ABTS | Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-sulfónico) |
| DMAB | Ácido 3-dimetilaminobenzóico |
| YMGA | Agar extracto de malta, glucosa y levadura. |
| aa | Aminoácidos |
| cm | Centímetro |
| ϵ | Coefficiente de extinción molar |
| DMSO | Dimetilsulfoxido |
| °C | Grado Celsius |
| g | Gramos |
| h | Horas |
| kDa | Kilodalton |
| Lac | Lacasa |
| λ | Longitud de onda |
| MnP | Manganeso peroxidasa |
| BF | Medio Bran Flakes® |
| DM | Medio Dhouib modificado |
| μg | Microgramos |

| | |
|------|------------------------------------|
| μl | Microlitros |
| ml | Mililitros |
| min | Minutos |
| pb | Pares de bases |
| ppm | Partes por millón |
| % | Porcentaje |
| pH | Potencial de Hidrógeno |
| pI | Punto isoeléctrico |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| Syr | Siringaldazina |
| s | Segundos |
| UV | Ultravioleta |
| U/ml | Unidades enzimáticas por mililitro |
| UI | Unidades Internacionales |
| V | Volts |

RESUMEN

Trametes (Cerrena) maxima CU1 es un basidiomiceto nativo con alta capacidad de degradar colorantes sintéticos modelo en cultivos sólidos y sumergidos; asociada a la producción de lacasas extracelulares. En el presente trabajo se llevó a cabo la purificación y caracterización de las lacasas producidas por una cepa nativa de *T. maxima*. Así como la evaluación de su capacidad para decolorar colorantes textiles. Para ello, las enzimas se purificaron a partir de cultivos inducidos de *T. maxima*, utilizando columnas DEAE-Sepharose y Sephadex G-200. El análisis de componentes se realizó por SDS-PAGE y Western blot. La secuenciación parcial se llevó a cabo por LC-MS/MS. La caracterización bioquímica (K_m , V_{max} y K_{cat} , especificidad de sustratos e inhibidores, talla molecular, grado de glicosilación y pI) y operativa (actividad y estabilidad a pH, temperatura) de la Lacasa se realizó por métodos convencionales (espectrofotometría, cromatografía y electroforesis). La capacidad de degradar colorantes textiles se evaluó por espectrofotometría. Finalmente, se obtuvo una preparación con dos bandas de actividad lacasa, de 71 y 62 kDa que solo son separadas por electroforesis. El tratamiento con endoglicosidasa F produjo una sola banda de 61kDa sugiriendo que se trata de dos glicofórmos. Éstas dan reacción positiva con anticuerpos Anti-Lac62, en Western Blot y el análisis por LC-MS/MS reveló los mismos péptidos en ambas fracciones de lacasa. Las proteínas muestran niveles altos de homología en el extremo amino con lacasas de *T. versicolor* (100%), *T. trogii* y *Cerrena maxima* (91%), mientras que algunas secuencias internas corresponden a la lacasa de *T. hirsuta*, acorde con la cercanía filogenética de los grupos. En general, las enzimas tienen propiedades bioquímicas y operativas similares a las reportadas para otras lacasas de basidiomicetos. La capacidad de degradación de los colorantes, es variable y limitada por la solubilidad. Sin embargo la mezcla (450 ppm) de nueve colorantes textiles de amplia aplicación es eficientemente degradada (67%) con 10 unidades de lacasa.

ABSTRACT

T maxima is a native basidiomycete with a great ability to degrade model synthetic dyes in plate and submerged cultures associated to the production of extracellular laccases. In this work we report the partial purification and characterization of the laccases produced by a northeast Mexico native strain of *T. maxima* and the results of the evaluation of its capability to degrade textile dyes. The enzymes were purified from cultures of *T. maxima* grown in the presence of inductors using DEAE- Sepharose and Sephadex G-200 columns. The component analysis was accomplished by SDS-PAGE and Western blot and the partial sequence by LC-MS/MS. The biochemical (K_m , V_{max} and K_{cat} , substrate specificity, behavior with inhibitors, molecular mass, degree of glycosilation and pI) and operative (pH and temperature optima and stability) characterization of laccase were obtained by conventional methods (spectrophotometry, chromatography and electrophoresis) and the ability to degrade textile dyes was evaluated by spectrophotometry. At the end we obtained a concentrate which showed two bands of laccase activity with masses of 71 and 62 kDa in SDS-PAGE and a single band of 62 kDa after a treatment with F-endoglycosidase. This indicates they are two different glycoforms. These glycoforms gave a positive reaction with Anti-Lac62 antibodies in Western blot and their analysis by LC-MS/MS revealed the same peptide sequence. The amino terminal end of the proteins is very similar to that of *T. versicolor* (100%), *T. trogii* and *Cerrena maxima* (both 91%) while some internal sequences are homologous to *T. hirsuta* laccase according to the filogenetic closeness of groups. In general, the enzymes have biochemical and operative properties similar to those reported for other basidiomycete laccases. The capacity to degrade textile dyes varied individually and was limited by their solubility, however a mixture of nine of the most commonly used in this industry, at a concentration of 450 ppm, was efficiently degraded (67%) in 24 h with 10 UI of laccase.

1. INTRODUCCIÓN.

Los hongos causantes de la pudrición blanca son los únicos organismos reconocidos como degradadores de lignina, gracias a su sistema extracelular de Lacasa, Lignina y Manganese Peroxidasas. Inicialmente, se asociaba esta capacidad a las actividades de las peroxidasas debido a su potencial Redox más alto que les permite actuar sobre los enlaces no fenólicos de la lignina; dejando la participación de la lacasa en un plano secundario. Sin embargo en años recientes, se ha observado que la lacasa es la más ubicua y que algunos hongos producen lacasas de alto potencial Redox, además se ha descrito un sistema de medidores de bajo peso molecular que amplía el rango de compuestos susceptibles a la degradación de lacasa. Gracias a esto, ha aumentado la prospección en busca de nuevas lacasas con diferentes propiedades a las ya reportadas, que se puedan aplicar a diferentes procesos de importancia económica y remediación. En general, las lacasas se describen como glicoproteínas muy activas en el rango ácido de pH y termotolerantes. En el presente trabajo, se purificaron y caracterizaron parcialmente las glicofomas de lacasas de una cepa nativa de *Trametes (Cerrena) maxima* CU1. La purificación se llevó a cabo por cromatografía de intercambio iónico y exclusión molecular. El análisis de componentes se realizó mediante SDS-PAGE, donde se revelaron dos bandas de actividad lacasa denominadas Lac 71 y Lac 62 por su peso molecular relativo, que al ser tratada con endoglicosidasa F migran como una sola banda de 60.7 KDa sugiriendo que se tratan de glicofomas. En Western Blot con Anti-Lac 62 ambas bandas dieron reacción positiva, mientras que el análisis por LC-MS/MS confirmó que las dos fracciones corresponden a la misma cadena peptídica, reiterando la presencia de glicofomas. La secuencia del extremo amino terminal fue 100% homóloga a la de *T. versicolor* y 91% a la de *T. trogii* y *Cerrena maxima*, en tanto que las secuencias de los péptidos internos son 100% homólogas a la de *C. maxima*. Como parte de su caracterización bioquímica, se estimó su talla molecular por medio de Biogel P-100 (51.7 kDa) y Sephacryl S-200 (63.2 kDa), así como su pI (4.38) ya que migran como una sola fracción cromatográfica. El grado de glicosilación para Lac 70K es 14.6% y 1.7% para Lac 60K. Su espectro de absorción es el típico de las lacasas azules, con un pico de absorción alrededor de 610 y un hombro a 330 nm, correspondientes a

los centros de cobre tipo I y III, respectivamente. Tiene un valor de K_m de 20 y 74 μM para siringaldazina y DMP, mientras que el K_{cat} para cada uno es de 55 y 31 s^{-1} , respectivamente. Como se ha reportado para otras lacasas, es totalmente inhibida por la azida de sodio (0.1 mM) y el fluoruro de sodio (5m M). Con respecto a la caracterización de sus propiedades operativas, se determinó el pH sobre algunos sustratos típicos como son el ABTS (3.5), DMP (3.5) y la siringaldazina (4.5), así como un par reportado específico de peroxidasas, MBTH+DMAH (4.5). Conservó el 100% de su actividad a pH 6.0 por 24 h. La temperatura óptima es 50°C, a la cual es estable por 5 horas, conservando el 82% de su actividad. Por otro lado, la capacidad de degradación de los colorantes, fue variable y limitada por la solubilidad. Sin embargo la mezcla (450 ppm) de nueve colorantes textiles de alta demanda es eficientemente degradada (67%) con 10 unidades de lacasa en 24 h.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

Los colorantes sintéticos son compuestos muy demandados a nivel industrial, consecuentemente son generados grandes volúmenes de efluentes impactados con color, los cuales además de afectar los cuerpos de aguas, resultan tóxicos para los organismos presentes en éstos. Sin embargo nuestro país aún no cuenta con normas que regulen la presencia de color.

Trametes (Cerrena) maxima CU1 es un basidiomiceto capaz de degradar colorantes sintéticos modelo en medios sólidos y sumergidos. Esta capacidad se asoció con la producción de lacasas al medio de cultivo. La purificación y caracterización de estas sentarán las bases para su aplicación en la degradación de colorantes textiles.

3. HIPÓTESIS.

La purificación y caracterización bioquímica y funcional de las lacasas de *Trametes maxima* CU1 cimentarán las bases para su aplicación en la degradación de colorantes textiles.

4. OBJETIVO

4.1 Objetivo General

Llevar a cabo la purificación de las lacasas producidas por *T. maxima*, así como la caracterización bioquímica y funcional que sustenten su aplicación

4.2 Objetivos Específicos

1. Analizar el efecto de algunos inductores sobre la producción de lacasas de *T. maxima*.
2. Purificar y caracterizar bioquímicamente las lacasas.
3. Identificar y catalogar las enzimas por análisis comparativo de las secuencias amino terminal.
4. Evaluar la capacidad de degradación de las enzimas sobre colorantes textiles *in vitro*.

5. ANTECEDENTES

A través de la historia, el hombre ha aprovechado los recursos naturales para el desarrollo de diversos procesos industriales que satisfagan alguna necesidad. De igual forma han utilizados los microorganismos en la industria alimentaria como en la química. Un ejemplo de ello es la producción de antibióticos por hongos y bacterias.

La industria textil no es la excepción, ya que para el tratamiento de los efluentes que genera, los métodos fisicoquímicos que utiliza son complementados con procesos biológicos. En el caso de la degradación de los colorantes sintéticos, como una alternativa eficiente y barata ha sido explorado el uso de los hongos de la pudrición blanca de la madera.

El uso de los basidiomicetos de la pudrición en la degradación de colorantes sintéticos es atribuido a su sistema extracelular de enzimas oxidativas. Una de ellas es la lacasa, la cual se encuentra ampliamente distribuida en estos hongos y en algunos casos se reporta como la única enzima ligninolítica (Eggert *et al.*, 1996).

La lacasa es una de las enzimas más estudiadas y mejor conocidas en cuanto a sus características operativas y catalíticas, aún cuando su participación en la degradación de la lignina no es del todo clara. En las siguientes secciones se expondrá a detalle la información concerniente a su estructura, sus genes, inducción, mecanismo de reacción, importancia biológica y su aplicación en la degradación de colorantes sintéticos.

Capítulo I. Lacasa

5.1. Generalidades

La lacasa (benzenediol:oxígeno oxidoreductasa E.C. 1.10.3.2) es un miembro de la pequeña familia de las multicupro oxidasas. Fue descubierta en 1883 (Yoshida H) en el árbol japonés de la laca, *Rhus vernicifera*, lo que la hace una de las enzimas más viejas

descritas. A la fecha es una de las enzimas mejor caracterizadas operativa y físicoquímica. En la naturaleza, se encuentra ampliamente distribuida, ya que se ha detectado en plantas superiores (Dean & Ericksson, 1994; Gregory & Bendall, 1966, Hutterman *et al.*, 2001), en hongos de la pudrición blanca de la madera (Schmidt, 2006), en algunos ascomicetos (Froehrev *et al.*, 1974) y en algunas bacterias como *Azospirillum lipoferum* (Givaudan *et al.*, 1993) o *Streptomyces* spp.

Forma parte del sistema extracelular de los basidiomicetos causantes de la pudrición blanca, implicado en la degradación de la madera. Aún cuando no esta claro su actividad en la ligninólisis, se ha aprovechado su inespecificidad de sustrato en la oxidación y degradación de compuestos xenobióticos. Dentro de estos se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos, herbicidas (atrazina), pesticidas (DDT), y colorantes sintéticos, entre otros. Encontrando además múltiples aplicaciones biotecnológicas y que incluyen, estabilización del vino, conversión enzimática de intermediarios químicos y en el desarrollo de análisis para la cuantificación de fenoles (Duran & Esposito, 2000; Minussi *et al.*, 2002; Gomes & Rebelo, 2003), entre otros.

Los hongos más estudiados en este sentido son *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus*, sin embargo a nivel mundial se ha retomado el interés por encontrar nuevas lacasas que tengan cualidades catalíticas y operativas que les permitan ser utilizadas en diversos procesos biotecnológicos.

A la fecha está bien establecido que las típicas lacasas fúngicas son glicoproteínas, con tres centros de cobre, con tallas moleculares que van de 45 a 110 KDa dependiendo del hongo y del grado de glicosidación. Llevan a cabo la reducción de dos moléculas de oxígeno a una de agua, tienen pH óptimos ácidos y son termotolerantes.

En general, han sido objeto de estudios de purificación, caracterización, prospección y aplicación como se detalla en las siguientes secciones.

5.2. Estudios de purificación

La purificación de una proteína es fundamental para su caracterización, por tal razón se han desarrollado diversos métodos de separación en base a las propiedades de peso molecular, carga, punto isoeléctrico, entre otras.

Para la caracterización bioquímica y molecular de la lacasa, se ha recurrido a métodos y protocolos para la purificación de la enzima como se ha reportado en diversos trabajos. En la gran mayoría de estos, los métodos más utilizados han sido el intercambio iónico y la exclusión molecular (Tabla I). En algunos de estos trabajos se ha reportado la presencia de un pigmento que interfiere con la cuantificación de las unidades presentes en los extractos crudos y su dificultad para ser removido.

Por otro lado, aún cuando se han reportado comportamientos atípicos en las separaciones de glicoproteínas (Sviridov *et al.*, 2006), en ninguno de los trabajos referidos se hace una mención acerca de esto. Lo que sugiere que las consideraciones más importantes para la purificación de las lacasa es la remoción del color. Para el intercambio iónico, el intercambiador más utilizado es DEAE, no hay una solución amortiguadora o un gradiente específico para la separación de la lacasa. De igual manera, para la filtración en gel, se utilizan diversos materiales y el tamaño de exclusión incluye 75, 100 y 200 kDa.

De forma general, en la mayor parte de las lacasas que han sido purificadas, sólo recurren a dos pasos cromatográficos, alternados con métodos de ultrafiltración para su concentración. Comúnmente, la actividad es seguida con cursos temporales utilizando como sustratos ABTS y DMP. Una vez pura la Lacasa se prosigue a su caracterización.

Tabla I. Métodos convencionales en la purificación de lacasas.

| Hongo | Métodos de Purificación | | | Referencia |
|---|------------------------------------|-------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| | Intercambio Iónico | Filtración en Gel | Otro | |
| <i>Rigidoporus lignosus</i> | DE-52 | Sephadex G-75 | HA Cellulose | Geiger <i>et al.</i> , 1986 |
| <i>Phellinus noxius</i> | DE-52 | Sephadex G-75 | HA Cellulose | Geiger <i>et al.</i> , 1986 |
| <i>Pycnoporus coccineus</i> | DEAE-Cellulose | | HA | Oda <i>et al.</i> , 1991 |
| PM1 (CECT 2971) | Mono Q | | Phenyl Superose | Coll <i>et al.</i> , 1993 |
| <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> | Acel A. E Mono Q | | Phenyl Superose IEF preparativo | Fukushima <i>et al.</i> , 1995 |
| <i>Phanerochaete flavido-alba</i> | Q M A Mono Q A. E. | Superdex 75 HR | | Pérez <i>et al.</i> , 1996 |
| <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> | DEAD-M | Sephacryl S-100 | Butyl-Toyopearl | Eggert <i>et al.</i> , 1996 |
| <i>Trametes villosa</i> | Q-sepharose | Superdex 75 HR | | Yaver <i>et al.</i> , 1996 |
| <i>Pleurotus ostreatus</i> (lacasa blanca) | DEAE-Sepharose Mono S Mono Q | | | Palmieri <i>et al.</i> , 1997 |
| <i>Dichomitus squalens</i> | DEAE-Sepharose Mono Q | | | Péridé <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Panaeolus sphinctrinus</i> | Q-Sepharose Bio scaleQ2 | | | Heinzkill <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Panaeolus papilionaceus</i> | Q-Sepharose DEAE-Sepharose | | | Heinzkill <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Coprinus friesii</i> | Q-Sepharose DEAE-Sepharose | | | Heinzkill <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Chaetomium thermophilum</i> | DEAE-Sephacel | | Concanavalina A | Chefetz <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Coriolus zonatus</i> | DEAE-Toyopearl | Sephadex G25 | | Koroljova <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>Marasmius puercophilus</i> | Q-Sepharose | Sephacryl S-200 | Chelatin Sephacel | Dedeyan <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>P. cinnabarius</i> ss3 | Mono Q | | | Otterbein <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Ganoderma lucidum</i> | ✓ | | PAGE preparativa | Ku <i>et al.</i> , 20001 |
| <i>Phellinus ribis</i> | Resource Q | | Phenyl Sepharose | Min <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>Marasmius quercophilus</i> | Mono Q | | | Farnet <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Cerrena unicolor</i> | DEAE-Sephacel CM- Sepharose | Sephacryl S-100 | | Kim <i>et al.</i> , 2002 |
| Basidiomicete C30 | DEAE-Sepharose | Sephacry HR 100 | | Klonowska <i>et al.</i> , 2002 |

| | | | | |
|---|--|------------------------|---------------------|--------------------------------------|
| <i>Trametes sp.</i> AH28-2 | DEAE-Sepharose Mono Q | Superdex 200 | | Xiao <i>et al.</i> , 003 |
| <i>Volvariella volvacea</i> | DEAE-Sepharose | Sephacryl S-100 | | Chen <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Daedalea quercina</i> | DEAE-Sepharose Mono Q | Superdex 75 HR | | Baldrian 2005 |
| <i>Basidiomiceto</i> no identificado | Super Q | | | Jordan <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Trametes versicolor</i> | DEAE-Sepharose | Superdex G-200 | Phenyl Sepharose | Han <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>Trametes trogii</i> | Hitrap Q Mono Q | Superdex 75 | | Zouari-Mechichi <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Cerrena unicolor</i> 137 | Mono Q | | | Michniewicz <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Pleurotus ostreatus</i> (cuerpo fructífero) | DEAE-Cellulose Q-Sepharose CM- Cellulose | Superdex 75 | | Wang <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Perennipora tephropora</i> | ✓ | ✓ | | Younes <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Cerrena maxima</i> | DEAE-Cellulose DEAE-toyopearl | Superdex 200 (HPLC) | | Lyashen <i>et al.</i> , 2006 |

✓ No especifican la matriz de la cromatografía

5.3. Estructura

La gran mayoría de las lacasas fúngicas son glicoproteínas monoméricas, cuyas tallas moleculares oscilan entre 45 y 100 kDa, la cual entre el 10 y 45% corresponden a la porción de carbohidratos. El contenido de residuos de aminoácidos es alrededor de 500 y dependiendo del hongo, se pueden presentar isoformas (Yaropolov *et al.*, 1994). Generalmente, los aminoácidos se distribuyen en tres dominios barriles β . La estructura es estabilizada por dos puentes disulfuros, el primero se forma entre la Cys 85 y Cys 487 (o 488 dependiendo del organismo) asegurando el dominio 1 y 3. El segundo puente es formado por la Cys 117 y Cys 205 y estabiliza el dominio 1 y 2 (Piontek *et al.*, 2002, Hakulinen *et al.*, 2002; Ferraroni *et al.*, 2005, Ferraroni *et al.*, 2007).

Con respecto a la composición de aminoácidos, en la tabla II se presenta el contenido de aminoácidos de *Coriolus hirsuta*, el cual es uno de los degradadores más eficientes de madera. Su secuencia amino terminal mostró reemplazos conservados reportados también para otras lacasas (Koroljova-Skorobogat'ko *et al.*, 1998).

Tabla II. Composición de aminoácidos de la lacasa de *Coriolus hirsuta*

| Aminoácido | Número de residuos por molécula | Aminoácido | Número de residuos por molécula |
|------------|---------------------------------|------------|---------------------------------|
| Asx | 46 | Ile | 22 |
| Thr | 30 | Leu | 26 |
| Ser | 31 | Tyr | 15 |
| Glx | 31 | Phe | 28 |
| Gly | 23 | Lys | 11 |
| Ala | 35 | His | 18 |
| Cys | 14 | Arg | 17 |
| Val | 28 | Pro | 7 |
| Met | 5 | | |

Como se mencionó previamente, las típicas lacasas azules tienen cuatro átomos de cobre distribuidos en tres centros con características espectroméricas específicas. Además, forman parte del sitio catalítico y son responsables de llevar a cabo la transferencia de electrones.

El centro de cobre tipo I se caracteriza por una fuerte absorción en la zona de 600 nm y es el responsable del típico color azul de la lacasa. Se une a la región peptídica a través de una cisteína y dos histidinas. Esta involucrado en la captura y transferencia de electrones (Reinhammar & Malmstron, 1981).

El centro de cobre tipo II solo exhibe su pico de absorción en la región visible, por lo que es invisible para el análisis por resonancia paramagneta de electrón. Es fácilmente

removido en condiciones anaerobias y en presencia de un agente reductor. Además de estar implicado en la captura y transferencia de electrones, interviene en la unión del oxígeno al sitio activo.

El cobre tipo III es un centro binario que absorbe alrededor de 330 nm. Al igual que el centro tipo II, participa en la unión del oxígeno. Este centro junto al centro tipo II forman un grupo trinuclear (T2/T3) incrustado entre los dominios 1 y 3, los cuales proveen sus aminoácidos para su estabilización (Thurston, 1994; Piontek *et al.*, 2002.). En la figura 1 se muestra el arreglo de los centros de cobre.

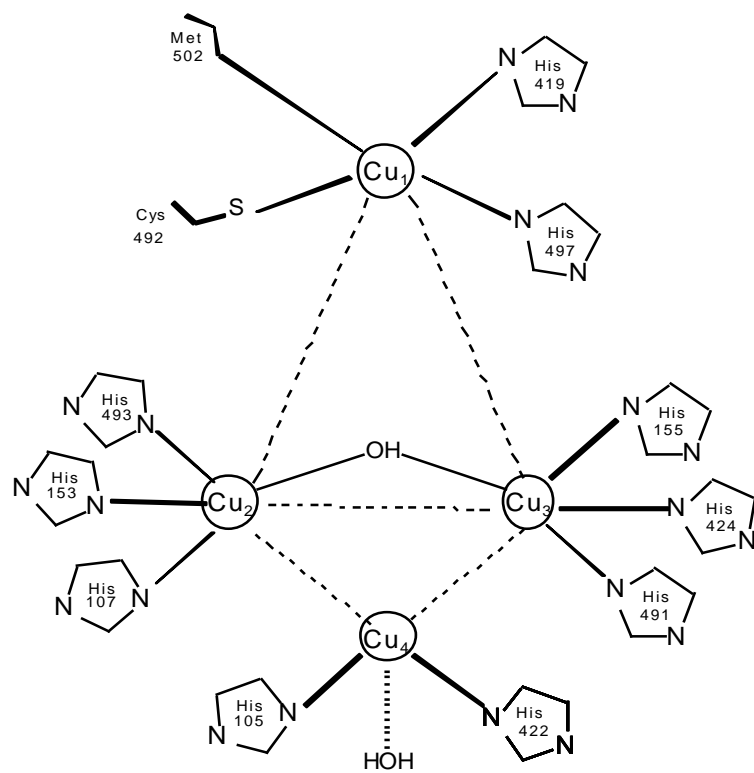


Figura 1. Esquema de los Centros de Cobre. La figura muestra los sitios de cobre de la lacasa CotA de *Bacillus subtilis*. Adaptada de Enguita *et al.*, 2003.

Por otro lado, gracias a los estudios de cristalografía de la lacasa, se conocen los sitios de glicosilaciones, los cuales varían tanto en posiciones como en el contenido de carbohidratos, dependiendo del organismo productor. Para *T. versicolor* se reportan cinco sitios distintos de N-glicosilaciones (Piontek *et al.*, 2002), para *Lentinus tigrinus*, se reportan tres sitios (Ferraroni *et al.*, 2007), por mencionar algunos ejemplos.

Dentro de los azúcares que pueden estar presentes, se encuentra la glucosa, manosa, galactosa, mucosa, arabinosa, xilosa y hexosaminas, los cuales se unen a la cadena peptídica mediante N-enlaces. Son responsables de la microheterogeneidad en la lacasa, la cual es responsable de variaciones en las glicosilaciones de la enzima, produciendo glicofomas. Se ha propuesto que su rol estructural es conferirle a la lacasa protección a la degradación proteolítica (Yaropolov *et al.*, 1994, Marbach & Mayer 1984).

En la figura 2 se presenta el alineamiento de la secuencia peptídica de algunas lacasas, los sitios de unión de los átomos de cobre y los sitios de glicosilación.

| | | |
|-----------------------------|-----|---|
| <i>L. edodes</i> Lac1A | 1 | MLPFVSLLAEL-VCLVYG-AEVI-RDTTTYGQIVSE-NLFIVNKQLAPDGFQORSTVLAGL---T-PS--TGSFPGPLIS |
| <i>L. edodes</i> Lac1B | 1 | MLPFVSLLAEL-VCLVYG-AEVI-RDTTTYGQIVSE-NLFIVNKQLAPDGFQORSTVLAGL---T-PS--TGSFPGPLIS |
| <i>T. versicolor</i> Lac2 | 1 | MGKFHSFV--NV-VAL-SLSL-SG-RVFGAIG-PV-T-DLTTISNADVTPDGTTRAAVLG-----GVFPGLIT |
| CECT Lac1 | 1 | MSRFHSL--TFIVA--SL-A-S-S-ALASIG-PV-A-DMTISNAEVS PDGFARQAVVNV-----GVTFPGLVK |
| <i>P. ostreatus</i> Lac2 | 1 | MFPGARIL-ATLTLAL-HL-L-HG---AHAAG-P--AGNMYIVNEDVSPDGFARS AVVARSVPATDPTPATASIPGVLVQ |
| <i>P. cinnabarinus</i> Lcc3 | 1 | MSRFQSL--SF-V-LVSL-AAV---ANAAG-PV-A-DLTLTNAAVSPDGF SREAVVNV-----GITPAPLIA |
| | | M F LL V L L IG PV I N V PDGF R AV G PGPL |
| <i>L. edodes</i> Lac1A | 71 | GNKGVRFNLNVTDQLTDPMSVRSTTV-HWHGLFQKTTNYADGVAFVSQCPAIAANHSFLYDFQVPDQAGTFWYHSHISVQY |
| <i>L. edodes</i> Lac1B | 71 | GNKGVRFNLNVTDQLTDPMSVRSTTV-HWHGLFQKTTNYADGVAFVSQCPAIAANHSFLYDFQVPDQAGTFWYHSHISVQY |
| <i>T. versicolor</i> Lac2 | 61 | GNKGDEFQINVIDNLTNETMLKSTT-IHWHGLFQAGTNWADGAAFVNQCP IATGNSFLYDFVTPDQAGTFWYHSHLSTQY |
| CECT Lac1 | 59 | GNMGDRFQNLVIDNLTNHTMLKST-SIHWHGLFQHG TNWADGPAFVNQCPV SAGHSFLYDFQVPDQAGTFWYHSHLSTQY |
| <i>P. ostreatus</i> Lac2 | 72 | GNKGDNFQNLNVNQLSDTTLMLK-TTSHHWHGFFQAGSSWADGPAFVTCQPVASGDSFLYNFNVPDQAGTFWYHSHLSTQY |
| <i>P. cinnabarinus</i> Lcc3 | 59 | QQRGDRFQNLVIDNLTNHTMLK-TTSHHWHGFFQHG TNWADGVSFVNQCP IASGHSFLYDFQVPDQAGTFWYHSHLSTQY |
| | | Q Q K G D F Q L N V D Q L T T M L K T T I H W H G F Q G T N W A D G F V N Q C P A G S F L Y D F V P D Q A G T F W Y H S H L S T Q Y |
| <i>L. edodes</i> Lac1A | 150 | CDGLRGLVVIYDPDQAYLYDVEDETTVLTADWTELI AA AVAP---ADATLINGKGR-Y--LGGPAVLAVINVQQ |
| <i>L. edodes</i> Lac1B | 150 | CDGLRGLVVIYDPDQAYLYDVEDETTVLTADWTELI AA AVAP---ADATLINGKGR-Y--LGGPAVLAVINVQQ |
| <i>T. versicolor</i> Lac2 | 140 | CDGLRGLVVIYDPDQAYLYDVEDETTVLTADWTELI AA AVAP---ADATLINGKGR-Y--LGGPAVLAVINVQQ |
| CECT Lac1 | 138 | CDGLRGLVVIYDPDQAYLYDVEDETTVLTADWTELI AA AVAP---ADATLINGKGR-Y--LGGPAVLAVINVQQ |
| <i>P. ostreatus</i> Lac2 | 151 | CDGLRGLVVIYDPDQAYLYDVEDETTVLTADWTELI AA AVAP---ADATLINGKGR-Y--LGGPAVLAVINVQQ |
| <i>P. cinnabarinus</i> Lcc3 | 138 | CDGLRGLVVIYDPDQAYLYDVEDETTVLTADWTELI AA AVAP---ADATLINGKGR-Y--LGGPAVLAVINVQQ |
| | | CDGLRGP VVYDP DP SLYD DD TVITL DW YH AA P D TLING GR G LAVI V Q |
| <i>L. edodes</i> Lac1A | 223 | GKRYRFRMISACDANHNFSIDGHRITVIEVDGENHEPATVDNIQIFPQGRYSFVLATQVPDNYWRALSSSGVGSF |
| <i>L. edodes</i> Lac1B | 223 | GKRYRFRMISACDANHNFSIDGHRITVIEVDGENHEPATVDNIQIFPQGRYSFVLATQVPDNYWRALSSSGVGSF |
| <i>T. versicolor</i> Lac2 | 218 | GKRYRFRMISACDANHNFSIDGHRITVIEVDGENHEPATVDNIQIFPQGRYSFVLATQVPDNYWRALSSSGVGSF |
| CECT Lac1 | 214 | GKRYRFRMISACDANHNFSIDGHRITVIEVDGENHEPATVDNIQIFPQGRYSFVLATQVPDNYWRALSSSGVGSF |
| <i>P. ostreatus</i> Lac2 | 226 | NKRYRFRMISACDANHNFSIDGHRITVIEVDGENHEPATVDNIQIFPQGRYSFVLATQVPDNYWRALSSSGVGSF |
| <i>P. cinnabarinus</i> Lcc3 | 214 | GKRYRFRMISACDANHNFSIDGHRITVIEVDGENHEPATVDNIQIFPQGRYSFVLATQVPDNYWRALSSSGVGSF |
| | | G K R Y R F R M I S A C D A N H N F S I D G H R I T V I E V D G E N H E P A T V D N I Q I F P Q G R Y S F V L A T Q V P D N Y W R A L S S S G V G S F |
| <i>L. edodes</i> Lac1A | 303 | TGGNSGILRYQGAPDADPTTNTSTGVV-LTESMLHPLENPGA-PGLPFGGAEVNLNLTGLFNLPATFF--MNDTQYIP |
| <i>L. edodes</i> Lac1B | 303 | TGGNSGILRYQGAPDADPTTNTSTGVV-LTESMLHPLENPGA-PGLPFGGAEVNLNLTGLFNLPATFF--MNDTQYIP |
| <i>T. versicolor</i> Lac2 | 296 | TGGNSGILRYQGAPDADPTTNTSTGVV-LTESMLHPLENPGA-PGLPFGGAEVNLNLTGLFNLPATFF--MNDTQYIP |
| CECT Lac1 | 292 | TGGNSGILRYQGAPDADPTTNTSTGVV-LTESMLHPLENPGA-PGLPFGGAEVNLNLTGLFNLPATFF--MNDTQYIP |
| <i>P. ostreatus</i> Lac2 | 304 | TGGNSGILRYQGAPDADPTTNTSTGVV-LTESMLHPLENPGA-PGLPFGGAEVNLNLTGLFNLPATFF--MNDTQYIP |
| <i>P. cinnabarinus</i> Lcc3 | 292 | TGGNSGILRYQGAPDADPTTNTSTGVV-LTESMLHPLENPGA-PGLPFGGAEVNLNLTGLFNLPATFF--MNDTQYIP |
| | | G G N S I L R Y A P T T T T S P L E L P L P P G P G G D S F T F F I N F P |
| <i>L. edodes</i> Lac1A | 379 | PTVPVLLQILSGAQS-PQDLLPQGSVYTLPI NKTIETINFF--GN--A-T-PGGPHPHLHGHSFDVRSADNTTYNYBNP |
| <i>L. edodes</i> Lac1B | 379 | PTVPVLLQILSGAQS-PQDLLPQGSVYTLPI NKTIETINFF--GN--A-T-PGGPHPHLHGHSFDVRSADNTTYNYBNP |
| <i>T. versicolor</i> Lac2 | 372 | PTVPVLLQILSGAQS-PQDLLPQGSVYTLPI NKTIETINFF--GN--A-T-PGGPHPHLHGHSFDVRSADNTTYNYBNP |
| CECT Lac1 | 368 | PTVPVLLQILSGAQS-PQDLLPQGSVYTLPI NKTIETINFF--GN--A-T-PGGPHPHLHGHSFDVRSADNTTYNYBNP |
| <i>P. ostreatus</i> Lac2 | 381 | PTVPVLLQILSGAQS-PQDLLPQGSVYTLPI NKTIETINFF--GN--A-T-PGGPHPHLHGHSFDVRSADNTTYNYBNP |
| <i>P. cinnabarinus</i> Lcc3 | 368 | PTVPVLLQILSGAQS-PQDLLPQGSVYTLPI NKTIETINFF--GN--A-T-PGGPHPHLHGHSFDVRSADNTTYNYBNP |
| | | P T V P V L L Q I L S G A Q S - P Q D L L P Q G S V Y T L P I N K T I E T I N F F - - G N - - A - T - P G G P H P H L H G H S F D V R S A D N T T Y N Y B N P |
| <i>L. edodes</i> Lac1A | 452 | VSCTYVHP-KQ--T---TIRFVTDNPGPWFLHWHIDLHLELGLAVVMAEAPSLVK-ATDVTTAAWDELCPYDLSLTPAQ |
| <i>L. edodes</i> Lac1B | 452 | VSCTYVHP-KQ--T---TIRFVTDNPGPWFLHWHIDLHLELGLAVVMAEAPSLVK-ATDVTTAAWDELCPYDLSLTPAQ |
| <i>T. versicolor</i> Lac2 | 450 | VSCTYVHP-KQ--T---TIRFVTDNPGPWFLHWHIDLHLELGLAVVMAEAPSLVK-ATDVTTAAWDELCPYDLSLTPAQ |
| CECT Lac1 | 442 | VSCTYVHP-KQ--T---TIRFVTDNPGPWFLHWHIDLHLELGLAVVMAEAPSLVK-ATDVTTAAWDELCPYDLSLTPAQ |
| <i>P. ostreatus</i> Lac2 | 453 | VSCTYVHP-KQ--T---TIRFVTDNPGPWFLHWHIDLHLELGLAVVMAEAPSLVK-ATDVTTAAWDELCPYDLSLTPAQ |
| <i>P. cinnabarinus</i> Lcc3 | 442 | VSCTYVHP-KQ--T---TIRFVTDNPGPWFLHWHIDLHLELGLAVVMAEAPSLVK-ATDVTTAAWDELCPYDLSLTPAQ |
| | | R D V V T G N T I R F V T D N P G P W F L H C H I D F H L E A G F A V V L A E D T P D T A - A V N P V P Q S W S D L C P I Y D A L D P S D |
| <i>L. edodes</i> Lac1A | 525 | L----P- |
| <i>L. edodes</i> Lac1B | 525 | L----P- |
| <i>T. versicolor</i> Lac2 | 526 | L----- |
| CECT Lac1 | 520 | Q----- |
| <i>P. ostreatus</i> Lac2 | 527 | KGGIVPS |
| <i>P. cinnabarinus</i> Lcc3 | 518 | L----- |

Figura 2. Comparación de Secuencias de Algunas Lacasas. Alineamiento de las lacasas de *Lentinula edodes* Lac1A, *L. edodes* Lac1B, *T. versicolor* Lac2, CECT Lac1, *P. ostreatus* Lac2, *Pycnoporus cinabarinus* Lcc3. Las zonas en gris corresponden a los sitios de unión de los átomos de cobre. Los posibles sitios de glicosilación son subrayados, mientras los gaps son representados con guiones (Zhao & Kwan, 1999).

5.4. Estructura de la lacasa *Cerrena maxima*

Gracias a los estudios de cristalografía se ha esclarecido la estructura de algunas lacasas, los cuales han reiterado su gran homología. Un claro ejemplo de ello es la lacasa de *C. maxima*, que al igual que la mayoría de las lacasas es un monómero de 499 aminoácidos distribuidos en tres dominios: I (del Aa 1-113), II (del Aa 132-309) y III (del Aa 310-499). El dominio I está formado por 11 tiras β y una hélice, el dominio II tiene 11 tiras β y tres hélices, el dominio III consta de seis tiras β y seis hélices. La proteína es estabilizada por dos puentes disulfuros situados entre las cisteínas 85 y 488, y la 117 y 205. El centro de cobre de tipo I está coordinado por los residuos Cys 453, Hys 395 e Hys 458. El grupo trinuclear de cobre está estabilizado por ocho histidinas entre los dominios I y II (cuatro de cada uno). Las asparaginas 54, 217 y 436 son los sitios de glicosilación (Lyashenko *et al.*, 2005). En la figura 3 se presenta la estructura de la lacasa de *C. maxima*.

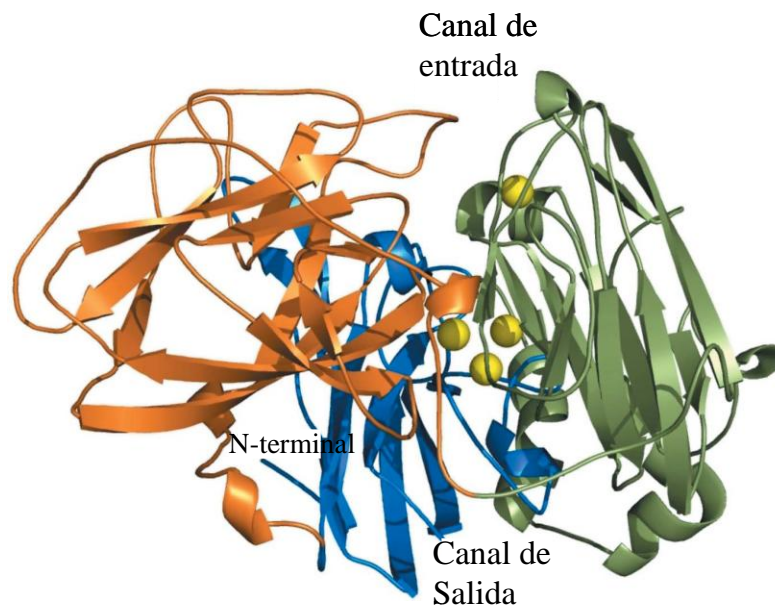


Figura 3. Estructura Terciaria de la Lacasa de *C. maxima*. Adaptada de Lyashenko *et al.*, 2005.

5. 5. Caracterización molecular

En este sentido se conocen varios genes responsables de la síntesis de lacasa en algunos hongos, como es el caso de *Pleurotus ostreatus*. Su gen *pox1* que consiste de 2592 pb, interrumpido por 19 intrones, codifica una proteína de 529 aa con cinco posibles sitios de glicosilación (Giardina *et al.*, 1995). Otro gen productor de lacasa en *P. ostreatus* es *pox1b* el cual consiste de 1599 pb, es interrumpido por 15 intrones y codifica una isoforma de 62 kDa con cinco sitios de glicosilación (Giardina *et al.*, 1999). En una cepa nativa se ha reportado el gen *lccK* que consiste de 2929 pb, con 19 intrones y marco de lectura de 1599 pb que codifican una proteína de 533 aa (Okamoto *et al.*, 2003).

Para el asilado CETC20197 se reportaron tres diferentes genes (*lcc1*, *lcc2* y *lcc3*) que codifican para tres fenoloxidasas. El gen *lcc1* esta formado por 2401 pb, nueve intrones y codifica una de proteína de 519 aa con ocho sitios de glicosilación. El gen *lcc2* cuenta 2351 pb, es interrumpida por nueve intrones, codifica una proteína de 520 aa con nueve sitios de glicosilación. El gen *lcc3* comprende 2401 pb, presenta diez intrones, codifica una proteína de 524 aa con cinco sitios de glicosilación. Gracias al análisis de comparación de secuencias, se catalogó este aislado como un miembro del género *Trametes* ya que las secuencias de las tres enzimas son altamente homólogas a las lacasas de éste (Mansur *et al.*, 1997).

Así mismo, la lacasa de *Lentinula edodes* se ha caracterizado, clonado y estudiado su expresión diferenciada tanto en distintos medios de cultivos como en diferentes etapas del desarrollo. El gen *lac1* codifica un péptido de 526 aa interrumpido por 13 intrones. El gen *lac2* mostró las mismas características, sin embargo difieren en 95 nucleótidos lo cual es reflejado en nueve aminoácidos que son diferentes entre las dos isoformas de lacasa. En lo referente al efecto del medio en la producción de lacasa, sólo el extracto de papa al 1% mostró un incremento de 2.8 veces con respecto al medio, en contraste con la concentración de RNA de *lac1* y *lac2* que si se ve afectada por las condiciones de cultivo. En las diferentes etapas del desarrollo del cuerpo fructífero, el mayor título de actividad lacasa se da en el sombrero (1.113 U/g que representa 34 veces más que en el

pie y 13 veces más que en el primodio), a pesar de esto, en todas ellas el RNA predominante correspondió a *lacI* (Zhao & Kwan, 1999).

En el caso de *Trametes villosa*, una de las especies productoras de lacasa más estudiadas, se ha identificado una familia de cinco genes. (Yaver *et al.*, 1996). Para otro miembro del género de los *Trametes*, *T. sanguinea* también se identificó un grupo de cinco genes responsables de la producción de cinco enzimas (Hoshida *et al.*, 2002).

En conclusión, la gran mayoría de los estudios de caracterización molecular, reportan que las lacasas son producidas por más de un gen y son interrumpidos de entre 8 hasta 19 intrones dependiendo del hongo. Para *Pleurotus sajor-caju* se describe una familia de cinco genes (Soden & Dobson, 2001), para *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*) se reporta una familia de ocho genes (Hoegger *et al.*, 2004), por mencionar algunos ejemplos.

Gracias a estos estudios de caracterización molecular, se ha observado que la lacasa presenta múltiples regiones conservadas, como sus sitios de unión al cobre lo que ha sido de gran ayuda en los estudios de filogenia y en la identificación de algunos aislados como se describió anteriormente. También han sido de gran ayuda para llevar a cabo la producción heteróloga de la enzima en modelos de expresión como *Pichia pastoris* (Liu *et al.*, 2003) y *Aspegillus oryzae* (Yaver *et al.*, 1996)

5.6. Lacasas constitutivas e inducidas

La inducción de las enzimas extracelulares de los hongos de la pudrición blanca es muy importante para su actividad metabólica y crecimiento, los cuales dependen de las condiciones ambientales. A nivel de cultivo, se han observado diferencias en la producción de lacasa dependiendo de la composición del medio. Esta diferencia además de presentarse en cuanto a las unidades de lacasa, también se da en cuanto al número de isoformas presentes. Leonowicz *et al.*, (1978) encontraron que las formas inducibles

generalmente son más activas que las constitutivas y propone que esta alta actividad es necesaria para la detoxificación de ambientes contaminados con sustancias fenólicas.

5.7. Efecto de la composición del medio de cultivo sobre la producción de lacasa

Otro aspecto a considerar en el medio de cultivo para la producción de lacasa es la concentración de glucosa y de nitrógeno. Se ha reportado que altas concentraciones de glucosa causan un efecto inhibitorio en la producción de lacasa, en tanto que altos niveles de nitrógeno la estimulan (Levin *et al.*, 2002). Esto se ha combinado con el uso de diversos inductores para obtener altos títulos de actividad en los sobrenadates de los cultivos.

5.8. Inductores

Las lacasas son parte del metabolismo constitutivo y son producidas en pequeñas cantidades, sin embargo su producción puede ser inducida considerablemente por una gran cantidad compuestos aromáticos y fenólicos, iones metálicos, alcohol y detergentes (Leonowicz *et al.*, 2001), algunos de ellos se muestran en la tabla III.

Tabla III. Compuestos probados en la producción de lacasa como inductores

| Inductor | Concentración | Inductor | Concentración |
|-------------------------|---------------|-----------------------|---------------|
| 2,5-Xilidina | 1 mM | Guayacol | 0.1 mM |
| Alcohol veratrílico | 1 mM | 3,5-Dihidroxitolueno | 0.1 mM |
| Ácido veratraldehído | 1 mM | Ácido Ferúlico | 0.1 mM |
| Ácido homoverátrico | 1 mM | Ácido siríngico | 0.1 mM |
| Ácido vainílico | 1 mM | Vainillina | 0.1 mM |
| Ácido <i>p</i> -anísico | 1 mM | 3,3-Dimetoxibenzidina | 0.1 mM |
| Alcalignina* | 1mg/ml | 2,4-Diaminotolueno | 0.1 mM |
| CuSO ₄ | 0.15-1 mM | Etanol | 3% |
| Siringaldazina | 0.11 µM | DMSO | 1% |
| <i>o</i> -Toluidina | 0.1 mM | | |

* Lignina obtenida en la digestión alcalina de la madera.

En muchas especies de hongos la presencia de lacasas constitutivas e inducibles, presentan isoformas con diferentes propiedades (Bollag & Leonowicz, 1984). Por lo cual se ha indagado acerca del efecto de los inductores reportados sobre diferentes especies de hongos. Muestra de ello es el trabajo realizado por Muñoz y colaboradores (1997), que prueban el efecto de siete inductores en cultivos de *Pleurotus eryngii*, encontrando que la lignina de la cascarilla del trigo incrementa la actividad lacasa seis veces con respecto al control. Aún cuando el resto de los inductores no mostraron el mismo incremento en la actividad, en zimogramas revelados con ABTS, se observó la presencia de dos isoformas a diferencia del control que solo mostró una.

Un efecto similar fue encontrado para la cepa *Trametes sp* AH28-2. En este estudio, se probaron nueve inductores, los cuales incrementaron los títulos de actividad lacasa. Aún más, la composición de isoenzimas de lacasa fue variable dependiendo del inductor. La LacA fue inducida en mayor proporción en presencia de *o*-toluidina. Con 3,5-dihidroxitolueno se produce principalmente la isoforma LacB, mientras que con guayacol se presentan las dos formas en la misma proporción. También mostraron diferencias entre sus constantes cinéticas (Xiao *et al.*, 2004).

En los estudios del efecto del cobre en la producción de lacasa se ha estudiado en diversos hongos, entre los cuales se encuentra *Trametes trogii* que se incrementan los títulos de lacasa aproximadamente 18 veces a una concentración 1 mM de sulfato de cobre, sin afectar el patrón de isoenzimas de lacasa (Levin *et al.*, 2002). En *Coriolopsis rigida*, la presencia de cobre en el medio de cultivo, incrementó la producción de lacasa 500 veces (Saparrat *et al.*, 2002), por mencionar algunos ejemplos.

En *P. ostreatus*, el uso del cobre en los cultivos incrementa sustancialmente la producción de lacasa, así como la presencia de las tres isoformas conocidas de este hongo, POXA1b, POXA2 y POXC (Palmieri *et al.*, 2000). A nivel molecular, se identificaron regiones puntuales de respuesta a metales (MRE) presentes en los promotores de los genes *poxc* y *pox1b* de *P. ostreatus*, cuya transcripción es inducida por la presencia de cobre (Faraco *et al.*, 2003). Para *Trametes pubescens* se identificaron

dos de estos elementos MRE cercanos al promotor del gen *lap2* que codifica para una de las isoformas de lacasas de este hongo (Galhaup *et al.*, 2002). En general, los más fuertes promotores típicos de hongos son grandes regiones ricas en pirimidinas y cerca de ellas se encuentran estos elementos MRE (Thiele, 1992).

5.9. Propiedades catalíticas y operativas

5.9.1. Mecanismo de reacción.

La lacasa lleva a cabo la reducción del oxígeno (O_2) a agua, acompañada de la oxidación de un sustrato fenólico (Thurston, 1994). La oxidación del compuesto fenólico genera radicales catiónicos, ya que del sustrato sólo se remueve un electrón (Figura 3). La reactividad de estos intermediarios depende de la naturaleza de los grupos químicos de los sustratos y de las condiciones del medio. En presencia de compuestos aromáticos, la oxidación generalmente se presenta en los enlaces carbón- carbón y carbón-oxígeno, generando productos de un mayor peso molecular que el compuesto original a causa de la polimerización de los radicales (Gierer & Opara, 1973). En el ambiente natural de los hongos de la pudrición blanca, predominan los compuestos monofenoles son radicales metoxi (Muñoz *et al.*, 1997).

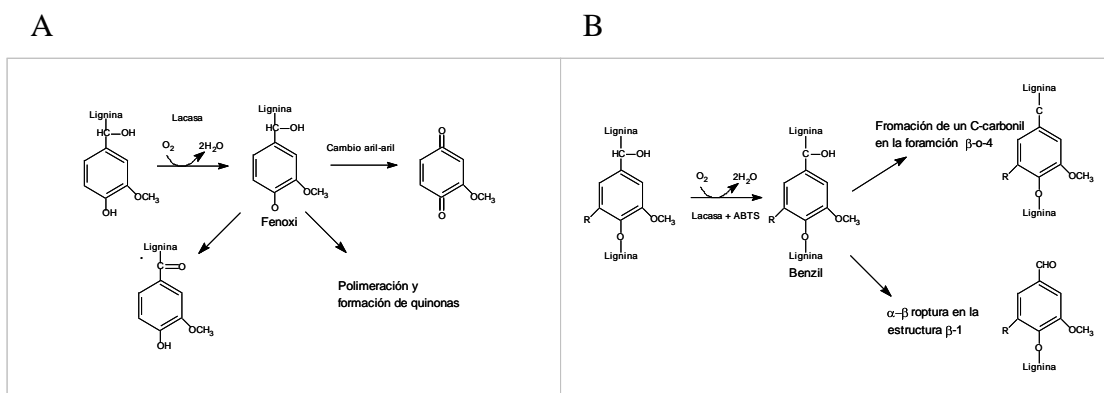


Figura 4. Ciclo catalítico de la lacasa. A) Oxidación de una subunidad aromática de lignina. B) Mecanismo de reducción y oxidación de los centros de cobre. Adaptada de Kunamneni *et al.*, 2007

Con respecto a su potencial Redox, éste ha servido para dividirlos en dos grupos, las de alto potencial (0.73V) y las de bajo potencial (0.56V) (Klonowska *et al.*, 2002). El incremento de dicho potencial se ha atribuido a la estabilización del centro de cobre tipo I (Taniguchi *et al.*, 1982). En el caso del potencial Redox de los grupos prostéticos de *Coriolus (Trametes) versicolor*, se han reportado en 785 y 782 mV para los centros 1 y 3. Estos valores se ven disminuidos en presencia de inhibidores como el fluoruro, que disminuye el potencial del cobre tipo 2 más de 210mV que interactúa fuertemente con el ion fluoruro (Yaropolov *et al.*, 1994).

Por otro lado, se ha reportado que las lacasas de alto potencial Redox son capaces de oxidar el par DMAB y MBTH, el cual es considerado un sustrato específico de manganeso peroxidasa (Jordaan & Leukes, 2003)

5.9.2. Rango de sustratos

Dentro de los compuestos susceptibles a la acción oxidativa de la lacasa se encuentran *o,p*-difenoles, aminofenoles, polifenoles, ácidos metoxifenoles, iones orgánicos, diaminas, aril diaminas y aminas aromáticas. Su oxidación se realiza mediante un mecanismo de transferencia de un electrón (Thurston, 1994; Yaropolov *et al.*, 1994).

5.9.3. Constantes catalíticas

A pesar de que la lacasa es capaz de actuar sobre un amplio rango de sustratos, las propiedades catalíticas solo se han caracterizado para un número reducido, entre los cuales se encuentran el ABTS un compuesto sintético, además del DMP, guayacol y la siringaldazina, los cuales son fenólicos. Los rangos de K_m oscilan entre 10 s/ μ M para la siringaldazina y el ABTS, y 100 s/ μ M para el DMP y guayacol. El rango de los valores K_{cat} es muy amplio y de diferentes órdenes de magnitud entre los diferentes sustratos y usualmente es característico de cada proteína. De forma general, las lacasas combinan la

alta afinidad y un número de recambio grande sobre el ABTS y la siringaldazina, mientras que para el guayacol y el DMP las constantes de afinidad y recambio son bajas. Por otro lado, valores bajos de K_m son típicos para el ácido sinápico, hidroquinona y ácido sirínico, en tanto que valores superiores se han encontrado para fenoles *para*-sustituídos, ácido vainílico o su aldehído. En algunos hongos productores de isoformas, se ha visto que estas poseen valores similares de K_m y K_{cat} (Baldrian, 2005).

5.9.4. Efecto del pH y temperatura

Las lacasas fúngicas son enzimas que presentan pH óptimo en la zona ácida, entre 3 y 4 dependiendo del sustrato y del amortiguador utilizado. A pH alcalino, la actividad enzimática se ve disminuida por la unión del ion hidróxido en el centro de cobre T2/T3 de la lacasa que interrumpe la transferencia interna de electrones de T1 a T2/T3 (Muñoz *et al.*, 1997). El pH no solo afecta la velocidad de la reacción, sino también los productos de la reacción (Xu, 1997). La estabilidad de las lacasas, generalmente es mayor a pH ácidos, con algunas excepciones (Leonowics *et al.*, 1984; Baldrian, 2004)

Los perfiles de temperatura de la actividad lacasa, usualmente no difieren del de otros de enzimas ligninolíticas extracelulares, con temperaturas óptimas entre 50 y 70°C. La termoestabilidad varía considerablemente de un organismo a otro, la vida media a 50°C puede ser de algunos minutos (Slomczynski *et al.*, 1995), de 2-3 horas (D'Annibale *et al.*, 1996) y en algunas especies de *Trametes* puede ser de 50-70 horas (Smirnov *et al.*, 2001).

5.10. Importancia Biológica

Las lacasas son el componente más importante del sistema ligninolítico de los hongos de la pudrición blanca de la madera, aún cuando no se conoce a detalle este proceso. Por otro lado, no es esta la única actividad biológica de la cual es responsable la lacasa, ya

que también se ha reportado como un factor de virulencia en infecciones por hongos, así como en los procesos de diferenciación y pigmentación de estos organismos. A continuación se describe su participación en estos procesos.

5.10.1. Como enzima ligninolítica

La lacasa es la enzima ligninolítica más distribuida en los hongos de la pudrición blanca, a pesar del menor potencial Redox con respecto al de las peroxidasas. Se ha implicado tanto en la polimerización de la lignina en las plantas superiores, así como en la degradación de ésta por los basidiomicetos.

En las plantas se han detectado en el tejido del xilema, donde se ha reportado la presencia de entre una (Gregory & Bendall, 1966), cinco (Ranocha *et al.*, 1999) y ocho (Sato *et al.*, 2001) isoformas diferentes de lacasa. En la polimerización de la lignina, la lacasa lleva a cabo la formación de radicales fenoxilo, los cuales a través de una serie de reacciones la polimerizan (Schmidt, 2006).

En el caso de los hongos de la pudrición blanca, es excretada como parte del sistema extracelular degradador de lignina, es ampliamente distribuida entre estos organismos, aún más que la LiP o MnP. Por otro lado, al no ser capaz de actuar sobre los enlaces no fenólicos de la lignina, no se considera como un componente significativo del sistema degradador de lignina (Ferraroni *et al.*, 2005). Sin embargo en algunos casos, como el *Pycnoporus cinnabarinus*, el cual es un eficiente degradador, sólo se detecta a la lacasa como la única actividad ligninolítica. En este sistema se ha reportado la presencia de pequeñas moléculas que son oxidadas por la lacasa, que forman radicales libres que actúan sobre los enlaces no fenólicos de la lignina (Eggert *et al.*, 1996).

Gracias al amplio rango de sustratos sobre el cual puede actuar y aún más a la presencia de mediadores que le permiten actuar sobre compuestos de alto potencial, la lacasa ha

retomado el interés de muchos investigadores para su aplicación en nuevos procesos biotecnológicos.

5.10.2. Su función en la morfogénesis de hongos

Generalmente los basidiomicetos secretan lacasa a partir del micelio vegetativo, se incrementa su síntesis durante la fructificación y disminuye con la maduración del cuerpo fructífero. En el caso *L. edodes*, participa en la síntesis de melanina de las lamelas (Nagai *et al.*, 2003).

En la formación de cuerpos fructíferos, además de estar involucrada en la formación de pigmentos, participa en la polimerización oxidativa de componentes de la pared celular relacionados con la adhesión célula-célula (Bu'Lock, 1967; Leathman & Stahmann, 1981; Thurston, 1994); además en *Armillaria mellea* se le ha asociado en el desarrollo de rizomorfos (Worrell *et al.*, 1986).

5.10.3. Como factor de virulencia

La lacasa también es considerada un factor de virulencia en muchas infecciones de hongos, tanto de plantas como en humanos.

En el caso de algunos hongos patógenos de plantas como *Botrytis cinerea*, es capaz de actuar sobre cucurbitacinas (triterpenoides tetracíclicos), los cuales son agentes de protección de las plantas del pepino contra infecciones. De forma general, la lacasa le confiere protección a los hongos contra la toxicidad de fitoalexinas y taninos en el medio.

Un ejemplo de su participación en infecciones de hongos en humanos, es la causada por *Cryptococcus neoformans*. Este patógeno, el cual afecta principalmente a pacientes

inmunocomprometidos donde la lacasa es responsable de la síntesis de melanina que le confiere protección antioxidante o contra efectores de la inmunidad celular (Lui *et al.*, 1999).

5.11. Importancia Industrial

Como se ha venido mencionando, la lacasa es una enzima poseedora de cualidades de gran interés en el ámbito industrial, ya que puede ser utilizada en el área de la biorremediación, en la síntesis química, diseño de nuevos biosensores, en la industria alimentaria, textil, entre otras. Esto gracias a su amplio rango de sustratos, su termoestabilidad y al hecho de que no requiere de la presencia de cosustratos como es el caso de las peroxidasas.

Industria papelera

La industria papelera, genera una gran cantidad de aguas de descarga con un alto contenido de compuestos ligninolíticos que le confieren un color café que resultan tóxicos para los organismos acuáticos. Por tal razón se han empleado las enzimas ligninolíticas como una alternativa al tratamiento de sus descargas mencionadas. En este sentido, la lacasa tiene como ventaja sobre las peroxidasas que no requiere la adición de cofactores.

Además de ser utilizada en el blanqueamiento del papel, se ha ensayado su efecto en la modificación de fibras de madera, para la manufactura de materiales como el cartón, sin adhesivos sintéticos tóxicos (Felby *et al.*, 1997). Otra aplicación en este ámbito es la modificación de las fibras lignocelulosicas, para conferirle nuevas propiedades químicas o físicas a los productos derivados de éstas (Lund & Ragauskas, 2001; Chandra & Ragauskas, 2002), o en el desarrollo de nuevos materiales propiedades de hidrofobicidad o carga generados por la actividad lacasa.

Industria alimentaria

En este sector, la enzima ha sido utilizada en la eliminación de compuestos fenólicos responsables de la turbidez en vinos, cerveza y jugos (Servili *et al.*, 2000).

Biorremediación

Gracias a la gran versatilidad de sustratos de la lacasa, se ha evaluado su acción en la degradación de compuestos xenobióticos cíclicos presentes en suelos y descargas de aguas industriales. Dentro de estos compuestos se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos, aminas aromáticas, pesticidas como el DDT o atracina, fenoles clorados, bifenilos policlorinados, anilinas cloradas, nitrotolueno, dioxinas y colorantes sintéticos (Field *et al.*, 1993)

5.12. Estudios de prospección

Aunque en un principio, la gran mayoría de los estudios de caracterización y de aplicación de lacasa se enfocaron en algunas cepas como *T. versicolor* o *P. ostreatus*, en años recientes ha crecido el interés por encontrar lacasas con nuevas cualidades en su potencial Redox, mayor capacidad ligninolítica, y termoestabilidad, máxima actividad a pH extremos, mayor rango de sustratos, entre otras.

Un ejemplo de lo anterior es el estudio realizado por Kiiskinen y colaboradores (2004), en el cual realizan una prospección en medio sólido suplementado con RBBR, Poly R-478, guayacol o ácido tánico en busca de lacasas con potencial ligninolítico y habilidad decolorante. De 26 cepas probadas, 16 fueron capaces de actuar sobre alguno de los colorantes y ocho de estas también mostraron actividad sobre el guayacol. Al identificar a sus mejores aislados se encontraron con géneros como *Pholiota* sp, *Mucor* spp, *Trichoderma* spp. *Peniophora* sp, *Sporotrichum pruinosum*, *Cryosporium queenslandicum*. Este sistema de selección en medio sólido les permitió obtener una cepa de *Pholiota* sp que mostró gran estabilidad a 60°C.

En Túnez se realizó un escrutinio del potencial ligninolítico de algunos de sus hongos autóctonos (Dhouib *et al.*, 2005). En el cual se analizaron 315, de los cuales 18 fueron capaces de decolorar el Poly R-478 en medio sólido. En medio líquido, el mejor productor de lacasa fue una cepa de *Trametes trogii*. Posteriormente se purificó y caracterizó la lacasa de este aislado y fue aplicada en la decoloración de seis colorantes textiles (Zouari-Mechichi *et al.*, 2006).

En nuestro laboratorio, previamente hemos realizado un estudio de prospección de basidiomicetos de la pudrición blanca de la madera en las serranías aledañas al área metropolitana de Monterrey (Gutiérrez-Soto, 2004, Hernández-Luna *et al.*, 2008), y evaluamos su potencial ligninolítico y su capacidad de degradar colorantes sintéticos empleando un sistema en medio sólido de indicadores cromogénicos, de oxidasas y peroxidasas, así como de un colorante polimérico (Poly R-478) para detectar la capacidad lignolítica y tres colorantes monoméricos para determinar la capacidad de decoloración (AR 44, CV y RBBR). De 91 aislados nativos seleccionamos dos (CS 5 y CU1), que fueron los que mostraron mejores resultados de decoloración en medio sólido y en medios líquidos. Además, la capacidad de decoloración coincidió con la presencia e incremento de la actividad lacasa, por lo que se caracterizó la capacidad de decoloración de los extractos crudos y algunas de las características fisicoquímicas de la actividad. Se determinaron el pH y temperatura óptimos, 3.5 y 55°C respectivamente; así como se demostró la termoestabilidad a 55°C por 1 h, para ambos aislados. Además se detectaron al menos dos bandas de actividad lacasa, alrededor de los 60 y 110 kDa en los zimogramas realizados. La actividad lacasa de estos dos aislados, fue capaz de actuar sobre pares de sustratos reportados como indicativos de actividad peroxidasa, como la 4-AAP-2,4-DCP para LiP, y MBTH-DMAB para MnP, sugiriendo un alto potencial Redox para la lacasa.

La estabilización genética de los aislados, se realizó mediante cultivos de puntas de hifas, a partir de estos, su identificación se llevo a cabo en el “Centralalbureau voor Schimelcultures” Instituto de la Real Academia de Artes y Ciencias de Holanda (KNAW) y su confirmación en IPICYT de San Luis Potosí. El aislado CS5 fue

identificado con un 99% homología con *Trametes hirsuta*, mientras que CU1 presentó una homología del 99% con *Trametes (Cerrena) maxima*.

Capítulo II. Problemática asociada a los colorantes textiles

Los colorantes sintéticos son compuestos ampliamente utilizados en la industria en diversos procesos y en grandes cantidades. Aunado a su uso existe una problemática de tipo ambiental, debido a las características químicas que presentan para resistir los diferentes procesos a los que son sometidos. La gran mayoría de ellos son difíciles de degradar por los métodos fisicoquímicos convencionales que incluyen floculación combinada con flotación, electroflotación, filtración con membranas, coagulación, destrucción electroquímica, irradiación, intercambio iónico, precipitación, ozonación, y tratamiento Katox, sin embargo, estas tecnologías son ineficientes en la remoción de color, costosas y no se pueden adaptar a un amplio rango de colorantes (Robinson *et al.*, 2001; Fu, 2001).

Los colorantes resultan tóxicos debido a la estructura química que presenta el cromóforo, que generalmente corresponde a una estructura cíclica de uno o más anillos. Su carácter recalcitrante se incrementa debido al tipo y número de radicales cromógenos. Aún más, estos compuestos son diseñados para resistir los procesos y tratamientos industriales a los que son sometidos.

Basados en la estructura de los grupos cromóforos, los colorantes se pueden clasificar como azos, antraquinónicos, triarilmetano y ftalocianinas, todos estos conocidos como colorantes reactivos (Zollinger, 1991). Por otra parte, son reconocidos veinte diferentes cromógenos de colorantes, por lo cual también se han clasificado como colorantes ácidos, básicos, directos, dispersos, mordentes, reactivos, sulfurosos, azoicos y a la tina (Hao *et al.*, 2000).

En la actualidad, se busca desarrollar procesos más efectivos para la remoción del color presente en los efluentes industriales. No obstante, esto resulta complicado ya que los colorantes sintéticos poseen estructuras complejas y variadas. Dentro de los métodos convencionales para su tratamiento se encuentran los procesos fisicoquímicos y electroquímicos que generan una gran cantidad de sedimentos, y presentan notables diferencias en la cantidad del color removido, volumen de capacidad, duración de la operación y costo. Para la remoción de grandes volúmenes de color en las descargas de agua, se ha utilizado eficientemente la remoción con membranas y los tratamientos de ozono, sin embargo su costo es elevado.

Dentro de las alternativas biológicas para el tratamiento de descargas de la industria textil se encuentra el uso de bacterias tanto en condiciones anaerobias como aerobias. Por otro lado, estos organismos han mostrado una capacidad inferior de decoloración sobre los colorantes triarilmetano que sobre los de tipo azo. Además debido a que se tratan de bacterias que actúan sobre un colorante en particular, no pueden ser aplicadas en mezclas de estos.

También se han utilizado algunas cepas de actinomicetos en decoloración de colorantes reactivos, azos, antraquinónicos y ftalocianinas mediante la bioabsorción de estos compuestos.

Otros organismos que se han utilizado para la degradación de colorantes azos son las algas. Algunas especies de los géneros de *Chlorella* y *Oscillatoria* son capaces de degradar los colorantes de tipo azo a aminas aromáticas y eventualmente lo transforman a CO₂.

En el caso de los hongos, especialmente aquellos relacionados con la descomposición de la madera, se ha demostrado que son capaces de degradar varias clases de colorantes (Banat *et al.*, 1996). Por lo anterior se han realizado varios estudios de prospección de cepas basidiomicetos de la pudrición blanca con la capacidad de degradar colorantes sintéticos (Swamy & Ramsay, 1999; Jarosz-Wilkolazka *et al.*, 2002; Asgher *et al.*, 2006)

5.13. Monterrey: Sector productor y consumidor de colorantes industriales

Monterrey es una de las principales ciudades a nivel nacional en donde se concentran la industria del acero, vidrio, cervecera, autopartes, cemento, cerámica, alimentaria y textil. PYOSA (Pigmentos y Óxidos, S. A.) es una de las empresas más importantes a nivel nacional e internacional que ofrece pigmentos, colorantes y preparaciones de la más alta calidad para la fabricación de pinturas, tintas, plásticos, textiles, derivados de petróleo, etc. Cuenta con una amplia gama de colorantes de calidad reconocida a nivel internacional, ofreciendo una línea completa de colorantes para textiles de fibra natural o sintética, así como las diferentes líneas de colorantes para cuero, papel y uso industrial. Distribuyen sus productos a fabricantes de pinturas, tintas, plásticos, textiles, derivados del petróleo, baterías automotrices, cinescopios, fragancias, medicamentos y detergentes, entre otros (www.pyosa.com).

6. Estrategia Experimental

Para la realización del presente trabajo se siguió la estrategia descrita a continuación.



Una vez definidas las condiciones más óptimas para la producción de lacasa, se realizó la purificación de la lacasa mediante cromatografía de intercambio iónico y exclusión molecular. Una vez pura la actividad lacasas de *T. maxima* CU1, se llevó a cabo la caracterización bioquímica y funcional de la misma.

7. Metodología

7.1. Material y Métodos

Todos los compuestos químicos utilizados fueron de grado reactivo. Los ingredientes para preparar los medios de cultivo de la marca Difco y los demás químicos, incluyendo colorantes, de la casa Sigma o CTR Scientific. Los reactivos utilizados en los ensayos de electroforesis, Acrilamida, bis-N,N'-metilen-bis-acrilamida, Lauril Sulfato de Sodio (SDS), Persulfato de Amonio, N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED), 2-mercaptoetanol, Trizma-base y Glicina fueron de las marcas comerciales Sigma, Fluka o Aldrich y obtenidos a partir de Sigma-Aldrich de México, S. A. de C. V. Las soluciones fueron preparadas con agua bidestilada de laboratorios Monterrey, S.A.

Matrices: DEAE-Sephacel y Sephadex G-200 de Pharmacia; DEAE-Sepharose, Q-Sepharose, Sephacryl S-200 HR, Concanavalina A 4B y Buffer Ion Exchanger de Sigma; DE-52 de Whatman; Biogel P-60, Biogel P-100 y Biogel HPT de Bio-Rad.

Estándares de peso molecular: Para la estimación del peso molecular en SDS-PAGE, se empleó el marcado preteñido Kaleidoscope de Bio-Rad: Miosina 192.9 kDa; β -Galactosidasa 111.4 kDa; Albúmina sérica de bovino 57.4 kDa, Anhidrasa carbónica 30.3 kDa; Inhibidor de tripsina de soya 25.2 kDa; Lisozima 12.9 kDa; Aprotinina 6.5 kDa.

En algunos casos se utilizó un marcador de rango bajo: Fosforilasa b 97.4 kDa; Albúmina sérica 66.2 kDa; Ovoalbúmina 45 kDa; Anhidrasa carbónica 31 kDa; Lisozima 14.4 kDa; Aprotinina 6.5 kDa.

Para la calibración de las columnas de exclusión molecular se utilizó el juego de estándares de peso molecular en el rango de 200 a 12 kDa: β -Amilasa 200 kDa; Alcohol deshidrogenasa 150 kDa; Albúmina 66 kDa; Anhidrasa Carbónica 29 kDa; Citocromo c 12.4 kDa.

Sustratos: 2,6-Dimetoxifenol (Metoxifenol), Guayacol, Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)-sal de diamonio (ABTS), Siringaldazina (3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzaldeidazina), Ácido 3-dimetilaminobenzóico (DMAB), 3-metil-2-benzotiazolina hidrazona (MBTH). Todos adquiridos en Sigma.

Colorantes industriales: Fueron amablemente proporcionados por la Empresa Pigmentos y Óxidos, S.A. (PYOSA): Negro Reactivo 5, Azul Reactivo 19, Negro Directo 22, Azul Disperso 79, Rojo Disperso 60, Naranja Disperso 29, Negro Ácido 194, Azul Ácido 25, Negro Ácido 210. En la tabla IV se presentan el grupo químico al que pertenecen, uso y longitud de onda utilizada en los estudios de decoloración.

Tabla IV. Colorantes Textiles.

| Colorante | Grupo | Uso | λ |
|----------------------------|----------------|------------|-----------------------------|
| Negro reactivo 5 (RB5) | Diazo | Algodón. | 597 |
| Azul reactivo 19 (RB19) | Antraquinónico | Algodón. | 592 |
| Negro directo 22 (DB22) | Tetrakiazo | Algodón. | 474 |
| Azul disperso 79 (DB79) | Monoazo | Poliéster. | 580 |
| Rojo disperso 60 (DR60) | Antraquinónico | Poliéster. | 592 |
| Naranja disperso 29 (DO29) | Diazo | Poliéster. | 454 |
| Negro ácido 194 (AB194) | Monoazo | Nylon | 597 |
| Azul ácido 25 (AB25) | Antraquinónico | Nylon | 417 |
| Negro ácido 210 (AB210) | Triazo | Cuero | 461 |

7.2. Material biológico

Microorganismo: En el presente trabajo se utilizó la cepa nativa *Trametes maxima* CU1, la cual se conservó en medio YMGA en refrigeración a 4°C. La conservación se realizó por resiembras cada dos o tres meses.

Conejos: Se utilizaron dos conejos de raza Nueva Zelanda para la obtención de anticuerpos para los Western Blot, un macho de 2.8 Kg y una hembra de 2.5 Kg.

7.3. Medios de cultivo

YMGA: glucosa 4 g l⁻¹, extracto de malta 10 g l⁻¹, extracto de levadura 4 g l⁻¹ y agar 15 g l⁻¹ (Hernández-Luna *et al.*, 2008).

Medio Bran Flakes: se preparó en una solución amortiguadora de fosfato de potasio 60 mM, ajustando el pH a 6.0 con hidróxido de potasio 1M y agregando el cereal All Bran Flakes® al 2% (Pickard *et al.*, 1999).

Medio Dhouib modificado (DM): glucosa 10 g l⁻¹, extracto de levadura 1 g l⁻¹, peptona 5 g l⁻¹, tartrato de amonio 2 g l⁻¹, KH₂PO₄ 1 g l⁻¹, MgSO₄ 0.5 g l⁻¹, KCl 0.5 g l⁻¹, y 1 ml de la solución de elementos traza 100X. Para preparar 100 ml de la solución de elementos traza 100X se pesaron 0.5 g EDTA, 0.2 g FeSO₄, 0.01 g ZnSO₄, 0.003 g MnCl₂, 0.03 g H₃BO₄, 0.02 g CoCl₂, 0.001 g CuCl₂, y 0.003 g NaMoO₄ (Dhouib *et al.*, 2005; Zouari-Mechichi *et al.*, 2006).

El medio de cultivo para la producción de la lacasa fue esterilizado en autoclave a 121°C por 15 minutos.

7.4. Protocolos de trabajo

Determinación de la Actividad Lacasa

El método para determinar la actividad de la lacasa esta basado en la oxidación del sustrato cromogénico del 2,6-Dimetoxifenol (DMP) por acción de la enzima, generando un color anaranjado, el cual es detectado a una longitud de onda de 468 nm. Para la mezcla de reacción se utilizaron 2.8 ml de amortiguador de acetato de sodio 200 mM de pH 4.5, 0.1 ml de DMOP 60 mM y 10 μ l del extracto enzimático, dando un volumen total de 3 ml. La reacción se inició con la adición del extracto enzimático (o preparación enzimática) y se siguió a través del cambio en la densidad óptica a 468 nm por un minuto. Las unidades de lacasa se expresan como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 μ mol de sustrato por minuto, tomando como valor de coeficiente de extinción molar (ϵ)=49 600 M⁻¹ cm⁻¹ (Abadula *et al.*, 2000). Las determinaciones se realizaron en un espectro Shimadzu UV-VIS mini 1240.

Cuantificación de Proteína

Se utilizó el método de Bradford para la cuantificación de proteína, utilizando el kit “Protein Assay Bradford” de BioRad. Como estándar se utilizó la albúmina de suero bovina.

Electroforesis

Para el análisis de componentes se utilizó el método descrito por Garfin (1990):

Gel de concentración de Acrilamida al 4%: Agua bidestilada, 3.050 ml; Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 1.250 ml; SDS 10%, 0.050 ml; Acrilamida/Bis (30%/2.7%), 0.650 ml; APS 10%, 25 μ l y TEMED 5 μ l

Gel Separador de Poliacrilamida al 12%: Agua bidestilada, 5.025 ml; Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, 3.75 ml; SDS 10%, 0.050 ml; Acrilamida/Bis (30%/2.7%), 6.0 ml; APS 10%, 100 μ l y TEMED 10 μ l.

El amortiguador para las muestras consistió en Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, conteniendo glicerol a 10 % y azul de bromofenol a 0.025%, y 50 µl de 2-mercaptoetanol a cada 0.95 ml del amortiguador (para muestras desnaturalizadas); y el amortiguador del electrodo en Tris 0.025 M, Glicina 0.192 M, SDS 0.1% (p/v) a pH 8.3.

Para los geles nativos, en su elaboración solo se omitirá el SDS, la presencia de 2-mercaptoetanol en el amortiguador de la muestra y el tratamiento térmico en las muestras. Los carriles se cargaron con 25 µg de proteína en cada uno de los pasos de purificación, los primeros carriles con muestras desnaturalizadas a 95°C por 4 minutos en presencia de 2-mercaptoetanol y los siguientes con muestras nativas sin él para el zimograma. La electroforesis se corrió a 100 V.

Condiciones de cultivo para la producción enzimática

La producción de lacasa se llevó a cabo en dos medios de cultivos diferentes, uno lignocelulósico a base de Bran Flakes® y otro definido a base de sales, Dhouib modificado.

Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 200 ml del respectivo medio. Los medios se esterilizaron a 121°C a 15 libras de presión por 20 minutos. Para inocular los medios se agregaron tres piezas de 0.5 cm de diámetro del micelio crecido en YMGA por cada 100 ml del medio de cultivo. Se incubaron a 28°C a 150 rpm por aproximadamente 20 días. Se tomaron alícuotas de 50 µL cada dos días para la determinación de la actividad lacasa como ya se describió.

Efecto de inductores sobre la producción de lacasa

Una vez definido el medio más conveniente para la producción, se probaron dos de los inductores comúnmente utilizados, el sulfato de cobre y el etanol (Chefetz *et al.*, 1998; Heinzkill *et al.*, 1998; Koroljova *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 2003), para incrementar las unidades volumétricas de la actividad en los sobrenadantes.

Ya que no todos los organismos responden igual a los inductores se realizaron ensayos por duplicado en medio DM para encontrar las concentraciones óptimas para este hongo. En el caso de sulfato de cobre se agregó al medio a las concentraciones de 75, 150 y 350 μM antes de ser esterilizado, mientras el etanol se agregó al 1, 2 y 3%, al tercer día de crecimiento.

También se probaron otros compuestos que se han reportado como inductores, tales como la siringaldazina (Farnet *et al.*, 2002), ácidos húmicos (Koroljova-Skorobogat'ko *et al.*, 1998) y DMSO (Shah *et al.*, 2006). Solo los húmicos fueron agregados al inicio del cultivo, los demás a los tres días de crecimiento.

Al igual que en la selección del medio de cultivo, se tituló la actividad lacasa cada tercer día para construir la curva de producción para cada condición.

Obtención de extractos crudos

Establecidas las condiciones óptimas para la producción, se prepararon tres litros en matraces de 500 ml con 200 ml del medio. Una vez crecidos los cultivos y con el mayor título de actividad lacasa, se separó la biomasa del sobrenadante utilizando un cedazo de algodón-poliéster (50:50%). Para retirar los polisacáridos solubles en agua, se congeló el sobrenadante a -20°C por 24 horas. Posteriormente se descongeló el sobrenadante y se filtro a través de papel filtro (Whatman #1).

Para concentrar el sobrenadante se empleó un cartucho de ultrafiltración (Millipore prep/scale TFF de 10kDa) hasta aproximadamente 200 ml y finalmente a 5 ml con el sistema de ultrafiltración AMICON con una membrana de corte YM10, a una presión 40 psi. Finalmente la muestra se equilibró con tres volúmenes del amortiguador fosfato potasio 20 mM, ajustado a pH 6.0. Todo el proceso se realizó en baño de hielo.

Purificación

Ya que el concentrado contiene gran cantidad de pigmento, es necesario que se remueva del extracto, ya que este interfiere en la determinación de proteína y con la estimación de

la actividad lacasa. Por ello, como primer paso de purificación se utilizó una columna DEAE-Sepharose (2.5x17cm) equilibrada con el amortiguador de fosfato de potasio 20 mM, pH 6.0 (amortiguador A) para removerlo. Una vez aplicada la muestra en la columna, se pasaron 160 ml del amortiguador A, para remover todas las proteínas que no se unieron a la matriz. Para la separación de la muestra, se utilizó un gradiente lineal de fosfato de 20 a 150 mM de 400 ml, y utilizando un amortiguador de fosfato de potasio 150 mM, pH 6.0 (buffer B). Como paso final, se pasaron 160 ml del amortiguador B. Se colectaron fracciones de 7 ml. Una vez terminado el programa, se identificaron las fracciones con actividad lacasa, se colectaron, se concentraron y finalmente se equilibrio la fracción con amortiguador A en la celda AMICON.

El siguiente paso de purificación consistió en una filtración en gel, empleando una columna Sephadex G-200 (2x90cm), equilibrada y eluida con amortiguador de fosfato de potasio 100 mM, pH 6.0, se colectaron fracciones de 6 ml. Las fracciones con actividad se colectaron y concentraron. En cada uno de los pasos se tomaron alícuotas para la determinación de proteína y actividad lacasa.

Todas las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo en el sistema FPLC, Biologic LP de Biorad. Por otro lado se realizaron separaciones en las matrices De-52, Biogel HPT, Biogel P-60, Biogel P-100.

La evaluación de la eficiencia de los pasos de purificación se realizó a través de SDS-PAGE con el protocolo arriba descrito.

Para tinción se empleó Azul de Coomassie al 0.1% en solución fijadora 10% acético, 40% metanol toda la noche. Para el desteñido se utilizó la solución fijadora.

La actividad se reveló colocando los geles en acetato de sodio 200 mM, pH 4.5 y agregando el DMP. Una vez visualizadas las bandas de actividad, se detuvo la reacción con solución fijadora.

Producción de anticuerpos y Western Blot

En el análisis de componentes se observaron bandas de menor tamaño que la lacasa, para comprobar si se trataba de fragmentos de degradación de la misma o de otras proteínas contaminantes, se levantaron anticuerpos en conejos, contra la lacasa de 61 758 Da.

La lacasa utilizada para inmunizar los conejos, fue purificada a partir de un gel SDS-PAGE con muestras no tratadas. Se les aplicó cuatro dosis de 300µg de la proteína, y a la quinta semana se les aplicó una dosis de refuerzo. A la sexta semana, se les extrajo 10 ml de sangre por punción cardiaca. Para la obtención del suero, se coaguló y centrifugó la sangre (3000rpm por 15 min). El suero se mantuvo en refrigeración hasta su utilización.

Para el análisis Western Blot de las fracciones se corrió la electroforesis con geles SDS-PAGE con muestras tratadas y no tratadas. Se realizó la transferencia de los geles a membranas de celulosa (300 volts por 1.5 horas). La membrana es teñida con rojo Ponceau S para asegurar la transferencia de las proteínas. Registrada la transferencia se retira el color con lavados de agua destilada, luego de ello, las membranas se bloquearon con Tween 20 (0.5%) en TB (Tris Buffer 1M) por dos horas. Se realizaron dos lavados de 5 minutos con TB, posteriormente se agregó el anti-lacasa (20 µL de una dilución 1:1000 en 20 ml de TB) y se incubó por 1.5 horas. Nuevamente se realizó un lavado con Tween 20 y dos lavados con TB de 5 minutos, se agregó el conjugado Peroxidasa anti-conejo (20 µL de una dilución 1:1000 en 20 ml de TB) y se incubó por 1 hora. Finalmente con TMB, se generó un precipitado azul (Xu *et al.*, 2007).

Determinación del Peso Molecular

Para la estimación del peso molecular se utilizaron las columnas Sephacryl S-200 HR y Biogel P-100 (1.5x70), calibrada con el juego de estándares de peso molecular X. Tanto para los estándares como para las muestras, la separación se efectuó con amortiguador de fosfato de potasio 50mM, pH 6.0. Los estándares, fueron resuspendidos en 1 ml del amortiguador

También se estimó el peso molecular a través de SDS-PAGE, utilizando los estándares preteñidos Kaleidoscope de Bio-Rad y por LC-SM/LC (realizado en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.).

Deglicosilación de la Lacasa

Para la estimación del grado de glicosilación, la muestra fue tratada con una glicosidasa: PNGase F de Sigma.

Para lo cual se preparó una mezcla de reacción con 200 µg de lacasa en un volumen de 35 µl de agua. Se le agregó 10 µl de fosfato de potasio 250 mM, ajustado a 7.5; 2.5 µl de SDS 2% adicionado con 2-mercaptoetanol 1 M. La mezcla se incubó a 100°C por 5 minutos. Se dejó enfriar y se agregan 2.5 µl de Tritón X-100 al 15%, se añadió la PNGase F y se incubó la mezcla de reacción por 3 horas a 37°C.

Estimación del pI

Para el cálculo del pI se empleó una columna empacada con una matriz Poly Buffer Exchanger 94 Sigma, equilibrada con Imidazol 25 mM ajustado a pH 7.0. Para la elusión de las muestras se utilizó una solución de anfolitos (Poly buffer 74 sigma) ajustado a pH 3.0 con HCl 1N. A las fracciones obtenidas se les midió el pH con un potenciómetro Corning pH meter 430, también se midió la absorbancia a 280 nm, para la evaluación de la pureza de la fracción.

Espectro de absorción

Como parte de la caracterización de las propiedades fisicoquímicas de la lacasa, se le realizó el espectro de absorción de 200 a 800 nm en el espectro UV-VIS Shimadzu. El ensayo se realizó con 150µM de la proteína en 1 ml de agua.

Análisis bio-informático

Las secuencias N-terminal se identificaron por LC-MS/MS en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. El análisis comparativo entre las secuencias obtenidas y las

ya reportadas se realizó utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Efectos del pH

Para la determinación del pH óptimo, se empleó un amortiguador de citrato-fosfato de potasio 100:50 mM en un rango de pH de 2.0 a 6.0. Para la determinación de la actividad se utilizó el método del DPM como ya se describió.

Para evaluar la estabilidad al pH, se incubó la enzima en 2 ml del amortiguador citrato-fosfato. Se tomaron alícuotas de 10 μ l para medir la actividad a los tiempos 0, 1, 2, 3, 4 y 24 horas utilizando la mezcla de reacción con 2,6-DMPO en el acetato de sodio 50 mM, ajustado al pH óptimo.

Efecto de la temperatura

La temperatura al igual que el pH, es uno de los parámetros que intervienen en el funcionamiento óptimo de las enzimas. Por lo tanto, para determinar la temperatura óptima, se emplearon mezclas de reacción con DMOP incubadas en un rango de 15 a 70 °C. Las reacciones se iniciaron con la adición de la enzima.

Para los ensayos de termoestabilidad, se incubó la enzima en agua bidestilada a 50, 60 y 70°C, horas sobre 2,6-DMOP en amortiguador acetato de sodio a pH 3.0.

Determinación de los Parámetros Cinéticos

Los parámetros cinéticos fueron estimados empleando los gráficos de Linewaver-Burk, realizando cursos temporales sobre los sustratos: Siringaldazina y 2,6-DMOP, a diferentes concentraciones (0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 mM). Las mezclas de reacción se llevaron a cabo en amortiguador de acetato de sodio 50 mM ajustado a pH 3.0. La longitud de onda para la siringaldazina ($\epsilon= 65\ 000$) es 530 nm, para el 2,6-DMPO ($\epsilon=49\ 600\ M^{-1}\ cm^{-1}$) es 468 nm. Las mediciones en el cambio de la desviación óptica se realizaron por un minuto y por triplicado.

Efecto de inhibidores

Una vez determinados los parámetros cinéticos, se evaluó el efecto de algunos inhibidores sobre la actividad enzimática. Ensayándose sobre mezclas de reacción con 2,6-DMPO (como ya se describió), en presencia de concentraciones de 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10, y 25 mM de azida de sodio, fluoruro de sodio, SDS, EDTA, ácido tioglicólico y dimetil sulfóxido.

Decoloración enzimática

Para evaluar la participación de la lacasa en la decoloración de los colorantes industriales, se realizaron ensayos con lacasa pura de *T. maxima* CU1. La mezcla de reacción se llevó a cabo en amortiguador fosfato-citrato a pH 3.0 y 5.0, conteniendo 50 ppm del colorante y 10 U de actividad lacasa a un volumen final de 2 ml. La incubación se realizó a 50°C. Otra condición probada fue a pH neutro (mezcla en agua bidestilada) y a temperatura ambiente. Se realizaron lecturas en el rango de 200 a 800 nm cada 1, 2, 3 y 24 horas. Se estimó el porcentaje de decoloración en base a la disminución de la absorbancia en el pico máximo para cada colorante (ver tabla I).

Ensayos con efluentes simulados

Los efluentes industriales son complejas mezclas. Por tal razón, para tener un panorama más claro del comportamiento de la enzima bajo estas condiciones, se simuló un efluente con 50 ppm de cada uno los nueve colorantes industriales. Los ensayos se realizaron en las mismas condiciones descritas en la decoloración enzimática. Para calcular el porcentaje de decoloración, se tomó el pico máximo de absorción del espectro de la mezcla sin enzima como el 100% para cada condición.

8. Resultados

Previamente, seleccionamos la cepa de *Trametes maxima* CU1 que fue eficiente degradadora de nueve colorantes sintéticos de cinco diferentes grupos químicos. Por lo anterior, en el presente trabajo se llevo a cabo la purificación de la lacasa producida por *T. maxima* CU1, necesaria para su caracterización bioquímica y su aplicación *in vitro* en la decoloración de colorantes textiles y la mezcla de estos.

8.1. Selección del las Condiciones de Cultivo

8.1.1 Selección del medio de crecimiento

Para la producción de lacasa se probaron dos medios, uno a base de Cereal Bran Flakes® y otro a base de sales (Dhouib modificado), ya que las condiciones de cultivo son de suma importancia para una buena producción y a que se han presentado diferencias en cuanto a los niveles de producción y la presencia de isoformas de un mismo organismo al variar las condiciones de crecimiento (Chen *et al.*, 2003).

Los niveles más altos de actividad lacasa se presentaron en medio Bran Flakes® (2U/ml), en tanto que en el medio Dhouib modificado no se detectó actividad. Sin embargo en el medio Bran Flakes® se produce una gran cantidad de carbohidratos y un pigmento de color café que interfiere con la cuantificación de proteína y de la actividad lacasa, por lo que se decidió probar el medio Dhouib modificado en presencia de dos de los inductores de mayor uso a concentraciones estándar: sulfato de cobre 0.35mM y etanol 3% (Figura 5).

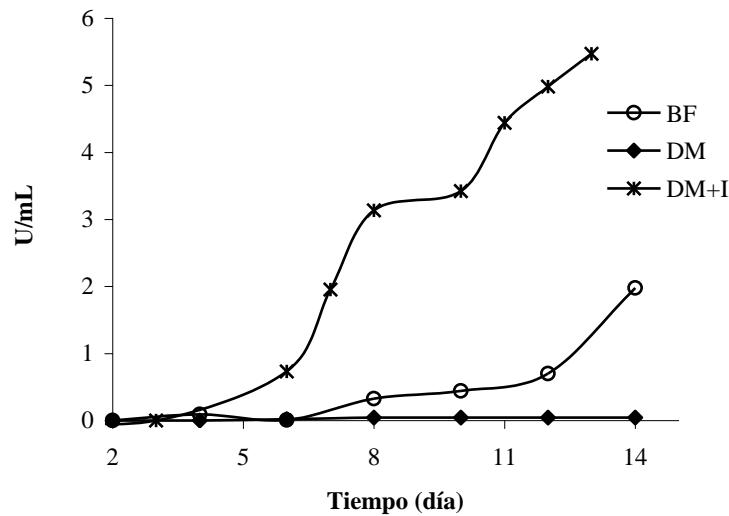


Figura 5. Producción de Lacasa en Medio Bran Flakes® y Dhouib modificado. La determinación de la actividad se realizó en acetato de sodio 200mM, pH 4.5, utilizando el DMP como sustrato. Los ensayos se realizaron por triplicado.

8.1.2. Efecto de algunos inductores

Al observar que el hongo respondió favorablemente a la presencia de los inductores, se procedió a evaluar el efecto la siringaldazina, los ácidos húmicos, DMSO, etanol y el sulfato de cobre, así como determinar la concentración óptima para incrementar la actividad lacasa en el medio.

A pesar de que se ha reportado que la siringaldazina es un buen inductor de la actividad lacasa (Farnet *et al.*, 2002), en *T. maxima* CU1 no se observó tal efecto. De igual manera, el DMSO y los ácidos húmicos no mostraron incremento significativo en la actividad lacasa. Los títulos más altos de lacasa se obtuvieron con el medio DM suplementado con sulfato de cobre 0.35 mM y etanol 3%. En este medio y con el sulfato de cobre a la misma concentración, se titularon 3.5 U/ml al sexto día de crecimiento, mientras que el etanol por si solo no mostró efecto inductor (Figura 2). El efecto sinérgico entre el cobre y el etanol se ha reportado para una cepa de *Trametes trogii* (Dhouib *et al.*, 2006).

Por otra parte, el pobre efecto de los demás inductores reitera que, no todos los inductores reportados muestran en mismo efecto en diversos organismos y que las condiciones de cultivo deben ser ajustadas para cada cepa.

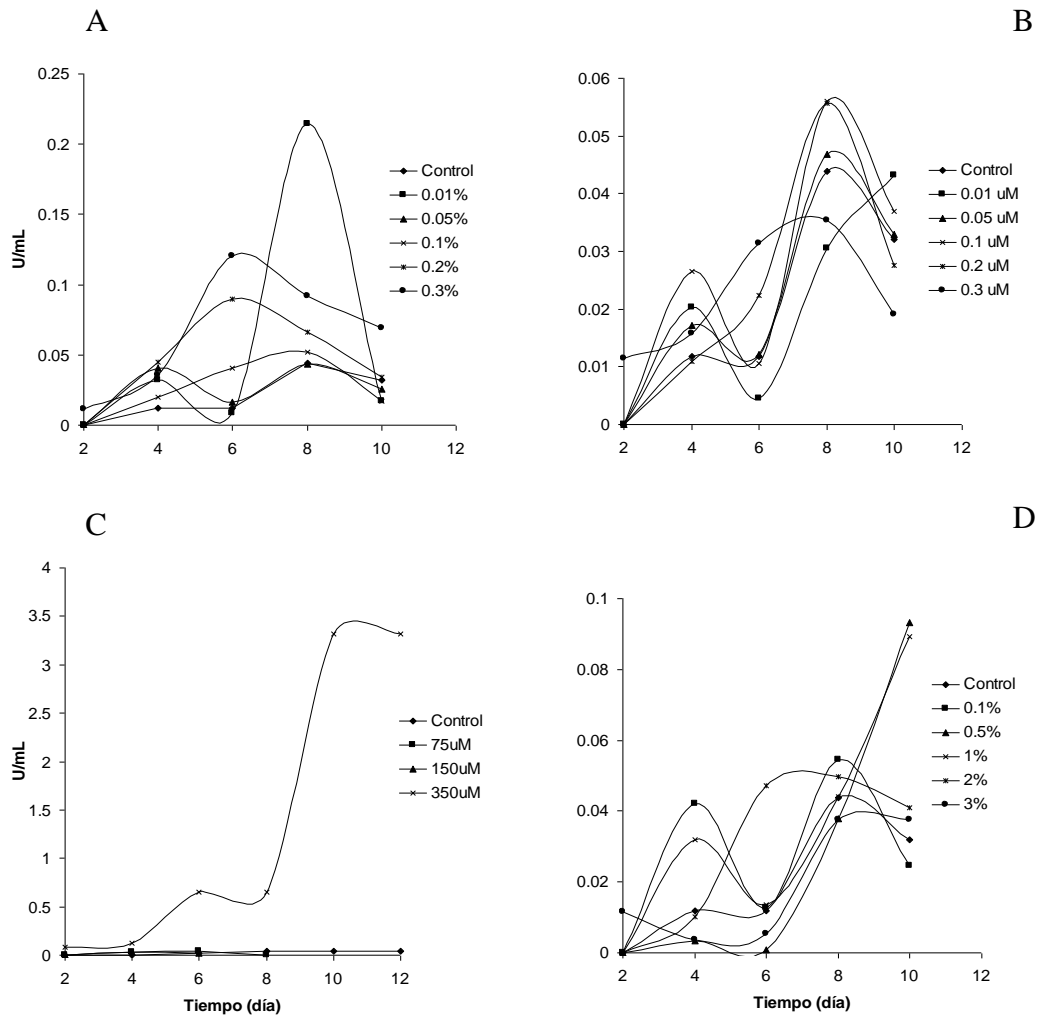


Figura 6. Efecto de algunos inductores. A) Ácidos húmicos. B) Siringaldazina. C) Sulfato de cobre. D) DMSO. Los ensayos se llevaron a cabo en el medio DM suplementado con diferentes concentraciones de los inductores probados. Los cultivos se

prepararon por triplicado, de igual forma se realizaron las determinaciones, en todos los casos la desviación estándar fue menor al 5%.

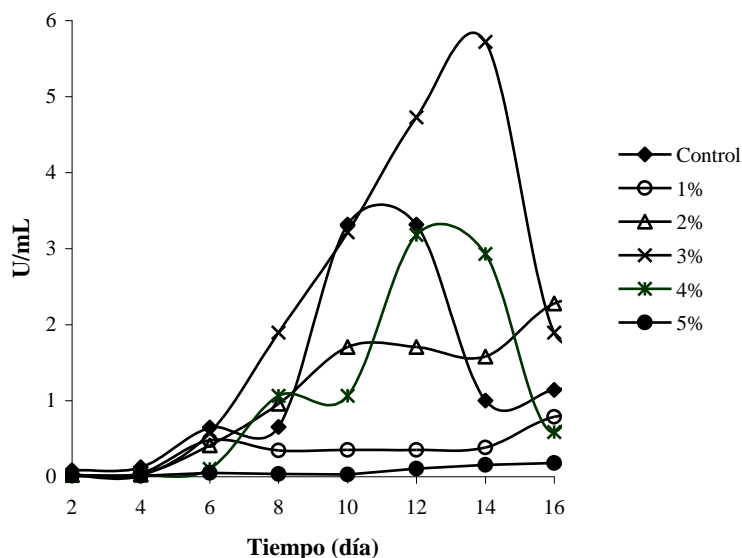


Figura 7. Condiciones óptimas de cultivo. Las determinaciones fueron hechas por triplicado, en todos los casos la desviación estándar fue menor al 5%.

8.1.3. Obtención del extracto crudo

Una vez definidas las condiciones de cultivo, se preparó un lote de producción de tres litros, hasta que se detectaron aproximadamente 6 U/ml. Posteriormente se separó la biomasa del sobrenadante, se concentró y se diafiltró la muestra para equilibrarla y ser aplicada a una columna de intercambio iónico. Finalmente se cuantificó la actividad lacasa inicial y la concentración de proteína total del lote (6418 unidades totales y 266.1mg). La preparación final, de 12 ml, presentó un color verde oliváceo la cual se mantuvo en congelación hasta su uso.

8.2. Purificación

8.2.1 Estudios previos de purificación

Inicialmente para la purificación de la lacasa de *T. maxima* CU1, utilizamos como primer paso una columna DEAE-Sephacel, seguida de una filtración en gel utilizando una columna de Biogel P-100. Sin embargo en el análisis de componentes en SDS-PAGE se observaba la presencia de dos bandas de proteínas con actividad lacasa en la zona de 70 y 60 kDa, acompañadas de bandas menores en la zona de 40-25 kDa y una mayor en la zona alrededor de 100 kDa. Por lo que se probaron modificaciones en el intercambio iónico como fue el cambiar la matriz por una DE-52 con un gradiente de fosfato de 20 a 250 mM, que posteriormente se redujo de 20 a 150 incrementando los volúmenes de elución de 5 a 10, sin embargo no se lograba la separación de estas aparentes isoformas. Por lo que se probó pasar la fracción obtenida del intercambio iónico DEAE por una Q-sepharose (una amina cuaternaria reportada para la separación de isoformas de lacasa por Farnet *et al.*, 2002), con un gradiente con NaCl de 0 a 500 mM; sin embargo no se logró separar estas isoformas.

Por lo anterior, se trató de remover las proteínas menores con una columna Biogel P-60. Bajo estas condiciones se esperaba una fracción principal en la zona de exclusión y otras dos o tres en la zona entre 40 y 25 kDa, más sólo se obtuvo una fracción en la zona de exclusión que al ser analizada por SDS-PAGE permitió visualizar todas las bandas de menor tamaño junto con las dos lacasas de 60 y 70 kDa. Otra estrategia para tratar de separar las proteínas de diferentes tallas fue el utilizar una columna Sephadex G-200, que incrementa el rango de resolución de las proteínas de menor tamaño y también remueve una gran cantidad de pigmentos. Este se utilizó como primer paso, seguido de un intercambio iónico en DEAE-Sepharose. La fracción obtenida fue aplicada a una columna de afinidad (Concanavalina A 4B), en esta última, la lacasa se quedó unida a la matriz. No pudo ser removida con altas concentraciones de glucosa (1 M), ni de manosa (0.5 M), además del Borato de sodio 100 mM, pH 6.5, no obstante que Coll *et al.* (1993) con un protocolo similar habían logrado separar dos isoformas del basidiomiceto PM1.

En forma paralela se utilizó la hidroxiapatita (Oda *et al.*, 1991), en la cual se obtuvieron dos fracciones que al ser analizadas por electroforesis presentaron el mismo patrón de bandas para ambas fracciones.

Por otra parte, también se realizaron separaciones por filtración en gel bajo condiciones de alta fuerza iónica (500 mM NaCl) para romper los enlaces débiles, en presencia de detergentes en el eluente (SDS 0.1% y Tritón 100X 0.1%), para tratar de romper interacciones hidrofóbicas entre las proteínas y la matriz, en presencia de urea 4 y 6 M, así como de 2-mercaptoetanol y Tritón en combinación. En lo referente al intercambio iónico se probaron diferentes soluciones amortiguadoras (fosfato, Tris-HCl, fosfato-citrato), en distintas proporciones y aplicados en pasos bajo diferentes esquemas de gradiente (stendidos? o pronunciados), con diferentes matrices (intercambiadores fuertes y débiles) y tipos de sales en los gradientes (NaCl, PO₄, KCl). Bajo todas las condiciones solo se obtuvo un pico principal de proteína donde se detectaba la actividad lacasa. Sugiriendo lo anterior que la principal proteína presente en los extractos curdos correspondía a las isoformas de lacasa, las cuales solo podían separarse por electroforesis. Algo similar ocurre con la isoforma L2 de *Ceriporiopsis subvermispora*, la cual sólo es posible purificar por isoelectroenfoque preparativo (Fukushima *et al.*, 1995).

Las matrices de exclusión molecular han sido diseñadas para separar proteínas simples y cuya forma comúnmente es esférica. La glicosilación de las lacasas provoca una desviación de esta esfericidad además de que puede causar interacciones con la matriz, lo cual explicaría la pobre resolución de las bandas (Fig. 9 A carriles 2 y 3) y la discrepancia en los pesos moleculares encontrados para la misma proteína en diferentes cortes y matrices (Tabla VII resultados con Biogel P-100 y Sephacryl S-200) en función de su peso. Revisando la literatura, encontramos variaciones similares reportadas para glicoproteínas. En el estudio realizado por Sviridov y colaboradores (2006), observaron que pueden coeluir glicoproteínas con otras proteínas de diferentes tallas y que no pueden ser separadas aún con el uso de HPLC.

Ya que las isoformas solo pueden ser separadas por electroforesis, la actividad lacasa de *T. maxima* CU1 fue caracterizada como una sola fracción conteniendo diversas glicofomas de la enzima.

Por todo lo anterior, se seleccionó como protocolo de purificación de la actividad lacasa de *T. maxima* CU1 el uso de DEAE-Sepharose y Sephadex G-200, el cual permitió obtener una fracción con un mayor rendimiento al final del proceso.

Además de los co-migrados observados en la exclusión molecular, en los geles tanto SDS-PAGE (cargados con muestras tratadas con mercaptoetanol y calor, y sin tratar), como en geles nativos, los patrones de migración son diferentes ya que en las condiciones reductoras se aprecian bandas de menor tamaño a las isoformas principales, que no son visibles tanto en las condiciones nativas como en las muestras no tratadas, mientras que la banda cercana a los 100 kDa se presentó en las tres condiciones. Otra variación observada fue la migración de la fracción de 60 kDa antes de la de 70 kDa en los geles nativos. Al igual que en la filtración en gel, se han reportado previamente estas desviaciones en separaciones de glicoproteínas en geles SDS-PAGE (Durchschlag *et al.*, 1991; Durchschlag & Jaenicke, 1997).

En las figuras 8 se muestran los perfiles de las separaciones típicas de la lacasa de *T. maxima* CU1 en intercambio iónico y exclusión molecular, así como en la figura 9 la separación característica en SDS-PAGE de las glicofomas de CU1 en los diferentes protocolos de purificación.

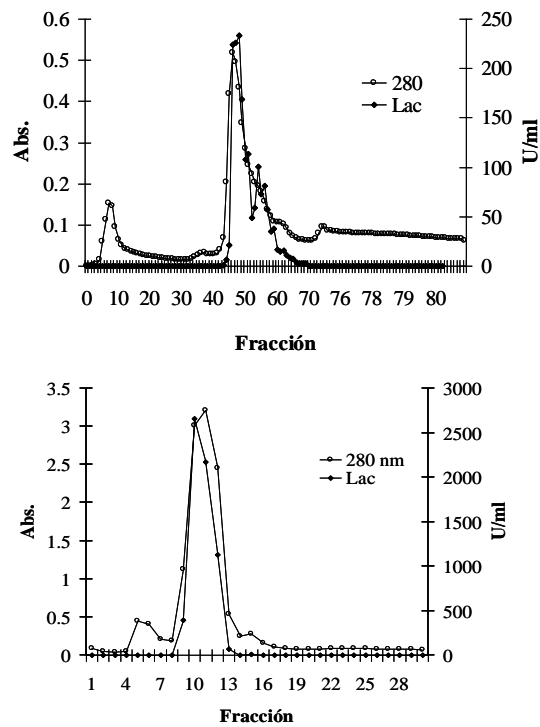


Figura 8. Perfiles cromatográficos característicos de la purificación de *T. maxima* CU1. El panel A corresponde al perfil típico de la separación del extracto crudo de *T. maxima* CU1. El panel B muestra el perfil característico de las separaciones en exclusión molecular.

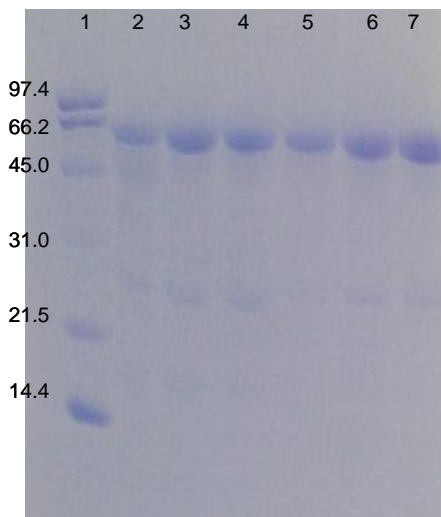


Figura 9. Separación típica en SDS-PAGE. En los diferentes carriles se muestran las fracciones de lacasa obtenidas mediante diferentes cromatografías. 1) Estándares de PM, 2) Concentrado YM10, 3) DE-52 4) Biogel P-100, 5) DEAE-Sepharose, 6) Biogel P-60, y 7) Biogel P-60. Todos cargados con 25µg de proteína y teñidos con azul Coomassie.

8.2.2 Protocolo final de purificación

Como primer paso para la purificación de la lacasa de *T. maxima* CU1, se empleó una columna DEAE-Sepharose. Este paso removió gran cantidad del pigmento presente en la muestra, que enmascara la presencia de otras proteínas presentes, además de que es eluido como una sola fracción muy amplia. Por otro lado al ser removido, deja en evidencia el característico color azul de la lacasa. Se obtuvo un pico de proteína dentro del cual se aprecian dos fracciones de actividad lacasa que se concentraron como una sola fracción, a la cual se le realizó una filtración en gel, en donde la actividad lacasa se fracciona nuevamente como un solo pico de proteína y actividad. En ambos pasos el componente principal correspondió a la actividad lacasa y fueron removidos algunos de los componentes proteicos contaminantes. En el anexo I se presentan los perfiles cromatográficos de cada uno de los pasos.

El rendimiento final de la preparación de lacasa obtenida fue 208%, un factor de purificación de 5 veces y un aumento en la actividad específica alrededor de la misma magnitud (121 U/mg vs 24 U/mg) con respecto al extracto crudo (Tabla V). El incremento en las unidades puede atribuirse a la remoción del pigmento presente en el extracto crudo, donde la presencia de compuestos fenólicos podría estar inhibiendo la actividad lacasa y por ende se detectarían menos unidades de las que están presentes (Zouari-Mechici *et al.*, 2006).

Tabla V. Purificación de la Lacasas de *T. maxima* CU1.

| Paso | Vol (ml) | Proteína Total (mg) | Unidades Totales | Actividad Específica (U/mg) | Rendimiento (%) | Factor de Purificación (veces) |
|-----------------|-----------------|----------------------------|-------------------------|------------------------------------|------------------------|---------------------------------------|
| Concentrado 10K | 12 | 266 | 6,418 | 24 | 100 | 1 |
| DEAE-Sepharose | 3.5 | 119 | 10,796 | 91 | 168 | 4 |
| Sephadex G-200 | 3.5 | 110 | 13,337 | 121 | 208 | 5 |

8.3. Análisis de componentes

En el análisis de componentes en un gel SDS-PAGE (figura 8), se observó una banda principal en la zona de 60 kDa aproximadamente y otros componentes menores, los cuales no fueron removidos con los pasos cromatográficos aplicados. En estos mismos geles, pero con muestras no reducidas con mercaptoetanol ni hervidas, se aprecian dos bandas de actividad lacasa en zimogramas revelados con DMP, lo que sugiere la presencia de dos isoformas de lacasa, una de alrededor de 70kDa y otra de 60 kDa sin las bandas menores. Esta última mostró ser más activa y fue capaz de degradar el azul de Coomasie mientras eran teñidos los geles. En condiciones nativas, se observan solo las dos bandas de actividad, sin embargo migran de forma inversa a los geles SDS-PAGE, es decir la banda más activa se retiene en la zona alrededor de 70 kDa, en tanto que la menos activa migra a la zona de 60 kDa (figura 9).

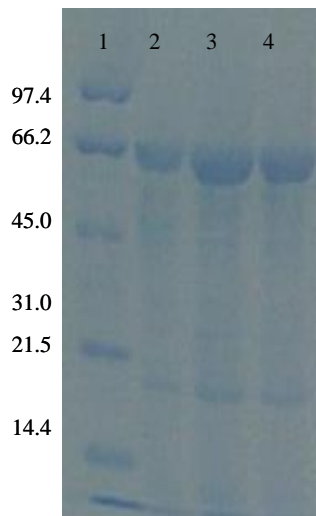


Figura 10. Análisis de componentes. Gel SDS-PAGE teñido con Coomassie: 1) Marcador de peso molecular Low Range de Bio Rad., 2) concentrado 10KDa, 3) DEAE-Sepharose, 4) Sephadex G-200. Todos los carriles fueron cargados con 25 μ g de proteína

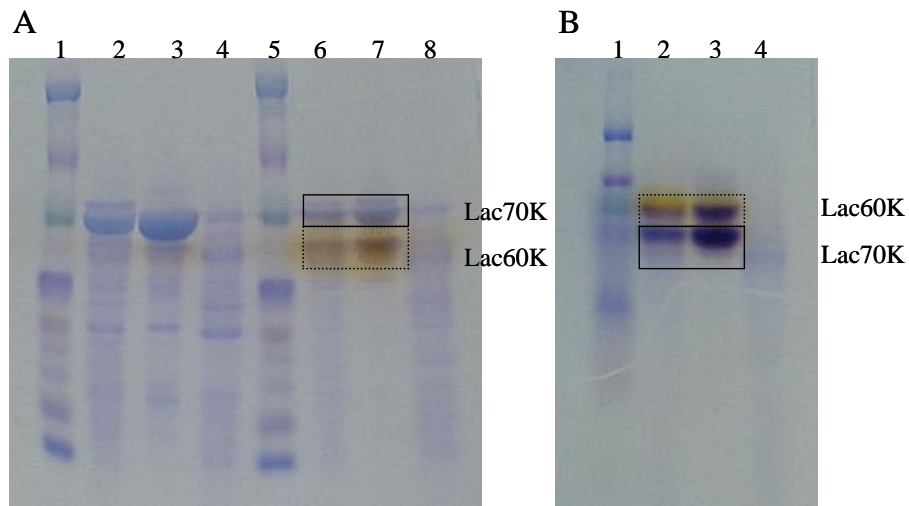


Figura 11. Electroforesis en geles SDS-PAGE y nativos. A) Gel SDS-PAGE donde los carriles 1 y 5 corresponden a el marcador de peso molecular preteñido Kaleidoscope de Bio Rad; 2 y 6 al extracto crudo, 3 y 7 a la fracción de lacasa obtenida en la columna Sephadex G-200, 4 y 8 a la fracción del pigmento. Las fracciones de los carriles 2, 3 y 4 refieren muestras tratadas con mercaptoetanol y calor, mientras que las muestras de los carriles 6, 7 y 8 son muestras no tratadas. B) Gel Nativo. El carril 1 corresponde a los marcadores de PM, 2 al extracto crudo, 3 a la fracción de lacasa obtenida en la columna Sephadex G-200, 4 a la fracción del pigmento. Ambos geles fueron primeramente revelados con DMP y posteriormente teñidos con Coomassie, todos los carriles fueron cargados con 25 μ g de proteína.

Para descartar que las bandas de menor peso presentes bajo condiciones reductoras se traten de fragmentos de degradación, se estimuló la producción de anticuerpos en conejos contra la lacasa Lac 60K. Para esto se purificó la lacasa a partir de geles de SDS-PAGE, con muestras no tratadas ya que presentan un mejor patrón de separación (Figura 10). Esto mismo fue aprovechado para obtener las dos lacasas y enviarlas al Instituto de Biotecnología de la UNAM para obtener la secuencia del extremo amino terminal, necesaria para el análisis de secuencias y útil para saber si las actividades lacasa presentes en la fracción corresponderían a isoformas o glicofomas.



Figura 12. Purificación por SDS-PAGE. Para la separación se utilizó la fracción obtenida del Sephadex G200. Los carriles fueron cargados con 25 μ g de proteína. La fracción Lac 60K es más activa que la Lac 70K, ya que es capaz de actuar sobre el colorante de Coomasie.

En el análisis por Western Blot se observó que la fracción Lac 70K da reacción positiva con los anticuerpos Lac 60K, sugiriendo que se trata de una glicofoma. Lo anterior se confirmó al ser tratada la muestra con una glicosidasa, donde solo se detecta una sola banda de aproximadamente 61 kDa (figura 11). Las demás bandas presentes bajo condiciones reductoras podrían corresponder a formas inactivas de lacasa ya que no son reveladas con DMP pero si reaccionan con los anti-Lac 60K. Estas solo son separadas por electroforesis bajo condiciones nativas, lo que implicaría que forman agregados con las formas activas.

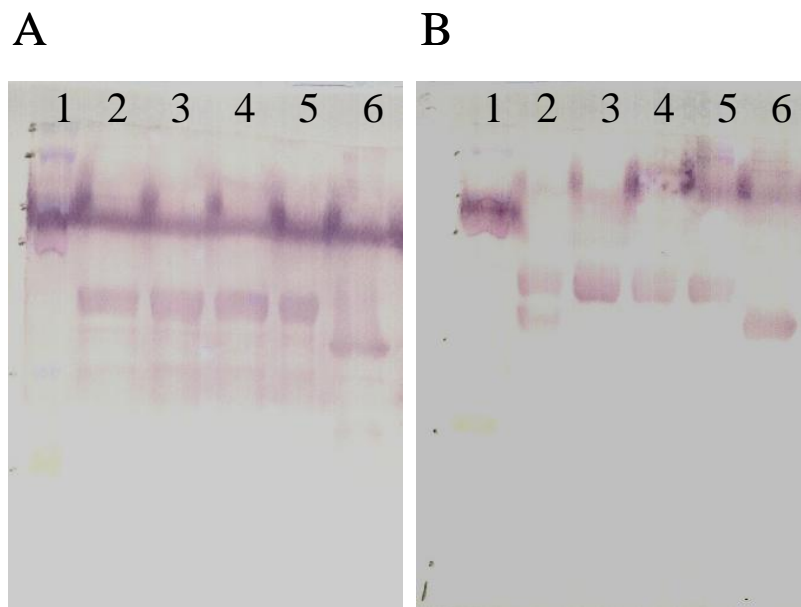


Figura 13. Análisis por Western Blot. El panel A corresponde al western blot de un gel SDS-PAGE con muestras tratadas con mercaptoetanol y calor: 1) Marcadores, 2) Concentrado, 3) DEAE-Sepharose, 4) Sephadex G-200, 5) Sephadex G-200 Tratada sin glicosidasa 6) Sephadex G-200 Deglicosilada. El panel B muestra a las mismas muestras no tratadas.

8.4. Análisis de secuencias

8.4.1. Secuencias de Lac60 y Lac70

A partir de extractos crudos de *T. maxima* CU1 se purificaron dos lacasas, Lac60K y Lac70K, las cuales fueron secuenciadas en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Los péptidos obtenidos de estas proteínas por el análisis de LC-MS/MS fueron los mismos para ambas fracciones. Esto sugiere esto que se trata de la misma cadena proteica y que la discrepancia en la talla se debe a diferentes grados de glicosilación, por lo que las dos bandas de lacasa observadas corresponden a dos glicofomas presentes en el extracto y que migran como una sola fracción cromatográfica en las separaciones de intercambio iónico y filtración en gel.

Para ambas glicoproteínas se obtuvieron ocho fragmentos distintos que se muestran en la figura 12, mientras que los resultados completos de los péptidos de cada una de ellas se presentan en el anexo II.

Lac 60K

- 1) R.GPFVVYDPNDPHASR.Y
- 2) R.SAGSTVYNYDNPIFR.D
- 3) R.ANPNFGNVGFDGGINSAILR.Y
- 4) R.YSFVLDANQAVDNYWIR.A
- 5) R.YDVDNDDTVITLADWYHTAAK.L
- 6) R.YSFTLNANQAVDNYWIR.A
- 7) R.YDVDNDDTTITLADWYHTAAK.L
- 8) GIGPVADLTITNAAVSPDGFSR.Q

Lac 70K

- 1) R.GPFVVYDPNDPHASR.Y
- 2) R.SAGSTVYNYDNPIFR.D
- 3) R.ANPNFGNVGFDGGINSAILR.Y
- 4) R.YSFVLDANQAVDNYWIR.A
- 5) R.YDVDNDDTVITLADWYHTAAK.L
- 6) R.YSFTLNANQAVDNYWIR.A
- 7) R.YDVDNDDTTITLADWYHTAAK.L
- 8) GIGPVADLTITNAAVSPDGFSR.Q

Figura 14. Péptidos de las Glicofomas de Lacasa. Se presentan los diferentes fragmentos péptidos de cada una de las glicofomas obtenidas del análisis por LC-MS/MS.

8.4.2. Comparación de secuencias con *Cerrena maxima*

Una vez analizados los fragmentos de la cadena peptídica de la lacasa de *T. maxima* CU1, se compararon los ocho fragmentes con la secuencia reportada para *Cerrena (Trametes) maxima*. De 117 aminoácidos alineados, 8 de la lacasa nativa fueron diferentes a la secuencia reportada (alrededor del 7%). Estos resultados se presentan en la figura 13, además se resaltan en la secuencia de *C. maxima* las regiones involucradas en la unión y estabilidad de los centros de cobre, aún cuando ninguno de los fragmentos obtenidos coincide con estas regiones.

```

1  gvgpvadnti tnaatspdgf srqavvngv tpgplvagni gdrfqlnvid nlnhtmlkt
   gvgpvadnti tnaavspdgf srq

61  tsvhwhgffq qgtnwadgpa finqcpispq hsflydfqvp nqagtfwyhs hlstqycdgl

121 rgpfvvydnp dphasrydvd nddttitlad wyhtaaklqp afpngadstl ingkgrapsd
    rgpfvvydnp dphasrydvd nddttitlad wyhtaakl

181 ssaqlsvsvv tkgkrxrfrl vslscdpnft fsidghnnti ietdsvnsqp lntdsiqifa

241 aqrysftlna nqavdnywir anpnfngvvgf  ngginsailr ydgapavept tnqststqpl
    rysfvlca nqavdnywir anpnfngvvgf  dgginsailr y

301 netnlhplvs tppvpgspaag gvdkainmaf nfngsnffin gasftppsvp vllqilsgaq

361 taqdllpsgs vxtlpsnasi eisfpataaa pgaphpfhllh ghvfavvrsa gstvynysnp
                                           rsa gstvynychnp

421 ifrdvstgt paagdntir fltnnpgpwf lhchidfhle ggfavvqaed vpdvkatnpv
    ifrd

481 pqawsdlcpt ydanapsdq

```

Figura 15. Comparación de secuencias entre cepas de *T. maxima*. La secuencia completa de *C. maxima* (Lyashenko *et al.*, 2006) se presenta en la parte superior, mientras que los fragmentos de *T. maxima* CU1 se muestran en la parte inferior. En negro se resaltan los cambios en la secuencia de aminoácidos de *T. maxima* CU1 y en gris las regiones correspondientes a los sitios de unión a los centros de cobre presentes en *C. maxima*.

8.4.3. Análisis de la secuencia amino terminal

Las proteínas muestran niveles altos de homología (100%) en el extremo amino con lacasas de *T. versicolor* (Bertrand *et al.*, 2002); y fue 91% igual a la de *T. trogii* (Matera *et al.*, 2007) y *Cerrena maxima* (Lyashenko *et al.*, 2006) esto acorde con la cercanía filogenética de los grupos.

En la tabla VI se presenta un comparativo entre los extremo amino terminal de *T. maxima* CU1 y algunas de las lacasas del género *Trametes*. Si bien se tratan de lacasas producidas por organismos de un mismo genero, las especies referidas en esta tabla, muestran variaciones entre las secuencias del extremo amino. Los aminoácidos más altamente conservados son la glicina, prolina y valina en la posición 3, 4 y 5, así como la

lisina en la posición 8. Por otro lado, estas secuencias pueden presentar cierta homología con lacasa de otros géneros debido a las regiones altamente conservadas de la lacasa (Thurston, 1994).

Tabla VI. Comparación entre los extremos amino terminal entre lacasa de diferentes especies de *Trametes*.

| Microorganismo | Secuencia N-terminal |
|--------------------------------------|----------------------|
| <i>Trametes villosa</i> lacasa I | GIGPVADLTITNAAV |
| <i>Trametes villosa</i> lacasa II | AIGPVASLVVANAPV |
| <i>Trametes villosa</i> lcc3 | SIGPVTELDIVNKVI |
| <i>Trametes villosa</i> lcc4 | AIGPVTDLTISNGDV |
| <i>Trametes villosa</i> lcc5 | AIGPVTDLTISNADV |
| <i>Trametes versicolor</i> lacasa I | AIGPVASLVVANAPV |
| <i>Trametes versicolor</i> lacasa II | GIGPVADLTITNAAV |
| <i>Trametes versicolor</i> laccIIIc | GIGPVADLTITNAEV |
| <i>Trametes</i> sp <i>LccII</i> | AVG-EADLTITNAVV |
| <i>Trametes</i> sp Lacasa II | SIGPVADMTISNAEV |
| <i>Trametes</i> sp Lacasa III | AVGPVTDLTISNANV |
| <i>Trametes trogii</i> | AIGPVADLVISNGAV |
| <i>Trametes maxima</i> | GIGPVADLTITNAAV |

Los datos de la secuencia N-terminal de *T. villosa*, *T. versicolor*, *Trametes* sp., y *T. trogii* fueron tomadas del trabajo de Mansur *et al* 2003.

8.5. Estimación del peso molecular

Como se mencionó anteriormente, las lacasas poseen tallas moleculares que oscilan entre los 45 y 110 kDa, sin embargo, estas diferencias en las tallas se han atribuido más

al grado de glicosilación que a diferencias en las cadenas peptídicas ya que las secuencias de las lacasas son altamente conservadas (Thurston, 1994).

En SDS-PAGE se revelan dos bandas de actividad lacasa cuyo peso molecular relativo se estimó en 71 y 62 kDa, las cuales al ser tratadas con una glicosidasa migran como una sola banda de 61kDa. Por LC-MS/MS el peso fue estimado en 56 kDa, mientras que en las columnas en filtración en gel se observaron variaciones en la talla dependiendo del tamaño del corte y del tipo de matriz (Tabla VII). Estas variaciones pueden deberse a interacciones que se ejercen entre los carbohidratos y el soporte. Por lo tanto el porcentaje de glicosilación de Lac 70K y Lac 60K es de 14 y 1.6 respectivamente.

Para la estimación de la talla molecular por filtración en gel, se calibraron las columnas con los estándares de Sigma. En la figura 15 se muestra los datos de calibración de la columna Sephacryl S-200 HR, así como la estimación de la talla molecular relativa de la lacasa de *T. maxima* CU1.

Tabla VII. Peso molecular de la lacasa de *T. maxima* CU1.

| Método | PM (kDa) |
|--------------------------|----------|
| LC-MS/MS | 56 |
| SDS-PAGE | 71 62 |
| SDS-PAGE (Deglicosilada) | 61 |
| Biogel P-100 | 52 |
| Sephacryl S-200 HR | 63 |

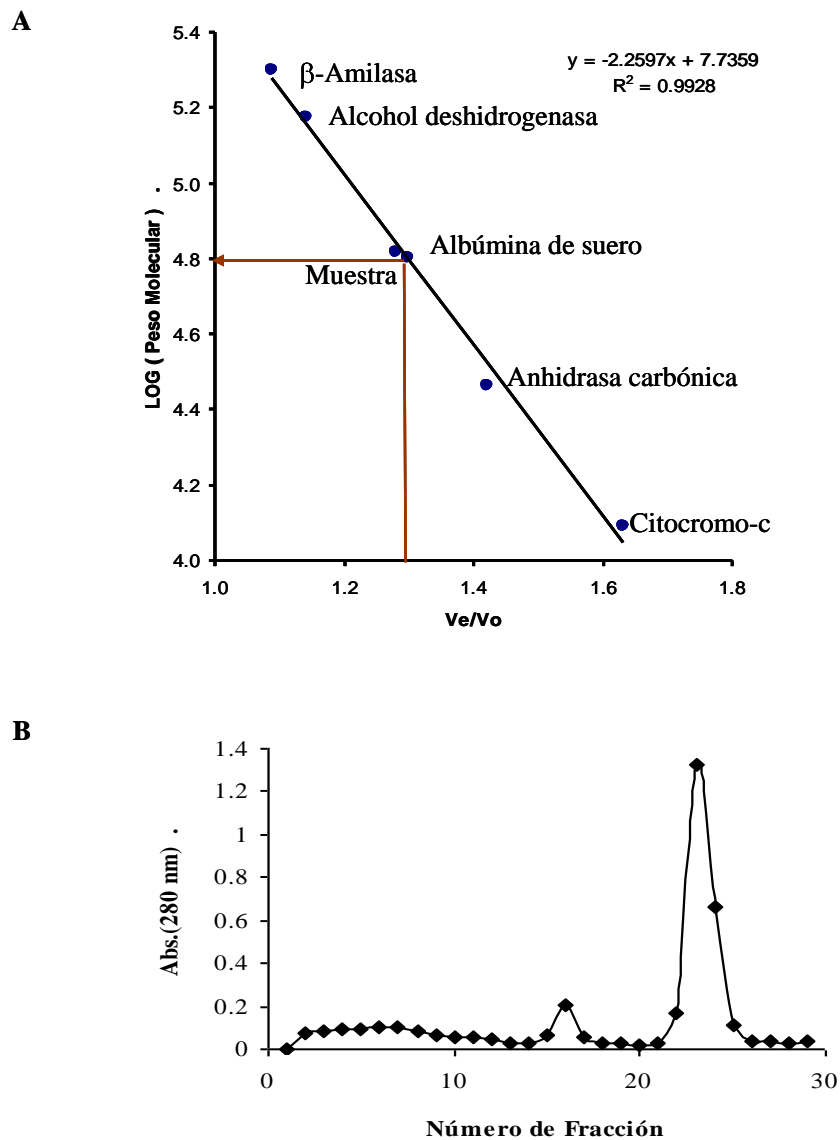


Figura 16. Estimación de la talla molecular de la lacasa de *T. maxima* CU1 en Sephacryl S-200. En el panel A se muestra la calibración de la columna con los volúmenes de exclusión de los estándares y sus respectivos logaritmos de los pesos moleculares, así como el volumen de exclusión de la muestra. En el B se muestra la separación de la muestra en la columna una vez calibrada.

8.6. Espectro de Absorción

Las lacasas azules fúngicas típicas presentan un espectro característico, muestran un pico en la zona de 605 nm que indica la presencia del centro de cobre tipo I, el cual es responsable del color azul (Kololojva-Skorobogat'ko *et al.*, 1998; Coll *et al.*, 1993). Otro pico es detectado en la zona de 330 nm, relacionado con el centro binuclear de cobre tipo III (Thurston, 1994). El coeficiente de extinción molar para el cobre tipo I de *T. maxima* CU1 a 605 nm fue de $5\,547\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, un valor muy similar al reportado para la lacasa de *Marasmius quercophilus*, $5\,200\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Dedeyan *et al.*, 2000).

Otro parámetro de referencia para la purificación de la lacasa en la relación de absorbancia 280/605, la cual mientras más cercana se encuentre a 20, mayor es la pureza de la preparación de lacasa (Kim *et al.*, 2002). Para la preparación de glicofomas de *T. maxima* CU1, ésta relación fue 18. En la figura 14 se presenta el espectro de absorción de la lacasa de *T. maxima* CU1. La preparación de las glicofomas de lacasa exhibió las características antes descritas. La relación entre $A_{280/605\text{nm}}$ es 18, para otras lacasas se ha reportado un valor de 19 (Kim *et al.*, 2002), el cual da idea de la pureza de la lacasa mientras más cercano sea a 20. Para la caracterización fina de los centros de cobre será necesario estudio de resonancia de electrones.

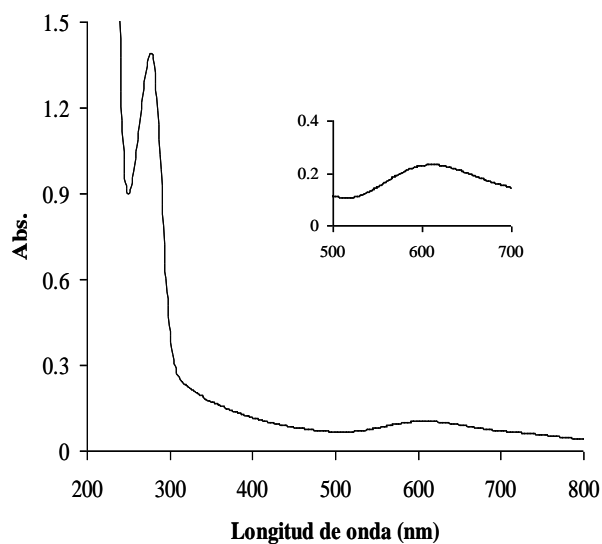


Figura 17. Espectro de Absorción. El espectro se realizó a una concentración de 150 μ M, considerando 61 kDa como su peso molecular.

8.7. Determinación del punto isoeléctrico

Para la determinación del pI se utilizó la técnica de cromatofoco, con un gradiente de pH de 7.0 a 3.0. El perfil obtenido muestra un solo pico de proteína con un pI de 4.4, lo que nuevamente confirma la presencia de dos glicofomas con igual cadena de aminoácidos y diferentes grados de glicosilación, las cuales solo pueden ser separadas por electroforesis (Figura 15). El valor del pI de la lacasa de *T. maxima* CU1 se encuentra en el rango ácido de pH al igual que el de lacasa de otras lacasas azules (Eggert *et al.*, 1996; Kololojva-Skorobogat'ko *et al.*, 1998).

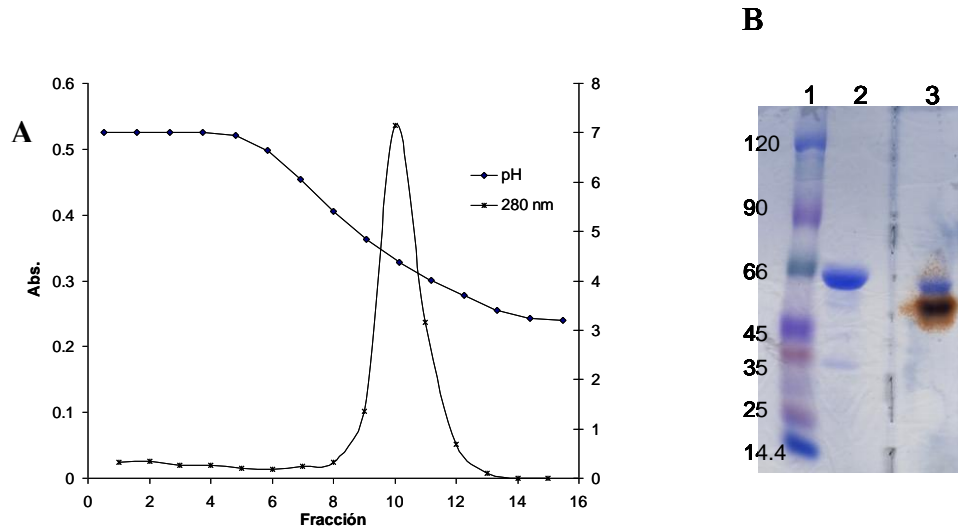


Figura 18. Cromatofoco. En el panel A se presenta el perfil obtenido del cromatofoco, donde el pI es estimado en 4.4. En el panel B se presenta en análisis SDS-PAGE de la fracción obtenida teñida con azul Coomassie, donde el carril 1 corresponde al marcador de peso molecular, el 2 a la fracción tratada con mercaptoetanol y calor, y 3 a la muestra no tratada. Todos los carriles fueron cargados con 25 μ g de proteína.

8.8. Caracterización de los parámetros operativos

8.8.1. Efecto del pH

El pH es uno de los parámetros importantes a considerar en la caracterización de una enzima, ya que éste influye en la actividad incrementándola o inhibiéndola. En el caso de las lacasas fúngicas, se ha observado que tiene pH óptimos ácidos sobre sustratos fenólicos (como el DMP), y pH cerca del rango neutro para sustratos no fenólicos (como la siringaldazina) (Baldrian, 2005).

Se determinó el pH óptimo para los sustratos comunes de lacasas como son el DMP, ABTS y siringaldazina, además de calcularlo para el par MBTH y DMAH que es un sustrato específico de MnP (Jordaan & Leukes 2003) y que es atacado por la lacasa de *T. maxima* CU1.

En el caso del DMP, tuvo un pH óptimo de 3.0, mostrando el típico trazo de campana; sobre el ABTS también fue de 3.0. Para la siringaldazina se registró su óptima actividad a pH 4.5 como se ha reportado para otras especies de *Trametes* (Baldrian 2004). El complejo En la figura 16 se presenta estos resultados.

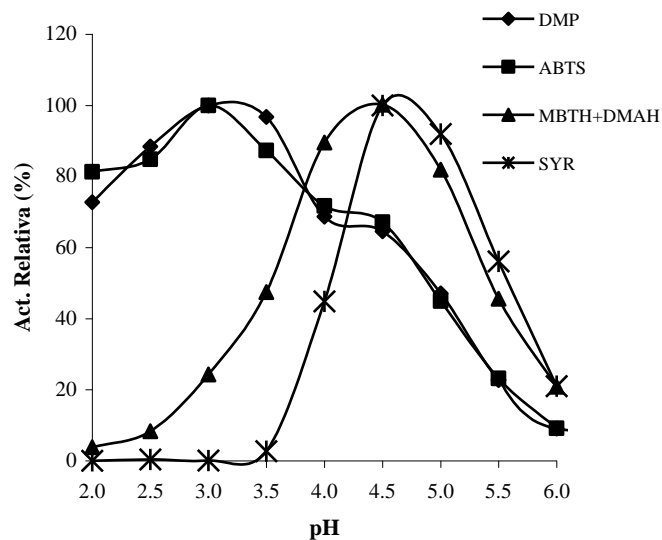


Figura 19. Determinación del pH óptimo. Los cursos temporales se llevaron a cabo en amortiguador de fosfato-citrato 100:50 mM, las mediciones con DMP se realizaron a 468 nm, para el ABTS 405 nm, para la siringaldazina 425 nm y para el par MBTH+DMAH 590 nm. Las determinaciones se realizaron por triplicado y con una desviación estándar menor al 5%.

Con respecto a la estabilidad de la actividad a diversos pH, la lacasa de *T. maxima* CU1 fue muy estable a pH 6.0 conservando el 100% de su actividad por 24 h. A pH 7.0 conservó el 98% de la actividad por 4 h. A pH 3, 4, 5 y 8 retiene entre el 85 y 75% de la actividad al ser incubada por 4 h (Figura 17). Este comportamiento se ha reportado para las lacasas azules fúngicas.

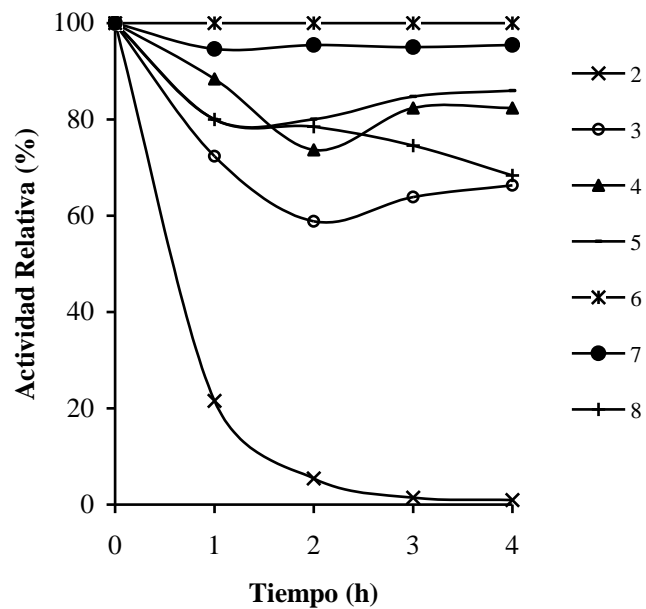


Figura 20. Estabilidad a pH. La incubación se realizó en amortiguador fosfato-citrato 100:50mM en el rango de pH de 2.0-8.0, mientras que la determinación se hizo en acetato de sodio 200mM, pH 3.5 sobre DMP. Los ensayos se realizaron por triplicado y con una desviación estándar menor a 5%.

8.8.2. Efecto de la temperatura

Al igual que el pH, la temperatura es un factor importante sobre la actividad enzimática, si bien puede ser favorable para el incremento de la misma o para su inactivación. Las lacasas fúngicas han sido reportadas como enzimas termoestables, ya que presentan temperaturas óptimas alrededor de 50°C, y conservar su actividad por más tres horas.

La lacasa de *T. maxima* CU1, mostró su máxima actividad a 50°C a pH 3.0 y 4.5; a 70°C es activa en un 85%. Con respecto a la estabilidad conservó el 82% de la actividad a 50°C por 5 horas, mientras que a 60°C sólo retienen el 10% de su actividad en ese periodo de tiempo. La vida media a 50°C se estimó en 52.5 horas, en tanto que a 60°C es de 4.8 h (Figura 18).

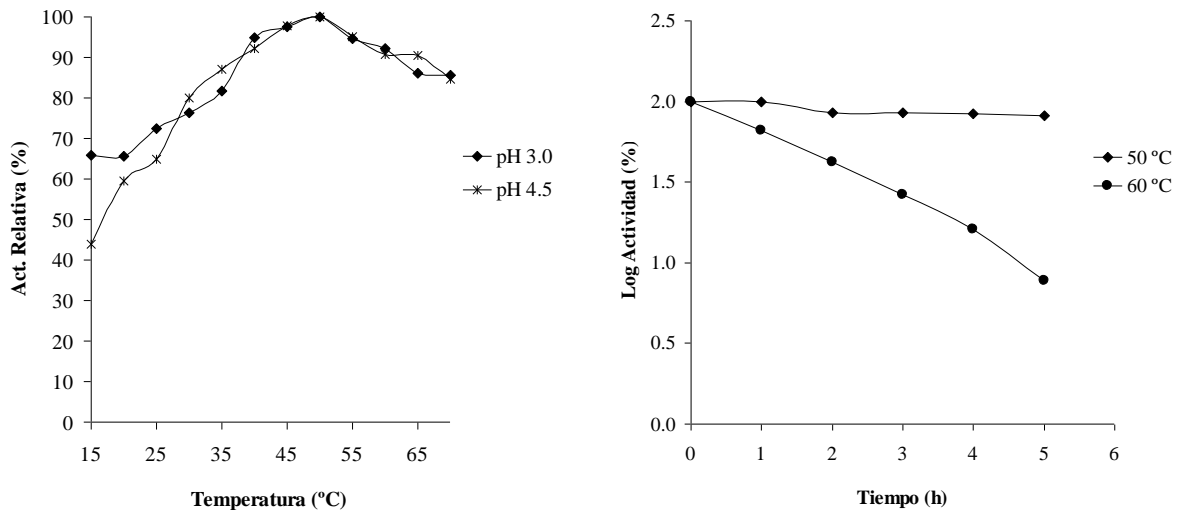


Figura 21. Efecto de la temperatura. A) Temperatura óptima de la lacasa de *T. maxima* CU1. Las incubaciones se realizaron en amortiguador fosfato-citrato 100:50 mM con DMP como sustrato, por triplicado y con una desviación estándar menor al 5%. B) Estabilidad a 50 y 60°C. Los ensayos se llevaron a cabo en amortiguador fosfato-citrato 100:50 mM, pH 3.0, sobre DMP, por triplicado con una desviación estándar menor al 5%.

8.9. Caracterización de las propiedades catalíticas

8.9.1 Constantes catalíticas

Se determinaron los valores de K_m y K_{cat} sobre dos sustratos típicos de lacasas, siringaldazina y dimetoxifenol, en acetato de sodio 200 mM, pH 3.0 (Tabla VIII). Los valores de K_m de *T. maxima* CU1 para siringaldazina (20 μ M) y DMP (74 μ M) se

encontraron en la zona baja del rango reportado para otras lacasas de diversos basidiomicetos (3400-4.5 μM para la siringaldazina y 14.72-0.015 mM para el DMP) (Baldrian, 2005). En el anexo II se presenta el análisis cinético para el DMP.

Con respecto al K_{cat} , el rango reportado para las lacasas fúngicas va desde 15 hasta 360 000 s^{-1} para estos sustratos. Los valores para *T. maxima* CU1 sobre la siringaldazina y DMP, fueron de 31 y 55 s^{-1} respectivamente, se ubican también en la zona baja del mencionado rango. En general, se han reportado variaciones importantes en los valores de estas constantes catalíticas, incluso para lacasas obtenidas de en diferentes cepas de una misma especie (Tinoco *et al.*, 2001).

Tabla VIII. Constantes cinéticas.

| Sustrato | K_m (μM) | V_{max} ($\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) | K_{cat} (s) | K_{cat}/K_m |
|----------------|----------------------------|--|------------------|-------------------|
| Siringaldazina | 20 | 1.5×10^{-5} | 55 | 2.7×10^6 |
| Dimetoxifenol | 74 | 8.5×10^{-6} | 31 | 4.4×10^5 |

8.9.2. Inhibidores

Se evaluó el efecto de algunos inhibidores reportados sobre la actividad de preparación de lacasa de *T. maxima* CU1 (Tabla IX). La azida y el fluoruro de sodio, junto con el SDS fueron los que mostraron mayor actividad inhibitoria sobre la lacasa a bajas concentraciones (0.1, 1 y 5 mM respectivamente). Alrededor del 50% de la actividad es inhibida a 1 y 5 del ácido tioglicólico y el cloruro de sodio. El DMSO no mostró efecto inhibitorio considerable, ya que solo afecta el 14% de la actividad a una concentración de 50 mM. Resultados similares se ha reportado para lacasas de algunas especies de *Trametes* (Xiao *et al.*, 2003)

Tabla IX. Efecto de Inhibidores.

| NaN ₃ [*] | | NaF [*] | |
|-------------------------------|----------------|------------------|----------------|
| [mM] | Inhibición (%) | [mM] | Inhibición (%) |
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.1 | 99 | 0.1 | 78 |
| 0.5 | 100 | 0.5 | 95 |
| 1 | 100 | 1 | 97 |
| | | 5 | 100 |

| NaCl [*] | | ATG [*] | |
|-------------------|----------------|------------------|----------------|
| [mM] | Inhibición (%) | [mM] | Inhibición (%) |
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.1 | 17 | 0.1 | 33 |
| 0.5 | 23 | 0.5 | 42 |
| 1 | 24 | 1 | 45 |
| 5 | 51 | 5 | 68 |
| 10 | 67 | 10 | 80 |
| 25 | 81 | 25 | 100 |
| 50 | 89 | | |

| SDS [*] | | DMSO [*] | |
|------------------|----------------|-------------------|----------------|
| [mM] | Inhibición (%) | [mM] | Inhibición (%) |
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.1 | 1 | 0.1 | 4 |
| 0.5 | 8 | 0.5 | 4 |
| 1 | 23 | 1 | 5 |
| 5 | 100 | 5 | 6 |
| | | 10 | 8 |
| | | 25 | 10 |
| | | 50 | 14 |

* Los ensayos fueron realizados en acetato de sodio 200 mM, pH 3.0, utilizando DMP como sustrato. Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado, con una desviación estándar menor al 5%.

8.10. Decoloración *in vitro*

8.10.1 Colorantes textiles

Una vez caracterizadas las propiedades de la lacasa de *T. maxima* CU1, se procedió a su aplicación en la degradación de colorantes textiles *in vitro*. Previamente se analizó el potencial de decoloración sobre 500 ppm de los colorantes de la cepa en medio sólido y líquido de Bran flakes® y Dhouib modificado. La mejor condición para la decoloración en fase sólida fue en medio BF, ya que se decoloraron eficientemente siete de los nueve colorantes probados (Anexo IV). En medio líquido, ocho de los nueve colorantes fueron decolorados en más del 80% en medio BF, a las 24 horas de ser agregados al medio a una concentración final de 50 ppm (Anexo V). En los cultivos líquidos, solo se detectó la actividad lacasa, a la cual se le ha atribuido la capacidad de actuar sobre colorantes sintéticos y otros xenobióticos (Higson, 1991). Por tal razón se llevó a cabo la purificación y caracterización de la lacasa de *T. maxima* CU1 para su aplicación directa sobre los colorantes textiles de alta demanda en nuestra región.

Para ello se prepararon mezclas de reacción con 50 ppm de cada uno de los colorantes en amortiguador fosfato-citrato 100:50 mM, a pH 3.0 y 5.0, incubándose a 50°C. También se llevó a cabo en agua bidestilada (pH 7.0), a temperatura ambiente. En el caso particular de esta lacasa, tiene un pH óptimo de 3.0, estable por 24 h a pH 5.0 y su temperatura óptima es de 50°C sobre DMP. Por lo que se buscaron las condiciones óptimas para la decoloración de la mayor cantidad de colorantes textiles. Sin embargo, dependiendo del grupo y de la solubilidad se favoreció la decoloración a un determinado pH y temperatura. Mientras que a pH 5.0 y 50 °C se decoloran más del 50% del DR60, RB5 y AB210. A pH 3.0 y 50°C se decoloró el DB45 y DO29, mientras que a pH 7.0 y 25°C solo se decoloró eficientemente (más del 95%) el RB19 (Tabla X). En el caso particular del DB22 ninguna de estas condiciones fue adecuada para su decoloración.

Las diferencias entre los porcentajes de decoloración de los cultivos completos y la enzima purificada, se pueden deber a que el hongo a nivel de cultivo puede producir

enzimas que sean complementarias a la actividad lacasa (Levin *et al.*, 2002), y/o metabolitos mediadores (Eggert *et al.*, 1996), que le permitan degradar más eficientemente el colorante.

Tablas X. Decoloración de colorantes industriales.

| Colorante | Decoloración (%) | | |
|-----------------------|------------------|---------|---------|
| | pH 3.0* | pH 5.0* | pH 7.0& |
| Azul Ácido 25 (ARN25) | 75 | 5 | 0 |
| Rojo Disperso 60 | 48 | 69 | 26 |
| Negro Ácido 194 | 80 | 95 | 87 |
| Negro Ácido 210 | 0 | 70 | 56 |
| Azul Reactivo 19 | 72 | 81 | 96 |
| Azul Disperso 79 | 45 | 15 | 12 |
| Naranja Disperso 29 | 89 | 6 | 6 |
| Negro Directo 22 | 0 | 0 | 5 |
| Negro Reactivo 5 | 70 | 82 | 40 |

* La incubación se llevo a cabo en amortiguador fosfato-citrato 100:50 mM a 50°C, con 50 ppm de cada uno de los colorantes.

& La incubación se llevo a cabo en agua bidestilada a temperatura ambiente, con 50 ppm tomadas de cada uno de los colorantes.

8.10.1 Mezcla de colorantes textiles

En la decoloración enzimática del efluente simulado, a diferencia de los resultados de los colorantes individuales, se observó una decoloración alrededor del 60% a pH 5.0 incubando a 50°C, y a pH 7.0 a temperatura ambiente (Figura 19). Esto se puede deber a que algunos de los colorantes susceptibles a la acción de lacasa pueden actuar como mediadores que oxiden a los colorantes que son más resistentes a la acción enzimática.

Con respecto al efecto del pH, además de afectar positiva o negativamente sobre la actividad enzimática, también modifica el espectro de absorción de la mezcla de colores

(Figura 20), sugiriendo que además de afectar la conformación de la proteína también afectaría la estructura de alguno de los colorantes.

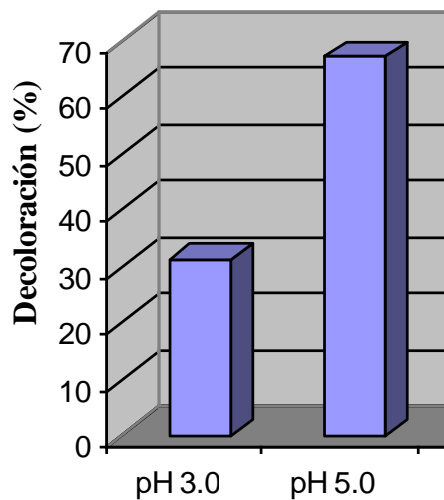


Figura 22. Decoloración enzimática de la mezcla de colorantes textiles. Los resultados que se muestran corresponden a 24 h de incubación con 10 U de lacasa. Las incubaciones a pH 3.0 y 5.0 se realizaron en Fosfato-citrato 150 mM a 50°C.

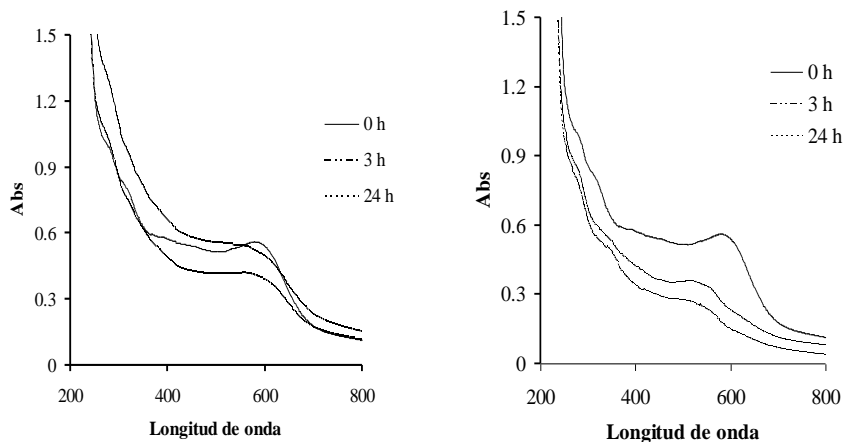


Figura 23. Espectro de Absorción la mezcla de colorantes textiles. Las mezclas de reacción contenían 10 U.I. de lacasa, 50 ppm de cada colorante. A) Incubación a pH 3.0 y 50°; B) incubación a pH 5.0 a 50°C.

9. Discusión

9.1. Producción

La cepa CU1 de *T. maxima* es un basidiomiceto nativo de Nuevo León, que previamente mostró la capacidad de degradar colorantes sintéticos asociada con la producción de lacasa en medio Bran Flakes (Hernández-Luna *et al.*, 2008). Estas condiciones de cultivo no son las óptimas para llevar a cabo la purificación de la lacasa, ya que en este medio produce una gran cantidad de pigmentos y carbohidratos que interfieren con los métodos de purificación. Por ello, los estudios de purificación de lacasa utilizan comúnmente medios a base de sales. Sin embargo, este tipo de medios requieren la presencia de inductores para estimular la producción de lacasa, como son el etanol, el ion cobre, la siringaldazina, el DMSO y los ácidos húmicos (Chefetz *et al.*, 1998; Heinzkill *et al.*, 1998; Koroljova *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 2003). Por tal razón, es necesario seleccionar y estandarizar las condiciones de crecimiento y producción de lacasa para cada organismo.

En el presente trabajo se usó una modificación del medio utilizado por Zouari-Mechichi *et al.* (2006). En dicho trabajo utilizan el sulfato de cobre (0.35mM) y el etanol (3% v/v) como inductores de la actividad lacasa en una cepa nativa de *Trametes trogii*, titulando 20 U/ml al día 9 de crecimiento. Bajo estas mismas condiciones, *T. maxima* CU1 produjo 6 U/ml al día 12. Este valor representa un incremento de 6 veces la producción con respecto a las unidades detectadas en medio Bran Flakes® y además se redujo considerablemente la presencia de pigmento en los concentrados de los sobrenadantes.

9.2. Purificación

Gran parte de los trabajos previos en los que se ha llevado a cabo la purificación de la lacasa, utilizan dos o tres pasos de cromatografía: intercambio iónico con una matriz DEAE principalmente para la remoción de pigmentos presentes en la muestra, seguido

de una filtración en gel y algunas veces, otro paso de intercambio iónico con una matriz Q para la resolución de isoformas presentes. Comúnmente este número de pasos son reportados como suficientes para la obtención de lacasas puras a homogeneidad (Froehner & Eriksson, 1974; Geiger *et al.*, 1986; Yaver *et al.*, 1996; Saparrat *et al.*, 2002; Galhaup *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2006).

En el caso de los extractos crudos de *T. maxima* CU1, fueron sometidos a diferentes protocolos de purificación, con uno o dos pasos cromatográficos sin que se obtuviera una preparación pura como es reportado. Aún más, en todos los casos se observó el mismo patrón de bandas en geles de SDS-PAGE, dos bandas principales que migran alrededor de los 60 y 70 kDa, así como bandas menores en la zona de 100, 35 y 25 kDa.

Una posibilidad para la presencia de estas bandas menores, es la heterogeneidad de la lacasa debida a su localización extracelular (Perry *et al.*, 1993). En este medio se encuentran actividades proteolíticas y glicosídicas (Word, 1985), las cuales pueden modificar la proteína a nivel de la cadena proteica o de los carbohidratos (Perry *et al.*, 1993).

Para eliminar la posibilidad de que estas bandas menores se tratasen de proteínas distintas o fragmentos de degradación de la lacasa, se levantaron anticuerpos contra la lacasa Lac 60K, sin embargo estos reaccionaron con todas las bandas presentes en el gel SDS-PAGE y nativos, sugiriendo que éstas (en el caso de la cercana a los 100 kDa) corresponde a algún precursor de la enzima y las menores se deben a artefactos en la separación del SDS-PAGE, ya que en las muestras no tratadas y en los geles nativos no se aprecian (Fig. 11).

Finalmente, una vez establecido el protocolo de purificación, este fue aplicado a extractos crudos de *Trametes hirsuta* CS5, *Pycnoporus sanguineus* CS43 y *Coriolopsis gallica*. En el caso de las cepas CS5 y CS43, se logró la purificación de dos isoformas de lacasa ya que mostraron diferencias en cargas y tallas moleculares, mientras que en *C. gallica* solo se obtuvo una. Sin embargo, en el análisis de componentes nuevamente se

presenta el mismo patrón que en *T. maxima* CU1: componentes menores en las zonas de 100 kDa, tanto en condiciones nativas como reductoras, y en la zona de 30 a 20 kDa bajo condiciones reductoras. Esto nos permite pensar que es un patrón típico en las purificaciones de lacasa que no ha sido descrito antes, por lo que se requiere profundizar en este sentido en futuros estudios.

9.3 Análisis de secuencia

Gracias a los resultados obtenidos de la secuenciación parcial de las isoformas principales de lacasa, así como de los resultados obtenidos en el Western Blot, el análisis del grado de glicosilación y el cromatofoco, nos permitieron concluir que las isoformas principales corresponden a glicofomas de la misma cadena peptídica, las cuales solo son separadas por electroforesis. De manera similar, las isoformas de lacasa de *C. subvermispora*, son definitivamente separadas mediante isoelectroenfoque preparativo (Fukushima *et al.*, 1995)

9.4. Caracterización Bioquímica

En lo referente a las propiedades de las glicofomas de *T. maxima* CU1, mostraron tallas moleculares, porcentajes de glicosilaciones, pI, espectro de absorción, pH y temperaturas óptimas, así como termotolerancia a 50°C que concuerdan con lo reportado para otras lacasas de este género (Yaver *et al.*, 1996; Koroljova-Skorobogat'ko *et al.*, 1998; Galhaup *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2003; Ham *et al.*, 2005). De igual manera, su secuencia amino terminal fue idéntica a la de *T. versicolor* (Bertrand *et al.*, 2002) y 91% a la de *T. troglia* (Matera *et al.*, 2007) y *Cerrena maxima* (Lyashenko *et al.*, 2006).

Por otra parte, sus características catalíticas (K_m y K_{cat}) para el DMP y la siringaldazina fueron similares a las de otras lacasas (Eggert *et al.*, 1996; Chefetz *et al.*, 1998; Saparrat *et al.*, 2002), aún cuando hay una gran arbitrariedad en cuanto a los coeficientes de

extinción molar, amortiguadores, longitudes de onda y unidades de expresión sobretodo para el ABTS y DMP (Heinskill *et al.*, 1998; Palmieri *et al.*, 2000; Mansur *et al.*, 2003; Abadulla *et al.* 2000; Saparrat *et al.*, 2002). Al igual que otras lacasas azules, fue fuertemente inhibida por la azida de sodio y el fluoruro de sodio (Périeré *et al.*, 1998).

Además de actuar sobre el rango clásico de sustratos de lacasas, ABTS, siringaldazina, guayacol y dimetoxifenol, fue capaz de actuar sobre sustratos reportados para peroxididasas como son el amino antipirina y el diclorofenol (Glenn & Gold, 1985) y el par MBTH + DMAB (Jordaan & Leukes, 2003). Lo cual sugiere que las glicofomas de *T. maxima* CU1 son de un alto potencial Redox. Esto concuerda con lo reportado por Morozova *et al.*, 2007.

9.5. Actividad sobre colorantes textiles

T. maxima CU1 fue aislada en los jardines de la Universidad Autónoma de Nuevo León, que mostró poseer un potencial ligninolítico y una habilidad de degradar colorantes sintéticos comparable al de *Phanerochaete chrysosporium* ATCC24725, asociado a la producción de lacasa (Hernández-Luna *et al.*, 2008). A nivel de medio sólido y cultivo líquido mostró la capacidad de degradar eficientemente cinco y ocho colorantes textiles de nueve probados. Sin embargo, al evaluar el actividad de la enzima pura estos mismos colorantes, observamos que los porcentajes de decoloración variaron dependiendo del pH y de la temperatura de incubación, así como del tipo de colorante. De manera general, el colorante de tipo tetraquizado (negro directo 22) fue el más recalcitrante, ya que bajo ninguna condición fue decolorado, caso contrario el de tipo antraquinónico, azul reactivo 19 que en cualquiera de las condiciones fue el más susceptible a la actividad de la lacasa. Por otro lado, no se observó una relación directa entre el tipo de colorante o el uso y la acción de la enzima.

Con este contexto se han realizado diversos estudios, el más claro ejemplo es el de Zouari-Mechichi y colaboradores (2006) donde además de evaluar la degradación de

colorantes textiles en medio sólido y con extractos crudos de un aislado de *T. trogii*, purifican y caracterizan su lacasa, y analizan su capacidad decolorante. En lo referente a la decoloración enzimática, a las 24 horas de incubación solo decoloran eficientemente (u más del 90%), dos de los seis colorantes probados; por lo que hacen uso de un mediador para incrementar los valores de decoloración a las 24 horas.

Este ejemplo nos sirve para validar el concepto de utilizar nuestro aislado como una alternativa en los procesos de biorremediación de este tipo de compuestos. Si bien, se requiere controlar las condiciones de temperatura o pH según el colorante (Tabla X), en la mezcla de estos nueve colorantes, la preparación enzimática fue más eficiente que con cada uno por separado. Esto puede atribuirse a que la lacasa puede generar radicales que actúen como mediadores (Thurston, 1994), en este caso un colorante susceptible (como lo sería el azul reactivo 19) al ser oxidado por la lacasa, actuaría sobre otro de los colorantes presentes en la mezcla. Sin embargo, este mecanismo requiere ser estudiado en posteriores estudios.

10. Conclusión

- ◆ La lacasa es la principal enzima extracelular producida por *Trametes maxima* CU1.
- ◆ Las dos formas principales de lacasas corresponden a glicoformas.
- ◆ Las glicoformas de lacasa solo son separadas por electroforesis.
- ◆ La preparación de lacasas muestran parámetros operativos típicos de las lacasas de basidiomicetos.
- ◆ La capacidad de degradar colorantes textiles y su mezcla *in vitro*, bajo diferentes condiciones de temperatura o pH, sustenta la aplicación de *Trametes maxima* (sus cultivos o sus lacasas) en procesos de biorremediación de estos compuestos.

10. FUTURAS INVESTIGACIONES

La Lacasa es una de las enzimas que a nivel industrial resulta muy interesante, ya que puede ser aplicada a diversos procesos. Muchos estudios de biorremediación se han enfocado en su capacidad de decoloración de efluentes impactados con colorantes sintéticos. Por lo que, es recomendable identificar la secuencia de los productos de oxidación de los colorantes textiles y monitoriar al mismo tiempo la disminución de la toxicidad.

Además, la realización de ensayos de decoloración con efluentes reales a mayor escala, con cultivos completos y con la enzima inmovilizada, es imperativa. Asimismo, detectar posibles mezclas de colorantes en las que al oxidarse uno o más de los componentes tenga un efecto sinérgico decolorante.

Por otro lado, y para un mejor conocimiento de nuestro sistema, es necesario identificar el gen o los genes involucrados en la síntesis de Lacasa de *T. maxima* CU1 y como se modifica su expresión en presencia de metales pesados como plomo, cromo y cadmio, así como de colorantes sintéticos presentes en las descargas de agua.

ANEXOS

Anexo I. Datos de secuenciación de las glicofomas de *T. maxima* CU1

Resultados de Lac 60K

gi|183178983 Mass: 56155 Score: 306 Queries matched: 15 emPAI: 0.34

| Query | Observed | Mr(expt) | Mr(calc) | Delta | Miss | Score | Expect | Rank | Peptide |
|-------|-----------|-----------|-----------|---------|------|-------|---------|------|---------------------------|
| 60 | 1670.0000 | 1668.9927 | 1669.7849 | -0.7922 | 0 | (9) | 2.7e+03 | 8 | R.GPFVVYDPNDPHASR.Y |
| 61 | 836.0039 | 1669.9933 | 1669.7849 | 0.2084 | 0 | 55 | 0.078 | 1 | R.GPFVVYDPNDPHASR.Y |
| 62 | 836.0039 | 1669.9933 | 1669.7849 | 0.2084 | 0 | (51) | 0.17 | 1 | R.GPFVVYDPNDPHASR.Y |
| 63 | 836.0039 | 1669.9933 | 1669.7849 | 0.2084 | 0 | (51) | 0.19 | 1 | R.GPFVVYDPNDPHASR.Y |
| 64 | 836.0039 | 1669.9933 | 1669.7849 | 0.2084 | 0 | (50) | 0.23 | 1 | R.GPFVVYDPNDPHASR.Y |
| 65 | 1703.0000 | 1701.9927 | 1702.7951 | -0.8024 | 0 | (15) | 7.2e+02 | 1 | R.SAGSTVYNYDNIPIFR.D |
| 66 | 852.0039 | 1701.9933 | 1702.7951 | -0.8018 | 0 | (43) | 1.2 | 1 | R.SAGSTVYNYDNIPIFR.D |
| 67 | 852.0039 | 1701.9933 | 1702.7951 | -0.8018 | 0 | (37) | 4.6 | 1 | R.SAGSTVYNYDNIPIFR.D |
| 68 | 852.6039 | 1703.1933 | 1702.7951 | 0.3982 | 0 | 73 | 0.00093 | 1 | R.SAGSTVYNYDNIPIFR.D |
| 69 | 853.0039 | 1703.9933 | 1702.7951 | 1.1982 | 0 | (70) | 0.0024 | 1 | R.SAGSTVYNYDNIPIFR.D |
| 70 | 853.0039 | 1703.9933 | 1702.7951 | 1.1982 | 0 | (56) | 0.063 | 1 | R.SAGSTVYNYDNIPIFR.D |
| 95 | 1017.0039 | 2031.9933 | 2032.0126 | -0.0194 | 0 | 34 | 9.3 | 1 | R.ANPFGNVGFDGGINSAILR.Y |
| 104 | 1038.0039 | 2073.9933 | 2072.9956 | 0.9977 | 0 | 80 | 0.00019 | 1 | R.YSFVLDANQAVDNYWIR.A |
| 123 | 1214.0039 | 2425.9933 | 2425.1074 | 0.8859 | 0 | (65) | 0.0045 | 1 | R.YDVDNDDTVITLADWYHTAAK.L |
| 124 | 1214.0039 | 2425.9933 | 2425.1074 | 0.8859 | 0 | 67 | 0.003 | 1 | R.YDVDNDDTVITLADWYHTAAK.L |

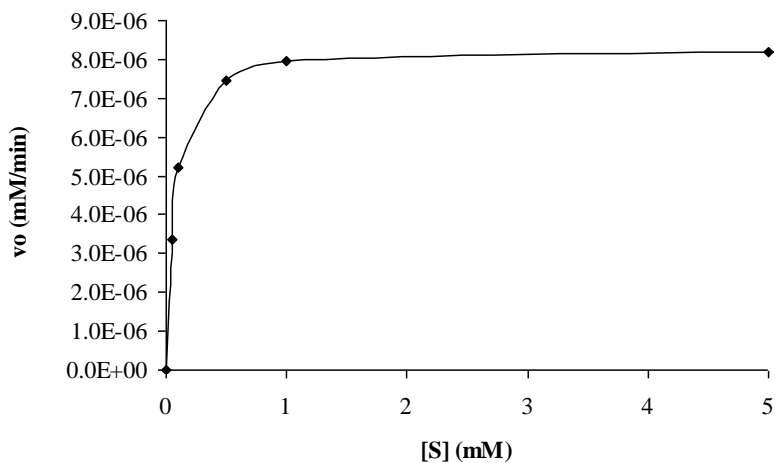
Resultados de Lac 70K

gi|183178983 Mass: 56155 Score: 306 Queries matched: 15 emPAI: 0.34

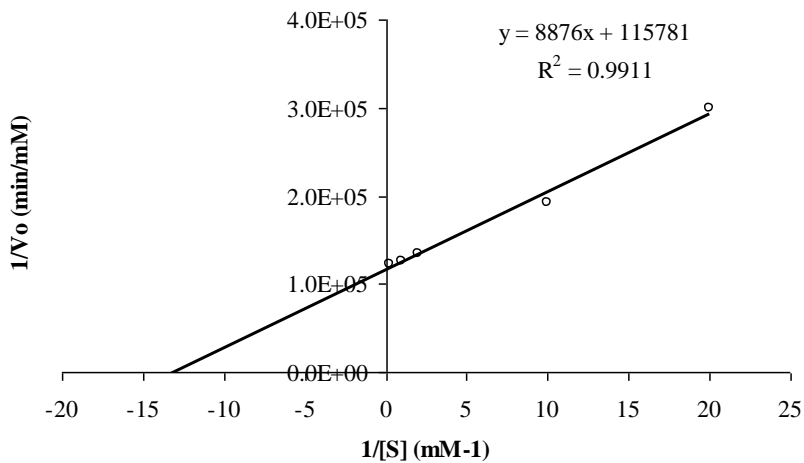
| Query | Observed | Mr(expt) | Mr(calc) | Delta | Miss | Score | Expect | Rank | Peptide |
|-------|-----------|-----------|-----------|---------|------|-------|---------|------|---------------------------|
| 59 | 1670.0000 | 1668.9927 | 1669.7849 | -0.7922 | 0 | (9) | 2.7e+03 | 8 | R.GPFVVYDPNDPHASR.Y |
| 60 | 836.0039 | 1669.9933 | 1669.7849 | 0.2084 | 0 | 55 | 0.078 | 1 | R.GPFVVYDPNDPHASR.Y |
| 61 | 836.0039 | 1669.9933 | 1669.7849 | 0.2084 | 0 | (51) | 0.17 | 1 | R.GPFVVYDPNDPHASR.Y |
| 62 | 836.0039 | 1669.9933 | 1669.7849 | 0.2084 | 0 | (51) | 0.19 | 1 | R.GPFVVYDPNDPHASR.Y |
| 63 | 836.0039 | 1669.9933 | 1669.7849 | 0.2084 | 0 | (50) | 0.23 | 1 | R.GPFVVYDPNDPHASR.Y |
| 64 | 1703.0000 | 1701.9927 | 1702.7951 | -0.8024 | 0 | (15) | 7.2e+02 | 1 | R.SAGSTVYNYDNIPIFR.D |
| 65 | 852.0039 | 1701.9933 | 1702.7951 | -0.8018 | 0 | (43) | 1.2 | 1 | R.SAGSTVYNYDNIPIFR.D |
| 66 | 852.0039 | 1701.9933 | 1702.7951 | -0.8018 | 0 | (37) | 4.6 | 1 | R.SAGSTVYNYDNIPIFR.D |
| 67 | 852.6039 | 1703.1933 | 1702.7951 | 0.3982 | 0 | 73 | 0.00093 | 1 | R.SAGSTVYNYDNIPIFR.D |
| 68 | 853.0039 | 1703.9933 | 1702.7951 | 1.1982 | 0 | (70) | 0.0024 | 1 | R.SAGSTVYNYDNIPIFR.D |
| 69 | 853.0039 | 1703.9933 | 1702.7951 | 1.1982 | 0 | (56) | 0.063 | 1 | R.SAGSTVYNYDNIPIFR.D |
| 92 | 1017.0039 | 2031.9933 | 2032.0126 | -0.0194 | 0 | 34 | 9.3 | 1 | R.ANPFGNVGFDGGINSAILR.Y |
| 101 | 1038.0039 | 2073.9933 | 2072.9956 | 0.9977 | 0 | 80 | 0.00019 | 1 | R.YSFVLDANQAVDNYWIR.A |
| 118 | 1214.0039 | 2425.9933 | 2425.1074 | 0.8859 | 0 | (65) | 0.0045 | 1 | R.YDVDNDDTVITLADWYHTAAK.L |
| 119 | 1214.0039 | 2425.9933 | 2425.1074 | 0.8859 | 0 | 67 | 0.003 | 1 | R.YDVDNDDTVITLADWYHTAAK.L |

Anexo II. Análisis cinético de la lacasa de *T. maxima* CU1.

A

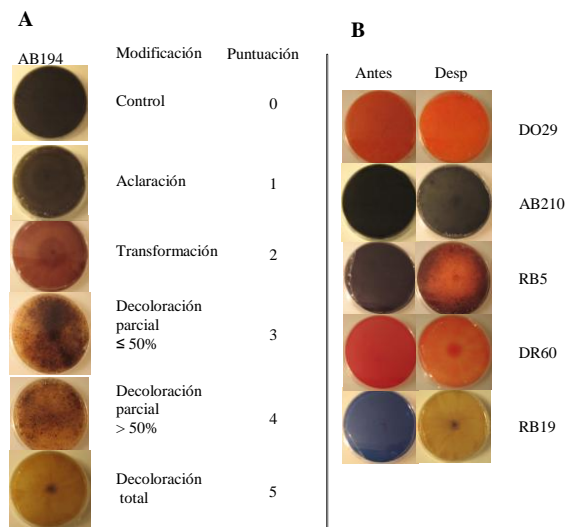


B



En el panel A se presenta el análisis por Michaelis-Menten y en el panel B se muestra el análisis por Lineweaver-Burk para el cálculo de K_m y K_{cat} para el DMP en acetato de sodio 200 mM, ajustado a pH 3.0.

Anexo III. Decoloración en medio sólido

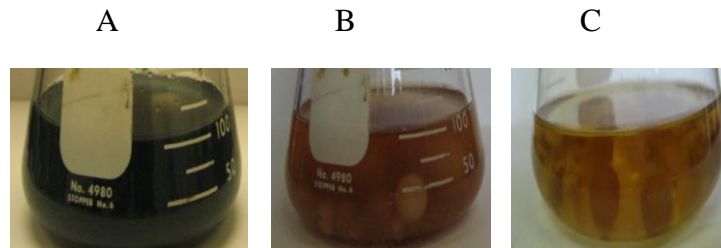


Escala de decoloración y su aplicación a los diferentes colorantes. Panel A: Diferentes grados de decoloración (puntuación) para el Negro Ácido 194. Panel B: Algunos ejemplos de la aplicación de la escala para diferentes colorantes. Controles (antes), resultados de decoloración (después).

| | Muy bajo (<5) | Bajo (6-8) | Medio (9-11) | Alto (12-15) |
|----|------------------------------|----------------|-----------------|-------------------------------------|
| BF | DO29 | DB79 | AB194 AB210 | AB25 DB22 DR60 RB19 RB5 |
| KM | AB25 DB79 DB22 DO29 | AB194 AB210 | DR60 RB5 | RB19 |

Resultados de decoloración de *Trametes maxima* CU1 en medios sólidos.

Anexo IV. Decoloración en medio líquido



Decoloración en medio líquido por CU1. A) Cultivo con RB19 al tiempo 0 de adición de 50 ppm del color, B) cultivo a una hora de incubación en medio BF, y C) cultivo a una hora en medio KM

| Colorante | BF | KM |
|-----------|----|----|
| DR60 | 99 | 76 |
| RB5 | 96 | 94 |
| AB194 | 94 | 92 |
| DB79 | 89 | 41 |
| DO29 | 83 | 54 |
| RB19 | 82 | 65 |
| DB22 | 82 | 21 |
| AB210 | 80 | 57 |
| AB25 | 40 | 1 |

Los resultados se expresan en porcentajes, a tiempo de incubación de 24 horas.

LITERATURA CITADA

Abadulla E, Tzanov T, Costa S, Robra K, Gübitz G. 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:8:3357-3362.

Asgher M, Shah SAH, Ali M, Legge RL. 2006. Decolorization of some reactive textile dyes by white rot fungi isolated in Pakistan. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 22:89-93.

Baldrian P. 2004. Purification and characterization of Laccase from the white-rot fungus *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme. *Applied and Microbial Biotechnology*. 63:560-563.

Baldrian P. 2005. Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbial Review*. 1-28.

Banat IM, Nigam P, Singh D, Marchant R. 1996. Microbial decolorization of textile-dye containing effluents: a review. *Bioresource Technology* 58:217-227.

Bao W, O'Malley DM, Whetten, R, Sederoff RR. 1993. A laccase associated with lignification in *Loblolly* pine xylem. *Science* 260:672-674.

Bertran G. 1985. Sur la laccase et sur le pouvoir oxydant de cette diastase. *CR. Académie des sciences (Paris)* 120:266-269.

Bertrand T, Jolival C, Briozzo P, Caminade E, Joly N, Madzak C, Mougin C. 2002. Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry* 41: 7325-7333.

Bligny R, Douce R. 1983. Excretion of laccase by sycamore (*Acer pseudoplatanus*. L.) cell. Purification and properties of the enzyme. *Journal of Biochemistry*. 209:489-496.

Bollag JM, Leonowicz A. 1984 Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Applied and Environmental Microbiology*. 48(4):849-854.

Bu'Lock JD. 1967. Fungal metabolites with structural function. In *Essays in Biosynthesis and Microbial Development*. E.R. Squibb. Lectures on Chemistry of Microbial Products. pp1-18. New York: John Wiley & Sons.

Chandra FS, Ragauskas AJ. 2002. Evaluating laccase-facilitated coupling of phenolic acids to high-yield kraft pulp. *Enzyme and Microbial Technology* 30:855-861.

Chefetz B, Chen Y, Hadar Y. 1998. Purification and characterization of Laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(9):3175-3179.

Chen S, Ge W, Buswell JA. 2004. Biochemical and molecular characterization of a Laccase from the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *European Journal of Biochemistry* 271:318-328.

Chen S, Ma D, Ge W, Buswell J. 2003. Induction of laccase activity in the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *Microbiology Letters* 218: 143-148.

Coll PM, Fernández-Aballos J.M, Villanueva JR, Santamaria R, Pérez P. 1993. Purification and Characterization of a Phenoloxidase PM1 (CECT 2971). *Applied and Environmental Microbiology*. 59 (8):2607-2613.

D'Annibale A, Gelletti D, Felici M, Dimattia E, Giovannozzi-Sermanni G. 1996. Substrate specificity of laccase from *Lentinus edodes*. *Acta Biotechnologica* 16:257-270.

Dean JFD, Ericksson KEL. 1994. Laccase and the deposition of lignin in vascular plants. *Holzforschung* 48 (Suppl.):21-33.

Dedeyan B, Klonowska A, Tagger S, Tron T, Iacazio G, Gil G, Petit JL. 2000. Biochemical and molecular characterization of a Laccase from *Marasmius quercophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(3): 925-929.

Dhouib A, Hamza M, Zouari H, Mechichi T, Hmidi R, Labat M, Martinez MJ, Sayadi S. 2005. Screening for ligninolytic enzyme production by diverse fungi from Tunisia. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 21:1415-1423.

Durán N, Esposito E. 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B: Environmental* 28:(2):83-99

Durchschlag H, Christl R, Jaenicke R. 1991. Comparative determination of the particle weight of glycoproteins by SDS-PAGE and analytical ultracentrifugation. Springer Berlin / Heidelberg Volume 86.

Durchschlag H, Jaenicke R. 1997. SDS-electrophoresis of glycoproteins. *Chimica oggi* 15 (9-10):15-24

Edens WA, Goins TQ, Dooley D, Henson J. 1999. Purification and characterization of a secreted Laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(7):3071-3074.

Eggert C, Temp U, Eriksson KL. 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:4:1151-1158.

Enguita FJ, Martins LO, Henriques AO, Carrondo MA. 2003. Crystal structure of a bacterial endospore coat component: a laccase with enhanced thermostability properties. *Journal of Biological Chemistry* 278:19416-19425.

Faraco V, Giardina P, Sannia G. 2003. Metal-responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters. *Microbiology* 149:2155-2162.

Farnet AM, Criquet S, Pocachard E. 2002. Purification of a new isoform of laccase from a *Marasmius quercophilus* strain isolated from a cork oak litter (*Quercus subre* L.). *Mycologia*. 94(5):735-740.

Felby C, Pedersen LS, Nielsen BR. 1997. Enhanced auto adhesion of wood fibers using phenol oxidases. *Holzforschung* 51:281-286.

Ferraroni M, Dichi I, Myasoedova NM, Leontievsky AA, Golovleva LA, Scozzafava A, Briganti F. 2005. Crystallization and preliminary structure analysis of the blue laccase from the ligninolytic fungus *Panus tigrinus*. *Structural Biology and Crystallization Communications* 61:205-207.

Ferraroni M, Myasoedova NM, Schmatchenko V, Leontievsky AA, Golovleva LA, Scozzafava A, Briganti F. 2007. Crystal structure of a blue laccase from *Lentinus tigrinus*: evidences for intermediates in the molecular oxygen reductive splitting by multicopper oxidase. *BMC Structural Biology* 7:60.

Field JA, Jong E, Costa F, de Bont, JAM. 1993. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends Biotechnol* 11:44-49.

Froehner SC, Eriksson KE. 1974. Purification and properties of *Neurospora crassa* Laccase. *Journal of Bacteriology*. 120(1):458-465.

Fu Y. 2001. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Bioresource Technology* 79:251-262.

Fukushima Y, Kirk TK. 1995. Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispora* lignin-degrading system. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(3):872-876.

Galhault C, Goller S, Peterbauer CK, Stratuss J, Haltrich D. 2002. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology* 148:2159-2169.

Garfin D E. 1990. *Methods in Enzymology*. Academic Press Inc. 182:425

Geiger JP, Rio B, Nandris D, Nicole M. 1986. Laccase of *Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 12:121-133

Ganesa C, Fox MT, Flurkey WH. 1992. Microheterogeneity in purified broad bean polyphenol oxidase. *Plant Physiology* 98:472-479.

Giardina P, Cannio R, Martirani L, Marzullo L, Palmieri G, Sanna G. 1995. Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 61(6):2408-2413.

Giardina P, Palmieri G, Scaloni A, Fontanella B, Farazo V. 1999. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Journal* 341:655-663.

Gierer J, Opara AE. 1973. Studies of the enzymatic degradation of lignin. *Acta Chemica Scandinavica*. 27:2909-2922.

Gindilis A I. 1988. Physicochemical principles of catalysis by laccase from various sources. Dissertation for Candidate of Sciences (Chemistry) Moscow.

Givaudan A, Effosse A, Faure D, Potier P, Bouillant M, Bally R. 1993. Polyphenol oxidase from *Azospirillum lipoferum* isolates from the rhizosphere: evidence for a laccase-like non-motile strain of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiology Letters* 108:205-210.

Glenn JK, Gold MH. 1985. Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 242:329-3411.

Gomes SASS, Rebelo MJF. 2003. A New Laccase Biosensor For Polyphenols Determination. *Sensors* 3(6):166-175.

Gregory RP, Bendall DS. 1966. Studies with plant laccases: I. Comparison of plant and fungal laccases. *Journal of Biochemistry, Mol.Biol.& Biophys* 3:45-51.

Gregory RP, Bendall DS. 1966. The purification and some properties of the polyphenol oxidase from tea (*Camellia sinensis* L.). *Journal of Biochemistry* 101:569-581.

Gutiérrez-Soto JG. (2004). Aislamiento y Selección de Cepas Nativas de Basidiomicetos Lignolíticos con Capacidad de Degradar Colorantes Sintéticos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas UANL. 73 p.

Hakulinen N, Kiiskinen LL, Kruus K, Saloheimo M, Paananen A, Koivula A, Rouvienen J. 2002. Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nature Structural Biology* 9(8):601-605.

Ham MJ, Choi HT, Song HG. 2005. Purification and characterization of Laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Journal of Microbiology*. 43(6):555-560.

Hao OJ, Kim H, Chiang PC. 2000. Decolorization of wastewater. *Crit. Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 30:449-505.

Harvey BM, Walter JRK. 1999. Studies with plant laccases: I. Comparison of plant and fungal laccases. *Journal of Biochemistry, Mol. Biol. & Biophys* 3:45-51

Heinzkill M, Bech L, Halkier T, Schneider P, Anke T. 1998. Characterization of laccase and peroxidase from wood-rotting fungi (Family *Coprinaceae*). *Applied and Environmental Microbiology*. 64(5):1601-1606.

Hernandez-Luna CE, Gutiérrez-Soto G, Salcedo-Martínez SM. 2008. Screening for decolorizing basidiomycetes in Mexico. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24:465-473

Higson FK. 1991. Degradation of xenobiotics by white rot fungi. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 122:111-152.

Hutterman A, Mai C, Kharazipour A. 2001. Modification of lignin for the production of new compounded materials. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55:387-394.

Jarosz-Wilkolazka A, Kochmańska-Rdest J, Malarczyk E, Wardas W, Leonowicz A. 2002. Fungi and their ability to decolourize azo and antraquinonic dye. *Enzyme Microbial Technology* 30:566-572.

Jordaan J, Leukes WD. 2003. Isolation of a thermostable laccase with DMAB and MBTH oxidative coupling activity from a mesophilic white rot fungus. *Enzyme and Microbial Technology* 33:212-219.

Jordaan J, Pleischke BI, Leukes, W.D. 2004. Purification and partial characterization of a thermostable Laccase from an unidentified basidiomycete.

Kiiskinen L, Rättö M, Kruus K. 2004. Screening for novel laccase-producing microbes. *Journal of Applied Microbiology* 97:640-646.

Kim Y, Cho NS, Eom TJ, Shin W. 2002. Purification and characterization of a Laccase from *Cerrena unicolor* and its reactivity in lignin degradation. *Bull. Journal of the Korean Chemical Society* 23(7):985-989.

Klonowska A, Gaudin C, Fournel A, Asso M, Petit JL, Giorgi M, Tron T. 2002. Characterization of a low redox potential laccase from the basidiomycete C30. *European Journal of Biochemistry* 269:6119-6125.

Ko EM, Leem YE, Choi HT. 2001. Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75:98-102.

Koroljova, OV, Stepanova EV, Gavrilova VP, Biniukov VI, Jaropolov AI, Varfolomeyv SD, Scheller F, Makower A, Otto A. 1999. Laccase of *Coriolus zonatus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 76:115-127.

Koroljova-Skorobogat'ko OV, Stepanova EV, Gavrilova VP, Morozova OV, Lubimova NV, Dzchafarova AN, Jaropolov AI, Makower A. 1998. Purification and characterization of the constitutive form of laccase from the basidiomycete *Coriolus hirsutus* and effect of inducer on laccase synthesis. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 28:47-54.

Kunamneni A, Ballesteros A, Plou FJ, Alcalde M. 2007. Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications. *Communicating Current Research and*

Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. A. Méndez-Vilas (Ed.)
©FORMATEX 2007. 233-245.

Leathman GF, Stahmann MA. 1981. Studies on the laccase of *Lentinus edodes*: specificity, localization and association with the development of fruiting bodies. *Journal of General Microbiology* 125:147-157.

Leonowicz A, Cho NS, Luterek J, Wilkolazka A, Wojtawasilewska M, Matuszewska A, Wesenberg D, Rogalski, J. 2001. Fungal laccase properties and activity on lignin. *Journal Basic of Microbiology* 41:185-227.

Leonowicz A, Cho NS, Luterek J, Wilkolazka A, Wojtawasilewska M, Matuszewska A, Hofrichter M, Wesenberg D, Rogalski J. 2001. Fungal laccase properties and activity on lignin. *Journal Basic of Microbiology* 41:185-227.

Leonowicz A, Edgehill RU, Bollag JM. 1984. The effect of pH on the transformation of syringic and vanillic acids by the laccases of *Rhizoctonia praticola* and *Trametes versicolor*. *Archives of Microbiology* 137:89-96.

Leonowicz A, Trojanowski J, Orlicz B. 1978. Induction laccase in basidiomycetes: apparent activity of the inducible a constitutive forms of the enzyme with phenolic substrate. *Act of Biochemistry of Poland* 25:369-378.

Leontievsky AA, Vares T, Lankinen P, Shergill JK, Pozdnyakona NN, Myasoedova NM. 1997. Blue and yellow laccases of ligninolytic fungi. *FEMS Microbiology Letters* 156:9-14.

Levin L, Forchiassin F, Ramos AM. 2002. Copper induction of lignin-modifying enzyme in the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Mycologia* 94(3):377-383.

Lu L, Zhao M, Zhang BB, Yu SY, Bian XJ, Wang W, Wang Y. 2006. Purification and characterization of laccase from *Pycnoporus sanguineus* and decolorization of an anthraquinone dye by the enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology* on line.

Liu W, Chao Y, Liu S, Bao H, Qian S. 2003. Molecular cloning and characterization of a laccase gene from the basidiomycete *Fomes lignosus* and expression in *Pichia psatoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63:174-181.

Lui L, Tewari RP, Williamson RP. 1999. Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. *Infection and Immunity* 67:213-224.

Lund M, Ragauskas AJ. 2001. Enzymatic modification of kraft lignin through oxidative coupling with water-soluble phenol. *Applied Microbiology and Biotechnology* 21:255-264.

Lyashenko AV, Zhukhilistova NE, Gabdoulkhakov AG, Zhukova YN, Voelter W, Zaitsev VN, Bento I, Stepanova EV, Kachalova GS, Koroleva OV, Cherkashyn EA, Tishkov AI, Lamzin VS, Schirwitz K, Morgunova EY, Betzel C, Lindley PF, Mikhailov AM. 2006. Purification, crystallization and preliminary X-ray study of the Laccase from *Cerrena maxima*. *Structural Biology and Crystallization Communications. Acta Crystallization Seccion I.F62*:954-957.

Mansur M, Arias ME, Copa-Patiño JL, Flärdh M, González AE. 2003. The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* laccase isozymes with different substrate specificities. *Mycologia* 95(6):1013-1020.

Marbach IH, Mayer AM. 1984. Molecular properties of extracellular laccase of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 23:2713-2717.

Matera I, Gullotto A, Tilli S, Ferraroni M, Scozzafava A, Briganti. 2007. Crystal structure of the blue multicopper oxidase from the white-rot fungus *Trametes trogii* complexed with *p*-toluate. *Inorganica Chimica Acta* 361(14-15):4129-4137.

Mayer AM, Staples RC. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60:551-565.

Mayer AM, Harel E. 1979. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* 18:193-215.

Messerschmidt A. (1997). Multi-copper oxidases. World Scientific, Singapore.

Michniewicz A, Ullrich R, Ledakowicz S, Hofrichter M. 2006. The white rot fungus *Cerrena unicolor* strain 137 produces two laccases isoforms with different physicochemical and catalytic properties. Applied Microbiology and Biotechnology. 69(6):682-688.

Min KL, Kim YH, Kim YG, Jung HS, Hah YC. 2001. Characterization of a novel Laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribus*. Archives of Biochemistry and Biophysics. 392(2):279-286.

Minussi RC, Pastore GM, Durán, N. 2002. Potential applications of laccase in the food industry. Trends in Food Science & Technology 13(6-7):205-216

Muñoz C, Guillén F, Martínez AT, Martínez MJ. 1997. Induction and characterization of laccase in the Ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. Current Microbiology 34:1-5.

Nagai M, Kawata M, Watanabe H, Ogawa M, Saito K, Takesawa T, Kandam K, Sato T. 2003. Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis: purification and characterization of an intracellular laccase from *Lentinula edodes* fruit bodies. Microbiology 149:2455-2462.

Oda Y, Adachi K, Aita I, Ito M, Aso Y, Igarashi H. 1991. Purification and properties of Laccase excreted by *Pycnoporus coccineus*. Agricultural Biology and Chemistry 55(5):1393-1395.

Okamoto K, Ito Y, Schigematsu I, Yanagi SO, Yanase H. 2003. Cloning and characterization of a laccase gene from the white-rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Mycoscience 44:11-17.

Otterbein L, Record E, Chereau D, Herpoël I, Asther M, Moukha SM. 2000. Isolation of a new Laccase isoform from the white-rot fungi *Pycnoporus cinnabarinus* strain ss3. Canadian Journal Microbiology 46:759-763.

Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Fontanella B, Sannia G. 2000. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 66(3): 920-924.

Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Scaloni A, Cpasso A, Sannia G. 1997. A novel Laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biological Chemistry*. 272(50):31301-31307.

Pereira-Cavallazi JR, Almeida-Oliveira MG, Megumi-Kasuya MC. 2004. Laccase production by *Lepista sordida*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 35:261-263.

Pérez J, Martínez J, de la Rubia T. 1996. Purification and partial characterization of a Laccase from the white rot fungus *Phanerochaete flavidobrunnea*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(11):4263-4267.

Périé FH, Reddy VB, Blackburn NJ, Gold MH. 1998. Purification and characterization of Laccases from the white-rot basidiomycete *Dichomitus squalens*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 353(2):349-355.

Perry CR, Matcham SE, Wood DA, Thurston CF. 1993. The structure of laccase protein and its synthesis by the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Journal General of Microbiology* 19:171-178.

Pickard MA, Vandertol H, Roman R, Vazquez-Duhalt R. 1999. High production of ligninolytic enzymes from white rot fungi in cereal bran liquid medium. *Canadian Journal of Microbiology*. 45: 627-631.

Piontek K, Antorinis M, Chonowski T. 2002. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *The Journal of Biological Chemistry* 277(40):37663-37669.

Ranocha P, McDougall G, Hawkins S, Sterjiades R, Borderies G, Stewart D, Cabanes-Macheteau M, Boudet AM, Goffner D. 1999. Biochemical characterization, molecular

cloning and expression of laccase –a divergent gene family- in poplar. *European Journal of Biochemistry* 259:458-45.

Reinhammar B, Malmström BG. 1981. Blue copper-containing oxidases. In *Copper proteins (metal ions in Biology, vol. 3)*, pp109-149. Edited by T.G. Spiro. New York: John Wiley & Sons.

Robinson T, Chandran B, Nigam. 2001. Studies on the production of enzymes by white-rot fungi for decolourisation of textile dye. *Enzyme and Microbial Technology* 29:575-579.

Saparrat MC, Guilén F, Aramabarri AM, Martínez A, Martínez M J. 2002. Induction, isolation and characterization of two laccase from the white rot basidiomycete *Coriolus rigida*. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:8:1534-1540.

Sato Y, Sederoff R, Whetten R. 2001. Molecular cloning and expression of eight cDNAs in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Journal of Plant Research* 114:147-155.

Schmidt O. 2006. *Wood and tree fungi: Biology, damage, protection, and use*. Ed. Springer Pp334.

Servili M, De Estefano G, Piacquadio P, Sciancalepore V. 2000. A novel method for removing phenols from grape must. *American Journal of Enology and Viticulture* 51:357-361.

Shah V, Baldrian P, Eichlerova I, Dave R, Madamwar D, Nerud F, Gross R. 2006. Influence of dimethyl sulfoxide on extracellular enzyme production by *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnology Letters* 28: 651–655

Slomczynski D, Nakas JP, Tanenbaum SW. 1995. Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea* 61-34. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61:907-912.

Smirnov SA, Koroleva OV, Vavilova VP, Belova AB, Klyachko NL. 2001. Laccases from basidiomycetes: physicochemical characteristics and substrate specificity towards methoxyphenolic compounds. *Biochemistry (Mosc)* 66:774-779.

Soden DM, Dobson ADW. 2001. Differential regulation of laccase genes expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology* 147:1755-1763.

Sviridov D, Meilinger B, Drake SK, Hoehn GT, Hortin GL. 2006. Coelution of other proteins with albumin during size-exclusion HPLC: implications for analysis of urinary albumin. *Clinical Chemistry* 52(3):389-397.

Swamy J, Ramsay JA. 1999. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. *Enzyme and Microbial Technology* 24:130-137.

Taniguchi VT, Malmström BG, Anson FC, Gray HR. 1982. Temperature dependence of the reduction potential of blue copper in fungal laccase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Chemistry* 79:3387-3389.

Thiele DJ. 1992. Metal-regulated transcription in eukaryotes. *Nucleic Acids research* 20:1183-1191.

Thurston CF. 1994. The structure and Fungal laccases. *Journal of Microbiology* 140:19-26.

Tinoco R, Pickard MA, Vazquez-Duhalt R. 2001. Kinetic differences of purified laccase from six *Pleurotus ostreatus*. *Letters in Applied Microbiology* 32:331-335.

Walter M, Guthrie JM, Sivakumaran S, Parker EM, Slade A, McNaughton D, Boyd-Wilson KSH. 2003. Screening of New Zealand native white-rot isolates for PCP degradation. *Bioremediation Journal*. 7(2):119-128.

Wang H, NG TB. 2006. Purification of a Laccase from fruiting bodies of the mushroom *Pleurotus eryngii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69(5): 521-525.

Williamson PR. 1994. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *Journal of Bacteriology*. 176:656-664.

Williamson PR. 1997. Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Frontiers in Bioscience* 199:E99-E107.

Wood DA. 1985. Production and roles of extracellular enzymes during morphogenesis of basidiomycete fungi. In *Developmental Biology of Higher Fungi* (British Mycological Society Symposium, vol 10), pp. 375-387. Edited by D. Moore, L.A. Casselton, D.A. Wood & J.C. Frankland. Cambridge: Cambridge University Press.

Worrell JJ, Chet I, Hüttermann A. 1986. Association of rhizomorph formation with laccase activity in *Armillaria spp.* *Journal General of Microbiology* 132:2527-2533.

Xiao YZ, Chen Q, Hang J, Shi YY. Selective induction, purification and characterization of a laccase isoenzyme from the basidiomycete *Trametes sp* AH28-2. *Mycologia* 96:26-35.

Xiao YZ, Tu XM, Wang J, Zhang M, Cheng Q, Zeng WY, Shi YY. 2003. Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a Laccase from basidiomycete *Trametes sp.* strain AH28-2. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60:700-707.

Xu F. 1997. Effects of Redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *Journal General of Microbiology* 272:924-928.

Xu F, Hong Y, Xiao Y, Fang W. 2007. Preparation and application of polyclonal antibody against a recombinant laccase. *Cellular & Molecular Immunology* 4(4):315-317.

Yaropolov AI, Skorobogat'ko OV, Vartanov SS, Varfolomeyev DS. 1994. Laccase: Properties, catalytic mechanism, and applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 49:257-280.

Yaver DS, Xu F, Golightly EJ, Brown KM, Brown SH, Rey MW, Schneider P, Halkier T, Mondorf K, Dalboge H. 1996. Purification, characterization, molecular cloning and expression of two Laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 62(3):834-841.

Yoshida H. 1883. Chemistry of Lacquer (Hurushi) part I. *Journal of Chemistry Society Tokyo* 43:472-486.

Younes SB, Mechichi T, Sayadi S. 2006. Purification and characterization of the Laccase secreted by the white rot fungus *Perenniporia tephropora* and its role in the decolorization of synthetic dyes. *Journal of Applied Microbiology* 103(4): 1033-1042.

Zhao J, Kwan HS. 1999. Characterization, molecular cloning, and differential expression analysis of laccase genes from the edible mushroom *Lentinula edodes*. *Applied and Environmental Microbiology* 65(11):4908-4913.

Zollinger H. 1991. *Color Chemistry*, 2nd Ed. VCH, Weinheim, Germany.

Zouari-Mechichi H, Mechichi T, Dhouib A, Sayadi S, Martínez AT, Martínez MJ. 2006. Laccase and characterization from *Trametes troglia* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*. 39:141-

RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Juanita Guadalupe Gutiérrez Soto

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: Purificación y Caracterización Parcial de las Lacasas de *Trametes maxima* CU1 y su Aplicación en la Degradación de Colorantes Textiles

Campo de
Estudio: Microbiología y Bioquímica

Datos
Personales:

Nacida en Monterrey, Nuevo León el 24 de Abril de 1981, hija de René Gutiérrez López y Margarita Soto.

Escolaridad:

Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, obteniendo el grado de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en Enero del 2004 y de Maestro en Ciencias con Especialidad de Microbiología en Julio del 2006 en la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

Experiencia
Persona:

Miembro del Laboratorio de Enzimología de la FCB-UANL desde Agosto del 2002 a la fecha. Durante el desarrollo de este proyecto, se realizó una colaboración con el Dr. Raúl Rodríguez Guerra del Campo Experimental General Terán, INIFAP durante la cual se enviaron dos trabajos a congresos nacional e internacional.

Screening for decolorizing basidiomycetes in Mexico

Screening and selection of ligninolytic basidiomycetes with decolorizing ability in Northeast Mexico

C. E. Hernández-Luna · G. Gutiérrez-Soto ·
S. M. Salcedo-Martínez

Received: 29 November 2006 / Accepted: 9 July 2007 / Published online: 17 August 2007
© Springer Science+Business Media B.V. 2007

Abstract A survey to isolate native white rot basidiomycetes from Northeast Mexico was conducted in the forests of the Sierra Madre Oriental in the state of Nuevo León. A total of 92 isolates from at least 20 different genera, were screened on Bran-Flakes solid plate cultures for the production of ligninolytic oxidases and/or peroxidases with guaiacol and o-anisidine as substrates; their lignin depolymerizing potential using the polymeric dye Poly R 478; their ability to decolorize anthraquinonic (Remazol Brilliant Blue Reactive), azo (Acid Red 44) and triphenylmethane (Crystal Violet) dyes. Among all fungi tested, 15 isolates showed extensive decolorization of the three dyes within a week and gave a positive reaction in guaiacol and o-anisidine tests. Nine of them were also efficient degraders of Poly R-478. Two isolates (CS5 and CU1) showed decolorization of all dyes within 5 days, comparing favorably with reference strains of *P. chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, and *Bjerkandera adusta*. Decolorization was associated with laccase activity in both isolates and reached 90% or more for all dyes within 24 h in 8-day-old liquid cultures. The coupling of pairs 2,4-dichlorophenol + 4-aminoantipyrine and 3-dimethylaminobenzoic acid + 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone, strongly suggest that the laccases of both strains correspond to those considered of high redox potential. These strains are considered good candidates for bioremediation of dye polluted effluents due to their ligninolytic potential and decolorizing performance.

Keywords Bioremediation · Dye decolorization · Laccase · Native basidiomycetes · *Phanerochaete chrysosporium*

Introduction

Colorants and dyestuff are used in food, pharmaceutical, cosmetic, paper, printing, leather, paint and many other industries as main ingredients or accessories to improve the durability and/or attractiveness of their products. It has been estimated that 80,000 tons of these compounds are dumped annually in wastewater worldwide (Heinfling et al. 1998); in Mexico, the textile and leather industries generate wastewaters with an estimate of 4,300 tons of dyes and colorants (INEGI 2001). In the aquatic ecosystems, dyes and colorants interfere with photosynthesis, affect the diffusion of gasses and are visible even in small concentrations, besides, they threaten human health due to the toxic aromatic structure of their chromophore and the possible transformation of some azo and nitro compounds into carcinogenic aromatic amines in anoxic environments (Baughman and Weber 1994; Chung et al. 1992).

Synthetic dyes are commonly recalcitrant substances designed to resist washing, solar light exposition and diverse chemical treatments, making their removal from waste water difficult and expensive (Hao et al. 2000). The white rot basidiomycetes are a group of ligninolytic fungi capable of decomposing synthetic compounds due to their structural similarities with lignin or its derivatives (Hofrichter 2002). Its use has been proposed as a promissory alternative to replace or supplement sewage treatment processes, with the advantages of growing on simple inexpensive media, having high production rate and biosorptive capacity (Zhang et al. 1999), and a lignin-degrading system (LDS) composed of

C. E. Hernández-Luna (✉) · G. Gutiérrez-Soto ·
S. M. Salcedo-Martínez
Laboratorio de Enzimología, Facultad de Ciencias Biológicas,
Universidad Autónoma de Nuevo León, Ave. Pedro de Alba S/N
Ciudad Universitaria, San Nicolas de los Garza, Nuevo Leon
C.P. 64450, Mexico
e-mail: carlosehlmx@yahoo.com

oxidoreductases capable of aerobically decomposing xenobiotic compounds commonly considered as recalcitrant, among them the synthetic dyes (Mester and Tien 2000; Pointing 2001).

Decolorizing ability of LDS of white rot fungi has been extensively studied only in a few strains of *Phanerochaete chrysosporium*, *Bjerkandera adusta*, *Coriolus versicolor*, and several species of *Pleurotus* and *Phlebia* (McMullan et al. 2001). But recent isolation of strains with a better color removal ability than reference strains (Tekere et al. 2001; Jarosz-Wilkolazka et al. 2002) directs worldwide attention towards the searching of autochthonous fungi belonging to different ecophysiological and taxonomic groups (Kiiskinen et al. 2004) for biotechnological application in bioremediation (Raghukumar 2000). Monterrey area, located in Northeast Mexico, is second place in industrial importance in the country and harbors important synthesis and dye using industries. Their wastewater must be decolorized and harmless before reaching the environment. In this work we used a simple screening plate system to look for native wood decay basidiomycete fungi in the lignin-rich hard-wood forests of the Sierra Madre Oriental around Monterrey, with the purpose of isolating and selecting strains with a comparable capacity to degrade synthetic dyes than international reference strains, making them potentially valuable in bioremediation.

Materials and methods

Chemicals

All chemicals used were reagent grade unless otherwise stated. The substrates: guaiacol, o-anisidine and Poly R-478 (PR); reagents 2,6-dimethoxyphenol (DMOP), 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazolinesulphonate) (ABTS), syringaldazine [N,N'-bis-(3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzylidene)hydrazine], 4-aminoantipyrine (4-AAP), 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP), 3-dimethylaminobenzoic acid (DMAB), 3-methyl-2-benzothiazoline hydrazone (MBTH), veratryl alcohol, and synthetic dyes Remazol Brilliant Blue R (RBBR), Acid Red 44 (AR44), and Crystal Violet (CV) were from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. Malt extract, yeast extract, glucose and agar for media from Difco and other chemicals and salts from CTR Mexico.

Culture media

All fungal strains were maintained at 4°C on YMGA (4 g yeast extract, 10 g malt extract, 4 g glucose, 15 g agar per liter). YMGA supplemented with 14 ml of 10% w/v Tartaric Acid and 4 mg Benomyl per liter (Isolation media)

was used to favor the growth of basidiomycetes. Bran-Flakes media (ligninolytic enzymes inducer media), consisting of 2% (w/v) Kellogg's Bran Flakes[®] in 60 mM Potassium Phosphate buffer pH 6.0, added with 1.5% (w/v) agar (Pickard et al. 1999) was used for the selection of the strains with the best ligninolytic potential and ability to decolorize the main groups of synthetic dyes. In liquid cultures agar was omitted from Bran Flakes media. All media were autoclaved at 121°C at 15 lb for 20 min.

Reference strains

Phanerochaete chrysosporium ATCC 24725, *Pleurotus ostreatus* ATCC 58053 and *Bjerkandera adusta* UAMH 8258 used as reference for this work were kindly provided by Dr. M. A. Pickard from the University of Alberta, Edmonton, Canada. Stock cultures were stored on YMGA plates at 4°C and periodically subcultured. They were reactivated on YMGA at 28°C before every assay.

Collection and isolation of native fungi

Fungal strains were isolated from fruiting bodies found on trees and decomposing logs and stumps in different biotopes around Monterrey, Northeast Mexico. The collecting focused mainly on well developed carpophores of white rot fungi from chaparral and gallery vegetation zones where Leguminosae and other hard wood trees were dominant, but oak-pine forests were also surveyed. Basidiocarps were transported in numbered paper bags to the laboratory and mostly processed immediately but sometimes were stored overnight at 4°C. Photographic records, phenotypical characteristics and measurements gathered in situ, along with sporeprints, microchemical reactions, and microscopical observations conducted in the laboratory helped in the identification to genus, or species when possible, following a manual with keys to the most common macromycetes from Mexico (Guzmán 1980). The most promising strains were identified by the Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands.

After washing the carpophores with sterile distilled water, tissue plugs around 2 mm diameter obtained from their inner tissue were disinfected in 3% hydrogen peroxide for 1 min, washed thoroughly in sterile distilled water and then transferred to Isolation media, incubated at 28°C in 90 mm diameter Petri dishes, and repeatedly transferred onto new plates until microscopical observation confirmed its purity, and presence of clamp connections confirmed the isolation of a basidiomycete (Thorn et al. 1996). The isolates were maintained and reactivated before every assay as described for collection strains.

Screening for ligninolytic enzyme activity and decolorizing potential

Our selection system consisted of the three substrates: Poly R-478 (PR), guaiacol and *o*-anisidine, used as indicators of ligninolytic potential and the three synthetic dyes: the anthraquinonic Remazol Brilliant Blue Reactive (RBBR), the azo Acid Red 44 (AR) and the triphenyl-methane Crystal Violet (CV) used to evaluate the decolorizing ability. Every isolate was evaluated for triplicate in the selection system, in 90 mm diameter Petri dishes inoculated with a 5 mm diameter plug taken from the periphery of a fresh culture. PR was added to media before sterilizing, the other substrates and dyes were added aseptically (Millipore 0.45 μm) to previously sterilized Bran Flakes media to a final concentration of 0.02%. Plates were incubated at 28°C and diameter growth, substrate reactions and decolorization were registered daily during the first 5–7 days and sporadically afterwards for 3 weeks. Substrate reactions were indicative of ligninolytic potential, if the production of extracellular oxidases and/or peroxidases was revealed by a colored zone developed around microbial growth (reddish-brown with guaiacol or purple with *o*-anisidine) and potential to break down lignin bonds was indicated by the depolymerization of PR (color change from pink to yellow) (Field et al. 1992). The extent of decolorization was assessed by visual examination of the decolorization area and quantitatively determined by assigning numbers 0–5 with decolorization maximum at 5.

Production of ligninolytic enzymes in liquid culture

Isolates with the best ligninolytic potential and decolorizing ability in plate assays, were cultured in liquid media to study the production of the tree major ligninolytic enzymes: namely, lignin peroxidase (EC 1.11.1.14, 1,2-bis(3,4-dimethoxyphenyl)propane-1,3-diol:hydrogen-peroxide oxidoreductase) (LiP), manganese peroxidase (EC 1.11.1.13 Mn(II):hydrogen-peroxide oxidoreductase) (MnP) and laccase (EC 1.10.3.2 benzenediol:oxygen oxidoreductase). Three 5 mm diameter cylinders of mycelium from each isolate were used to inoculate 100 ml Bran Flakes media in 250 ml Erlenmeyer flasks and the flasks were incubated for 20 days on a shaker at 28°C and 150 rev/min. Enzyme activity in submerged cultures was determined every other day by triplicate, using 100 μl samples from a 1 ml aliquot, taken from cultures and centrifuged at 14,000 rpm for 10 min (Eppendorf Centrifuge 5415c). The peaks of enzyme production were established from the graphs of enzyme activity with time.

Enzyme assays

Laccase activity was determined according to Heinzkill et al. (1998) following the formation of the green cationic radical of 2 mM ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid)-diammonium salt) at 405 nm ($\epsilon_{405} = 36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in 100 mM acetate buffer (pH 5.0). LiP activity was assayed according to Ramachandra et al. (1988) measuring the formation of the pink colored oxidation product between 1 mM 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) and 8.2 mM 4-aminoantipyrine (4-AAP) at 510 nm ($\epsilon_{510} = 18,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in 100 mM sodium succinate (pH 5.5). Reaction was initiated by the addition of H_2O_2 to a final concentration of 0.1 mM. LiP was also evaluated according to Tien and Kirk (1988) with 4 mM veratryl alcohol as substrate in the presence of 0.4 mM H_2O_2 . The assay was performed in 40 mM sodium tartrate (pH 3.0), and the change in absorbance was monitored at 310 nm ($\epsilon_{310} = 9,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). MnP was determined according to Wariishi et al. (1992) following the H_2O_2 -dependent formation of Mn(III)-malonate complex at 270 nm ($\epsilon_{270} = 11,590 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Reaction mixtures contained 0.2 mM MnSO_4 in 50 mM sodium malonate buffer (pH 4.5), and the reaction was initiated by the addition of H_2O_2 to a final concentration of 0.1 mM. All assays were performed at 25°C. One unit of enzymatic activity was defined as the amount of enzyme transforming 1 μmol of substrate per minute.

Assays for the verification of enzyme activities

Centrifuged samples obtained as described for monitoring the enzyme production, were used in a series of assays to confirm the enzyme activities present in 10-day-old cultures. A positive reaction with syringaldazine (Harkin et al. 1974) would confirm the laccase activity. LiP in the presence of H_2O_2 would react with veratryl alcohol (Tien and Kirk 1988) or couple the pair 2,4-DCP + 4-AAP, and the MnP activity would be revealed by the coupling of the pair 3-dimethylaminobenzoic acid (DMAB) + 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH) (Castillo et al. 1994) or by the formation of the Mn(III)-Malonate complex in the presence of Mn^{2+} and H_2O_2 .

A possible overlapping between laccases and peroxidases would be prevented by keeping the necessary requirements away from the latter or retrieving them from the assay media (Jordaan and Leukes 2003). In other series of assays, 8-day-old cultures were filtered successively through gauze and filter paper (Whatman # 1) and concentrated hundredfold by ultrafiltration (Amicon 10-kDa cut-off membrane) to obtain crude enzyme preparations. Using discontinuous native PAGE on 12% polyacrylamide

as separating gels (Garfin 1990), their activities were revealed using ABTS, 2,4-DCP + 4-AAP, and DMAB + MBTH as substrates without cofactors for peroxidases. Protein concentration was determined by the Bradford protein assay (Stoscheck 1990).

Determination of decolorizing ability

The decolorizing ability of selected strains in liquid cultures was evaluated on 0.02% RBBR, AR44 or CV supplemented at the time of inoculation. One ml samples of cultures were taken right after dye addition and then every other day, centrifuged (Eppendorf Centrifuge 5415c 14,000 rpm, 10 min) and the absorption spectra in the range 200–800 nm were recorded using a Shimadzu mini 1240 UV-VIS spectrophotometer. Color reduction was followed spectrophotometrically and decolorizing activity was calculated from the decrease in absorption of the peak maximum for each dye (592 for RBBR, 510 for AR44, and 588 for CV). Microbial decolorization was also assessed in 8-day-old liquid cultures. Dyes were supplemented after fungal growth and decolorization was measured every 2 h after dye addition. Additionally, to discard mycelia participation in decolorization, dyes (100 ppm) were added to 1 ml clear supernatants samples obtained from 8-day-old cultures (enzymatic decolorization). Absorption spectra were registered immediately after dye addition and after 12 h of incubation at 25°C. Percentage of decolorization was calculated as described above.

Results and discussion

Isolates screening for the best decolorizing ability and ligninolytic potential

A total of 92 native basidiomycetes from Northeast Mexico were isolated and their pure cultures were screened for decolorization, associating this ability to their ligninolytic potential. These strains were distributed mainly in the genera *Pycnoporus*, *Polyporus*, *Schizophyllum*, *Ganoderma*, *Trametes*, *Stereum*, *Chondrostereum*, *Inonotus*,

Phelinus, *Fomes*, *Daedalea*, *Trichaptum*, *Merulius*, *Irpex*, *Steccherium*, *Poria*, *Hexagonia*, *Ischnoderma*, *Fomitopsis*, and *Cerrena*.

Poly R-478 decolorization and the use of guaiacol and o-anisidine as chromogenic substrates are proved quick, reproducible, inexpensive screening methods to determine ligninolytic activity (Glenn and Gold 1983; De Jong et al. 1992; Kiiskinen et al. 2004). The LDS of white rot fungi consists of oxidases and peroxidases with a highly non-specific, free-radical mediated mechanism, capable of transforming and sometimes completely mineralizing a wide array of pollutant substances, among them the synthetic dyes (Paszczynski and Crawford 1995).

Plate screening results are summarized in Table 1. Among the 92 strains tested for ligninolytic potential, 67 oxidized o-anisidine and 66 oxidized guaiacol, representing 73 and 72%, respectively. However, not all producers of ligninolytic oxidases and/or peroxidases were able of depolymerising the Poly R-487 as only 42 strains (52%) had this ability. A possible explanation for this could be that along with the oxidases and/or peroxidases, some strains also need hydrogen peroxide generating systems or/and low weight mediators to attack the polymeric substrate, which were not produced under our study conditions (Rabinovich et al. 2004). The number of strains removing completely the color in the area of mycelial growth within 3 weeks was respectively 36, 38, and 22 for RBBR, AR, and CV. RBBR and AR dyes were more susceptible to decolorization in Bran Flakes media than CV, which usually had a negative effect on growth too, producing a total inhibition in 31 strains. Fifteen strains efficiently decolorized all three dyes within a week and of them only nine were also able to decolorize in some degree the ligninolytic potential indicator PR and are listed in Table 2. The decolorization magnitude of the different dyes as well as this ligninolytic indicator, by the fungal isolates is given in a scale 1–5 where 5 corresponds to total decolorization in mycelial area of growth. The results with CS5 and CU1 strains, identified as *Trametes villosa* and *Trametes maxima*, respectively, are outstanding, as they compared positively with the reference strains in the tests of ligninolytic potential and decolorizing capacity and showed

Table 1 Plate screening results for the 92 native isolates

| | Ligninolytic potential | | | Decolorizing ability ^a | | |
|----------------------------|------------------------|----------|----|-----------------------------------|---------|---------|
| | o-Anisidine | Guaiacol | PR | RBBR | AR | CV |
| Number of positive strains | 67 | 66 | 48 | 60 (36) | 62 (38) | 42 (22) |
| Percentage of total | 73 | 72 | 52 | 65 (39) | 67 (41) | 46 (24) |

AR Acid red 44, CV Crystal violet, RBBR Remazol brilliant blue reactive, PR Poly R-478

^a Strains able to decolorize at some degree. Numbers in parentheses indicate strains that completely decolorized the dye within 3 weeks

Table 2 Native isolates with ligninolytic potential and decolorizing ability comparable to reference strains

| Isolate/strain | Taxon | PR | RBBR | AR | CV | Growth ^a (mm/day) |
|----------------|------------------------------------|----|------|----|----|------------------------------|
| CU1 | <i>Trametes maxima</i> | 5 | 5 | 5 | 4 | 12 |
| CS5 | <i>Trametes villosa</i> | 5 | 5 | 5 | 3 | 8.7 |
| CS20 | <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> | 4 | 5 | 5 | 3 | 7.2 |
| CS63 | <i>Trametes trogii</i> | 4 | 5 | 5 | 3 | 8.8 |
| LE5 | <i>Trametes sp</i> | 4 | 5 | 5 | 3 | 7.1 |
| LE13 | Unidentified | 4 | 5 | 5 | 4 | 7.7 |
| LE45 | <i>Trametes sp</i> | 3 | 5 | 4 | 3 | 9 |
| LE95 | <i>Trametes pubescens</i> | 4 | 5 | 4 | 3 | 7.6 |
| LE79 | Unidentified | 3 | 5 | 4 | 3 | 7 |
| ATCC24725 | <i>Phanerochaete chrysosporium</i> | 4 | 5 | 4 | 1 | 16.8 |
| ATCC58053 | <i>Pleurotus ostreatus</i> | 1 | 2 | 4 | 2 | 30 |
| UAMH8258 | <i>Bjerkandera adusta</i> | 4 | 5 | 4 | 3 | 10.4 |

AR Acid red 44, CV Crystal violet, RBBR Remazol brilliant blue reactive, PR Poly R-478, 1–5 scale of decolorization magnitude, ^acalculated on Bran Flakes media

a high growth rate in Bran Flakes media with any dye, covering completely the surface of the plates within a week. In consequence these two strains were selected for the studies in liquid media. Remarkably the reference strain of *P. ostreatus* showed a poor ligninolytic potential and decolorizing ability under our conditions. These results reinforce the idea that screening surveys for autochthonous ligninolytic enzyme producers and decolorizers, like those carried out around the world by other authors (Tekere et al. 2001; Saparrat et al. 2002; Walter et al. 2003; Dhoubi et al. 2005; Asgher et al. 2006) could lead to finding novel strains with potential use in bioremediation.

Production of ligninolytic enzymes in liquid media

Laccase activity (Fig. 1a) was detected in both strains. In CS5 it was detected from day 6 and increased to a broad plateau of maximum activity (2,800 U/l) extending from day 8 to 14 and then decreased to be feebly detected in days 16–20. In CU1 it was also initially detected at day 6 but showed two peaks, the first one at day 10 (around 4,300 U/L) and the second at day 16 when it was higher (4,800 U/L), then it declined to be undetected at day 20. MnP (Fig. 1b) was detected in CS5 starting at day 10 of culture; it reached a production peak (120 U/l) between days 14 and 16 and then declined. However under our conditions we were unable to detect this activity in CU1. Although a positive reaction with the pair 2,4-DCP + 4-AA suggested that both isolates had LiP activity, we could not confirm it with its specific substrate veratryl alcohol. We thought the laccase could be responsible for this activity, since an oxidative coupling of other peroxidase substrates by laccase has been reported (Jordaan and Leukes 2003).

Verification of enzyme activities

To demonstrate that laccase activity was capable to promote the oxidative coupling of peroxidase substrates, we tested 10-day-old culture filtrates with a series of substrates for laccases and peroxidases varying the assay conditions (Table 3). A positive reaction with syringaldazine confirmed the presence of laccase in both strains. This activity

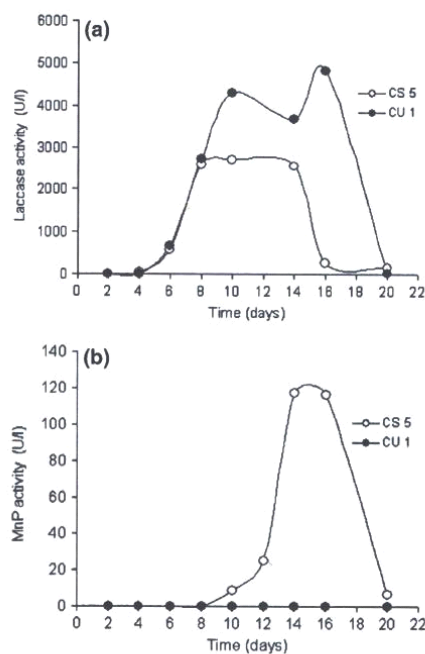


Fig. 1 Time course for production of Laccase (a) and Mn Peroxidase (b) by CS5 and CU1 strains

Table 3 Verification of the ligninolytic activities produced by CS5 and CU1 in liquid media

| Substrate(s)/Addition | Assay conditions ^a | | | | | | | | | |
|---|-------------------------------|-----|-----|-----|----------------------|-----|-----|-----|----------------------|-----|
| | Laccase | | LiP | | LiP (-) ^b | | MnP | | MnP (-) ^c | |
| | CS5 | CU1 | CS5 | CU1 | CS5 | CU1 | CS5 | CU1 | CS5 | CU1 |
| Syringaldazine | P | P | | | | | | | | |
| ABTS | P | P | | | | | P | P | P | P |
| Guaiaicol | P | P | | | | | P | P | P | P |
| Veratryl alcohol | | | N | N | | | | | | |
| 2,4-DCP + 4-AAP | | | P | P | P | P | | | | |
| 2,4-DCP + 4-AAP/catalase | | | P | P | P | P | | | | |
| Mn ²⁺ | | | | | | | P | N | N | N |
| 2,6-DMOP ^d | | | | | | | P | P | P | P |
| DMAB + MBTH ^d | | | | | | | P | P | P | P |
| DMAB + MBTH ^d /catalase/EDTA | | | | | | | P | P | P | P |

P positive reaction, N negative

^a Assay conditions correspond to each of the enzymes as described in methods

^b Conditions for LiP with no addition of hydrogen peroxide

^c Conditions for MnP with no addition of Mn²⁺ nor hydrogen peroxide

^d Used as chromogenic secondary substrate(s) for MnP activity

was also responsible for the positive reactions with ABTS and guaiaicol (developing even in the absence of Mn²⁺ and hydrogen peroxide), and with the pair 2,4-DCP + 4-AA (developing in the absence of hydrogen peroxide or in the presence of catalase), confirming that LiP is not present under our conditions in both CS5 and CU1. Even when MnP activity was confirmed for CS5 (positive reaction on Mn²⁺ only in the presence of H₂O₂), the occurrence of reaction for both strains with 2,6-DMOP and with the pair MBTH + DMAB even in the presence of EDTA and catalase (to remove both Mn²⁺ and H₂O₂), pointed to laccase activity as the only one responsible. On the bases of these results two possible explanations are proposed: either laccases belong to the high redox potential group or they act through low-molecular weight redox mediators. Zymograms (Fig. 2) of crude enzyme preparations, free of mediators, revealed the same bands for ABTS and the oxidative couples DMAB + MBTH and 2,4-DCP + 4-APP in the absence of H₂O₂ and Mn²⁺ (laccase conditions). Same patterns were obtained using syringaldazine and 2,6-DMOP (data not shown). These results strongly suggest that laccases belong to the high redox potential group.

The presence of MnP and laccase activities in CS5 is in agreement with reports of this combination as the most common in white rot fungi (Nerud and Misurkova 1996). Detecting laccase as the only ligninolytic activity in CU1 is in concordance with previous reports for other fungi such as *P. cinnabarinus* (Eggert et al. 1996). Briefly, our results support the idea that both strains could be producing laccases with high redox potential, which have the ability to

attack peroxidase substrates and consequently, constitute an important part of its ligninolytic machinery. However, we cannot discard the possible existence of a laccase/

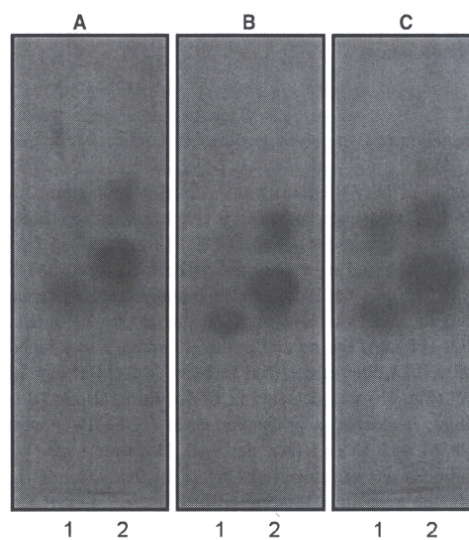


Fig. 2 Native PAGE of crude enzymes obtained from 8-day-old cultures. Bands developed under laccase conditions (in the absence of H₂O₂ and MnCl₂), using: ABTS (a), DMAB + MBTH (b), and 2,4-DCP + 4-AAP (c) as the substrates for CS5 (1), and CU1 (2) preparations

mediators system and peroxidases to degrade lignin in their natural environment.

Decolorizing activity

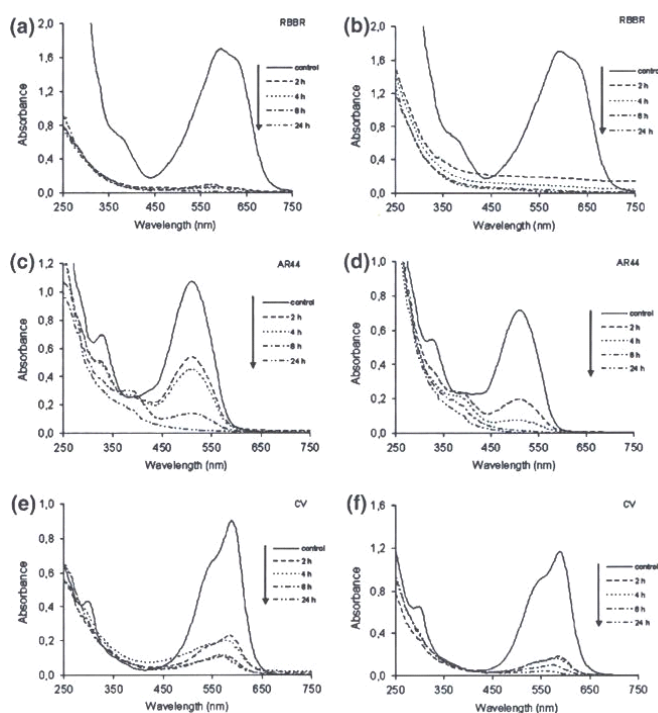
Both, CU1 and CS5 decolorized (RBBR, AR) or changed the coloring (CV) of dyes within 10 days of incubation when a dye was added from the beginning of culture (data not shown).

Although we only confirmed the MnP activity in CS5 cultures, assays with 8-day-old cultures of both strains were carried out in order to diminish the possible contribution of this activity to the decolorization process. Absorption spectra during microbial decolorization are shown in Fig. 3. The maximum absorption peak for RBBR in both cultures CS5 (Fig. 3a) and CU1 (Fig. 3b) decreases abruptly in 2 h to be almost undetected after 24 h. However, there is a difference between the two cultures, since CS5 shows a slight residual absorption peak shifting towards the left of the initial maximum, which is not present in that of CU1. For AR44, decreasing of main absorption peak was not as pronounced as with RBBR, however it reached comparable levels after 24 h.

Additionally, a new peak appeared around 385 nm being more evident in CS5 (Fig. 3c) than in CU1 (Fig. 3d). In the case of CV, disappearance of the main peak was also steep during the first 2 h and then gradual until the end of incubation, showing a continuous shift from 588 to about 570 nm for both cultures (Fig. 3e, f). The relationship between time of incubation and decolorization is shown in Fig. 4. Decolorization after 2 h with CS5 reached 96, 50 and 74% for RBBR, AR44 and CV, respectively, and 89, 74, and 83% with CU1. At 24 h of incubation, decolorization was almost complete for all cultures (>98%), with the exception of CS5 on CV which still had 10% of residual color.

In general, the disappearance of color in liquid cultures could be explained by mycelial adsorption or dye transformation. Even when dye absorption to mycelia could participate early in color reduction, we were not able to detect residual color on mycelia after 24 h by visual inspection of cultures or in methanol washings of filtered mycelia. Additionally, similar absorption spectra (not shown) to those of microbial decolorization were obtained with 8-day-old mycelia-free culture supernatants (enzymatic decolorization), where initial absorbance for RBBR, AR and CV, decreased after 12 h of incubation in >99, 94,

Fig. 3 Absorption spectra during microbial decolorization of synthetic dyes. Cultures of CS5 (series on left) and CU1 (series on right) strains were carried out on liquid Bran flakes media under agitated conditions, and dyes; RBBR (a and b), AR44 (c and d), and CV (e and f) were added at the eighth day of growth. Overlays were obtained at indicated times and compared with control spectra obtained immediately after dye addition



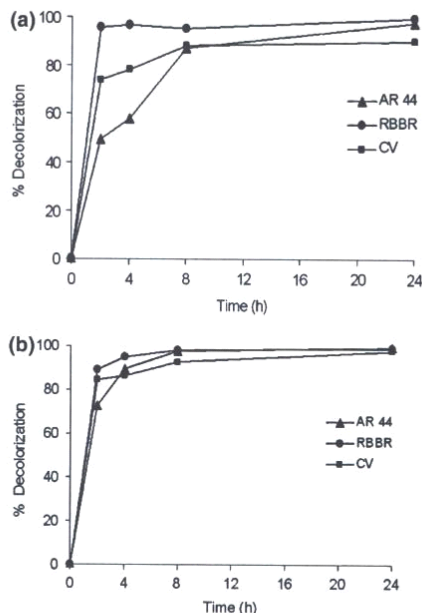


Fig. 4 Microbial decolorization of Remazol Brilliant Blue R, Acid Red 44 and Crystal Violet by 8-day-old liquid cultures of CS5 (a) and CU1 (b) as a function of time. Color reduction was calculated from the wavelengths of maximum absorption in the visible range for each dye

and 54% for CS5 (0.82 U/ml Laccase) and >99, >99, and 42% for CU1 (2 U/ml Laccase), respectively, for each dye, supporting that decolorization can be accomplished in the absence of mycelia. The removal of the major visible light absorbance peak combined with the displacement to the left (hypsochromic effect) (more evident in Fig. 3c, d), and the appearance of new peaks (Fig. 3e) could be explained by a dye degradation or transformation through different intermediaries as previously reported by Maximo et al. (2003) and McMullan et al. (2001).

A dye decolorization depends on its structural complexity (identity, number and position of functional groups in the aromatic region), its charge (distribution of electrons and density of charge) (Knapp et al. 1995; Swamy and Ramsay 1999) or could be the result of all interactions in its structure and be associated for example to ionization potential (Podgornik et al. 1999). Different fungal enzymes, and even isoenzymes, have different specificities for dyes belonging to different structural classes (Ollikka et al. 1993). Our results on dye decolorization are in agreement with literature in regard to anthraquinonic being more easily degraded than azo dyes (Abadulla et al. 2000) and CV, even as a member of the triarylmethane, being a

more recalcitrant one and its color loss depending on the strain used (Knapp et al. 1995).

Finding laccase as the principal activity responsible for decolorization is consistent with previous reports with *T. hispida* (Rodriguez et al. 1999) and *T. hirsuta* (Abadulla et al. 2000). However further studies with pure enzymes are necessary to prove it conclusively.

Conclusions

All the isolates with the ability to attack the three dyes gave also a positive reaction in the plates with guaiacol and o-anisidine, showing a strong correlation with the production of oxidoreductases. A possible explanation for the strains that by producing oxidases and/or peroxidases did not decolorize PR could be that depolymerization depends on the participation of redox mediators, which under the conditions of our assay should be produced only by those isolates that gave a positive decolorization of PR; or these isolates produce enzymes with high redox potentials. The finding of two native strains with ligninolytic and decolorizing performance comparable to that of reference strains *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725, *Pleurotus ostreatus* ATCC 58053, and *Bjerkandera adusta* UAMH 8258 encourages the searching of fungal strains with specific capabilities suitable to biotechnological processes in Mexican woodland. One of these, isolate CS5 showed a high decolorization rate and has a fast growth rate, consequently has been selected for further studies.

Acknowledgments The authors acknowledge the support received from the PAICYT, UANL under project number CA 822-04. G.G.S. and S.S.M. were recipients of CONACYT fellowships.

References

- Abadulla E, Tzanov T, Costa S, Robra K-H, Cavaco-Paulo A, Gübitz GM (2000) Decolorization and detoxification of textile dyes with a Laccase from *Trametes hirsuta*. *Appl Environ Microbiol* 66(8):3357–3362
- Asgher M, Shah SAH, Ali M, Legge RL (2006) Decolorization of some reactive dyes by white rot fungi isolated in Pakistan. *World J Microbiol Technol* 22:89–93
- Baughman GL, Weber EJ (1994) Transformation of dyes and related compounds in anoxic sediment: kinetics and products. *Environ Sci Technol* 28:267–276
- Castillo MdP, Stenström J, Ander P (1994) Determination of manganese peroxidase activity with 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone and 3-(dimethylamino) benzoic acid. *Anal Biochem* 218:399–404
- Chung KT, Stevens SE Jr, Cerniglia CR (1992) The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. *Crit Rev Microbiol* 18:175–190
- De Jong E, de Vries FP, Field JA, van der Zwan RP, de Bont JAM (1992) Isolation and screening of basidiomycetes with high peroxidative activity. *Mycol Res* 96(12):1098–1104

- Dhouib A, Hamza M, Zouari H, Mechichi T, Hmidi R, Labat M, Martínez MJ, Sayadi S (2005) Screening for ligninolytic enzyme production by diverse fungi from Tunisia. *World J Microbiol Technol* 21:1415–1423
- Eggert C, Temp U, Eriksson K-EL (1996) The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl Environ Microbiol* 62(4):1151–1158
- Field JA, Jong E, Feijoo Costal G, Bont JA (1992) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. *Appl Environ Microbiol* 58(7):2219–2226
- Garfin DE (1990) One dimensional gel electrophoresis. In: Deutscher MP (ed) *Methods in enzymology*, vol 182. Guide to protein purification. Academic, New York, pp 425–44. ISBN 0-12-182083-1
- Glenn JK, Gold MH (1983) Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 45(6):1741–1747
- Guzmán G (1980) Identificación de los hongos. Comestibles, venenosos y alucinantes. ed. Limusa, S.A. México, p 452. ISBN 968-18-0123-7
- Hao OJ, Kim H, Chiang PC (2000) Decolorization of wastewater. *Crit Rev Environ Sci Technol* 30(4):449–505
- Harkin JM, Larsen MJ, Obst JR (1974) Use of syringaldazine for detection of laccase in sporophores of wood rotting fungi. *Mycologia* 66:469–476
- Heinfling A, Martínez MJ, Martínez AT, Bergbauer M, Szewzyk U (1998) Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a Manganese-independent reaction. *Appl Environ Microbiol* 64(8):2788–2793
- Heinzkill M, Bech L, Halkier T, Schneider P, Anke T (1998) Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (Family Coprinaceae). *Appl Environ Microbiol* 64(5):1601–1606
- Hofrichter M (2002) Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microbiol Technol* 30:454–466
- INEGI (2001) XV Censo Industrial. Censos Económicos 1999. Industrias manufactureras subsector 32. Producción de textiles, prendas de vestir e industria del cuero. Productos y materias primas. ISBN 970-13-3334-9. INEGI, México, p 121
- Jarosz-Wilkolazka AJ, Kochmanska-Rdest J, Malarczyk E, Wardas W, Leonowicz A (2002) Fungi and their ability to decolorize azo and anthraquinonic dyes. *Enzyme Microbiol Technol* 30:566–572
- Jordaan J, Leukes WD (2003) Isolation of a thermostable laccase with DMAB and MBTH oxidative coupling activity from a mesophilic white rot fungus. *Enzyme Microb Technol* 33(2):212–219
- Kiiskinen L-L, Rättö M, Kruus K (2004) Screening for novel-producing microbes. *J Appl Microbiol* 97:640–646
- Knapp JS, Newby PS, Reece LP (1995) Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. *Enzyme Microb Technol* 17:664–668
- Maximo C, Pessoa MT, Costa-Ferreira M (2003) Biotransformation of industrial reactive azo dyes by *Geotrichum sp* CCMI 1019. *Enzyme Microb Technol* 32:145–151
- McMullan G, Meehan C, Connely A, Kirby N, Robinson T, Nigam P, Banat IM, Marchant R, Smyth WF (2001) Microbial decolorisation and degradation of textile dyes. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:81–87
- Mester T, Tien M (2000) Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. *Int Biodeterior Biodegradation* 46:51–59
- Nerud F, Misurkova Z (1996) Distribution of ligninolytic enzymes in white rot fungi. *Folia Microbiol* 41:264–266
- Ollikka O, Alhoniemi K, Leppänen V-M, Glumoff T, Rajola T, Suominen I (1993) Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 59:3605–3613
- Paszczynski A, Crawford RL (1995) Potential for bioremediation of xenobiotic compounds by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol Prog* 11:368–379
- Pickard MA, Vandertol H, Roman R, Vazquez-Duhalt R (1999) High production of ligninolytic enzymes from white rot fungi in cereal bran liquid medium. *Can J Microbiol* 45:627–631
- Podgornik H, Grgic I, Perdih A (1999) Decolorization rate of dyes using lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. *Chemosphere* 38:1353–1359
- Pointing SB (2001) Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 57:20–33
- Rabinovich ML, Bolobova AV, Vasil'chenko LG (2004) Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: a review. *Appl Biochem Microbiol* 40(1):1–17
- Raghukumar C (2000) Fungi from marine habitats: an application in biodegradation. *Mycol Res* 104(10):1222–1226
- Ramachandra M, Crawford DL, Hertel G (1988) Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete *Streptomyces viridosporus*. *Appl Environ Microbiol* 52(12):3057–3063
- Rodriguez E, Pickard MA, Vazquez-Duhalt R (1999) Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Curr Microbiol* 38:27–32
- Saparrat MCN, Martínez MJ, Cabello MN, Arambarri AM (2002) Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strains from Argentina isolated from different substrata. *Rev Iberoam Micol* 19:181–185
- Stoscheck CM (1990) Quantitation of protein. In: Deutscher MP (ed) *Methods in enzymology*, vol 182. Guide to protein purification. Academic, New York, pp 62–63. ISBN 0-12-182083-1
- Swamy J, Ramsay JA (1999) The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. *Enzyme Microb Technol* 24:130–137
- Tekere M, Mswaka AY, Zvauya R, Read JS (2001) Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white rot fungi. *Enzyme Microb Technol* 28:420–426
- Thorn RG, Reddy CA, Harris D, Paul EA (1996) Isolation of saprophytic basidiomycetes from soil. *Appl Environ Microbiol* 62(11):4288–4292
- Tien M, Kirk TK (1988) Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods Enzymol* 161B:238–248
- Walter M, Guthrie JM, Sivakumaran S, Parker E, Slade A, McNaughton D, Boyd Wilson KSH (2003) Screening for New Zealand native white-rot isolates for PCP degradation. *Bioremediation J* 7(2):119–128
- Wariishi H, Valli K, Gold MH (1992) Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J Biol Chem* 267:23688–23695
- Zhang F, Knapp JS, Tapley KN (1999) Development of bioreactor systems for decolorization of orange II using white rot fungus. *Enzyme Microb Technol* 24:48–53

FORMACIÓN DE UNA COLECCIÓN DE HONGOS NATIVOS DEL NORESTE DE MÉXICO Y EXPLORACIÓN DE SU POTENCIAL SOCIOECONÓMICO

SERGIO M. SALCEDO MARTÍNEZ*, MARCELA GONZÁLEZ ÁLVAREZ*, JOSÉ S. GARCÍA ALVARADO**, J. GUADALUPE GUTIÉRREZ SOTO***, IRENE CORTINA SÁNCHEZ***, CARLOS E. HERNÁNDEZ LUNA***

*Herbario, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL

** Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos. E-mail: santos@microbiosymas.com

*** Laboratorio de Bioquímica. E-mail: chernandez@fcb.uanl.mx

San Nicolás de los Garza, N. L., México. E-mail: checosalcedo@yahoo.com.mx

La micología es el estudio de los hongos. Los hongos verdaderos se agrupan en el Reino Fungi o Eumycota y son organismos eucariotas, unicelulares o pluricelulares, heterótrofos que presentan digestión extracelular y nutrición saprobia, provistos de paredes celulares de quitina y b-glucanos, de aspecto comúnmente filamentosos y que producen esporas en alguna etapa de su ciclo vital. Comprenden 4 phyla que se reconocen por el tipo de esporas que producen: Los Ascomycota son el phylum más numeroso y sus esporas sexuales se desarrollan dentro de ascas en forma de sacos alargados. Los Basidiomycota producen sus esporas sexuales en el exterior de filamentos o hifas especializadas ensanchadas hacia la punta llamadas basidias. Los Chytridiomycota a diferencia de los dos grupos anteriores son formas acuáticas y sus esporas son realmente gametos móviles (zoosporas) provistas generalmente de

un solo flagelo posterior en forma de látigo (opistoconte). En los Zygomycota la zygospora es una estructura de resistencia producto de la fusión de dos hifas diferenciadas en gametangios. Algunos grupos anteriormente considerados dentro del Reino Fungi como los Myxomycota y los Oomycota han sido segregados a partir de 1994 a los Reinos Protista y Chromista, respectivamente, basándose en la presencia de celulosa en la composición química de sus paredes celulares, la forma de sus crestas mitocondriales, que no es aplanada, la presencia de flagelos diferentes al tipo opistoconte en sus esporas y otras evidencias moleculares (Kirk *et al.*, 2001).

Se estima que el número total de especies de hongos verdaderos en el mundo es superior a 1.6 millones, de las cuales se han descrito alrededor de 64,000. No obstante que cada año se agregan 700 nuevas espe-

cias a la lista, es evidente la falta de micólogos en el mundo para el estudio de este Reino tan diverso (Carlile *et al.*, 2001). Para México, existe un total estimado de 200,000 especies de hongos, de las cuales se conocen apenas alrededor de 7,000 (Cifuentes *et al.*, 2004) por lo que la obtención de inventarios regionales es de suma importancia para el conocimiento del recurso.

La principal actividad benéfica de los hongos en la naturaleza es la descomposición de la materia orgánica. Al hacerlo contribuyen al ciclo del nitrógeno y del carbono. Aunque esta actividad también la realizan las bacterias, el reciclaje del carbono contenido en los dos polímeros naturales más abundantes del planeta, la celulosa y la lignina, presentes en estructuras vegetales como la madera, es una responsabilidad que cumplen principalmente los hongos. Además, las micorrizas o asociaciones que forman algunos hongos con las raíces de la mayoría de los árboles, aumentan significativamente su área de absorción, permitiéndoles a éstos últimos un crecimiento saludable, más rápido y vigoroso, ya que promueven una asimilación más eficiente de formas nitrogenadas y sales minerales.

Sin embargo, la actividad saprótrófa de los hongos también causa importantes pérdidas en la agricultura y las industrias alimentaria, energética, de pinturas, del calzado y del vestido, al atacar sustratos como granos, todo tipo de alimentos y bebidas, combustibles, solventes, cueros y telas.

Algunas especies parásitas de plantas o animales se consideran nocivas, ya que anualmente ocasionan enormes pérdidas agrícolas, forestales y pecuarias; mientras que otras especies se consideran benéficas, ya que pueden utilizarse en el control biológico de malezas,

nemátodos, insectos y aún otros hongos considerados como plagas agrícolas. Las especies parásitas del ser humano llegan a causar serios problemas de micosis en la piel y mucosas. En ocasiones afectan las vías respiratorias gravemente u ocasionan septicemia o causan meningitis, de tal forma que pueden llegar a causar la muerte.

En el ámbito industrial, la actividad enzimática extracelular de los hongos tradicionalmente se ha empleado en la obtención de alimentos fermentados (salsa de soya, tempe, sufu), la maduración de quesos (roquefort, gorgonzola, brie, danés, camembert) y la elaboración de pan y bebidas alcohólicas (cerveza, vino, sake, whisky). Con el desarrollo de la biotecnología el empleo de los hongos para obtener productos metabólicos se ha diversificado. Actualmente se emplean reactores para la obtención de proteína unicelular, vitaminas (riboflavina), alcohol industrial, ácidos orgánicos (ácido cítrico, fumárico, glucónico y otros), enzimas (glucoamilasas para producir jarabes de alta fructosa, glucanasas y pectinasas para clarificar cerveza y jugos de frutas respectivamente, proteasas y lipasas como aditivos de detergentes, nucleasas como mejoradores de sabor en carnes, entre otras), metabolitos primarios (nucleótidos, aminoácidos, polisacáridos y grasas) y metabolitos secundarios como antibióticos (penicilina, cefalosporina, griseofulvina, sordarina), medicamentos reductores del colesterol (mevastatina, lovastatina), inmunosupresores para reducir el rechazo en trasplantes de órganos (ciclosporina A), alcaloides (ergotamina para el tratamiento de migrañas, ergometrina para aumentar las contracciones en el parto), fitorreguladores (giberelinas) y fungicidas agrícolas (strobilurinas) (Carlile *et al.*, 2001).

Las setas son macromicetos con un cuerpo fructífero característico grande como para verse a simple vista y tomarse con la mano. De ellas se estima existen 140,000 especies y se conocen 22,000 y se estima que existen 7,000 especies todavía no descritas que podrían ser benéficas a la humanidad (Lindequist *et al.*, 2005). Entre las setas, 2,000 especies son comestibles en diferente grado (Chang, 1999). La producción anual de setas para alimento humano supera los 6 millones de toneladas, registra importantes aumentos en la última década y se basa en la explotación de una decena de especies, entre las que destacan *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes**, *Pleurotus spp.**, *Auricularia spp.*, *Flammulina velutipes**, *Volvariella volvacea*, *Tremella spp.**, *Hypsizygus marmoreus* y *Grifola frondosa** (Carlile *et al.*, 2001). La mayoría de estos hongos, además de ser comestibles presentan propiedades funcionales (*). Además, la creciente producción de las especies de setas medicinales pertenecientes a géneros como *Ganoderma*, *Trametes*., *Agrocybe*, *Auricularia*, *Calvatia*, *Flammulina*, *Hericium*, *Hypholoma*, *Inonotus*, *Lentinus*, *Lenzites*, *Polyporus*, *etc.* se espera que llegue en breve a un florecimiento debido a la economía de los sustratos de producción y la relativa simplicidad de los métodos de cultivo (Smith *et al.*, 2002; Stamets, 2000). El desarrollo de resistencia a antibióticos, el resurgimiento de enfermedades que se creían erradicadas y el incesante tráfico aéreo de personas desde sitios antes remotos, ha impulsado la búsqueda de nuevas sustancias bioactivas en las setas, facilitando la tarea las nuevas técnicas químicas de purificación. De tal forma que hongos empleados en la medicina tradicional de diferentes culturas han probado su utilidad como productores de

compuestos con actividades antimicrobiana, antiviral, antitumoral, como inmunomoduladores, citostáticas, inmunosupresora, antioxidante, hipoglucémica, antiinflamatoria, hepatoprotectora. Entre el 80 y 85 % de los productos de las setas medicinales se obtienen de cuerpos fructíferos cultivados o recolectados, pocos se basan en extractos del micelio o filtrados de cultivos (Lindequist *et al.* 2005).

Así, en la última década, a la importancia ecológica, alimenticia y médica tradicional y la de fermentaciones industriales utilizando hongos mitospóricos, se ha sumado un nuevo valor, el de la producción de metabolitos con actividad biológica por setas. Estos pueden ser como se menciona arriba sustancias con actividad antimicrobiana, citotóxica (antitumoral) o que incrementan la respuesta inmune o bien, enzimas, colorantes y aceites esenciales (utilizados como saborizantes y aromas) (Brizuela *et al.*, 1998).

Nuevo León posee una gran diversidad de macromicetos posiblemente como resultado del desarrollo de diferentes ecofisiologías adaptadas a los variados microambientes que se presentan en sus 3 provincias biogeográficas: la planicie costera, la Sierra Madre Oriental y el altiplano (Alanís *et al.*, 1996). Esta diversidad debe reflejarse en las Colecciones Micológicas, las cuales contienen ejemplares secos que conservan las características distintivas de su especie y sirven de referencia contra la cual se puede comparar las características de nuevos ejemplares. Además de este valor taxonómico, la información de la etiqueta de colecta es esencial en el desarrollo de estudios sobre la ecología y distribución fúngicas. Las colecciones de micelios vegetativos vivos, aunque no poseen las carac-

terísticas de los cuerpos fructíferos (setas), nos brindan la oportunidad de estudiar la biología y metabolitos de los hongos. La colección micológica (UNL) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, tiene alrededor de 50 años, es una colección de referencia constituida por cuerpos fructíferos colectados en la región noreste y otros estados del país, pero no estaba ordenada y esto limitaba su utilidad.

Los objetivos planteados en el presente trabajo fueron: ordenar la colección de setas de basidiomicetos en una forma que facilitara su consulta, elaborar un archivo electrónico con la información de colecta de los ejemplares ya presentes y que además incluyese fotografías y descripciones morfológicas de las nuevas adiciones y formar un cepario de especies nativas de basidiomicetos de Nuevo León aisladas de los cuerpos fructíferos antes de ser herborizadas y depositadas en la colección (lo cual permite una mayor certeza en la identificación al respaldarla por la fase sexual). La utilidad de lo anterior es contar para cada especie con un registro detallado que respalde su identificación y facilite en cualquier momento su consulta, permitiendo ofrecer a la comunidad una colección micológica y un cepario, que sirvan de apoyo en sus investigaciones sobre la taxonomía, biología y química de productos naturales en un grupo difícil, interesante y diverso, como es el de los hongos. Además, en un intento inicial por conocer la utilidad y potencial económico de las especies nativas, hemos desarrollado una línea de investigación sobre nuestros cultivos de basidiomicetos nativos buscando aquéllos potencialmente útiles en procesos de biorremediación de efluentes contaminados por colorantes sintéticos o con actividad antimicrobiana sobre patógenos

METODOLOGÍA

La Colección UNL. Los ejemplares de hongos y líquenes en el herbario UNL fueron separados por géneros y especies, ordenados alfabéticamente y depositados en cajas de cartón. Con la información de las etiquetas de colecta de los ejemplares se elaboró una base de datos en Excell y se generó una lista con los géneros para Nuevo León. La importancia de cada uno de los géneros fue entonces investigada.

Reactivos. Todos los compuestos químicos utilizados fueron grado reactivo, los medios de cultivo de la marca Difco y los demás químicos, de la casa Sigma o CTR Scientific. Las soluciones fueron preparadas en agua bidestilada de laboratorios Monterrey, S.A. Todos los medios se esterilizaron con autoclave a 121°C por 15 min o por filtración Millipore (0.45µm). El aislamiento y purificación de cepas se realizó en cajas petri desechables de 90 mm de diámetro conteniendo 20 ml de medio de cultivo.

Colecta de cuerpos fructíferos. La colecta de cuerpos fructíferos se realizó en las diferentes provincias fisiográficas del Estado de Nuevo León con un muestreo oportunista. Los sitios y fechas de colecta se seleccionaron previamente en base a la información de las fichas del material herborizado de la colección micológica que requería reposición. Las coordenadas geográficas de los puntos de colecta se determinaron con un geoposicionador (Magellan), las áreas de colecta se recorrieron exhaustivamente y a los carpóforos encontrados se les asignó una clave bajo la cual se anotó el número de colecta, las coordenadas, tipo de sustrato, las características macroscópicas, resultados de reac-

ciones microquímicas coloridas (Meltzer, KOH, CuSO₄) (Singer, 1986) y número de registro fotográfico. Los ejemplares fueron herborizados siguiendo la metodología de Wu *et al.* (2004).

Aislamiento y purificación de micelios. Para el aislamiento y purificación de los micelios vegetativos, de cada uno de los carpóforos se tomaron tres fragmentos de la parte interna del cuerpo fructífero, de aproximadamente 3 mm de diámetro. Fueron lavados por 1 min en peróxido de hidrógeno al 3 %, enjuagados en agua estéril y sembrados en cajas petri con medio YMGA (4g glucosa, 4g extracto de levadura, 10g extracto de malta y 15g agar por litro de medio) y 4 mg/l de benomil, disueltos en 2 ml de solución 1:1 acetona-70% etanol que se agregaron asépticamente (Millipore 0.45µm). La siembra se hizo por triplicado y las cajas petri se incubaron a 28°C. Las colonias que crecieron se resembraron en YMGA hasta estar puras. Los aislados puros constituyen el cepario y se conservan en tubos con medio YMGA a 4°C con resiembras cada dos meses.

Identificación. La identificación se realizó siguiendo las claves de Arora (1985), Bessette *et al.* (1997), Guzmán (1978), Guzmán (2003), Largent y Baroni (1988), Metzler y Metzler (1992), Singer (1986).

Pruebas de capacidad ligninolítica y decolorante. Estas pruebas se realizaron en cajas de petri con el medio de bran flakes (20g All Bran® y 15g de agar por litro de amortiguador de fosfato monobásico de potasio 60 mM, pH 6), el cual es inductor de enzimas ligninolíticas y adicionando 0.02% del colorante polimérico Poly-R 478 o alguno de 9 colorantes (Azo: Rojo Ácido 44 AR44, Rojo Ácido 183 AR183, Negro Reactivo 5 RB5, Naranja II OII, Indigoide: Índigo Carmín. Antraquinónico: Verde

Ácido 27 AG27, Azul Brillante Reactivo de Remazol RBBR, Triarilmetano: Azul Brillante Reactivo BBR, Cristal Violeta CV). El diámetro del área de desaparición del color bajo la superficie cubierta por micelio se consideró indicativo de la capacidad ligninolítica del hongo para el caso del Poly-R-478 y de la capacidad decolorante para el resto de los colorantes. Los aislados que mostraron la mayor eficiencia decolorante en placa se seleccionaron para realizar ensayos de decoloración en cultivos sumergidos en medio de bran flakes líquido conteniendo 50 ppm de colorante. El colorante se agregó a los 6 días de crecimiento, cuando la concentración de lacasas es evidente y las peroxidases aún no se detectan, basándonos en resultados iniciales que indicaron a las primeras como principales responsables de la actividad decolorante. La confirmación de su participación en el proceso se verificó con ensayos de decoloración *in vitro* con mezclas de reacción conteniendo preparaciones libres de micelio y el colorante, en amortiguador de acetato 200 mM y a pH óptimo de la enzima (3.5-4). La decoloración se determinó siguiendo la reducción en el pico de absorbancia de cada colorante medida en un espectrofotómetro Shimadzu UV mini 1240, haciéndolo a diferentes tiempos.

Pruebas antimicrobianas. Se realizaron por duplicado ensayos con extractos de acetato de etilo, obtenidos a partir de cultivos sumergidos de 10 días de crecimiento desarrollados en 100 ml de medio EmG (10% extracto de malta y 2% glucosa). Para cada aislado, 100 µL del extracto fueron probados contra las bacterias patógenas que contaminan alimentos *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* y *Shigella sp* (amablemente proporcionadas por el Laboratorio de Fisiología

y Bioquímica de Microorganismos de nuestra Facultad) en placas con agar Muller Hinton. La actividad antimicrobiana se determinó midiendo el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los pozos de 0.5 mm donde fue depositado el extracto.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Colección UNL. Se ordenó alfabéticamente por Género un total de 8,100 ejemplares de hongos y líquenes de la Colección Micológica. Su inspección visual nos permitió estimar que alrededor de un 12% de los ejemplares requerían reposición. Muchos de los ejemplares dañados fueron colectados en el Estado de Nuevo León, pero una gran cantidad procede de los Estados de Durango y México, entre otros, por lo que nos centramos en la reposición de los ejemplares colectados en nuestro Estado. Hasta ahora hemos incorporado 128 cuerpos fructíferos a la colección. El número de ejemplares dañados y la procedencia de los ejemplares hacen necesario un alto presupuesto y un esfuerzo continuo para lograr su total reposición. Con la información de colecta en las etiquetas de los ejemplares se formó un archivo electrónico de la Colección. Para los nuevos carpóforos además de esta información se agregaron las características distintivas de la especie y fotografías de cada ejemplar.

El número de basidiomicetos representados en la Colección UNL es de 437 especies, comprendidas en 135 géneros y 57 familias. En la Tabla 1 se resume la información de la Colección Micológica UNL, enseguida de los nombres de algunas especies aparece la sino-

nimia válida basándonos en Kirk *et al.* (2001). En ella están representadas especies que son venenosas, comestibles, alucinógenas, medicinales o que atacan la madera, ocasionando algún tipo de podredumbre. La Tabla 2 resume la importancia de los géneros de Basidiomicetos de Nuevo León en la Colección UNL. Algunos géneros poseen exclusivamente especies comestibles, como *Calvatia*, *Ramaria*, *Pleurotus*, *Lycoperdon*, *Hericium*, *Craterellus* and *Cantharellus* mientras que otros como *Boletus*, *Strobilomyces*, *Lactarius*, *Suillus*, *Lepiota*, *Armillariella*, *Coprinus*, *Clathrus* y *Clytocibe*, poseen solo algunas especies, por lo que se debe tener experiencia en su identificación para evitar envenenamientos con especies similares sobre todo en lo que respecta a los géneros *Boletus*, *Russula* y *Lactarius* y sobre todo, para reconocer las especies venenosas de *Amanita*, *Chlorophyllum*, *Stropharia*, *Hebeloma*, *Paxillus*, *Inocybe* and *Cortinarius* o las alucinógenas de *Coprinus* que se presentan en el estado. Los géneros *Auricularia*, *Fomitopsis*, *Ganoderma*, *Lycoperdon*, *Pleurotus*, *Podaxis*, *Polyporus*, *Pycnoporus*, *Trametes* y *Schizophyllum* tienen especies con propiedades medicinales. Los hongos que ocasionan podredumbre en la madera se distribuyen en los géneros *Armillariella*, *Gleophyllum*, *Daedalea/Daedaleopsis*, *Eichleriella*, *Fomes*, *Fomitopsis*, *Phellinus*, *Ganoderma*, *Hexagonia*, *Hymenochaete*, *Inonotus*, *Lenzites*, *Phlebia*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Polyporus*, *Pycnoporus*, *Poria*, *Trametes*, *Trichaptum*, *Phaeolus*, *Coltricia*, *Stereum* y *Schizophyllum*. Ciertas esencias y sabores típicos son utilizados en la identificación de los hongos y las moléculas responsables de estas propiedades podrían tener aplicación en las industrias cosmética. Especies

odoríferas se encuentran en los géneros *Polyporus*, *Phellinus*, *Stereum* y *Daedalea*.

Capacidad ligninolítica y decolorante de los aislados nativos. Se logró aislar y purificar un total de 85 micelios vegetativos de basidiomicetos nativos. Los resultados de los ensayos en placa con ellos, permitieron seleccionar inicialmente 10 aislados. Los de decoloración en cultivos sumergidos e *in vitro* los redujeron a cinco como los de mejor capacidad ligninolítica y decolorante: el aislado LE13 y cuatro más pertenecientes al género *Trametes*: *T. hispida* (LE95), *T. maxima* (CU1), *T. trogii* (CS63) y *T. villosa* (CS5) (Tabla 3). CU1 y CS5 fueron finalmente seleccionados por su mejor desempeño y actualmente se realiza la purificación de sus lacasas. La estabilidad y capacidad decolorante de CS5 lo convierten en nuestro mejor candidato hasta ahora para ser usado en biorremediación de efluentes contaminados con colorantes sintéticos.

Pruebas antimicrobianas. Los resultados de actividad de extractos de acetato de etilo contra patógenos que contaminan alimentos se muestran en la Tabla 4. Cinco aislados tuvieron efecto bactericida contra las tres bacterias, sin embargo, el aislado que mostró la mejor actividad bactericida fue el de *Trametes* sp (RC2).

CONCLUSIONES

Se ordenó alfabéticamente por Género los 8,100 ejemplares de hongos y líquenes de la Colección Micológica. Aunque se han incorporado 128 nuevos carpóforos, se estima que el 12% de los ejemplares requiere reposición, pero su número y procedencia hacen necesario un alto presupuesto y un esfuerzo continuo para lograr

su total reposición,

Con la información de campo, las características distintivas de las especies y fotografías de cada ejemplar añadido a la Colección, se formó un archivo electrónico de la Colección.

La diversidad de macrobasidiomicetos en Nuevo León es elevada, como se deduce del número de Familias (44), géneros (135) y especies (437) en la Colección UNL.

Se integró una colección de 85 aislados de basidiomicetos nativos. En los ensayos de ligninólisis, decoloración y antibiosis, dos de los aislados *Trametes villosa* (CS5) y *T. maxima* (CU1) mostraron propiedades promisorias para ser utilizados en biorremediación y uno *Trametes* sp (RC2) contra microorganismos patógenos que contaminan alimentos, por lo que es lógico pensar que existan más especies nativas de nuestro estado, cuyo valor nutricional, medicinal y comercial llegue a recomendar los esfuerzos de subsecuentes estudios de prospección

REFERENCIAS

- Alanís Flores, G. J., G. Cano y Cano, M. Rovalo Merino. 1996. Vegetación y flora de Nuevo León. Una guía botánico-ecológica. Impresora Monterrey, S. A. de C. V. México. 251 pp.
- Arora, D. 1985. Mushrooms Demystified. Ten Speed Press. Berkeley, CA, USA. 959 pp.
- Bessette, A. E., A. R. Bessette & D. W. Fischer. 1997. Mushrooms of Northeast North America. 1st. Edition, Syracuse University Press. 640 pp.
- Brizuela, M. A., L. García, L. Pérez y M. Mansur. 1998. Basidiomicetos: una nueva fuente de metabolitos secundarios. Rev. Iberoam. Micol. 15:69-74.

Tabla 1. Basidiomicetos en la colección UANL

| | | |
|---------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Reino Fungi | 38. Coprinus comatus | Género 26. Armillaria |
| Phylum Basidiomycota | 39. Coprinus niveus | 77. Armillaria (Armillariella) sp |
| Clase Basidiomycetes | Género 15. Psathyrella | 78. Armillaria tabescens |
| Subclase Agaricomycetidae | 40. Psathyrella sp | (=Armillariella tabescens) |
| Orden 1. Agaricales | 41. Psathyrella campestris | Género 27. Baeospora |
| Familia 1. Agaricaceae | Género 16. Cortinarius | 79. Baeospora sp |
| Género 1. Agaricus | 42. Cortinarius sp | 80. Baeospora rhyssura |
| 1. Agaricus (Psalliota) sp | Género 17. Crepidotus | Género 28. Cryptotrama |
| 2. Agaricus arvensis | 43. Crepidotus sp | 81. Cryptotrama crisopleura |
| 3. Agaricus augustus | 44. Crepidotus mollis | (=Xerulina crisopleura) |
| 4. Agaricus bisporus | Género 18. Gymnopilus | Género 29. Marasmius |
| 5. Agaricus campestris | 45. Gymnopilus sp | 82. Marasmius sp |
| 6. Agaricus placomyces | 46. Gymnopilus aeruginosus | 83. Marasmius cladophyllus |
| 7. Agaricus silvaticus | Género 19. Inocybe | 84. Marasmius rotula |
| 8. Agaricus silvicola | 47. Inocybe sp | Familia 10. Nidulariaceae |
| 9. Agaricus subperonatus | 48. Inocybe confusa | Género 30. Crucibulum |
| 10. Agaricus subrufescens | 49. Inocybe festigata | 85. Crucibulum sp |
| 11. Agaricus volvariis | Familia 9. Entolomataceae | 86. Crucibulum laeve |
| 12. Agaricus xanthodermus | Género 20. Entoloma | (=C. vulgare) |
| Género 2. Chlorophyllum | 50. Entoloma (Rhodophyllum) sp | Género 31. Cyathus |
| 13. Chlorophyllum sp | 51. Entoloma lividus | 87. Cyathus sp |
| 14. Chlorophyllum molybdites | (=Rhodophyllum lividus) | 88. Cyathus oia |
| Género 3. Gyrothragium | 52. Entoloma mexicanus | 89. Cyathus stereoreus |
| 15. Gyrothragium sp | (=Rhodophyllum mexicanus) | 90. Cyathus stratus |
| Género 4. Lepiota | 53. Entoloma violaceobrunneum | Género 32. Nidularia |
| 16. Lepiota sp | (=Rhodophyllum violaceobrunneum) | 91. Nidularia sp |
| 17. Lepiota acutescuamosa | Familia 7. Hydrangiaceae | 92. Nidularia fasciculata |
| 18. Lepiota americana | Género 21. Laccaria | Familia 11. Phelloniaceae |
| 19. Lepiota clypeolaria | 54. Laccaria lacata | Género 33. Phellonia |
| 20. Lepiota cristata | Familia 8. Lycoperdaceae | 93. Phellonia ingramii |
| 21. Lepiota procera | Género 22. Bovista | Familia 12. Pleurotaceae |
| 22. Lepiota rubrotincta | 55. Bovista sp | Género 34. Hohenbuehelia |
| Género 5. Leucoagaricus | Género 23. Calvatia | 94. Hohenbuehelia sp |
| 23. Leucoagaricus caepesit | 56. Calvatia sp | Género 35. Pleurotus |
| 24. Leucoagaricus sp | 57. Calvatia bovista | 95. Pleurotus sp |
| 25. Leucoagaricus caepesites | 58. Calvatia craniformis | Familia 13. Pluteaceae |
| 26. Leucoagaricus tefastites | 59. Calvatia cyathiformis | Género 36. Amanita |
| Género 6. Macrolepiota | 60. Calvatia gigantea | 96. Amanita sp |
| 27. Macrolepiota rachodes | 61. Calvatia vitiformis | 97. Amanita caesarea |
| Género 7. Montagnea | (=Calvatia caelata) | 98. Amanita muscaria |
| 28. Montagnea arenaria | Género 24. Disciidea | 99. Amanita pantherina |
| Género 8. Podaxis | 62. Disciidea sp | 100. Amanita polytramis |
| 29. Podaxis sp | 63. Disciidea bovista | 101. Amanita rubescens |
| 30. Podaxis pistillaris | 64. Disciidea candida | 102. Amanita solitaria |
| Género 9. Secotium | Género 25. Lycoperdon | 103. Amanita strobiliformis |
| 31. Secotium agaricoides | 65. Lycoperdon sp | 104. Amanita vaginata |
| Familia 2. Boletaceae | 66. Lycoperdon candidum | (=Amanitopsis vaginata) |
| Género 10. Bolbitius | 67. Lycoperdon depressum | 105. Amanita virosa |
| 32. Bolbitius vitellinus | 68. Lycoperdon marginatum | Género 37. Pluteus |
| Género 11. Hebeloma | 69. Lycoperdon muscorum | 106. Pluteus cervinus |
| 33. Hebeloma sp | 70. Lycoperdon pedicelatum | Familia 14. Schizophyllaceae |
| 34. Hebeloma fastibile | 71. Lycoperdon perlatum | Género 38. Schizophyllum |
| Género 12. Panaeolus | (=Lycoperdon gemmatum) | 107. Schizophyllum commune |
| 35. Panaeolus sp | 72. Lycoperdon pulcherrimum | 108. Schizophyllum fasciatum |
| Familia 3. Clavariaceae | 73. Lycoperdon pusillum | 109. Schizophyllum umbrinum |
| Género 13. Clavulinopsis | 74. Lycoperdon pyriforme | |
| 36. Clavulinopsis | 75. Lycoperdon subcarnatum | |
| amethystinoides | 76. Lycoperdon umbrinum | |
| 37. Clavulinopsis comiculata | Familia 9. Marasmiaceae | |
| Familia 4. Coprinaceae | | |
| Género 14. Coprinus | | |

| | | |
|--|--|---|
| <p>Familia 15. Strophariaceae Género 39. Psilocybe 110. <i>Psilocybe</i> (<i>Hypnoloma</i>) sp 111. <i>Psilocybe</i> (<i>Nematoloma</i>) sp 112. <i>Psilocybe</i> fasciculare (= <i>Nematoloma</i> fasciculare) 113. <i>Psilocybe</i> neurantaca (= <i>Nematoloma</i> aurantaca) 114. <i>Psilocybe</i> sublateritium (<i>Nematoloma</i> sublateritium) <i>Psilocybe</i> sp 115. <i>Psilocybe</i> coprophyla Género 40. Pholiota 116. <i>Pholiota</i> sp 117. <i>Pholiota</i> (<i>Flammula</i>?) sp 117. <i>Pholiota</i> spumosa Familia 16. Tricholomataceae Género 41. Clitocybe 118. <i>Clitocybe</i> gibba Género 42. Collybia 119. <i>Collybia</i> sp 120. <i>Collybia</i> alkalivivans Género 43. Hygrophorus 121. <i>Hygrophorus</i> sp 122. <i>Hygrophorus</i> olivaceoalbus 123. <i>Hygrophorus</i> sordidus Género 44. Leucopaxillus 124. <i>Leucopaxillus</i> amarus Género 45. Lyophyllum 125. <i>Lyophyllum</i> decastes Género 46. Mycena 126. <i>Mycena</i> sp 127. <i>Mycena</i> galopus 128. <i>Mycena</i> leana Género 47. Panellus 129. <i>Panellus</i> (<i>Dictyopanus</i>) sp 130. <i>Panellus</i> pusillus (= <i>Dictyopanus</i> pusillus) Género 48. Phaeolepiota 131. <i>Phaeolepiota</i> aurea Género 49. Tricholoma 132. <i>Tricholoma</i> sp 133. <i>Tricholoma</i> flavovirens 134. <i>Tricholoma</i> sejunctum 135. <i>Tricholoma</i> sulphureum 136. <i>Tricholoma</i> terreum Género 50. Tricholoporum 137. <i>Tricholoporum</i> sp Género 51. Trogia 138. <i>Trogia</i> sp Familia 17. Tulostomataceae Género 52. Batarrea 139. <i>Batarrea</i> sp 140. <i>Batarrea</i> digitati 141. <i>Batarrea</i> steverii 142. <i>Batarrea</i> (<i>oides</i>) diguetii Género 53. Tulostoma 143. <i>Tulostoma</i> sp 144. <i>Tulostoma</i> albicans 145. <i>Tulostoma</i> opacum</p> | <p>146. <i>Tulostoma</i> verrucosum Orden Auriculariales Familia 18. Auriculariaceae Género 54. Auricularia 147. <i>Auricularia</i> sp 148. <i>Auricularia</i> auricula 149. <i>Auricularia</i> delicata 150. <i>Auricularia</i> elastica 151. <i>Auricularia</i> intramembranosa 152. <i>Auricularia</i> mesenterica 153. <i>Auricularia</i> poltricha Orden Boletales Familia 19. Boletaceae Género 55. Boletellus 154. <i>Boletellus</i> ruselli Género 56. Boletus 155. <i>Boletus</i> edulis 156. <i>Boletus</i> fraternus 157. <i>Boletus</i> lundius 158. <i>Boletus</i> miniato-olivaceus 159. <i>Boletus</i> pinicola 160. <i>Boletus</i> rabelius 161. <i>Boletus</i> regius 162. <i>Boletus</i> rubellus fraternus Género. <i>Boletus</i> (<i>Xerocomus</i>) sp 163. <i>Boletus</i> illudens (= <i>Xerocomus</i> illudens) 164. <i>Boletus</i> truncatus (= <i>Xerocomus</i> truncatus) <i>Boletus</i> sp Género 57. Leccinum 165. <i>Leccinum</i> chromapes 166. <i>Leccinum</i> crocospodium 167. <i>Leccinum</i> aurantia 168. <i>Leccinum</i> luteum 169. <i>Leccinum</i> rugosiceps Género 58. Strobilomyces 170. <i>Strobilomyces</i> sp 171. <i>Strobilomyces</i> confusus 172. <i>Strobilomyces</i> floccopus 173. <i>Strobilomyces</i> strobilaceus Género 59. Tylophilus 174. <i>Tylophilus</i> sp 175. <i>Tylophilus</i> indecisus 176. <i>Tylophilus</i> plumboviolaceus 177. <i>Tylophilus</i> tabaciatus typicus Familia 20. Gyroporaceae Género 60. Gyroporus 178. <i>Gyroporus</i> sp 179. <i>Gyroporus</i> castaneus Familia 22. Melanogastraceae Género 61. Melanogaster 180. <i>Melanogaster</i> sp Familia 23. Octavianiniaceae Género 62. Octavianina 181. <i>Octavianina</i> sp Familia 24. Paxillaceae Género 63. Gyrodon</p> | <p>182. <i>Gyrodon</i> meruloides Familia 25. Rhizopogonaceae Género 64. Rhizopogon 183. <i>Rhizopogon</i> sp 184. <i>Rhizopogon</i> abietis 185. <i>Rhizopogon</i> couchii 186. <i>Rhizopogon</i> lutescens 187. <i>Rhizopogon</i> ponderosus 188. <i>Rhizopogon</i> rogersii 189. <i>Rhizopogon</i> subaustralis 190. <i>Rhizopogon</i> ventricosporus Familia 26. Sclerodermataceae Género 65. Astraeus 191. <i>Astraeus</i> hygrometricus 192. <i>Astraeus</i> triplex (= <i>Gesstrum</i> triplex) Género 66. Pisolithus 193. <i>Pisolithus</i> tinctorius Género 67. Scleroderma 194. <i>Scleroderma</i> sp 195. <i>Scleroderma</i> aerolatum 196. <i>Scleroderma</i> albidum 197. <i>Scleroderma</i> cepa 198. <i>Scleroderma</i> hypogaeum 199. <i>Scleroderma</i> lycoperoides 200. <i>Scleroderma</i> marginatum 201. <i>Scleroderma</i> verrucosum Familia 27. Suillaceae Género 68. Suillus 202. <i>Suillus</i> americanus 203. <i>Suillus</i> granulatus 204. <i>Suillus</i> lakei 205. <i>Suillus</i> luteus 206. <i>Suillus</i> tomentosus Orden Cantharellales Familia 28. Cantharellaceae Género 69. Cantharellus 207. <i>Cantharellus</i> sp 208. <i>Cantharellus</i> cibarius 209. <i>Cantharellus</i> tubaeformis Género 70. Craterellus 210. <i>Craterellus</i> sp 211. <i>Craterellus</i> cornucopioides 212. <i>Craterellus</i> fallax Familia 29. Clavulinaceae Género 71. Clavulina 213. <i>Clavulina</i> rugosa Orden Dacrymycetales Familia 30. Dacrymycetaceae Género 72. Dacrymyces 214. <i>Dacrymyces</i> sp Género 73. Dacryopinax 215. <i>Dacryopinax</i> spathuliana Orden Hymenochaetales Familia 31. Hymenochaetaceae Género 74. Hymenochaete 216. <i>Hymenochaete</i> sp</p> |
|--|--|---|

217. *Hymenochaete badioferuginea*
 218. *Hymenochaete pinnatifida*
 219. *Hymenochaete rubiginosa*
 220. *Hymenochaete salei*
 221. *Hymenochaete tabacina*
Género 75. Inonotus
 222. *Inonotus hispidus*
 223. *Inonotus radiatus*
 Orden Phallales
 Familia 32. Geastraceae
Género 76 Geastrum
 224. *Geastrum* sp.
 225. *Geastrum campestre*
 226. *Geastrum coronatum*
 227. *Geastrum fibrinatum*
 228. *Geastrum limbatum*
 229. *Geastrum minimum*
 230. *Geastrum quadrifidum*
 231. *Geastrum rufescens*
 232. *Geastrum sacatum*
 233. *Geastrum triplex*
 234. *Geastrum umbilicatum*
Género 77. Mesopheliopsis
 235. *Mesopheliopsis* sp.
 Familia 33. Gomphaceae
Género 78. Gomphus
 236. *Gomphus floccosus*
Género 79 Clavariadelphus
 237. *Clavariadelphus pistillans*
 Familia 34. Phallaceae
Género 80. Clathrus
 238. *Clathrus crispus*
 239. *Clathrus ruber*
Género 81. Lysurus
 240. *Lysurus sphaerocephalus*
 (= *Symbium sphaerocephalus*)
 Familia 35. Ramanaeaceae
Género 82. Ramania
 241. *Ramania* sp.
 242. *Ramania flava*
 243. *Ramania formosa*
 244. *Ramania stricta*
 Orden Polyporales
 Familia 36. Corticiaceae
Género 83. Corticum
 245. *Corticium* sp.
 246. *Corticium caeruleum*
 (= *Pulcherrimum caeruleum*)
 Familia 37. Fomitopsidaceae
Género 84 Daedalea
 247. *Daedalea* sp.
 248. *Daedalea confragosa*
 (*Daedaleopsis confragosa*)
 249. *Daedalea elegans*
 (= *D. ambigua*)
 250. *Daedalea palisoti*
 251. *Daedalea quercina*
 252. *Daedalea unicolor*
 (= *Cerrena unicolor*)
Género 85. Fomitopsis

253. *Fomitopsis cajanderi*
 (= *Fomes sulcosus*)
 254. *Fomitopsis pinicola*
 Familia 38. Ganodermataceae
Género 86. Amauroderma
 255. *Amauroderma* sp.
Género 87 Ganoderma
 256. *Ganoderma* sp.
 257. *Ganoderma annulans*
 258. *Ganoderma aplanatum*
 259. *Ganoderma brownii*
 260. *Ganoderma curtisii*
 261. *Ganoderma lobatum*
 262. *Ganoderma lucidum*
 263. *Ganoderma oregonense*
 264. *Ganoderma sessile*
 Familia 39. Gloeophyllaceae
Género 88. Gloeophyllum
 265. *Gloeophyllum sepiarium*
 266. *Gloeophyllum striatum*
 Familia 40. Haplosporaceae
Género 89. Bjerkandera
 267. *Bjerkandera* sp.
Género 90. Spongipellis
 268. *Spongipellis* sp.
 Familia 41. Meruliaceae
Género 91. Chondrostereum
 269. *Chondrostereum purpureum*
Género 92. Phlebia
 270. *Phlebia* (*Merulius*) sp.
 271. *Phlebia pallens*
 (= *Merulius pallens*)
 272. *Phlebia tremellosus*
 (= *Merulius tremellosus*)
 273. *Phlebia incarnatus*
 (= *Merulius incarnatus*)
 Familia 42. Phanerochaetaeaceae
Género 93. Lopharia
 274. *Lopharia cinerascens*
 275. *Lopharia papyrina*
Género 94 Phanerochaete
 276. *Phanerochaete affinis*
 277. *Phanerochaete cremea*
 278. *Phanerochaete filamentosa*
 279. *Phanerochaete sulphurea*
 Familia 43. Postoscyphaceae
Género 95. Cotylidia
 280. *Cotylidia aurantica*
 281. *Cotylidia diaphana*
 282. *Cotylidia undulata*
Género 96. Cymatoderma
 283. *Cymatoderma caperacea*
 Familia 44. Polyporaceae
Género 97. Cerrena
 284. *Cerrena* sp.
Género 98. Daedalopsis
Daedaleopsis confragosa
Género 99. Favolus
 285. *Favolus* sp.
 286. *Favolus cucullatus*

287. *Favolus rhipidum*
Género 100. Fomes
 288. *Fomes* sp.
 289. *Fomes badius*
 290. *Fomes calcitratus*
 291. *Fomes everhartii*
 (= *Phellinus everhartii*)
 292. *Fomes fastuosus*
 293. *Fomes intus*
 294. *Fomes lividus*
 295. *Fomes melanoporus*
 296. *Fomes nobilissimus*
 297. *Fomes piri*
 298. *Fomes pomaceus*
 (= *Phellinus pomaceus*)
 299. *Fomes rimosus*
 (= *Phellinus rimosus*)
 (= *Phellinus robiniae*)
 300. *Fomes robustus*
 (= *Phellinus robustus*)
 301. *Fomes rubritractus*
 302. *Fomes roseus*
 (¿? *Fomitopsis rosea*)
 303. *Fomes sancti*
 304. *Fomes sanjani*
 305. *Fomes sclerodermus*
 306. *Fomes scutellatus*
 307. *Fomes swieteniae*
 308. *Fomes ulmarus*
 309. *Fomes unius*
 310. *Fomes weinanus*
Género 101. Hexagonia
 311. *Hexagonia* sp.
 312. *Hexagonia papyracea*
 313. *Hexagonia lenius*
 314. *Hexagonia variegata*
 315. *Hexagonia hirta*
Género 102. Lentinus
 316. *Lentinus*
Género 103. Lenzites
 317. *Lenzites* sp.
 318. *Lenzites betulina*
Género 104. Panus
 319. *Panus* sp.
 320. *Panus badius*
 321. *Panus conchatus*
 322. *Panus cinctus*
 323. *Panus nudis*
Género 105. Perenniporia
 324. *Perenniporia* sp.
Género 106. Phaeolus
 325. *Phaeolus schweinitzii*
Género 107. Polyporus
 326. *Polyporus* sp. 1
 327. *Polyporus abietinus*
 (= *Trichaptum abietinum*)
 (= *Hirschioporus abietinus*)
 328. *Polyporus adustus*

| | | |
|--------------------------------------|--|--|
| 329. <i>Polyporus albiceps</i> | 377. <i>Trametes maxima</i> | 407. <i>Russula</i> sp |
| 330. <i>Polyporus anceps</i> | 378. <i>Trametes rigida</i> | 408. <i>Russula crustosa</i> |
| 331. <i>Polyporus arcularius</i> | 379. <i>Trametes trogii</i> | 409. <i>Russula delicata</i> |
| 332. <i>Polyporus azureus</i> | 380. <i>Trametes pubescens</i> | 410. <i>Russula foetens</i> |
| 333. <i>Polyporus azureus</i> | 381. <i>Trametes serialis</i> | 411. <i>Russula lepida</i> |
| (= <i>Polyporus versicolor</i>) | 382. <i>Trametes vaniformis</i> | 412. <i>Russula grata</i> |
| 334. <i>Polyporus berkeleyi</i> | 383. <i>Trametes velutina</i> | 413. <i>Russula sanguinea</i> |
| 335. <i>Polyporus biennis</i> | 384. <i>Trametes versicolor</i> | 414. <i>Russula virescens</i> |
| 336. <i>Polyporus brumalis</i> | 385. <i>Trametes villosa</i> | Familia 54. <i>Stenaceae</i> |
| 337. <i>Polyporus caesius</i> | Género 111. <i>Trichaptum</i> | Género 127. <i>Laxitextum</i> |
| (= <i>Tyromyces caesius</i>) | <i>Trichaptum bifforme</i> | 415. <i>Laxitextum roseo-carneum</i> |
| 338. <i>Polyporus cinnamomeus</i> | <i>Trichaptum fusco-vioaceum</i> | Género 128. <i>Stereum</i> |
| 339. <i>Polyporus conchoides</i> | Género 112. <i>Tyromyces</i> | 416. <i>Stereum</i> sp |
| 340. <i>Polyporus culicoides</i> | <i>Tyromyces caesius</i> | 417. <i>Stereum complicatum</i> |
| 341. <i>Polyporus dichrous</i> | Familia 45. <i>Podocyphaceae</i> | 418. <i>Stereum frustulatum</i> |
| 342. <i>Polyporus dryophila</i> | Género 113. <i>Cymatoderma</i> | 419. <i>Stereum guassapatum</i> |
| 343. <i>Polyporus dryadeus</i> | 386. <i>Cymatoderma</i> sp | 420. <i>Stereum hirsutum</i> |
| 344. <i>Polyporus durescens</i> | (= <i>Cladoderma</i> sp) | 421. <i>Stereum ostrea</i> |
| 345. <i>Polyporus facicola</i> | Familia 46. <i>Sparassidaceae</i> | 422. <i>Stereum subpileatum</i> |
| 346. <i>Polyporus fumosus</i> | Género 114. <i>Sparassis</i> | Familia 55. <i>Telephoraceae</i> |
| 347. <i>Polyporus gilvus</i> | 387. <i>Sparassis crispa</i> | Género 129. <i>Telephora</i> |
| (= <i>Phellinus gilvus</i>) | Familia 47. <i>Steccheriaceae</i> | 423. <i>Telephora terrestris</i> |
| 348. <i>Polyporus glomeratus</i> | Género 115. <i>Irpex</i> | Género 130. <i>Phellodon</i> |
| 349. <i>Polyporus hispidus</i> | 388. <i>Irpex</i> sp | 424. <i>Phellodon</i> sp |
| (= <i>Inonotus hispidus</i>) | 389. <i>Irpex pachydon</i> | Subclase <i>Tremellomycetidae</i> |
| 350. <i>Polyporus hydroides</i> | (= <i>Irpex mollis</i>) | Orden <i>Tremellales</i> |
| 351. <i>Polyporus hirsutus</i> | (= <i>Spongipellis pachydon</i>) | Familia 56. <i>Exidiaceae</i> |
| 352. <i>Polyporus juniperinus</i> | Orden <i>Russulales</i> | Género 131. <i>Echleriella</i> |
| 353. <i>Polyporus leucomelas</i> | Familia 48. <i>Auriscalpiceae</i> | 425. <i>Echleriella</i> sp |
| (= <i>Melanopus leucomelas</i>) | Género 116. <i>Auriscalpium</i> | 426. <i>Echleriella levilliana</i> |
| 354. <i>Polyporus licnoides</i> | 390. <i>Auriscalpium vulgare</i> | 427. <i>Echleriella macropsora</i> |
| 355. <i>Polyporus maximus</i> | Género 117. <i>Clavycorona</i> | Género 132. <i>Exidia</i> |
| 356. <i>Polyporus obtusus</i> | 391. <i>Clavycorona pyxidata</i> | 428. <i>Exidia</i> sp |
| 357. <i>Polyporus occidentales</i> | 392. <i>Clavycorona hypoxidia</i> | Género 133. <i>Tremelodendron</i> |
| (= <i>Trametes occidentales</i>) | Género 118. <i>Lentinellus</i> | 429. <i>Tremelodendron</i> sp |
| 358. <i>Polyporus palliatus</i> | 393. <i>Lentinellus urinus</i> | 430. <i>Tremelodendron pallidum</i> |
| 359. <i>Polyporus perennis</i> | Familia 49. <i>Bondarzewiaceae</i> | Género 134. <i>Tremiscus</i> |
| 360. <i>Polyporus pargamensis</i> | Género 120. <i>Bondarzewia</i> | 431. <i>Tremiscus helveloides</i> |
| (= <i>Trichaptum biformis</i>) | 394. <i>Bondarzewia berkeleyi</i> | (= <i>Phlogiotis helveloides</i>) |
| (= <i>Hirschporus pargamensis</i>) | Género 121. <i>Steccherium</i> | Familia 57. <i>Tremellaceae</i> |
| 361. <i>Polyporus picipes</i> | 395. <i>Steccherium</i> sp | Género 135. <i>Tremella</i> |
| 362. <i>Polyporus pinusius</i> | 396. <i>Steccherium senatum</i> | 432. <i>Tremella</i> sp |
| 363. <i>Polyporus pubescens</i> | Familia 50. <i>Hericaceae</i> | 433. <i>Tremella fusiformis</i> |
| (= <i>Trametes pubescens</i>) | Género 122. <i>Hericium</i> | 434. <i>Tremella lutea</i> |
| 364. <i>Polyporus radiatus</i> | 397. <i>Hericium</i> sp | 435. <i>Tremella lutescens</i> |
| 365. <i>Polyporus subchartaceus</i> | 398. <i>Hericium erinaceus</i> | 436. <i>Tremella mesenterica</i> |
| 366. <i>Polyporus sulphureus</i> | Familia 51. <i>Lachnocladiaceae</i> | 437. <i>Tremella reticulata</i> |
| (= <i>Laetiporus sulphureus</i>) | Género 123. <i>Asterostroma</i> | |
| 367. <i>Polyporus tomentosus</i> | 399. <i>Asterostroma ochroleucum</i> | |
| 368. <i>Polyporus tulipiferae</i> | Familia 52. <i>Peniophoraceae</i> | |
| 369. <i>Polyporus villosus</i> | Género 124. <i>Peniophora</i> | |
| Género 108. <i>Poria</i> | 400. <i>Peniophora</i> sp | |
| 370. <i>Poria</i> sp | 401. <i>Peniophora albobadis</i> | |
| 371. <i>Poria taxicola</i> | 402. <i>Peniophora gigantea</i> | |
| 372. <i>Poria tenuis</i> | 403. <i>Peniophora sambuci</i> | |
| Género 109. <i>Pycnoporus</i> | 404. <i>Peniophora sulfurea</i> | |
| 373. <i>Pycnoporus sanguineus</i> | Familia 53. <i>Russulaceae</i> | |
| Género 110. <i>Trametes</i> | Género 125. <i>Lactarius</i> | |
| 374. <i>Trametes</i> sp | 405. <i>Lactarius</i> sp | |
| 375. <i>Trametes americana</i> | 406. <i>Lactarius zonarius</i> | |
| 376. <i>Trametes hispida</i> | Género 126. <i>Russula</i> | |

Tabla 2. Importancia de los géneros de basidiomicetos de Nuevo León presentes en la Colección UNL

| Total de Géneros/ Porcentaje | Comestibles | Medicinales | Venenosos | Causantes de pudrición en madera | Alucinógenos | Productores de esencias o sabores |
|---------------------------------|-------------|-------------|-----------|----------------------------------|--------------|-----------------------------------|
| 135 | 19 | 10 | 11 | 25 | 1 | 4 |
| 100 | 14 | 7 | 8 | 19 | 1 | 3 |

Tabla 3. Resultado de la búsqueda de aislados nativos con habilidades ligninolítica y decolorante

| Aislados totales | Poly-R 478 + (Ligninolíticos) | Mejores decolorantes de RBBR, AR44 y CV | Mejores decolorantes de Indigo, AG27, OII, RB5, AR183, BBR |
|------------------|-------------------------------|---|--|
| 85 | 71 | 10 | 5 |

Tabla 4. Resultado de la búsqueda de aislados nativos con actividad bactericida sobre patógenos que contaminan alimentos

| | Bacterias patógenas | | |
|--|------------------------------|--------------------------------|--------------------|
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Salmonella thyphimurium</i> | <i>Shigella sp</i> |
| Porcentaje de los aislados con actividad bactericida | 68 | 58 | 46 |

Carlile, M. J., S. C. Watkinson, G. W. Gooday. 2001. The Fungi. 2nd Edition. Elsevier Academic Press. Cal. USA. 588 pp.

Chang, S. T. 1999. Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st Century – non-green revolution. Int. J. Med. Mush. 1: 1-7.

Cifuentes J., Villegas, M. García, R., Vidal, G., Sierra, S. Valenzuela, G. Pérez, R y Morales E. 2004. Distribución de macromicetos: Una aproximación al análisis de áreas de endemismos. En: Biodiversidad de la Sierra Madre Oriental. Luna, I., J. J. Morrone y D. Espinoza (Eds.). La Prensa de Ciencia, México, D. F. pp. 355-374.

Guzmán, G. 1978. Identificación de los hongos. Comestibles, venenosos y alucinantes. Ed. LIMUSA, S. A. México. 2^o. Reimpresión. 450 pp.

Guzmán, G. 2003. Los hongos de El Edén Quintana Roo (Introducción a la micobiota tropical de México). 1^o. Ed. Instituto de Ecología, A. C. Y CONABIO. Xalapa, Ver. México. 316 pp.

SERGIO M. SALCEDO M., MARCELA GONZÁLEZ Á., JOSÉ S. GARCÍA A., J. GUADALUPE GUTIÉRREZ S., IRENE CORTINA S., CARLOS E. HERNÁNDEZ L.

- Kirk, P.M., P.F. Cannon, J. C. David, J. A. Stalpers (Eds.). 2001. Ainsworth and Bisby's *DICTIONARY OF THE FUNGI*. 9th Edition. CAB International. Oxon, UK. 655 pp.
- Largent, D. L. & T. J. Baroni 1988. How to identify mushrooms to genus VI: Modern genera. Mad River Press, Inc. Eureka, Calif. USA. 277 pp.
- Lindequist, U., T. H. J. Niedermeyer, W-D Jülich. 2005. The pharmacological potential of mushrooms. *eCAM*. 2(3):285-299.
- Metzler, S. & V. Metzler. 1992. *Texas mushrooms a field guide*. 1st Edition. The Univ. Of Texas Press. Austin, Tx. USA. 350pp.
- Singer, R., 1986. *The Agaricales in modern taxonomy*. 4a. Ed. Koeltz sci. books. Koenigskin, FRA. 981 pp.
- Smith., J. E., N. J. Rowan and R. Sullivan. 2002. Medicinal mushrooms: a rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. *Biotechnology Letters*. 24: 1839-1845.
- Stamets, P. 2000. *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. 3rd Edition. Ten Speed Press. Olympia, WA, USA.
- Wu, Q. F., B. M. Thiers & D. H. Pfister. 2004. Preparation, preservation, and use of fungal specimens in herbaria. In: Mueller, G. M., G. F. Bills & M. S. Foster (eds.) *Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier Academic Press. San Diego, CA, USA: pp. 23-37.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la UANL (Proyecto PAICYT Clave CN 1311-06) por el apoyo financiero recibido para la realización del presente trabajo.