



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD IZTAPALAPA**

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA LACASA A  
PARTIR DE *Agaricus bisporus***

**TESIS QUE PRESENTA:**

**ROMAN JIMENEZ MORALES**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA**

**ASESOR**

**DR. GUSTAVO VINIEGRA GONZALEZ**

**Enero 20 de 1998**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

DENOMINACION DE LA TESIS  
 OBTENCION Y CARACTERIZACION  
 DE LA ENZIMA LACASA A PARTIR  
 DE Agaricus bisporus.

En México, D. F. se presentaron a las 15:00 horas del  
 día 20 del mes de ENERO del año 1998  
 en la Unidad IZTAPALAPA de la Universidad Autónoma  
 Metropolitana, los suscritos miembros del Jurado.

- DR. SERGIO HUERTA OCHOA;  
DR. GUSTAVO VINIEGRA GONZALEZ;  
DR. CARLOS REGALADO GONZALEZ Y  
DR. ERNESTO FAVELA TORRES

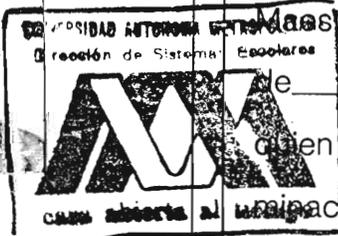
bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario  
 el último se reunieron para proceder al examen de grado de

Maestro en: BIOTECNOLOGIA  
 de ROMAN JIMENEZ MORALES

quien presentó una comunicación de resultados, cuya deno-  
 minación aparece al margen y de acuerdo con el artículo 78  
 fracciones I, II, III y V del Reglamento de Estudios Superiores  
 de esta Universidad, los miembros del Jurado resolvieron:

Aprobarlo

Acto continuo, el Presidente del Jurado comunicó al interesa-  
 do el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue  
 tomada la protesta.



ROMAN JIMENEZ MORALES  
 FIRMA DEL INTERESADO

REVISO

DIRECCIÓN DE SISTEMAS ESCOLARES

DR. SERGIO HUERTA OCHOA  
 PRESIDENTE

DR. GUSTAVO VINIEGRA G.  
 DR. CARLOS REGALADO G.  
 VOCAL

DR. ERNESTO FAVELA TORRES  
 SECRETARIO

El suscrito Director de División de C.B.S. hace  
 constar que las firmas que aparecen son auténticas y co-  
 rresponden a los señores Miembros del Jurado cuyos nom-  
 bres aparecen en esta acta.

DR. JOSE LUIS ARREDONDO F.  
 DIRECTOR DE DIVISION

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE .....</b>	<b>2</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>3</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>5</b>
<b>RESUMEN. ....</b>	<b>6</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN. ....</b>	<b>7</b>
<b>2 MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Hongos.....</b>	<b>9</b>
<b>2.2 Enzimas .....</b>	<b>10</b>
<b>2.3 Lacasa.....</b>	<b>11</b>
<b>2.4 Reacciones catalizadas por lacasa .....</b>	<b>11</b>
<b>2.5 Función de la enzima lacasa .....</b>	<b>13</b>
2.5.1 La función de la lacasa en la morfogénesis. ....	13
<b>2.6 Características generales de la enzima lacasa. ....</b>	<b>14</b>
<b>2.7 Contenido de cobre .....</b>	<b>16</b>
<b>2.8 Estudio de la secuencia de los genes y el cDNA de lacasas .....</b>	<b>16</b>
2.8.1 Clonación y expresión de la enzima lacasa .....	17
<b>2.9 Métodos de purificación.....</b>	<b>18</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 OBJETIVO GENERAL. ....</b>	<b>23</b>
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>23</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>24</b>
<b>5 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
<b>5.1 Organismo.....</b>	<b>25</b>

## INDICE

---

<b>5.2 Tratamiento del extracto enzimático.....</b>	<b>25</b>
<b>5.3 Determinación de la actividad de la lacasa. ....</b>	<b>25</b>
5.8.1 Columna de exclusión Superosa Pharmacia .....	27
5.8.2 Columna de intercambio aniónico .....	27
<b>5.9 Caracterización.....</b>	<b>28</b>
5.9.1 Determinación de $K_M$ y $V_{max}$ .....	28
5.9.2 Determinación del pH de actividad óptima. ....	29
5.9.3 Temperatura de estabilidad.....	29
5.9.4 Peso molecular de la enzima.....	30
<b>6 RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
<b>6.1 Medición de la actividad enzimática .....</b>	<b>31</b>
6.1.2 Caracterización del extracto crudo.....	31
<b>6.2 Enfoque isoelectrico .....</b>	<b>34</b>
<b>6.3 Columna de Sephadex.....</b>	<b>34</b>
<b>6.4 Columna de intercambio iónico .....</b>	<b>35</b>
<b>6.5 Caracterización de la enzima purificada .....</b>	<b>36</b>
6.5.1 Tempertura de estabilidad y energía de inactivación .....	36
6.5.2 Evaluación de $K_m$ y $V_{max}$ de la enzima pura.....	37
6.5.3 Evaluación del pH óptimo de la enzima purificada .....	39
6.5.4 Electroforesis y Zimografía.....	40
<b>7. DISCUSIÓN .....</b>	<b>43</b>
<b>8 CONCLUSIONES .....</b>	<b>46</b>
<b>9. RECOMENDACIONES. ....</b>	<b>47</b>
<b>10 BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>48</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. EL COBRE DE LA ENZIMA OXIDADA ( $E-Cu^{2+}$ ) ES REDUCIDO POR UN SUSTRATO Y EL COBRE REDUCIDO ( $E-Cu^+$ ) ES REOXIDADO POR UN SEGUNDO SUSTRATO, QUE USUALMENTE ES EL OXÍGENO MOLECULAR. ESTO OCURRE.....	11
FIGURA 2. (A) LA REACCIÓN TÍPICA DE LACASA, DONDE UN DIFENOL (HIDROXIQUINONA MOSTRADA AQUÍ) CEDE UN ELECTRÓN DE OXIDACIÓN CON EL CUAL SE FORMA UN RADICAL LIBRE DE OXIGENO. ESTA ESPECIE PUEDE CONVERTIRSE A UNA QUINONA EN UN SEGUNDO PASO CATALIZADO POR LA ENZIMA O POR DESPROPORCIONACIÓN ESPONTANEA. LA QUINONA Y EL RADICAL LIBRE PUEDEN POLIMERIZARSE. (B) LA REACCIÓN DE LACASA CON SIRINGALDIZINA COMO SUSTRATO TIENE COMO PRODUCTO UN RADICAL LIBRE. LA QUINONA SE FORMA AL LIBERARSE UN.....	12

FIGURA 3. DIAGRAMA DE PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA LACASA A PARTIR DE *AGARICUS BISPORUS* REPORTADO POR WOOD (1980A). SE MUESTRAN LOS DIFERENTES PASOS DE LA PURIFICACIÓN A PARTIR DE 15 LITROS DE EXTRACTO DE MALTA INCOCULADO CON MICELIO DE *AGARICUS BISPORUS*. 20

FIGURA 4. DIAGRAMA DE PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA LACASA A PARTIR DE *AGARICUS BISPORUS* REPORTADO POR MATCHMAN Y WOOD EN 1985; DONDE SE MUESTRAN LOS DIFERENTES PASOS DE LA PURIFICACIÓN A PARTIR DE 3 KG. DE COMPOSTA LAVADA EN AGUA DESIONIZADA PAR OBTENER 6 LITROS DE EXTRACTO. .... 21

FIGURA 5. DIAGRAMA DE PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA LACASA A PARTIR DE *AGARICUS BISPORUS*..... 28

FIGURA 6 PARA DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD INICIAL SE TOMÓ LA PENDIENTE DE LOS DATOS OBTENIDOS CON EL ESPECTROFOTÓMETRO EN UN TIEMPO DE 0 A 360 SEGUNDOS DETERMINANDO UNA PENDIENTE PARA LA CONCENTRACIÓN DEL SUSTRATO. PARA ESTE EJEMPLO LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO ES DE 4 mM. .... 29

FIGURA 7. GRÁFICA DE LINEWEVER BURK PARA DETERMINACIÓN DE  $K_M$  Y  $V_{MAX}$  CON UNA  $r = 0.964$  DONDE SE OBTUVO DE LAS INTERSECCIONES  $K_M$  DE 2.8 mM Y UNA  $V_{MAX}$  DE 517.6  $\mu\text{MOL}/\text{MIN} \times \text{ML}$ . .... 32

FIGURA 8. GRÁFICA DE ARRHENIUS PARA DETERMINAR LA  $E_a$  DE EL EXTRACTO CRUDO DONDE  $m = -E_a/R$  DONDE R ES LA CONSTANTE DE LOS GASES OBTENIÉNDOSE UN VALOR DE 23.14 KJAL/MOL. UTILIZANDO UNA CONCENTRACIÓN DE 30 mM Y UNA PH DE 6.5..... 33

FIGURA 9. GRÁFICA DE VELOCIDAD INICIAL CONTRA PH PARA DETERMINAR EL PH ÓPTIMO DEL EXTRACTO CRUDO DONDE SE PUEDE OBSERVAR LA MÁXIMA ACTIVIDAD SE OBTIENE ENTRE UN PH DE 6.5 Y 7.5. 33

FIGURA 10. PERFIL DE PH Y CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA DE LAS DIFERENTES FRACCIONES OBTENIDAS DEL ENFOQUE ISOELECTRICO EN EL ROTOFOR. .... 34

FIGURA 11. CROMATOGRAMA DE LA COLUMNA DE SEPHADEX SUPEROSE 75 EL PICO MARCADO PRESENTA ACTIVIDAD DE LACASA Y LA ACTIVIDAD SIGUE ASOCIADA AL COLOR. EL EJE Y1 ES LA CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA EN D.O. A 280 NM, EL EJE Y2 MUESTRA LA CONDUCTIVIDAD EN mM. EL EJE DE LA X MUESTRA EL TIEMPO Y EL EJE SUPERIOR EL NÚMERO DE MUESTRA. .... 35

FIGURA 12. CROMATOGRAMA DE LA COLUMNA DE INTERCAMBIO IÓNICO SE PUEDE OBSERVA UN PICO AL TENER EL 30 % DE NaCl A LOS 15 MIN QUE TIENE ACTIVIDAD DE LACASA. EL EJE Y1 MUESATRA LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN D.O., EL EJE Y2 MUESTRA LA CONDUCTIVIDAD EN mM Y EL EJE X ES EL TIEMPO EL EJE SUPERIOR MUESTRA EL NÚMERO DE MUESTRA. EL PICO MARCADO MUESTRA UNA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE 545 MMOL/MG X MIN UTILIZANDO P-CRESOL COMO SUSTRATO. .... 36

FIGURA 13. DIFERENTES VELOCIDADES INICIALES A DIFERENTES TEMPERATURAS UTILIZANDO AMORTIGUADOR DE FOSFATOS PH 6.5 0.01M CON 2mM DE P-CRESOL COMO SUSTRATO. .... 37

FIGURA 14. GRÁFICA DE ARRHENIUS Y CALCULO DE LA ENERGÍA DE INACTIVACIÓN DE LA ENZIMA LACASA UTILIZANDO AMORTIGUADOR DE FOSFATOS PH 6.5, 0.01M CON 2 mM DE P-CRESOL COMO SUSTRATO. .... 37

FIGURA 15. VELOCIDADES INICIALES CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SUSTRATO, LOS PUNTOS REDONDOS MUESTRAN LOS DATOS EXPERIMENTALES Y LA LÍNEA CONTINUA LOS VALORES CALCULADOS. .... 38

FIGURA 16. DOBLES RECÍPROCAS DE LINEWABER BURK PARA CALCULAR  $K_M$  Y  $V_{MAX}$  SE OBTUVIERON LOS SIGUIENTES VALORES PARA  $K_M = 717.4\mu\text{M}$  Y UNA  $V_{MAX}$  DE 184.5 $\mu\text{MOL}/\text{MG} \times \text{ML}$ . .... 39

FIGURA 17. COMPORTAMIENTO DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA LACASA A DIFERENTES PH'S UTILIZANDO UN AMORTIGUADOR DE ACETATOS 0.01 M Y UNA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO DE 2 mM Y UNA TEMPERATURA DE 30° C ..... 40

FIGURA 18. ELECTROFORESIS REALIZADA EN GEL DE POLIACRILAMIDA AL 8%; M MARCADORES DE PESO MOLECULAR, A EXTRACTO CRUDO B ROTOFOR c COLUMNA p6 D INTERCAMBIO IÓNICO. LOS MARCADORES SON  $\alpha$  MACROGLOBULINA 198,  $\beta$  GALACTOSIDASA 116, FRUCTOSA 6-FOSFATO CINASA 86, PIRUVATO CINASA 66, FUMARASA 56, DESHIDROGENASA LÁCTICA 40.5, TRIFOSFATO ISOMERASA 36 KDA. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA POR CARRIL: A; 15.65; B, 18; c, 11; y D, 2.4  $\mu\text{G}$  DE PROTEÍNA..... 41

FIGURA 19. REGRESIÓN DE LOS ESTÁNDARES DE PESO MOLECULAR CONTRA LA DISTANCIA PARA EL CALCULO DEL PESO MOLECULAR DE LA ENZIMA. .... 41

FIGURA 20.. ZIMOGRAFÍA. SE LLEVO A CABO EN UN GEL DE ELECTROFORESIS AL 8%. EL CARRIL A, ES EL EXTRACTO CRUDO,. EL CARRIL B, MUESTRA LA ACTIVIDAD DEL EXTRACTO OBTENIDO CON EL

## INDICE

---

ROTOFOR. EL CARRIL C, MUESTRA LA FRACCIÓN OBTENIDA DE LA COLUMNA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO. EL CARRIL D, MUESTRA UNA FRACCIÓN DE UN EXTRACTO CRUDO EN REFRIGERACIÓN.. 42

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. PRINCIPALES LACASAS ESTUDIADAS EN LOS ULTIMOS 30 AÑOS. ADAPTADO DE THURSTON (1994).....	15
TABLA 2. ACTIVIDADES ESPECÍFICAS DURANTE EL PROCESO DE PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA LACASA DE <i>A. BISPORUS</i> .....	42
TABLA 3. DATOS REPORTADOS PARA LACASAS DE DIFERENTE FUENTE.....	44
TABLA 4. CARACTERÍSTICAS DEL EXTRACTO CRUDO Y DE LA ENZIMA PURA UTILIZANDO P-CRESOL Y SIRINGALDIZINA COMO SUSTRATO.....	44

### RESUMEN.

La producción de hongos comestibles requiere un desarrollo biotecnológico para bioconvertir, rentablemente y a gran escala, residuos lignocelulósicos agrícolas y forestales en alimento de consumo humano directo. Anualmente se producen 2,000,000 de toneladas de hongos comestibles en el mundo, cuyo valor económico supera los 5 000 millones de dólares (Martínez y col., 1993); la composta comercial utilizada como sustrato sólido para el crecimiento de hongos es una fuente de bajo costo la cual, cuando es inoculada con micelio de *Agaricus bisporus*, es una fuente de muchas enzimas extracelulares del tipo oxidativas e hidrolíticas, siendo la más abundante la llamada lacasa (Matcham y Wood, 1992).

En este trabajo se plantea la identificación de una posible fuente industrial de lacasa a partir de los materiales presentes en la industria del hongo comestible, obteniéndose una diversificación del uso de subproductos de los hongos comestibles. El extracto crudo de lacasa puede aplicarse en la biorremediación en la oxidación selectiva de pigmentos fenólicos p. ej.: desteñido de telas con azul índigo.

La lacasa producida por *A. bisporus* fue purificada 15 veces, con un porcentaje de recuperación del 4.4% después de 3 etapas de purificación. El tiempo de purificación enzimática total requerido fue de 3 horas.

El punto isoelectrico (pI), de la lacasa producida por *A. bisporus*, fue de 4.2.

El peso molecular de la enzima fue de 100 kDa aproximadamente.

La temperatura óptima de actividad enzimática fue de 30° C y su energía de inactivación de 15.17 Kcal/mol.

El pH óptimo fue de 6.5 utilizando un amortiguador de fosfatos 0.01M.

El  $K_M$  fue de 717.4  $\mu$ M y la  $V_{max}$  de 184.5  $\mu$ mol/min x ml, con una concentración de proteína de 0.016 mg/mL la cual correspondió a una actividad específica de 545mmol/mg minuto

La metodología de purificación de este tipo de enzimas podrá ser útil para futuros estudios que permitan caracterizar y clonar los genes correspondientes para su eventual producción mediante ingeniería genética, usando organismos transformados como los del género *Aspergillus* que son mohos de más rápido crecimiento que los hongos productores de lacasas.

### 1 INTRODUCCIÓN.

La mayoría de los contaminantes fenólicos en los ríos son producidos por el pulpeo de la celulosa y por las industrias del papel principalmente en la fase de la extracción alcalina del blanqueo de la pulpa de madera que contribuye con el 50% de la carga del color (Ferrer, 1991). Convencionalmente los métodos de tratamiento, como las lagunas de aireación y las plantas de lodos activados, son inefectivas en la remoción de esos colores o son métodos extremadamente caros (Ferrer, 1991). Los contaminantes fenólicos pueden ingresar al medio ambiente de diferentes fuentes, incluyendo la degradación parcial de herbicidas fenoxi (Smith, 1985), los conservadores para madera (Valo, 1984), y los desperdicios de las industrias relacionadas con el petróleo (Guenther, 1981). Estos componentes fenólicos tienen varios grados de toxicidad y esto repercute en el medio ambiente. Sin embargo, muchos clorofenoles, cresoles y otros compuestos son biodegradables (Fewson, 1981; Stirt, 1985). Ciertas transformaciones biológicas y reacciones químicas pueden alterar la toxicidad de estos compuestos llegan incluso a la mineralización que es la conversión de materia orgánica en CO<sub>2</sub>, agua y sales minerales, pero la degradación parcial o algunas transformaciones químicas pueden incrementar o disminuir la toxicidad de un compuesto, (Fewson 1981). Una vía para disminuir los efectos tóxicos de algunos compuestos es la unión a ácidos o arcillas u otro tipo de material (Richards, 1986). Esta unión puede reducir la cantidad de material disponible para interactuar con la biota (McCarthy, 1985; Ogram, 1985). Por lo tanto, la cantidad de componente disponible se reduce y los efectos tóxicos también disminuyen. Diferentes polifenol oxidasas catalizan el acoplamiento oxidativo de compuestos fenólicos, resultando de la formación de compuestos poliméricos (Sjoblad, 1981). Recientemente el uso potencial de peroxidasas fue extendido hacia la remoción de desperdicios tóxicos y también se han ocupado a nivel laboratorio para remover eficientemente aminas aromáticas que pueden ser carcinógenicas a partir de efluentes industriales (Klibanov y Morris 1981), y compuestos coloridos de bajo peso molecular (Paice y Jurasek, 1984; Jurasek y Paice, 1986; Hopkins, 1984). A pesar de estos usos la aplicación de las peroxidasas a nivel industrial ha sido limitada, principalmente por su relativa inestabilidad, sus altos costos de aislamiento y purificación, y la dificultad en recuperar la actividad enzimática después de completar el proceso catalítico (Kennety y Cabral, 1987; Hakulin, 1987). La lacasa y las peroxidasas oxidan compuestos fenólicos a radicales oxiariles, con la polimerización espontánea de éstos para formar complejos insolubles que puedan ser removidos por precipitación, filtración o centrifugación (Davis y Burns, 1990).

Un tipo de fenol oxidasa es la lacasa y es producida por diferentes hongos incluyendo *A. bisporus*. Se ha analizado el potencial que representaría para el país el desarrollo de la producción de hongos comestibles en el campo mexicano (Martínez-Carrera, 1993). Se trata de una biotecnología microbiana capaz de bioconvertir, rentablemente y a gran escala, residuos lignocelulósicos agrícolas y forestales en alimento para el consumo humano directo. Anualmente se producen en el mundo más de 2 000 000 de toneladas de hongos comestibles, cuyo valor económico supera los 5 000 millones de dólares (O'Brain, 1989).

La producción de lacasa a partir de residuos de los hongos diversificaría la industria alimentaria dándole un valor comercial a dichos residuos. Sin embargo una fracción del micelio embebido en los residuos del sustrato y los fragmentos de los basidiocarpos realmente se destinan a la producción de compostas sin rescatarse de ellos productos valiosos como las enzimas.

En este trabajo se desarrolla una adaptación con mejoras en la reducción de los procesos de separación para purificar la enzima lacasa obtenida de basidiocarpos de *A. bisporus* con el propósito de facilitar estudios posteriores de esta enzima de gran interés biotecnológico.

## 2 MARCO TEÓRICO

### 2.1 Hongos

Los hongos carecen de clorofila, y se pueden diferenciar de las bacterias porque las células fúngicas son mucho mayores y contienen un núcleo, vacuolas y mitocondrias, típicas de las células eucarióticas. Aunque los hongos son un grupo grande y muy variado de organismos eucarióticos, tres grupos de ellos tienen una gran importancia práctica: los mohos, las levaduras y las setas.

El hábitat de los hongos es muy diverso, algunos son acuáticos, y viven principalmente en agua dulce, pero también se conocen algunos hongos marinos. Sin embargo, la mayor parte de los hongos tienen hábitats terrestres, sea en la tierra o en materia vegetal muerta y estos dos tipos desempeñan una función crucial en la mineralización del carbono orgánico en la naturaleza. Una gran cantidad de hongos son parásitos de plantas terrestres (Brock y Madigan, 1993).

Todos los hongos son organotróficos, porque al carecer de clorofila, no pueden realizar fotosíntesis y tampoco tienen actividades litotróficas. Pero al compararlos con las bacterias organotróficas, los hongos tienen requerimientos de nutrición mucho más simples y sus procesos metabólicos y biosintéticos no son relativamente sencillos. Sin embargo, en sus ciclos sexuales de vida presentan una diferenciación considerable; lo cual permite su clasificación (Brock y Madigan, 1993).

Varias clases de hongos se utilizan como fuentes de alimento humano, de los cuales los más importantes son las setas. Las setas son un grupo de hongos filamentosos que forman grandes y complicadas estructuras llamadas cuerpos fructificantes o basidiocarpos. El cuerpo fructificante es lo que comúnmente se llama seta. Este se forma por la asociación de una gran cantidad de hifas individuales pues, el cuerpo fructificante del hongo se corta y examina bajo el microscopio, se pueden observar las hifas individuales prensadas en apretada unión (Brock y Madigan, 1993).

Durante la mayor parte de su existencia estos hongos viven como micelios simples, que crecen dentro de la tierra, en la hojarasca o en los leños en descomposición. Cuando las condiciones del ambiente son favorables, desarrollan el cuerpo fructificante, el cual se inicia como una pequeña estructura en forma de botón que se desarrolla bajo el suelo y posteriormente se expande en el cuerpo fructificante que

vemos emerger del suelo. Los nutrientes para su desarrollo provienen de la materia orgánica local y son tomados por los filamentos de las hifas, los cuales, como las raíces de una planta, alimentan el cuerpo fructificante en desarrollo. Las esporas sexuales, llamadas basidiosporas, se forman al nacer en la parte interior del cuerpo fructificante, ya sea de placas planas llamadas agallas, o dentro de poros profundos. Con frecuencia las esporas tienen color e imparten este color a la parte inferior de la cabeza del cuerpo fructificante. Algunas setas, llamadas cuescos producen sus esporas dentro del cuerpo fructificante esféricos con preferencia a agallas o poros; las esporas se esparcen hacia afuera a través de roturas o agujeros que se desarrollan en el cuerpo fructificante al secarse. La espora es el agente de dispersión de los hongos y es llevada por el viento. Si cae en un sitio favorable, la espora germinará e iniciará el desarrollo de una nueva hifa, que cada vez producirá micelio y cuerpo fructificante (Brock y Madigan, 1993).

El hongo comercialmente disponible en la mayor parte del mundo es el *Agaricus bisporus*, que es un basidiomiceto, de color blanco el cual durante su crecimiento, produce la enzima lacasa (Wood y Goodenough 1977), cuya actividad se pierde durante la fructificación (Wood, 1980) y que es el objeto de este estudio.

### **2.2 Enzimas**

Una enzima es una proteína que actúa como catalizador biológico que acelera reacciones bioquímicas a muy altas velocidades con un elevado grado de especificidad. En su ausencia la mayoría de las transformaciones químicas requeridas para mantener activas las células tardarían mucho tiempo en efectuarse o simplemente no procederían. Su nombre proviene del griego y significa “en la levadura”, ya que a finales del siglo pasado, cuando se creó el término, se pensaba que estos compuestos sólo actuaban en el interior de las células.

La producción de enzimas ocurre en todas las células vivas, donde éstas catalizan y regulan reacciones de rutas bioquímicas esenciales para la existencia del sistema vivo. La información para la síntesis de este tipo de biomoléculas están almacenados en las cadenas de ADN por medio del código genético que estipula en tripletes de nucleótidos la identidad de cada uno de los aminoácidos que forman las proteínas.

### 2.3 Lacasa

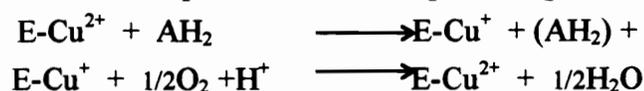
La lacasa es una polifenol oxidasa (*p*-difenoil oxidasa, EC-1.10.3.2), es una de las muchas enzimas que han sido estudiadas desde el final del último siglo. La enzima lacasa contiene cobre en su grupo prostetico, fue descubierta en exudados del árbol de licor japonés *Rhus vernicifera* (Yoshida, 1883), y subsecuentemente demostró ser una enzima fúngica (Bertrand, 1896; Laborde, 1896). Hasta el momento solamente hay una bacteria que contiene lacasa *Azospirillum lipoferum*. Las oxidasas azules han sido intensivamente estudiadas, pero no producidas porque ellas están asociadas con las oxidasas terminales de la respiración aerobica y tienen la habilidad de reducir el oxígeno molecular a agua.

La lacasa oxida polifenoles, fenoles metoxi sustituidos, diaminas y un considerable grupo de otros compuestos pero que no oxida la tirosina.

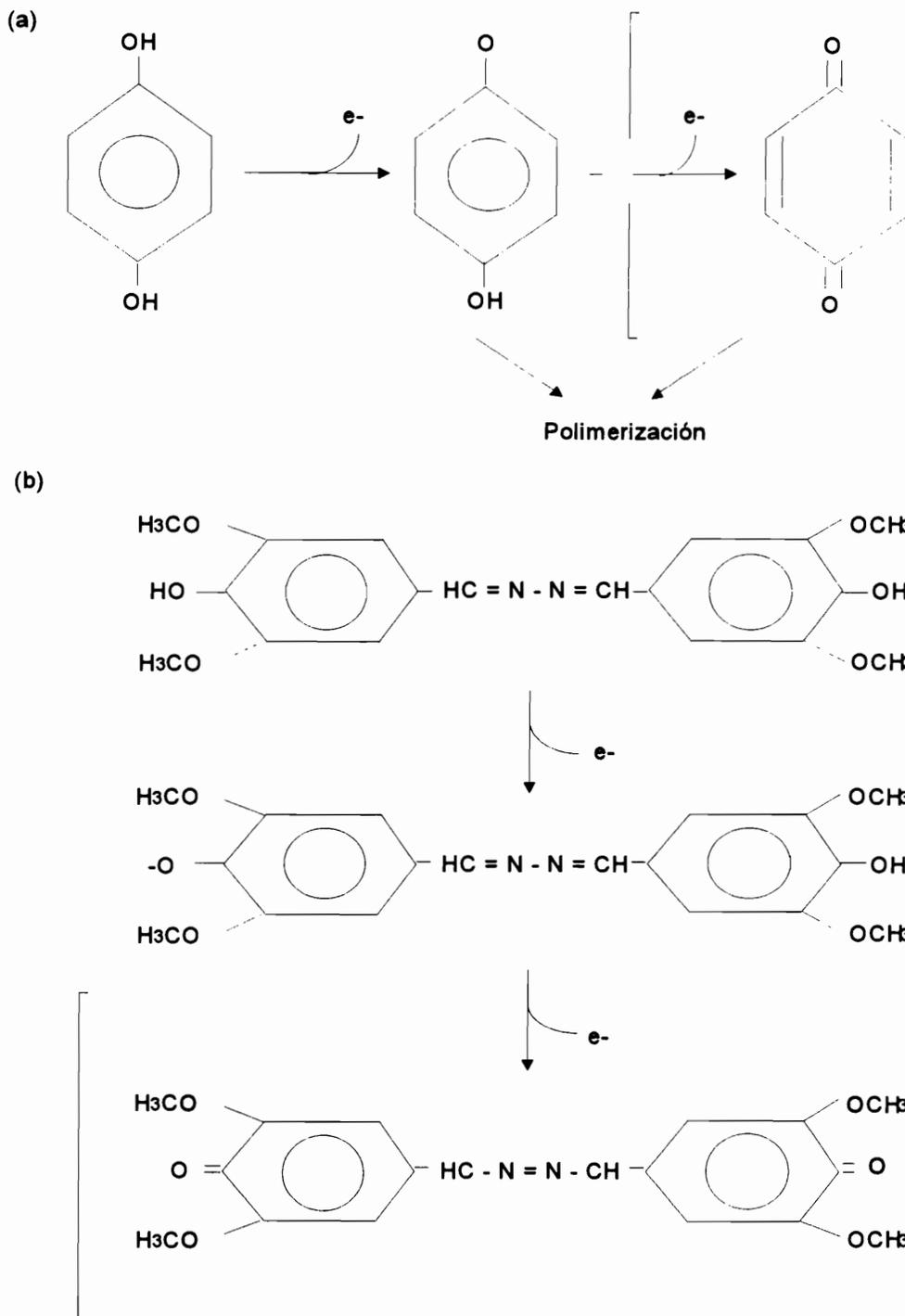
### 2.4 Reacciones catalizadas por lacasa

La reducción del oxígeno para producir agua es acompañada por la oxidación, típicamente, de un sustrato fenólico. La dificultad para definir a la lacasa por la reducción de este sustrato se debe, primero, a que la lacasa tiene un gran número de sustratos que se confunden con otro tipo de oxidasas, tales como: tirosinasas y la monofenolasa mono-oxigenasa, EC-1.14.18.1 (Mayer y Harel, 1979). Segundo, las lacasas son inespecíficas pero su diversidad en cuanto a los sustratos oxidables difiere de una lacasa a otra (Wood, 1980a). Los difenoles simples como hidroquinonas y catecoles son buenos sustratos para la mayoría de las lacasas, pero no para todas, pero el guayacol y la 2,6-dimetoxifenol son mejores, el *p*-fenilén diamina es el sustrato más utilizado junto con la siringaldizina [N,N'-bis(3,5-dimetoxi-4-hidroxibencilideno hidrazina)] (fig. 2), pues ya que es considerado el único sustrato específico para las enzimas lacasas (Harkin, 1974).

La reacción de la enzima lacasa puede ser ilustrada por el esquema de la fig. 1:



**Figura 1.** El cobre de la enzima oxidada (E-Cu<sup>2+</sup>) es reducido por un sustrato y el cobre reducido (E-Cu<sup>+</sup>) es reoxidado por un segundo sustrato, que usualmente es el oxígeno molecular. Esto ocurre por la presencia de una unidad de cuatro iones de Cu<sup>2+</sup>, cada uno de ellos acepta un electrón de un sustrato y los iones formados de Cu<sup>+</sup> donan sus electrones al oxígeno por un sistema cooperativo.



**Figura 2.** (a) La reacción típica de lacasa, donde un difenol (hidroxiquinona mostrada aquí) cede un electrón de oxidación con el cual se forma un radical libre de oxígeno. Esta especie puede convertirse a una quinona en un segundo paso catalizado por la enzima o por desproporciónación espontánea. La quinona y el radical libre pueden polimerizarse. (b) la reacción de lacasa con siringaldizina como sustrato tiene como producto un radical libre. La quinona se forma al liberarse un segundo electrón por oxidación (de nuevo, o bien por una reacción enzimática o por desproporciónación) y cuyo color es púrpura oscuro y aparentemente no se polimeriza.

La catálisis de la oxidación de sustratos por la lacasa es una reacción de un electrón que genera un radical libre (Reinhammar y Malmstrom, 1981), según se muestra en la fig. 2. Con 1,2,4,5-tetrametoxibenceno como sustrato el producto inicial es un catión del carbono central formado por la remoción de un electrón del núcleo aromático (Kersten, 1990). El producto inicial es típicamente inestable y por lo tanto susceptible a una segunda oxidación catalizada por la enzima (convirtiendo al fenol en una quinona) pero muchos sustratos pueden tener una reacción de tipo no enzimática como la hidratación o la desprotonación y/o pueden dar origen a una reacción de polimerización dando un producto amorfo e insoluble de tipo melanina. El electrón de la oxidación del sustrato puede acoplar a la reducción de cuatro electrones del oxígeno por un mecanismo de reacción que no a sido completamente entendido y está siendo objeto de muchas investigaciones (Reinhammar y Malmstrom, 1981). En esencia la lacasa opera almacenando electrones de reacciones de oxidación individuales para reducir al oxígeno molecular y parece que las uniones con el oxígeno intermediario también están involucradas (Messerchmidt, 1992).

### **2.5 Función de la enzima lacasa**

La función de la lacasa en las plantas es producir polímeros precursores de la lignina utilizada básicamente en el tejido vascular de las plantas (Chen, 1991; Dean y Ericksson, 1992); esto es importante por que una función atribuida repetidamente a la lacasa de basidiomicetos, es participar de la maquinaria enzimática que mineraliza la lignina la cual tiene una estructura especial, en este grupo de organismos, distinta de la lignina vegetal.

#### **2.5.1 La función de la lacasa en la morfogénesis.**

En algunos hongos, la lacasa se emplea en funciones no relacionadas con la lignólisis. El mejor ejemplo es *A. niger* en el cual contiene dos lacasas con diferente función. El producto del gene *yA* es una lacasa involucrada exclusivamente en la producción de color verde de las conidias (Clutterbuck, 1972). Una segunda lacasa está localizada en las células de Hülle y el primordio clestotecial que a su vez están involucrados en la síntesis de pigmentos (Hermann, 1983). En numerosos hongos, la lacasa esta asociada con la formación de pigmentos y en la estructura para proveer mayor rigidez al

agregado miceliar. La formación del cuerpo fructificante puede involucrar a las fenol oxidasas que catalizan la formación de pigmentos extracelulares acoplados a la polimerización oxidativa de componentes de la pared celular aumentan la adhesión entre célula y célula, (Bu'Lock, 1967; Leatham y Stahmann, 1981). La formación de rizomorfos estaría asociada con la síntesis de lacasa en *Armillaria mellea* (Worrell, 1986). Es posible, aquí también, que la lacasa sea responsable de la producción de un pegamento polifenólico que une las hifas una con otra. Esta idea debe ser tomada con precaución, ya que, en los cultivos líquidos de *Armillaria mellea*, la actividad de la lacasa se acumula en el medio coordinadamente con la formación de rizomorfismo y la manipulación del pH del medio puede substancialmente modificar la actividad de la lacasa que se puede acumular sin tener un efecto significativo sobre la masa del tejido del rizomorfo formado (Rehman y Thurston, 1992).

### **2.6 Características generales de la enzima lacasa.**

La Tabla 1 muestra una lista de lacasas de origen fúngico que han sido purificadas en los últimos 30 años. Todas estas son glucoproteínas extracelulares, pero es importante hacer notar que muchas de estas enzimas muestran mucha heterogeneidad después de la purificación. Esto es una inevitable consecuencia de la localización extracelular de estas proteínas, pues el medio fúngico, contiene propiedades proteolíticas y glicolíticas (Wood, 1985). Lo cual significa que una gran cantidad de la enzima producida puede ser modificada por adición de carbohidratos o cortes de la cadena polipeptídica (Perry, 1993a). La lacasa típica tiene un peso molecular entre 60 y 80 kDa y un contenido del 15 al 20% de carbohidratos. Los estudios de velocidad de sedimentación, indican que el peso molecular de la lacasa de *A. bisporus* parece ser sustancialmente mayor (100 kDa), y no está de acuerdo con los datos de los análisis electroforéticos bajo condiciones desnaturalizantes que da un valor aprox. de 65 kDa. El análisis de la secuencia del gen, muestra que la lacasa es un dímero de subunidades idénticas. De manera similar, el peso molecular de la lacasa de *A. nidulans* es de 110 kDa lo que indica que esta enzima es un dímero. La permeación en gel no es un método muy exacto para determinar el peso molecular porque depende del relación de Stoke; el cual determina la velocidad de migración de las proteínas y este relación puede ser similar para proteínas de distinto peso molecular.

## MARCO TEORICO

**Tabla 1.** Principales lacasas estudiadas en los ultimos 30 años. Adaptado de Thurston (1994).

Organismo	No. de enzimas	Masa (kDa)	% Carbohidratos	Contenido de Cu	Referencia
<i>Polyporus versicolor</i>	2	60, 65	14	4	Mosbach, 1963
<i>Podospora anserina</i>	3	70, 80, 390	25	3.3	Minuch, 1978; Durrens, 1981
<i>Neurospora crassa</i>	1	65	23	3	Froehner y Erickson, 1981
<i>Agaricus bisporus</i>	1 (2)	100, 65	22	2	Wood, 1980; Perry, 1993
<i>Botrytis cinerea</i>	2	72, 72	11	s.d.	Mayer, 1996
<i>Schizophyllum commune</i>	1	62-64	15	s.d.	De Vries, 1986
<i>Phlebia radiata</i>	1	64	80	2	Niku-Pavola, 1988
<i>Pyconoporus coccineus</i>	1	70	s.d.	s.d.	Oda, 1991
<i>Lentinus edodes</i>	1	66	s.d.	s.d.	Kofujita, 1991
<i>Armillaria mellea</i>	2	59	s.d.	s.d.	Rehman y Thruston, 1992
<i>Monocillium indicum</i>	1	100, 72	s.d.	s.d.	Thakker, 1992

s.d.: sin datos disponibles

## **2.7 Contenido de cobre**

El contenido de cobre de las lacasas purificadas varía entre 2 y 4 átomos por subunidad de enzima. Las bases purificadas de una de las lacasas fúngicas muestran una fracción de moléculas dañadas y por lo tanto incapaces de retener por completo el cobre (Reinhammar y Malmstrom, 1981), por ello, estos autores proponen que a pesar de que los iones cobre en estas proteínas estén firmemente unidos, el plegamiento selectivo de un cobre central tipo 2 puede ser modificado experimentalmente y puede ocurrir durante la purificación. También se ha encontrado que los centros de cobre tipo 1 se ligan a la metionina esto es para todas las lacasas fúngicas, y esta unión es inestable (Karlsson, 1989). Se cree que la lacasa de *Phlebia radiata* presenta una combinación novedosa de grupos prostéticos (Karhunen, 1990; Saloheimo, 1991). Esta es una lacasa que contiene dos átomos de cobre por molécula de enzima, se encontró que este tipo de enzima trabaja en acoplamiento con un cofactor pirroloquinolina quinona (PQQ), (Klinman, 1991; Maccarone, 1991). Todas las secuencias de amino ácidos de las lacasas muestran la conservación de once residuos involucrados en la unión con cuatro átomos de cobre (Perry, 1993b). Hasta el momento se tiene suficiente evidencia para proponer que las enzimas con actividad de lacasa contienen dos átomos de cobre por molécula/subunidad (Wood, 1980b).

## **2.8 Estudio de la secuencia de los genes y el cDNA de lacasas**

Durante los últimos años, el gen de la lacasa y/o la secuencia del cDNA se han descrito de cinco fuentes principales; la primera fue reportada de un ascomiceto *Neurospora crassa* (Germann, 1986; Germann, 1988). Subsecuentemente las secuencias de otros ascomicetos, *A. nidulans* (Aramayo Timberlake, 1990), y tres basidiomicetos *Coriolus hirsutus* (Kojima, 1990) *Phlebia radiata* (Saloheimo, 1991) y *Agaricus bisporus* (Perry, 1993b). Estas secuencias muestran un patrón común en las que todas codifican polipéptidos de aproximadamente 520-550 residuos de aminoácidos incluyendo un péptido de secreción N terminal. Además una cisteína y diez histidinas involucradas en la unión de cuatro átomos de cobre por cada molécula de lacasa (*secuencia*), junto con una pequeña cantidad de secuencias alrededor de cuatro regiones de las cuales se agrupan los ligandos de cobre en los residuos de aminoácidos unidos al cobre que están distribuidos en la cadena polipeptídica (dos pares de histidinas en el dominio N terminal y los otros residuos de unión junto al C

terminal). Todas las lacasas son muy parecidas, y tienen propiedades de ensamblaje parecidas a las subunidades de ascorbato oxidasa. También se reconoce la homología de los dominios con las proteínas seroplasmáticas de los mamíferos (Germann y Lerch, 1986; Messerschmidt y Huber, 1990; Saloheimo, 1991).

La similitud con las ascorbato oxidasa es muy significativo. Esta proteína a sido cristalizada y analizada por difracción de rayos X con una alta resolución (Messerschmidt, 1989,1992), por lo que la estructura tridimensional de la enzima lacasa de *Neurospora crassa* puede ser predecida por modelamiento molecular basada en la similitud con dicha proteína (Messerschmidt & Huber, 1990). Por otra parte, el arreglo de los centros de cobre aún no se conoce. Una gran cantidad de estudios fisicoquímicos de las oxidasas azules, muestran que las lacasas y la ascorbato oxidasas contienen tres tipos de cobre que pueden distinguirse por espectroscopía y por sus propiedades paramagnéticas: el tipo 1 (que confiere el color azul-verdoso en estas proteínas), el tipo 2 y el tipo 3, que tienen un par de átomos de cobre (Reinhammar y Malmstrom, 1981). Este conocimiento puede ayudar a predecir que los átomos de cobre tipo 2 y el tipo 3 como un grupo trinuclear (Allendorf, 1985). La estructura cristalina muestra que el cobre tipo 2 y tipo 3 se encuentran acomodados de forma equidistante, el par binuclear se encuentra entre 3.4 Å y 4 Å del tipo 2 haciendo un agrupamiento trinuclear (Messerschmidt, 1989; Meserschmidt y Huber, 1990). Los datos cinéticos, espectroscópicos y EPR (Reinhammar y Malmstrom, 1981), muestran que los átomos de cobre tipo 1 y 2 están involucrados en la captura y la transferencia de electrones, y los tipo 2 y 3 están involucrados en la unión con el oxígeno (Messerschmidt, 1980, 1992; Meserschmidt y Huber, 1990). Esto muestra una diferencia entre la lacasa y la ascorbato oxidaba. aunque ambas proteínas tiene una unión del cobre tipo 1 con una cisteína y dos histidinas. La enzima ascorbato oxidasa tiene cuatro aminoácidos como ligandos, y un residuo de metionina, que esta ausente de todas las secuencias de lacasas conocidas. Esta diferencia puede contribuir a un potencial redox positivo mayor de este centro de cobre en las lacasa comparado con otros centros de cobre tipo 1 (Reinhammar y Malstrom, 1981)

### **2.8.1 Clonación y expresión de la enzima lacasa**

Dos enzimas lacasas han sido purificadas con una aparente homogeneidad electrofóretica, de un medio extracelular con 2,5-xilidina como inductor del

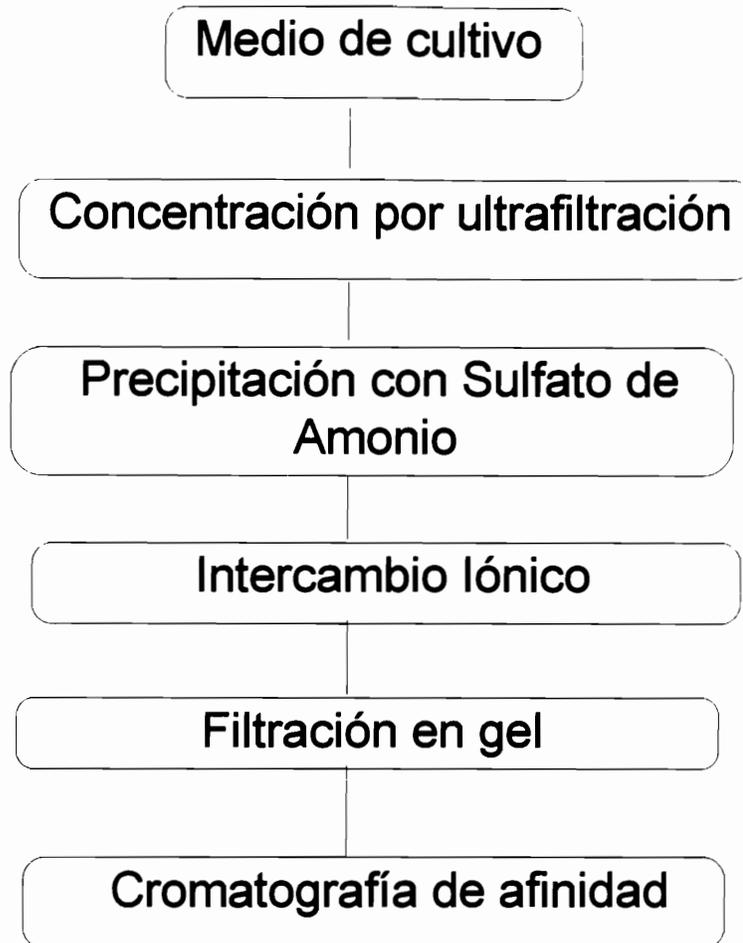
basidiomiceto *Trametes villosa*. Estas proteínas son dímeros, consistiendo en dos subunidades de 63 kDa, teniendo las mismas características espectrales de las lacasas azules. Las dos formas de lacasa tienen punto isoeléctrico diferente. Las enzimas que son del tipo 1 y 3, tienen pI de 3.5 y 6.5, respectivamente. Una tercera forma el tipo 2 tiene un pI de 5.5. Estas lacasas presentaron una actividad óptima a un pH de 5 con siringaldizina como sustrato. Los genes que fueron clonados son *lcc1* y *lcc2* que codifican para las dos enzimas purificadas (formas 1 y 3) y se les determinó su secuencia de nucleótidos. Los genes para *lcc1* y *lcc2* contienen 8 y 10 intrones respectivamente, teniendo un 79 % de niveles de aminoácidos idénticos. Se encontró por medio de un análisis de Northern (RNA) que la expresión del gen *lcc1* es inducible mientras que el gen *lcc2* parece ser constitutivo. El gen *lcc1* fue expresado en *Aspergillus oryzae*, y la proteína recombinante tiene el mismo pI, propiedades espectrales, estabilidad y perfiles de pH como la proteína nativa purificada (Yaver, 1996). Es interesante mencionar que este trabajo fue desarrollado en *Novo Nordisk Biotech*, la compañía más grande de producción de enzimas para uso industrial; lo que nos muestra la importancia comercial a este nivel para muchos bioprocesos ó en biorremediación. Por lo tanto, si se encontrase una enzima capaz de soportar los tratamientos a los cuales se aplica y se lograra purificar, se produciría un gran impacto económico. De ahí la búsqueda de diversas fuentes de la enzima, caracterizarla, secuenciarla y para poder obtener proteínas recombinantes, las cuales, expresadas en mohos de rápido crecimiento y teniendo un buen proceso de purificación, facilitarían su uso industrial.

### **2.9 Métodos de purificación.**

La purificación de las enzimas tienen variantes: desde precipitación con sulfato de amonio hasta cromatografía de intercambio iónico; pasando por: filtración en gel, interacción hidrofóbica, precipitación con acetona. El pH utilizado es muy variado, dependiendo del fuente de la enzima.

El primer trabajo publicado, de purificación de lacasa a partir de *A.bisporus* fue el de Wood (1980a), el cual se resume en el diagrama de la fig. 3, purificándola por precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel y cromatografía de afinidad en columnas con Concavalina A-Sepharosa. Obtenido, por elución de las columnas un solo pico de actividad, con un peso molecular de 100 000 Da y 2 átomos de cobre por molécula con una proporción del 15% de azúcares.

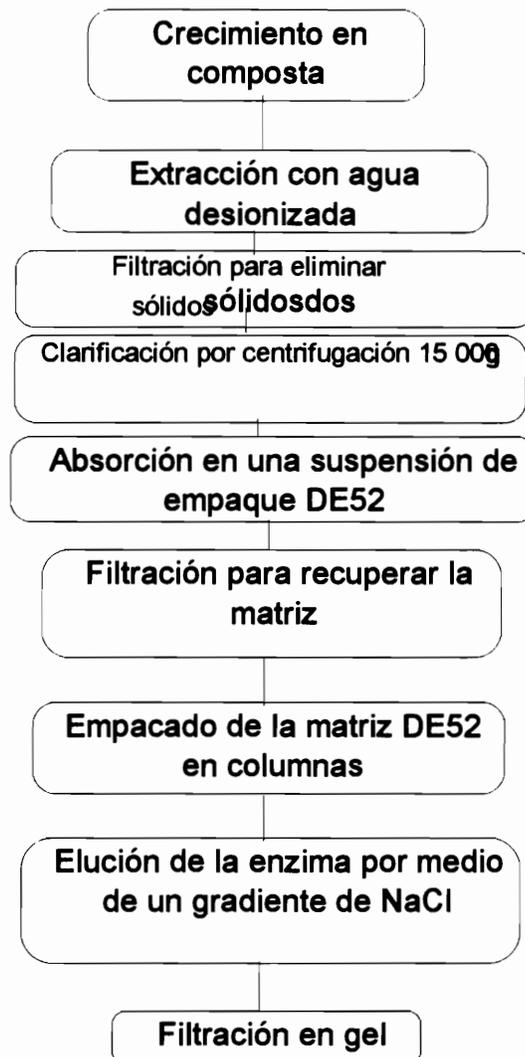
Estos resultados se obtuvieron a partir de un volumen de 3 litros de medio de cultivo con extracto de malta (2%), con un pH de 7.0 con micelio de *A. bisporus* por lote de trabajo que se concentró 10 veces por ultrafiltración con un tamaño de exclusión de 10 000 Da. Posteriormente, se precipitó con sulfato de amonio entre el 50 y 90% de saturación. Se colectó el precipitado por centrifugación a 20 000 x g durante 30 min. Este precipitado se resuspendió en 40 ml de amortiguador de fosfatos 0.01M, pH 7.0 y se dializó durante 24 hrs. (con dos cambios del mismo amortiguador), Las muestras de 10 ml del extracto dializado se inyectaron a una columna de intercambio iónico de 52 (1.5x30cm), previamente equilibrada con amortiguador de fosfatos 0.01M pH 7.0, con elución previa del pigmento de color café. La proteína fue lixiviada de la columna con un gradiente lineal de 0 a 0.5M de NaCl en un amortiguador de fosfatos 0.01M pH 7.0 a una velocidad de 20 ml/h. Las fracciones con actividad se aplicaron en una columna de Sephadex G-100 (1.5x90cm), previamente equilibrada con amortiguador de fosfatos 0.01 M pH 7.0 y la columna fue eluida con el mismo amortiguador, las fracciones con actividad se inyectaron en una columna de concavalina A-Sephadex 0.9 x 30 cm, equilibrada previamente con amortiguador de fosfatos 0.01 M pH 7.0 la columna fue eluida con 100 ml 10% (p/v) de  $\alpha$  metil-D-manopiranosido disuelta en amortiguador de fosfatos 0.01 M pH 7.0, posteriormente las fracciones colectadas fueron dializadas contra el amortiguador de fosfatos durante 24 h. las muestras obtenidas se concentraron por ultrafiltración y se almacenaron a -20 °C en alícuotas de 0.5 ml y mantuvieron su actividad durante 1 año. Se obtuvo un factor de purificación de 59.8.



**Figura 3.** Diagrama de purificación de la enzima lacasa a partir de *Agaricus bisporus* reportado por Wood (1980a). Se muestran los diferentes pasos de la purificación a partir de 15 litros de extracto de malta inoculado con micelio de *Agaricus bisporus*.

En 1992 Matcham y Wood (fig. 4), presentan la metodología para purificar lacasa a partir de *A. bisporus* en composta en tres pasos sencillos, los cuales contemplan la producción de una composta la cual se inocula con micelio de *A. bisporus*, durante dos semanas. Tres Kg de esta composta fueron colocados durante 20 min en 6 litros de agua desionizada. El extracto obtenido fue decantado a través de un filtro de tygon T975 con malla de 1mm, y fue clarificado por centrifugación a 15000 x g usando una centrífuga continua Sharples 1A. Posteriormente se preparó una suspensión del empaque de la columna DE52 (intercambio iónico), de 100g de sólidos por litro de amortiguador de acetatos 0.2 M, pH 5.6. Esta suspensión fue mezclada con el extracto clarificado teniendo una proporción de 30 g de DE52 por litro de sobrenadante. La matriz DE52 fue mantenida en suspensión durante 20 minutos por agitación continua.

En este tiempo se absorbió más del 60% de la enzima. La suspensión obtenida fue filtrada a través de un "Miracloth", para recuperar la matriz DE52 y fue empacada en columnas de cromatografía de 40 mm día x 210 mm de longitud. La enzima fue eluida de las columnas con 0.2M NaCl en amortiguador de acetatos 0.05 M pH 4.0. Las fracciones obtenidas fueron concentradas por ultrafiltración en membranas APICON PMIO, la purificación final fue por cromatografía de filtración en gel en una columna de Sephacryl S-200 de 800mm y 50 mm día. El eluyente fue amortiguador de Acetatos 0.05M pH 5.6 con un flujo de 2ml/min. Obteniendo un factor de purificación de 33.39.



**Figura 4.** Diagrama de purificación de la enzima lacasa a partir de *Agaricus bisporus* reportado por Matchman y Wood en 1985; donde se muestran los diferentes pasos de la purificación a partir de 3 kg. de composta lavada en agua desionizada par obtener 6 litros de extracto.

En conclusión la enzima lacasa de *Agaricus bisporus* es una oxidasa fenólica de interés para la detección, oxidación y polimerización de fenoles de muy diversos tipos y puede recuperarse de fragmentos desechables del micelio de este basidiomiceto que es un hongo comestible de amplio uso alimentario.

Su purificación ha sido llevada a cabo por Wood antes citado pero conviene tratar de simplificar este procedimiento para su posible adaptación industrial en México. Además, hace falta estudiar mejor las propiedades cinéticas y de estabilidad térmica para poderlas comparar con otras lacasas de diversas plantas o basidiomicetos cuyos genes pudieran clonarse y ser transferidos a mohos de rápido crecimiento como el género de *Aspergillus* de ahí la necesidad para desarrollar técnicas rápidas y sencillas de evaluación de las lacasas usando técnicas de zimografía por electroforesis y tinción selectiva de la enzima *in situ*.

### 3 OBJETIVOS

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL.**

Purificar la enzima lacasa de *Agaricus bisporus* mediante procedimientos físicos y químicos sencillos para facilitar su caracterización cinética y electroforética.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

3.2.1.- Establecer una metodología para la cuantificación de actividad enzimática utilizando p-cresol como sustrato.

3.2.2.- Identificar la presencia y cuantificar de actividad de lacasa en distintas partes del cuerpo fructífero *A. bisporus*.

3.2.3.- Desarrollo de un método de extracción de las enzimas con actividad de lacasa a partir de muestras de basidiocarpos de *A. bisporus*.

3.2.4.- Separación y purificación de las enzimas extraídas con actividad de lacasa.

3.2.5.- Determinación de algunas propiedades cinéticas y bioquímicas de una enzima con alta actividad específica de lacasa.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

La enzima lacasa es de interés industrial por utilizarse cada vez más en la decoloración de pigmentos aromáticos. su disponibilidad local más amplia se asocia a los desechos de la industria productora del hongo alimenticio *Agaricus bisporus*, lo cual facilitaría el aprovechamiento comercial de sus subproductos; el desarrollo de un método sencillo de medición, separación y caracterización bioquímica facilitaría el desarrollo de otros estudios para caracterizar lacasas de hongos silvestres mexicanos que pueden ser de interés biotecnológico como fuente de nuevos clones de ADN que codifiquen para lacasas novedosas, por ejemplo más termoestables.

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS

### **5.1 Organismo**

Las muestras de *Agaricus bisporus* fueron colectadas en un centro comercial directamente de los aparadores, cada vez que fue necesario para obtener extracto de trabajo. Se eligieron muestras de basidiocarpos que presentaban un color totalmente blanco sin importar su tamaño, la variación de actividad entre lote y lote, para obtener la enzima no fue relevante, lo que se quería hacer es establecer la metodología..

### **5.2 Tratamiento del extracto enzimático.**

Para obtener el extracto se homogenizó en una licuadora doméstica una parte del basidiocarpo con dos partes de agua desionizada. La suspensión resultante posteriormente se centrifugó a 7000 x g durante 15 min. a 4° C. El sobrenadante se filtró a través de membranas de 0.8 µm, se almacenó en alícuotas de 50ml a -80° C.

### **5.3 Determinación de la actividad de la lacasa.**

Para la determinación de la actividad de la enzima lacasa se utilizaron dos sustratos: uno, *p*-cresol en concentraciones de 30 mM para extracto crudo y 2 mM para enzima pura. Otro siringaldizina 125 µM, en un amortiguador de acetato de sodio 0.1 M pH 6.5. A 10µl de extracto crudo o enzima pura se le agregan 790µl de amortiguador de acetatos 0.1M pH 6.5 y 200 µl de sustrato, en un volumen final de trabajo de 1ml y se midió la absorbancia a 400 y 525 nm, para *p*-cresol y siringaldizina, respectivamente. Una unidad de actividad se definió como el incremento de 1 unidad de absorbancia/minuto, la actividad específica se definió como unidades de enzima/mg de proteína.

### **5.4 Determinación de proteína.**

El análisis de proteína se realizó mediante la técnica de Bradford, (1976). Se agregan 800 µl de extracto y se le adicionan 200 µl de reactivo de Bradford (BioRad). Se incuban a temperatura ambiente, después de 5 min se mide la absorbancia a 595 nm.

### **5.5 Electroforesis**

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida a una concentración de 8 % (p/v) para el gel separador y al 4 % (p/v) para el gel concentrador. El pH de corrida 8.9, en condiciones no desnaturalizantes, con una corriente de 16 mA por gel y en una minicámara BioRad. Las muestras (10 a 15  $\mu$ l) conteniendo la enzima fueron mezcladas con glicerol al 25% (v/v) conteniendo 0.03% (p/v) de azul de bromofenol, terminada la corrida se colocó el gel en una solución de TCA al 12 % para su posterior tinción con azul de Coomassie (Chrambach, 1967), quitando el exceso de colorante con una solución de alcohol/ácido acético 1:5, para su posterior conservación en un secador de geles (BioRad).

### **5.6 Zimografía**

La actividad de la enzima se localizó sumergiendo los geles de poliacrilamida en una solución de *p*-cresol 15 mM. Con un amortiguador de acetatos pH 6.5, y se incubó a 30° C en oscuridad durante 20 min o hasta la aparición de las bandas de color, para su posterior conservación en un secador de geles (BioRad).

### **5.7 Enfoque isoeléctrico.**

Se determinó el punto isoeléctrico de la enzima con un aparato Rotofor de cámara cilíndrica (BioRad). Dicha cámara se encuentra dividida por membranas de intercambio iónico en 20 compartimientos. Se adicionaron anfólitos (moléculas cargadas), con un gradiente de pH de 3 a 9 (Biolyte, 3/9 BioRad) al extracto enzimático en relación 1% (v/v). La preparación fue colocada en la cámara del Rotofor, estabilizada a una temperatura de -5°C con ayuda de un sistema refrigerante, llevándose a cabo el electroenfoque con una potencia de 15 W durante 2.5 hrs. Al término de la corrida se determinó el pH de las 20 fracciones obtenidas, así como su actividad de lacasa con *p*-cresol y la proteína total por el método de Bradford (1976).

### **5.8 Técnicas cromatográficas**

Todos los análisis cromatográficos fueron realizados en un equipo de FPLC (cromatografía líquida de baja presión (Biologic Work Station, BioRad), con colector de fracciones BioRad, modelo 2128. La detección de la proteína eluída se llevó a cabo en línea durante toda la corrida con un detector BioRad, mediante una celda UV a 280 nm.

### **5.8.1 Columna de exclusión Superosa Pharmacia**

Las fracciones con actividad se pasaron a través de una columna de Superose 75 (P6) (BioRad), con tamaño de exclusión entre 75 a 300 kDa, con un amortiguador de fosfatos 0.01 M pH 6.5, y a una velocidad de 0.3 ml/min. A las fracciones se les midió la absorbancia a 280 nm y se midió la actividad de las fracciones de 1 ml, con p-cresol y proteína total.

### **5.8.2 Columna de intercambio aniónico**

Las fracciones que presentaron actividad enzimática con p-cresol después de pasar por la columna de exclusión se utilizaron para realizar una cromatografía de intercambio aniónico, empleando una columna mono Q BioRad. Dicha columna se equilibró con un amortiguador de fosfatos 0.01 M pH 6.5 NaCl 1 M ( alta fuerza iónica) en un volumen de 60 ml y usando una velocidad de 6 ml/min. Posteriormente, se pasó un amortiguador de fosfatos 0.01 M pH 6.5 (baja fuerza iónica) con un volumen de 60 ml a una velocidad de 6 ml/min. Una vez equilibrada la columna, se inyectó la muestra y se empezó el gradiente de NaCl con el amortiguador de alta fuerza iónica a una velocidad de 2 ml/min. Las fracciones de 1 ml se monitorean a 280 nm, y se midió su actividad enzimática y su proteína total.

El diagrama de purificación que se siguió en esta tesis aparece en la (fig. 5)

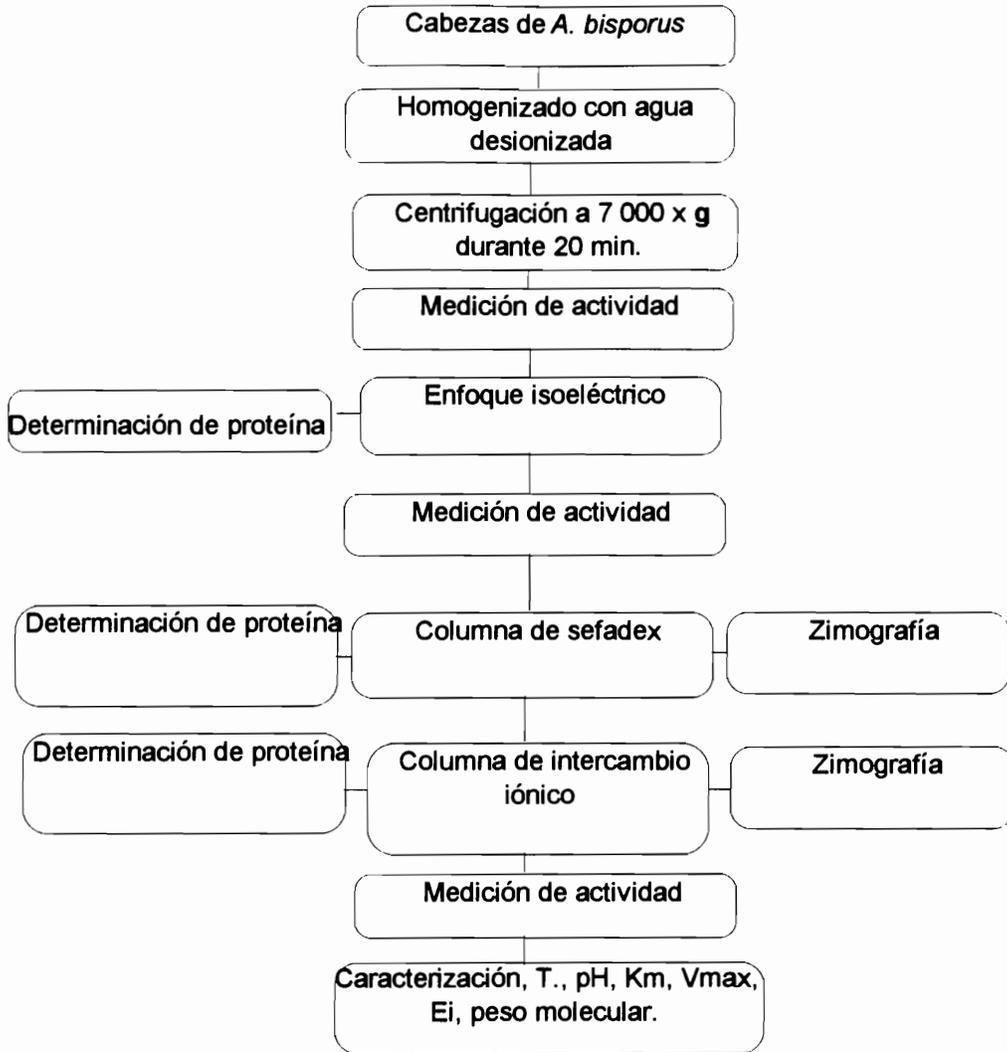


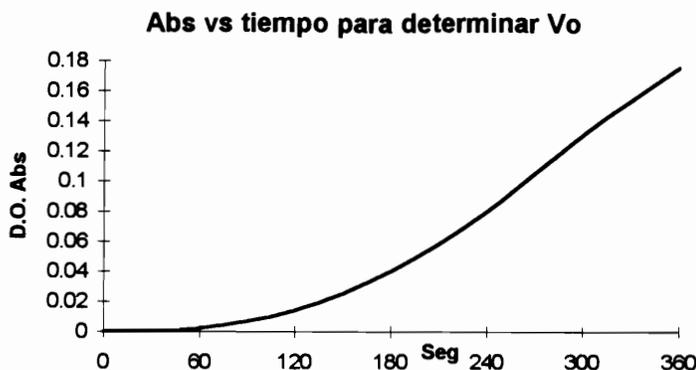
Figura 5. Diagrama de purificación de la enzima lacasa a partir de *Agaricus bisporus*

## 5.9 Caracterización

### 5.9.1 Determinación de $K_M$ y $V_{max}$

Para la determinación de estos parámetros cinéticos se usaron varias concentraciones de sustrato y se calculó la velocidad inicial para cada concentración de sustrato que fueron de 0.0 a 3.0 mM para la enzima pura, para el caso del extracto crudo se utilizaron las siguientes concentraciones 0.0 a 50 mM de *p*-cresol. Con estos valores de velocidad inicial y concentración se elaboró una gráfica de sustrato contra

velocidad inicial. Se estimó la regresión de ( $1/V_o$  vs  $1/S_o$ ) (Lineweber Burk) y se calcularon los valores de  $K_M$  y  $V_{max}$ .



**Figura 6** Para determinación de la velocidad inicial se tomó la pendiente de los datos obtenidos con el espectrofotómetro en un tiempo de 0 a 360 segundos determinando una pendiente para la concentración del sustrato. Para este ejemplo la concentración de sustrato es de 4 mM.

### 5.9.2 Determinación del pH de actividad óptima.

Para la determinación del pH óptimo con una concentración de sustrato de  $10 K_M$  para el extracto crudo y con la misma concentración de proteína se probaron diferentes valores de pH: 3, 4, 5, 6, 7, 8 y se determinó la velocidad inicial para cada pH. Se construyó una gráfica de velocidad inicial contra pH, tomándose como el óptimo la velocidad inicial más alta. Utilizando un amortiguador de acetatos de 1 a 5.5 y un amortiguador de fosfatos en un intervalo de 6 a 8.

### 5.9.3 Temperatura de estabilidad

Para la determinación de la temperatura óptima se empleó una concentración de sustrato 2mM en un amortiguador de acetatos 0.1 M pH 6.5 y la misma concentración de proteína en un volumen final de 1 ml al cual se le determinó su velocidad inicial a: 20, 30, 40, 50, 60 y 70° C, se siguió el procedimiento siguiente: se colocan 10  $\mu$ l del extracto enzimático en un tubo Eppendorff que contiene amortiguador de acetatos 0.1 M (pH 6.5). Estos tubos se colocan en una parrilla con bloques para calentamiento y se dejan durante 20 min, para cada temperatura una vez transcurrido ese tiempo se le adiciona el sustrato y se le determina su velocidad inicial. Con las velocidades iniciales se construye una gráfica de  $v_o$  vs T de donde se obtiene la temperatura óptima: la

gráfica de Arrhenius ( $\ln V_0$  vs  $1/T$ ) permite calcular la energía de inactivación pues su pendiente es  $m=-E_a/R$  donde  $R$  es la constante de los gases.

### 5.9.4 Peso molecular de la enzima.

Para la determinación del peso molecular de la enzima se midió la migración en geles de poliacrilamida al 8 % en condiciones desnaturalizantes, utilizando un conjunto de marcadores de peso molecular (Sigma Mark VI) que contiene:

Molécula	P.M (Da)
$\alpha$ Macroglobulina	198,000
$\beta$ Galactosidasa	116,000
Fructosa 6-fosfato cinasa	86,000
Piruvato cinasa	66,000
Fumarasa	56,000
Deshidrogenasa láctica	40,500
Triosafofosfato isomerasa	36,000

Una vez corrido el gel en las condiciones antes mencionadas, se construye una gráfica semilogarítmica. Se extrapola la distancia  $d$ , de la banda de la muestra y se calcula su peso molecular aproximado Fig. 19.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Medición de la actividad enzimática

La técnica indicada en materiales y métodos con *p*-cresol se calculó  $\epsilon_m = 0.0632$  mmol/ml cm para medir la actividad enzimática mostró ser muy sensible para la cuantificación de actividad, comparándose con los resultados de Ratcliffe (1994), donde obtuvieron una actividad específica de 0.064 Unidades/mg de proteína para el *p*-cresol en un extracto crudo; dividido entre el coeficiente de extinción molar calculado sería de 1.01 mol/mg x minuto, en este trabajo se obtuvo un valor de 38.2 mol/mg x minuto, para el extracto con *p*-cresol; esta diferencia puede deberse a la forma de obtención del extracto y las condiciones de reacción para medir la actividad enzimática. Además de ser muy útil para la caracterización de la enzima, por otra parte la actividad enzimática a partir de *p*-cresol resultó muy parecida a lo reportado por Ratcliffe (1994), en el cual con el *p*-cresol muestra mayor actividad específica y esta se inhibe con SHAM (ácido salicilhidroxámico), indicando que la actividad puede ser la suma de tirosinasa y lacasa, puesto que la actividad de lacasa medida con siringaldizina no se ve inhibida por SHAM lo que muestra que la actividad de lacasa es mucho menor que la actividad de tirosinasa.

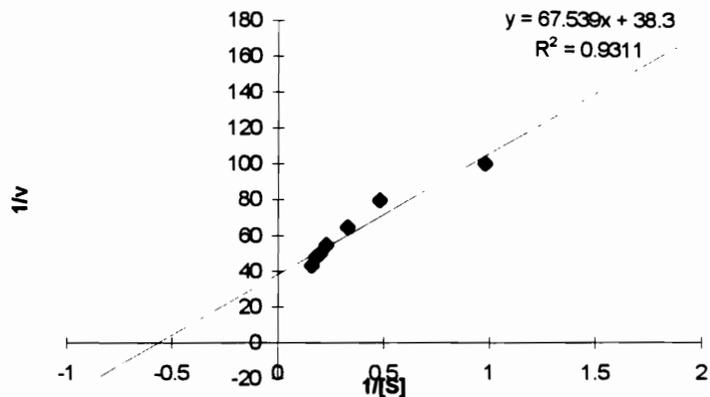
Actividad específica de Ratcliff y la obtenida en el laboratorio

Ratcliff, 1994	Este trabajo
1.01 mmol/mg x minuto	38.2 mmol/mg x minuto

Esta diferencia puede deberse a que la concentración que utilizó Ratcliff (1994), fue de 5 mmolar y en el laboratorio con la caracterización y optimización de la concentración de proteína, se utilizó una concentración 30 mmolar y una concentración de proteína de 30  $\mu$ g.

#### 6.1.2 Caracterización del extracto crudo.

Con los primeros datos obtenidos de la actividad específica del extracto crudo se procedió a caracterizar dicho extracto, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2, el valor de  $K_M = 2.8$  mM obtenido sirvió para optimizar la técnica de medición de actividad ( $S_0$ ,  $\Gamma$ , pH), (ver fig. 7,8,9).



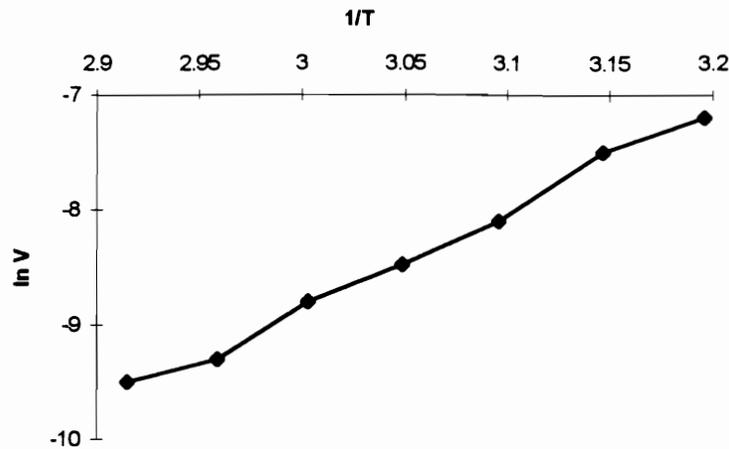
**Figura 7.** Gráfica de Lineweaver Burk para determinación de  $K_M$  Y  $V_{max}$  con una  $r = 0.964$  donde se obtuvo de las intersecciones  $K_M$  de 2.8 mM y una  $V_{max}$  de 517.6  $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{ml}$ .

En la figura 7 se muestra la gráfica de Lineweaver Burk ( $1/V_o$  vs  $1/S_o$ ) con una clara tendencia lineal con los cuales se estimó el valor de  $K_M$  2.8mM y  $V_{max}$  517.6  $\mu\text{mol}/\text{min}$  indicados en la tabla 2. Como la concentración de proteína en el extracto era de 13.5 mg/mL; se calculó que la actividad específica correspondía a 38.2 mmol/mg x min. (Tabla 2).

**Tabla 2.** Muestra los resultados de la caracterización del extracto crudo de *Agaricus bisporus* utilizando *p*-cresol

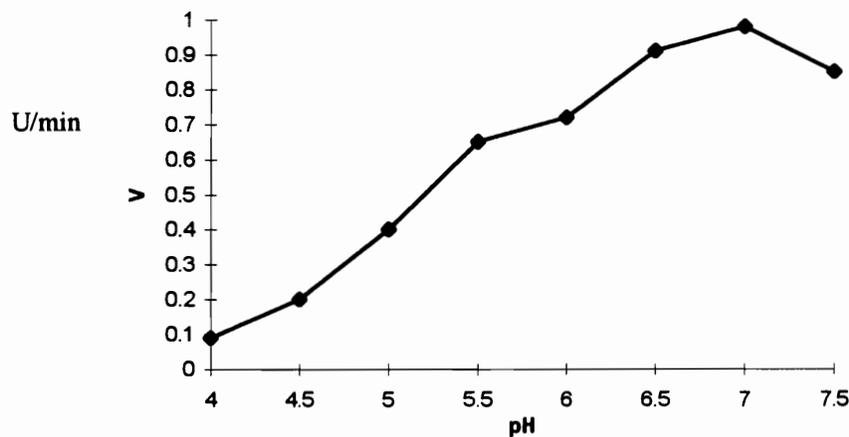
$K_M$	2.8 mM
$V_{max}$	517.6 $\mu\text{mol}/\text{min}$
Actividad específica	38.2 mmol/mg x min
pH óptimo	7.0
Temperatura óptima	30° C
Energía de inactivación	23.14 Kcal/mol

La actividad específica en este paso fue de 38 mmol/mg x min.



**Figura 8.** Gráfica de Arrhenius para determinar la  $E_a$  de el extracto crudo donde  $m = -E_a/R$  donde  $R$  es la constante de los gases obteniéndose un valor de 23.14 Kcal/mol. Utilizando una concentración de 30 mM y una pH de 6.5

En la figura 8. Se muestra la gráfica de Arrhenius del extracto crudo indicando en las abscisas el valor de  $1/T$  multiplicado por 1000 para facilitar la presentación de los datos la pendiente positiva en el intervalo entre  $10^3/T = 3.003$  (60°C) y  $10^3/T = 3.413$  (20°C) indica un proceso de inactivación térmica de la enzima con  $E_a$  23.14 kcal/mol (Tabla 2) que es cercano al indicado para otras enzimas.

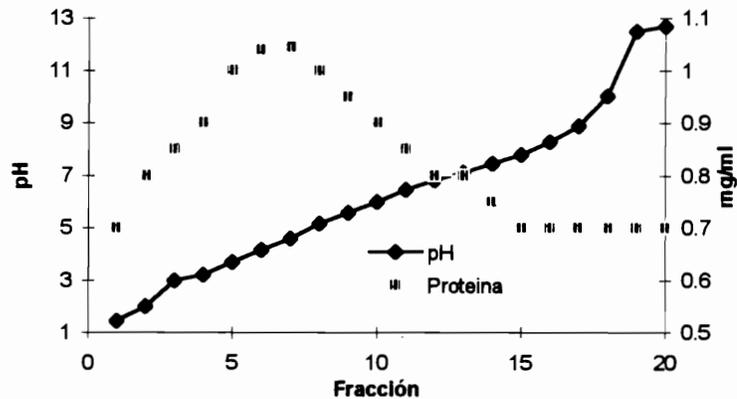


**Figura 9.** Gráfica de velocidad inicial contra pH para determinar el pH óptimo del extracto crudo donde se puede observar la máxima actividad se obtiene entre un pH de 6.5 y 7.5.

En la figura 9 se muestra el efecto del pH sobre la velocidad inicial  $V_o$  de la lacasa mostrando un valor óptimo cerca del  $pH = 7$  (Tabla 2); Este valor ha sido observado por otros como Wood, 1980a; Perry, 1993; Ratcliff, 1994;

### 6.2 Enfoque isoelectrico

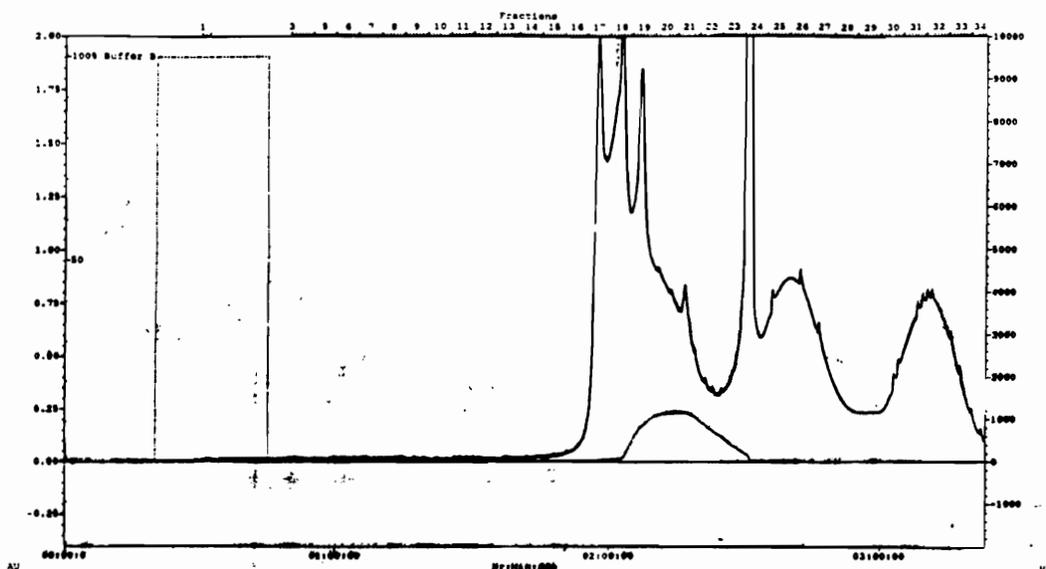
Las muestras obtenidas del electro enfoque se les determinó actividad y la fracción número 6 que correspondía a un pH de 4.18 tuvo actividad esta se encontró asociada al color del extracto con una actividad específica de 70 mmol/mg x min.(fig. 10). Que es aproximadamente del doble de la actividad específica del extracto crudo mostrado en la tabla 3



**Figura 10.** Perfil de pH y concentración de proteína de las diferentes fracciones obtenidas del enfoque isoelectrico en el Rotofor.

### 6.3 Columna de Sephadex

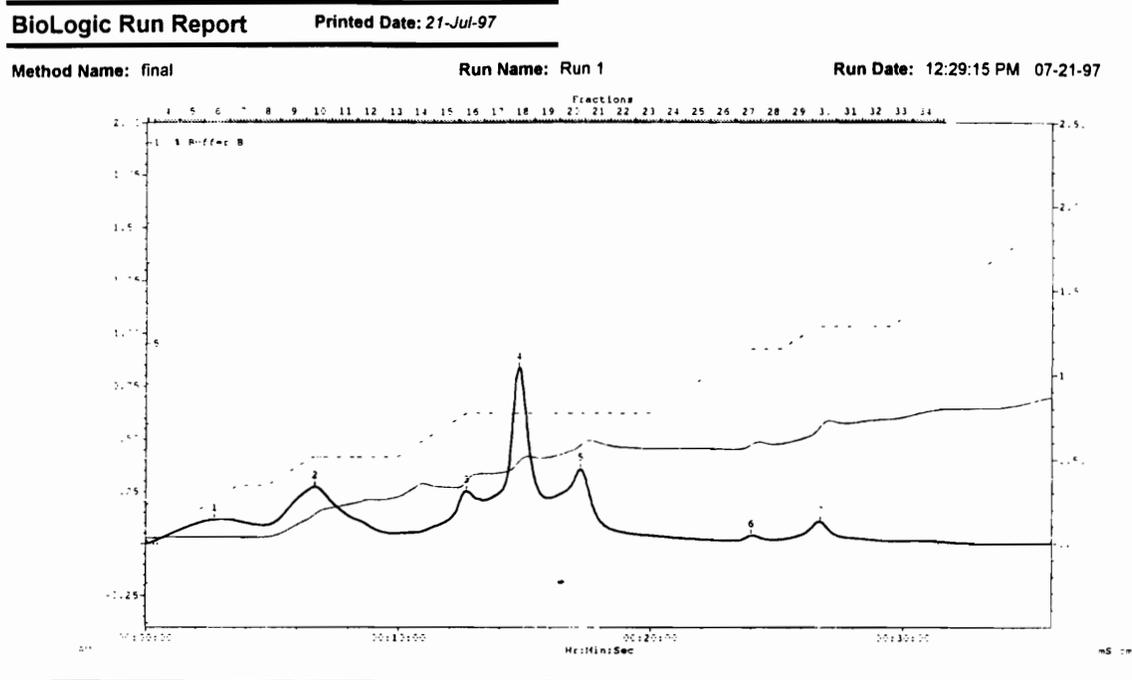
La fracción obtenida del electroenfoque fue inyectada a la columna de sephadex. El perfil de la elución se muestra en la fig. 11. De las fracciones eluidas solamente una conservó el color y esta misma conservo la actividad de lacasa, que presentó una actividad específica de 116 mmol/mg x min, que corresponde al pico señalado en el cromatograma (ver tabla 3)



**Figura 11.** Cromatograma de la columna de sephadex superose 75 el pico marcado presenta actividad de lacasa y la actividad sigue asociada al color. El eje y1 es la concentración de la muestra en D.O. a 280 nm, el eje y2 muestra la conductividad en mSm. El eje de la x muestra el tiempo y el eje superior el número de muestra.

#### 6.4 Columna de intercambio iónico

Del punto isoeléctrico ( $pI=4.18$ ) determinado con el electro enfoque, se elaboraron los amortiguadores para la columna de intercambio iónico a un pH de 6.5 y con estos se activó la columna, donde se pudo observar que el paso más importante en la purificación fue la cromatografía de intercambio aniónico. El perfil de elución se muestra en la fig. 12, donde se puede observar que la fracción con actividad de lacasa se obtuvo al tener un gradiente de NaCl del 30 %, la fracción obtenida ya no presentó el color café, pues este se eluyó con el del gradiente, obteniéndose una actividad específica de 545 mmol/mg x min, que corresponde al pico con el número 4, y teniendo la mayor actividad específica lo cual indica que este es el paso más importante de la purificación, tabla 3.



**Figura 12.** Cromatograma de la columna de intercambio iónico se puede observar un pico al tener el 30 % de NaCl a los 15 min que tiene actividad de lacasa. El eje y1 muestra la concentración de proteína en D.O., el eje y2 muestra la conductividad en mSm y el eje x es el tiempo el eje superior muestra el número de muestra. El pico marcado muestra una actividad específica de 545 mmol/mg x min utilizando *p*-cresol como sustrato.

## 6.5 Caracterización de la enzima purificada

### 6.5.1 Temperatura de estabilidad y energía de inactivación

De acuerdo a la figura 13, la mayor actividad se obtiene a los 30° C, lo que se confirma con otros estudios realizados para esta enzima (Wood 1980), Se calculó la energía de inactivación que no ha sido reportada para esta enzima y que es de  $E_a = 15.12$  Kcal/mol (fig. 14). Este valor de energía de activación es más pequeño que en el extracto crudo lo cual será discutido más adelante.

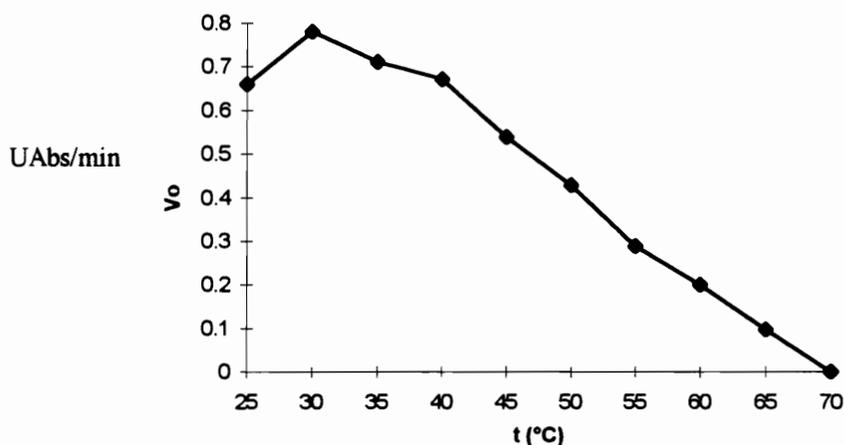


Figura 13. Diferentes velocidades iniciales a diferentes temperaturas utilizando amortiguador de fosfatos pH 6.5 0.01M con 2mM de p-cresol como sustrato.

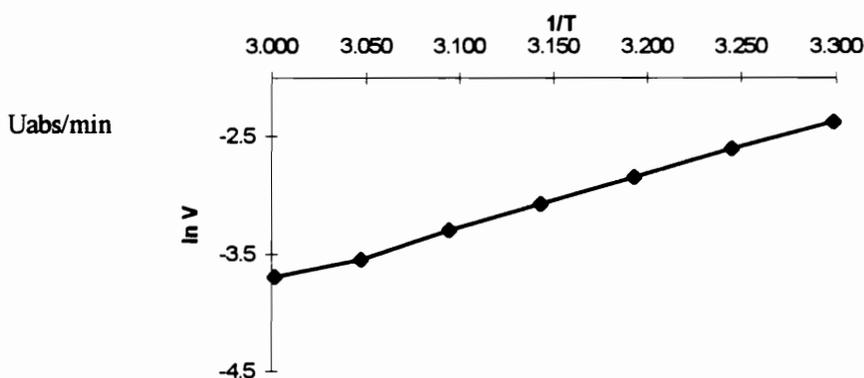
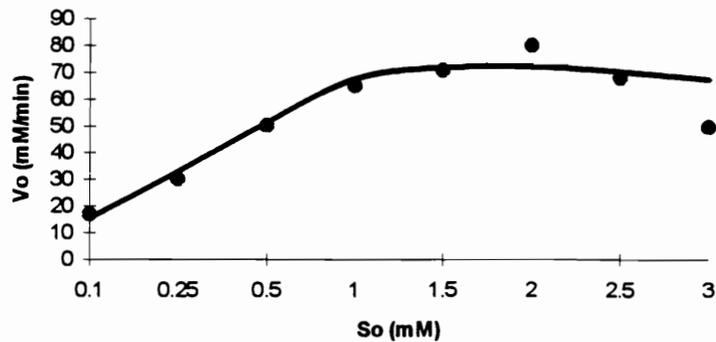


Figura 14. Gráfica de Arrhenius y calculo de la energía de inactivación de la enzima lacasa utilizando amortiguador de fosfatos pH 6.5, 0.01M con 2 mM de p-cresol como sustrato.

### 6.5.2 Evaluación de $K_M$ y $V_{max}$ de la enzima pura

La curva de las velocidades iniciales con diferentes concentraciones de sustrato indicada en la fig 15, en la cual se muestra, que la velocidad óptima ( $V_o$ ) se obtiene utilizando una concentración de 2 mM. Cabe hacer notar que se presenta inhibición de la actividad enzimática a concentraciones mayores de 2.0 mM. Posteriormente se calcularon los valores de  $K_M$  y  $V_{max}$  (figura 15), donde se obtuvieron una  $K_M$  de 717.4  $\mu M$  y una  $V_{max}$  de 184.5  $\mu mol/min$ . Datos que no habían sido publicados para este sustrato.



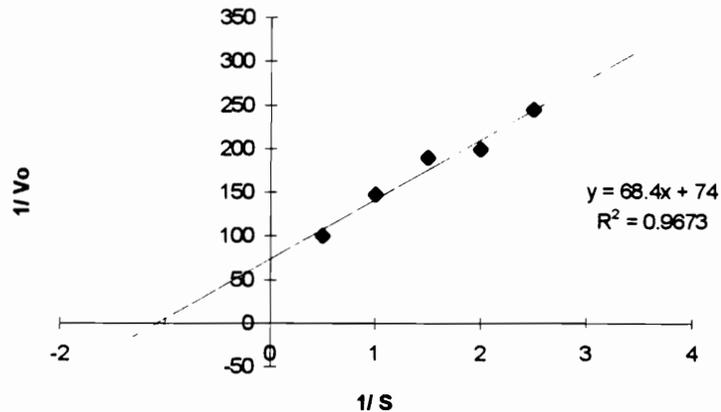
**Figura 15.** Velocidades iniciales con diferentes concentraciones de sustrato, los puntos redondos muestran los datos experimentales y la línea continua los valores calculados.

Para ajustar estas tendencias de activación e inhibición por sustrato se empleó el modelo de inhibición no competitiva que ajustó bien los datos de la Fig. 16 según ahí se muestra. Los parámetros obtenidos fueron  $V_{max} = 184.5 \mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mL}$ ;  $K_M = 717.4 \mu\text{M}$ ;  $K_I = 3.8 \text{ mM}$ .

$$V_o = \frac{V_{max} S}{(K_M + S)(1 + S/K_I)}$$

Para graficar se superponen la curva continua  $V \text{ calc vs } S_o$  a los datos discontinuos (puntos) de  $V_{abs} \text{ vs } S_o$ . Eso se muestra en la figura 15.

Para un buen ajuste de la curva se elimino el ultimo valor de  $V_o$  y  $S$  ya que al tomarlos en el modelo no se ajusta a la curva. Obteniéndose un valor calculado de  $V_{max} = 186.4 \mu\text{M}/\text{min} \times \text{mL}$ ;  $K_M = 1.05 \text{ mM}$ ;  $K_I = 2.9 \text{ mM}$ .



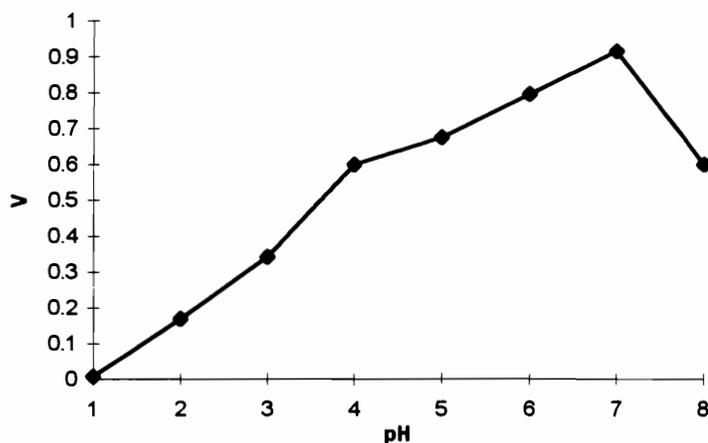
**Figura 16.** Dobles recíprocas de Linewaber Burk para calcular  $K_M$  y  $V_{max}$  se obtuvieron los siguientes valores para  $K_M = 717.4\mu M$  y una  $V_{max}$  de  $184.5\mu mol/mg \times ml$ .

Los datos usados para construir esta gráfica son los calculados en la figura 15.

los datos calculados a parecen en la tabla 4, de la enzima purificada. El  $K_M$  de la enzima pura es diferente al del extracto crudo; (Tabla 4) esto podría deberse que durante el proceso de purificación aparecían dos bandas con actividad de lacasa y al final de este proceso solo se obtuvo una banda con actividad, además de la perdida de proteína durante el proceso de purificación.

### 6.5.3 Evaluación del pH óptimo de la enzima purificada

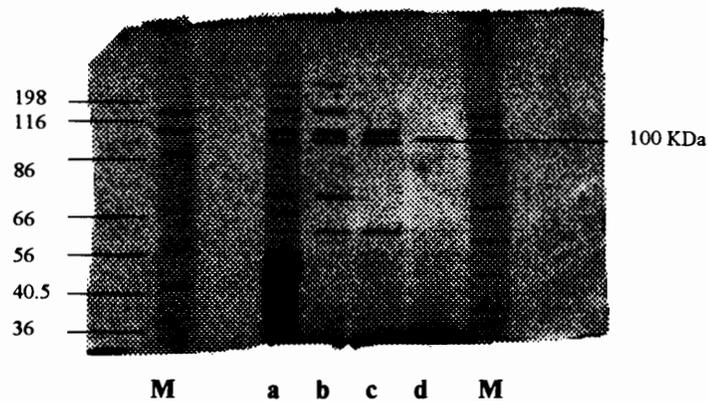
Para el pH óptimo se construyó una gráfica de velocidad inicial contra pH. Como se puede apreciar en la figura 17, el pH óptimo se encuentra entre 6.5 y 7, datos que ratifican con otros reportados (Wood, 1980a., Perry, 1992).Este dato concuerda con el valor obtenido con el extracto crudo.



**Figura 17.** Comportamiento de la actividad de la enzima lacasa a diferentes pH's utilizando un amortiguador de acetatos 0.01 M y una concentración de sustrato de 2 mM y una temperatura de 30° C

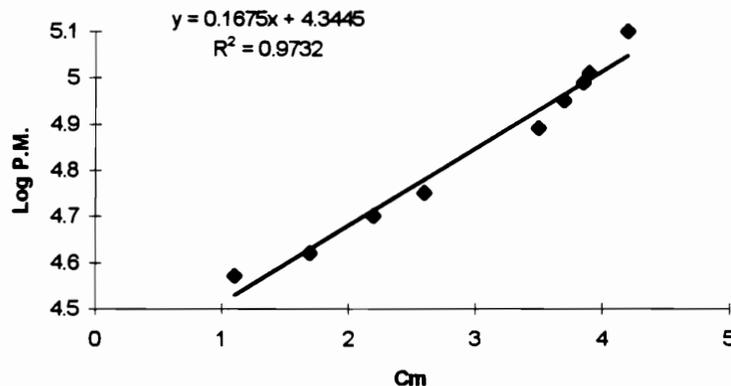
#### 6.5.4 Electroforesis y Zimografía

El peso molecular de la enzima se calculó a partir de la distancia recorrida en el gel de electroforesis (fig. 18), se muestran las diferentes bandas de proteínas durante el proceso de purificación. En los carriles extremos se encuentran los marcadores de peso molecular, en el carril a, se encuentra el extracto crudo donde las bandas que mostraron actividad fueron la 3 y 4. En el carril b se encuentra la muestra después de el enfoque isoelectrico con Rotofor incluyendo 4 bandas de impurezas 2 de bajo y 2 de alto peso molecular. En el carril c se encuentra la muestra eluída en la columna de sephadex donde todavía se pueden observar 1 banda de bajo peso molecular y, por ultimo, en el carril, d, se muestra la fracción obtenida de la columna de intercambio aniónico que se eluyó con el 30 % de NaCl pH 6.5 en un amortiguador de fosfatos 0.01 M



**Figura 18.** Electroforesis realizada en gel de poliacrilamida al 8%; M marcadores de peso molecular, a extracto crudo b Rotofor c columna p6 d intercambio iónico. Los marcadores son  $\alpha$  Macroglobulina 198,  $\beta$ Galactosidasa 116, Fructosa 6-fosfato cinasa 86, Piruvato cinasa 66, Fumarasa 56, Deshidrogenasa láctica 40.5, Trifosfato isomerasa 36 Kda. Concentración de proteína por carril: a; 15.65; b, 18; c, 11; y d, 2.4  $\mu$ g de proteína.

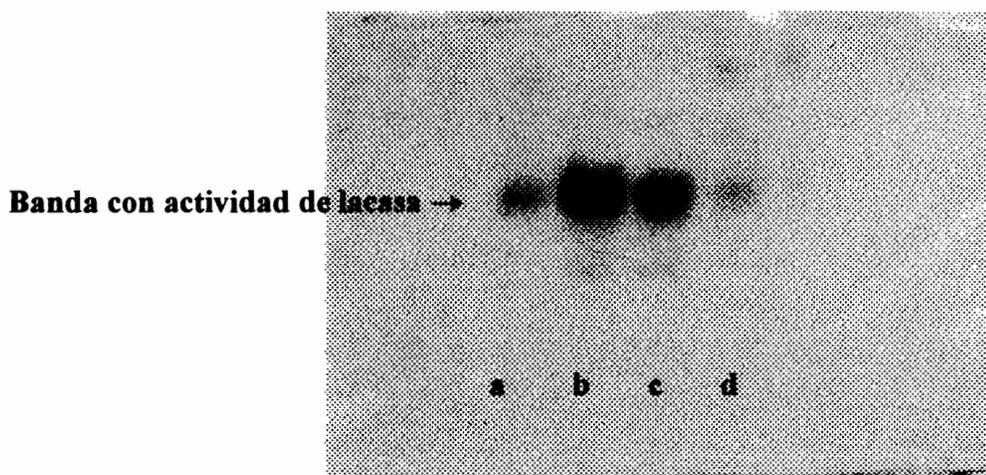
Se obtuvieron las distancias recorridas por los marcadores de peso molecular y se construyó la gráfica de regresión (figura 19), donde se extrapoló la distancia de la enzima en cuestión y se determinó su peso molecular calculándose un peso de 100 KDa lo que concuerda con lo reportado por Wood (1980a) pero difiere con los resultados que presenta Perry (1993a) quien obtuvo un peso molecular de 65 Kda. Esta diferencia se puede deber al hecho de las condiciones de corrida. En otras electroforesis se presentaba una banda de aproximadamente 60 kDa que posiblemente eran los monómeros de la enzima.



**Figura 19.** Regresión de los estándares de peso molecular contra la distancia para el calculo del peso molecular de la enzima.

## DISCUSIÓN

Para reconocer la banda de la enzima se utilizó la técnica de Zimografía como se muestra en la fig. 20. Donde las manchas indican la presencia de actividad de Lacasa con p-cresol.



**Figura 20.** Zimografía. Se llevo a cabo en un gel de electroforesis al 8%. El carril a, es el extracto crudo,. El carril b, muestra la actividad del extracto obtenido con el Rotofor. El carril c, muestra la fracción obtenida de la columna de intercambio aniónico. El carril d, muestra una fracción de un extracto crudo en refrigeración..

En la tabla 3, se muestran las actividades específicas durante el proceso de purificación. Es importante hacer notar el interés de tener una actividad específica muy alta como índice de purificación, el porcentaje de recuperación es del 4% y el paso más importante durante la purificación es en la columna de intercambio aniónico donde se aumenta el factor de purificación hasta 14 veces. Que es muy bueno comparado con otros proceso de purificación partiendo de un volumen muy pequeño y con un tiempo muy corto del proceso de purificación.

**Tabla 2.** Actividades específicas durante el proceso de purificación de la enzima lacasa de *A. bisporus*.

Fuente de la Enzima	Unidades de Actividad	Volumen	Proteína Total	Actividad Específica	% de Recuperación	Factor de Purificación
	mmol/min*ml	ml	mg	mmol/mg*min		
Extracto Crudo	39.9	50	52.18	38	100	1
Rotofor fracc. 10	84.5	2	2.40	70	8.5	1.83
FPLC Sephadex	85.5	3	2.2	116	6.9	3
FPLC Mono O	87.31	1	0.16	545	4.4	14.36

## 7. DISCUSIÓN

El método enzimático utilizando *p*-cresol para cuantificar la actividad de oxidasas fenólicas es una parte importante de este trabajo ya que se puede medir actividad de una forma rápida y visible por la aparición de un color amarillo. En el caso de la zimografía es una herramienta muy importante ya que se pudo identificar la presencia de actividad desde el extracto crudo y saber el peso molecular aproximado de la enzima durante la purificación y seguir la permanencia, desaparición y concentración de la enzima.

Las metodologías propuestas para la purificación de esta enzima (Wood, 1980a y Mattcham, 1992) a partir de este organismo tienen la desventaja de utilizar volúmenes muy grandes desde el inicio, al igual que el tiempo completo para la purificación es de mínimo 3 días. El método propuesto por nosotros es de 6 horas una vez estandarizado y con un volumen inicial de 50 ml, obteniendo una recuperación de la actividad de la 4% y un factor de purificación de 15. Con respecto a la actividad no son comparables ya que se utilizaron sustratos diferentes. Wood (1980a) utilizó diferentes sustratos principalmente el guayacol midiendo la actividad con un electrodo de oxígeno y la fuente enzimática fue de 3 litros de extracto de Malta 2% (W/V) inoculada con *A. bisporus* con un tiempo de crecimiento de 4 semanas; Wood *et al.* (1980a) extrajeron la enzima lacasa de una composta inoculada con micelio de *A. bisporus* el cual fue lavado por un volumen de 50 litros de agua desionizada para obtener el extracto crudo. El tiempo de crecimiento del micelio en la composta fue de 4-6 semanas donde lo reportan como un método muy rápido.

En los resultados obtenidos de la caracterización del extracto crudo y la enzima pura pueden apreciarse cambios en el  $K_M$  y  $V_{max}$ , debido a que en los pasos de purificación se tenían dos bandas con actividad, y que posiblemente se traten de una enzima lacasa tipo I y una lacasa tipo II, utilizando siringaldizina como sustrato. Por otro lado el extracto crudo con elevadas concentraciones de sustrato (30 mM de *p*-cresol) no había inhibición lo que si ocurra con la enzima pura utilizando *paracresol*, podría deberse a que como se mencionó antes se tenían dos lacasas y posiblemente actividad de tirosinasa, lo que concordaría con la drástica disminución del  $K_M$  de 2.8 mM a 0.72 mM en la enzima purificada. Por otra parte, la  $E_a$  cambia posiblemente por las diferentes enzimas con actividad de fenoloxidasas y que el extracto crudo contiene otras proteínas y compuestos que tienen la función de proteger a la enzima contra la temperatura, ya que respecto a los valores obtenidos de pI, y de pH óptimo, estos no cambian.

**Tabla 3.** Datos reportados para lacasas de diferente fuente.

Fuente	M <sub>r</sub> (10 <sup>3</sup> )	% Glucosilación	Atomos Cu	pI	pH óptimo	Est. al pH	T estab	Ref.
PM1	64.0	6.5	4	3.6	4.5	3-9	60	Coll, 1993
<i>C. versicolor</i>	63.0		4	3.0	4-5	7-8	50	Sugiura, 1987
<i>C. hirsutus</i>	63.0	15	4	3.6	4.5	6-9	50	Kojima, 1990; Sugiura, 1987
<i>Phlebia radiata</i>	64.0	5-14	2	3.9	4.5			Karhunen, 1990; Niku, 1988; Saloheimo, 1991
<i>Agaricus bisporus</i>	100.0	15	2	3.4- 4.0	5.6			Sundman, 1971
<i>Armillaria mellea</i>	59.0			4.1	3.5			Rehman, 1992

**Tabla 4.** Características del extracto crudo y de la enzima pura utilizando p-cresol y siringaldizina como sustrato.

	p-cresol		Siringaldizina	
	Ext. Crudo	Enz. Pura	Ext. crudo	Enz. Pura
K <sub>M</sub> (mM)	2.8	0.72	2.0	1.2
Act. esp. (mmol/mgxmin)	38.2	545	0.235	2.954
pH óptimo	7.0	6.5	5.0	5.0
Temp. óptima (°C)	30	30	30	30
-Ea (kcal/mol)	23.1	15.1	-	-
pI	-	4.2	-	4.2

La disminución del K<sub>M</sub> en el extracto crudo utilizando p-cresol sugiere que habian dos actividades p. ej.: tirosinasa + lacasa , lo que concuerda con lo reportado por Ratcliff (1994). Donde utilizando SHAM inhibe la actividad de tirosonasa pero no de lacasa. Los resultados con siringaldizina El K<sub>M</sub> disminuye una tercera parte para la enzima pura, lo que corroboraria la presencia de dos bandas de actividad en la zimografía y que se hacen presentes en la electroforesis. Al final de la purificación de la enzima solo

se encuentra una sola banda en la electroforesis y una sola banda de actividad en el zimograma. Lo que concuerda con resultados obtenidos para otras lacasas, en las cuales se encuentran dos lacasas una de tipo 1 y otra tipo 2 pero una con mayor actividad, que es la lacasa tipo 2 que es de tipo inducible. Esto se puede apreciar en los resultados de velocidad máxima para el extracto crudo que presenta un valor de  $2.76 \times 10^{-7}$  mol/BAAn x ml para la enzima pura de  $1.656 \times 10^{-7}$  mol/mg x min. Y un aumento en la actividad específica inicial del extracto crudo de 235.95  $\mu$ mol/mg x min, y para la enzima purificada de 3 mmol/mg x min, que es de un orden de 13 veces.

El avance principal de este estudio es la notable simplificación en los métodos de detección y de separación de las oxidasas de los fenoles en comparación con los métodos desarrollados por Wood y su grupo en Inglaterra (1980a) pues aquí se ha logrado establecer un conjunto de técnicas que incluyen: maceración del material en agua, extracción por filtración, separación por punto isoelectrico y purificación por filtración en gel y por cromatografía de intercambio iónico. Estas técnicas combinadas con la electroforesis y la zimografía, permite la caracterización efectiva de las oxidasas del fenol pues son más simples que el empleo de la polarografía indicada fundamentalmente en la sustitución de la cromatografía por afinidad por el procedimiento en materiales más simples de la cromatografía por intercambio iónico. La diferencia en la complejidad de los procedimientos recomendados por Wood (1980a) indicado en la Fig. 3 y el aquí propuesto reseñado en la Fig. 5.

Estas mejoras técnicas serán útiles sobre todo para facilitar la caracterización de oxidasas de fenoles de diversas especies de hongos, pues una de las metas a futuro de nuestro grupo es obtener nuevas oxidasas de fenoles que, provenientes de hongos silvestres de México, resulten tener propiedades termoresistentes. De esa manera sus genes podrían ser clonados y transferidos a mohos mesofílicos de fácil cultivo industrial. p. ej.: cepas de *Aspergillus niger*.

El uso del p-cresol como método rápido colorimétrico puede ser útil para evaluar extractos de posible interés con actividad de oxidasas de fenoles. Pero como se demuestra en este trabajo, deberá complementarse con otros sustratos como la siringaldizina cuando se quiera precisar mejor la especificidad de las enzimas.

Queda por lo tanto abierta la posibilidad de usar estos procedimientos para fomentar el desarrollo de una tecnología que permita producir y utilizar las oxidasas de los fenoles con posible aplicación industrial.

### 8 CONCLUSIONES

El *p*-cresol mostró ser un sustrato útil para medir actividad de la enzima lacasa, cuantificando su oxidación por espectrofotometría a 400 nm, comprobando la actividad de lacasa utilizando la siringaldizina, que es el único sustrato específico conocido.

El uso de la técnica de zimografía en este campo de investigación fue muy útil para ubicar la única banda con actividad de lacasa y determinar su peso molecular aún sin purificar la enzima, al igual que su permanencia y abundancia durante todo el proceso de purificación y caracterización.

La lacasa producida por *A. bisporus* se obtuvo con un factor de purificación de 14 veces, con un porcentaje de recuperación de actividad del 4.4% después de 3 etapas de purificación. El tiempo de purificación enzimática total es de 6 horas.

El punto isoeléctrico (pI), de la lacasa producida por *A. bisporus*, fue de 4.18.

El peso molecular aproximado de la enzima fue de 100 kDa en condiciones no desnaturizantes y de 50 kDa aproximadamente en condiciones desnaturizantes.

La temperatura de estabilidad de actividad enzimática fue de 50° C y una energía de inactivación de 15.17 Kcal/mol. El pH de actividad óptimo fue de 6.5 utilizando un amortiguador de fosfatos 0.01M. El  $K_M$  fue de 717.4  $\mu$ M y la  $V_{max}$  de 184.5  $\mu$ mol/min x min y una actividad específica de 545 mmol/mg x min. Utilizando *p*-cresol como sustrato.

### 9. RECOMENDACIONES.

Caracterizar la enzima con otros sustratos de interés comercial ó industrial, también determinar el porcentaje de glucosilación, obtener mayor cantidad de la enzima para estudios fisicoquímicos como polarimetría, concentración de cobre, producción de anticuerpos monoclonales para la detección de la enzima y la secuenciación de la misma para comparar la enzima producida por la cepa de Wood y la producida en este trabajo, pensando en un futuro la posibilidad de clonarla en *A. niger* y ver si es posible modificarla por ingeniería de proteínas, lo que daría por resultado una enzima con características únicas como resistencia a cambios drásticos de pH y Temperaturas extremas que se utilizan en los procesos industriales como el blanqueo de la pulpa de papel; una enzima con características de recuperación y un valor comercial alto, ya que en las aplicaciones ya se han dado ejemplos pero la limitante es la inactivación de la enzima, etc.

Caracterizar el método de actividad para ver sus cualidades.

Mejorar los métodos para determinar actividad y estabilidad.

Como se observo que la actividad específica se ve más enriquecida en la operación de intercambio aniónico sería interensante solo usar este paso para purificar la enzima.

## 10 BIBLIOGRAFÍA

Allendorf, M.D. Spira, D.J. y Solomon, E.I. (1985). Low temperature magnetic circular dichroism studies of native laccase: spectroscopic evidence exogenous ligand bridging at a trinuclear copper active site. *Proc. Natl Acad Sci. USA.* 82, 3063 - 3067.

Aramayo, R. y Timberlake, W.E. (1990). Sequence and molecular structure of the *Aspergillus nidulans* yA (lacasa 1) gene. *Nucleic Acids Res* 18, 3415.

Bertrand, G. *Compt. Rend.*, 118 (1894), 472. Citado por Bengt Reinhammar 1970

Bu'Lock, J.D. (1967). Fungal metabolites with structural function. In *Essays in Biosynthesis and Microbial Products*, pp. 1-18. New York: John Wiley & Sons.

Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the cuantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dande bindin. *Annal. Biochem.* 72, 248-254.

Brock y Madigan. *Microbiología* , sexta edición Prentice Hall Hispanoamerica. S.A. impreso en México 1993. Cap 10, pp 409-411.

Chen, C.L. (1991). Lignin: occurrence in woody tissues, isolation reactions, and strcuture. in wood estructura and composition (Lewin, M. and Goldstein, I.S., EDS). New York Marcel Dekker, Inc.; pp. 183-261.

Clutterbuck, A.J. (1972). Absence of laccase from yellow spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen Microbiol* 70: 423-435.

Coll, M.P., Fernández- Abalos J.M., Villanueva R.J., SantaMaría R., and Pérez P. (1993). Purification and Characterization of a Phenoloxidase (Laccase) from the Lignin-Degrading Basidiomycete PM1 (CECT 2971). *Appl Environ Microbiol.*, Vol 59 (8), 2607-2613.

## BIBLIOGRAFIA

---

- David M. O'Malley, Ross W, Wuli Bao, and Ronald R. Sederoff. (1993). The role of the laccase in lignification. *Plant J.* 4(5), 751-757.
- Davis S., and Burns R.G. (1990). Decolorization of phenolic effluents by soluble and immobilized phenol oxidases. *Appl Microbiol Biotechnol* 32: 721-726.
- Dean, J. F. D. and Eriksson, K. E. L. (1992). Biotechnological modification of lignin structure and composition in forest trees. *Holzforschung*, 46, 135-147
- Eriksson, K.E., Kirk T.K. (1986). Biopulping biobleaching and treatment of kraft bleaching effluents with white-rot fungi. In: Robinson C.W. De. *Comprehensive biotechnology*, vol 3. Pergamon Press, New York, pp271-294.
- Ferrer, I., Dezotti, M. & Durán, N. (1991). Decolorization of kraft effluent by free and immobilized lignin peroxidases and horseradish peroxidase. *Biotechnol Letters*. 13:577-582.
- Fewson, C.A. (1981). Biodegradation of aromatics with industrial significance, p. 141-179. In T. Leisinger, R. Hütter, A.M., Cook, and J. Nuesch (de.), *Microbial degradation of xenobiotic and recalcitrant compounds*. Academic Press, Inc., New York.
- Germann, U.A. & Lerch. K. (1986). Isolation and partial nucleotide sequence of the laccase genes from *Neurospora crassa*: amino acid sequence homology of the protein to human ceruloplasmin. *Proceedings of the National Academy of Sci.s of the United States of America* 83: 8854-8858.
- Germann, U.A., G. Müller, P.E. Hunziker, and Lerch, K. (1988). Characterization of two allelic forms of *Neurospora crassa* laccase. *J. Biol. Chem.* 263: 885-896.
- Guenther; F.R., R.M. Parris, S.N. Chesler, and L.R. Hilpert. (1981). Determination of phenolic compounds in alternate fuel matrices. *J. Chromatogr.* 207:256-261.
- Hakulin, R.(1987). Second IAWPRC Symp. on forest ind. waste water june, Tampere Finland. Citado por Ferrer, I. (1991).

## BIBLIOGRAFIA

---

- Harkin, J.M; Larsen M.J. & Obst, J.R. (1974). Use of syringaldizine for detection of laccase in sporophores of wood rotting fungi. *Mycologia* 66: 469-476.
- Hermann, T. E., Kurtz, M. B., & Champe, S.P., (1983). Laccase localized in hülle cells and cleistothecial primordia of *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* 154, 955-964
- Hopkins, T. R., (1984) US Patent, 4.485.016. Citado por Ferrer, I. (1991).
- Jurasek, L. and Paice, M. G., (1986), *CHEMTECH*, June 360-365. Citado por Ferrer, I. (1991).
- Karhunen, E., Niku-Paavola, M. L., Viikari, L., Haltia, T., Van Der Meer, R. A. & Duine, J. A., (1990). A novel combination of prosthetic groups in a fungal laccase; PQQ and two copper atoms. *FEBS Lett.* 267, 6-8
- Karlsson, B.G; Aasa, R; Malmstron, B.G. & lundberg, L.G. (1989). Rack-induced bonding in blue copper proteins: spectroscopic properties and reduction potential of the azurin mutant Met-121-Leu. *FEBS Lett* 253: 99-102.
- Kennedy, J.F., Cabral, J.M.S. (1987), In *Enzyme Technology* (J.F. Kennedy, De, VCH Publ. N.Y.) 7, 347-404.
- Kersten. P.J; Kalyanaraman, B; Hammel, K.E; Reinhammar, B. & Kirk, T.K. (1990). Comparison of lignin peroxidase of laccase in the oxidation of methoxybenzenes. *Boichem J* 268: 475-480.
- Klibanov A.M., Alberti B.N. (1981). Enzymatic removal of dissolved aromatics from industrial aqueous effluents. *Biotechnol Bioeng Symp* 2: 373-379.
- Klibanov A.M., Morris, E.D. (1981). *Enzyme Microbiol. Thecnol.* 3, 119-122.
- Klinman, J.P; Dooley, D.M; Duine, J.A; Knowles, P.F; Mondovi, B. & Villafranca, J.J. (1991). Status of the cofactor identity in oxidative copper enzymes. *FEBS Lett* 282: 1-4.

## BIBLIOGRAFIA

---

- Kojima, Y., Tsukuda, Y., Kawai, Y., Tsukamoto, A., Sugiura, J., Sakaimo, M. & Kita, Y. (1990). Cloning, sequence analysis, and expression of linninolytic phenoloxidase genes of the white-rot basidiomicete *Coriolus hirsutus*. *J Biol Chem* 265: 15224-15230.
- Laborde, J. (1896). Sur la ccase des vins. *C R Hebd Seances Acad Sci.* 123, 1074-1075. Citado por Thurston, F. C. (1994).
- Laemmli. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.
- Leatham, G.F. Stahmann, M.A. (1981), Studies on laccase of *Leentinus edodes*: specificity, localization and association with the develo of fruiting bodies. *J. Gen. Microbiol.* 125: 147-157.
- Maccarone, M., Veldink, G. A. & Vliegthart, J. F. G. (1991). An investigation of quinoprotein nature of some fungal and plant oxidoreductases. *J Biol Chem.* 266, 21014- 21017.
- Martínez-Carrera D., Larqué S.A., Morales P., Sobal M., Martínez W., y Aguilar A. Los hongos comestibles en México. *Ciencia y Desarrollo.* Enero-Febrero 1993. pp.41-49.
- Matcham, S.E., Wood, D.A. (1992). Purification of *Agaricus bisporus* extracellular laccase from mushroom compst. *Biotechnology Letters.* 14: 297-300.
- Mayer, A. M. & Harel, E. (1979). Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry.* 18, 193-215.
- Messerschmidt, A., Rossi, A., Ladenstein, R., Huber, R., Bolognesi, M., Gatti, G., Marchesen, A., Petruzzelli, R. & Finazzi-Agro, A. (1989). X-ray crystal structure of the blue oxidase ascorbate oxidase from zucchini. Analysis of the polipeptide foild and a model of the copper sites and ligands. *J. Mol Biol.* 206, 513-529.

## BIBLIOGRAFIA

---

- Messerschmidt, A., & Huber, R. (1990). The blue oxidases ascorbate oxidase, laccase and seruloplasmin. Modelling and structural relationships. *Eur J Biochem.* 187, 341-352.
- Messerschmidt, A., Ladenstein, R., Huber, R., Bolognesi, M., Avigliano, L., Petruzzelli, R., Rossi, A. & Finazzi-Agro, A. (1992). Refined crystal structure of ascorbate oxidase at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol.* 224, 179-205.
- McCarthy, J.F., and B.D. Jiménez (1985). Reduction in bioavailability to bluegills of polycyclic aromatic hydrocarbons bound to dissolved humic material. *Environ. Toxicol. Chem.* 4:511-521.
- Niku-Paavola, M.-L., Karhunen, E., Salola, P. & Raunio, V. 1988. Lignolytic enzymes of the whit-rot fungus *Phlebia radiata*. *Biochem J.* 254,877-884
- O'Brian. A., "Mushroom Marketing Worldwide", *The Mushroom J.*, núm. 200, 1989. pp. 253-263.
- Ogram, A.V., R.E. Jessup, L.T. Ou, and P.S. C. Rao. (1985). Effects of sorption on biological degradation rates of (2,4, dichlorophenoxy) acetic acid in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 582-587.
- Paice, M.G., Jurasek L. (1984). Peroxidase catalyzed colour removal from bleach plant effluent. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 477-480.
- Perry, C.R., Matcham, S.E., Wood D.A. & Thurston, C.F. (1993a). The structure of laccase protein and its synthesis by the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *J. of Gen. Microbiol.* 139: 171-178.
- Perry, C. R., Smith, M., Britnell, C. H., Wood, D. A. and Thurston C. F. (1993b). Identification of two laccase genes in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.*, 139: 1209-1218.
- Ratcliffe, B., Flurkey W.H., Kuglin, J. and Dawley, R. (1994). Tyrosinase, Laccase, and Peroxidase in Mushrooms (*Agaricus*, *Crimini*, *Oyster*, and *Shiitake*). *J. Food Sci.* Vol. 59, No.4, 824-827.

## BIBLIOGRAFIA

---

- Rehman, A.T., and C.F. Thurston. (1992). Purification of laccase I from *Armillaria mellea*. *J. Gen. Microbiol.*, 138: 1251-1257.
- Reinhammar, B. (1970). Purification and Properties of Laccase and Stellacyanin from *Rhus Vernicifera*. *Bochim. Biophys. Acta*, 205: 35-47.
- Reinhammar, B. & Malstrom, B. G. (1981). "Blue" copper containing oxidases. In copper proteins (metal ions in biology, vol 3), pp 109-149. Edited by T.G. Spiro. New York: John wiley & Sons.
- Richards, D.J. and W.K. Shieh. (1986). Biological Fate of organic priority pollutants in the aquatic environment. *Water Res.* 20: 1077-1090.
- Saloheimo, M., M. L. Niku-Paavola, & J. K. C. Knowles. (1991) Isolation and structural analysis of the laccase gene from the lignin degrading fungus *Phlebia radiata*. *J. Gen. Microbiol.* 137, 1537-1544.
- Sjoblad, R.D., and J.M. Bollag. (1981). Oxidative copper aromatic compounds by enzymes from soil microorganisms. In E. A Paul and Ladd J.N. (eds), *Soil Biochem.*, vol. 5. Marcel Dekker, Inc., New York. p.113-152.
- Smith, A. E. (1985). Identification of 4-chloro-2-methyl phenol as a soil degradation product of ring-labeled  $^{14}\text{C}$  Mecoprop. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 34, 646-660.
- Stirt, J. G. & R. L. Crawford. (1985). Microbial degradation of chlorinated phenoles. *Trends Biotechnol.* 3: 300-305.
- Sugiura, J., M. Sakaimo, Y. Kojima, K. Tsujioka, Y., Mutoh, Y., Shinohara, & K. Koide., (1987). Purification and properties of phenol oxidases produced by white-rot fungi and molecular cloning of phenol oxidase genes, P. 317-320. In *International Seminar on Lignin Enzymic and Microbial degradation. International Symposium on Wood and pulping chemistry*, Paris INRA publications Versailles, France.
- Sundman, V. & L. Näse (1971). A simple plate test for direct visualization of biological lignin degradation. *Pap. Timber*, 53, 67-71. Citado por Coll M. P. 1993.

- Thurston C.F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiol.*, 140: 19-26.
- Trombly, J. (1995). Engineering Enzymes for Better Bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* 29 (12), 560-564.
- Valo, R., Kitunen, M. Salkinoja-Salonen, and S. Räsänen. (1984). Chlorinated phenols as contaminants of soil and water in the vicinity of two Finnish sawmills. *Chemosphere* 13:835-844.
- Wood, D. A. & Goodenough, P. W.(1977). Fruiting of *Agaricus bisporus*. Changes in extracellular enzyme activities during growth and fruiting. *Archives of Microbiology.* 114, 161-165.
- Wood, D.A. (1980a). Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* 117, 327-338.
- Wood, D.A. (1980b). Inactivation of extracellular laccase during fruiting of *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* 117, 339-345.
- Wood, D.A. (1985). Production and roles of extracellular enzymes during morphogenesis of basidiomycete fungi. In *Developmental biology of higher fungi.* pp 375-387.
- Worrell, J. J., Chet, Y. & Hüttermann, A. (1986). Association of rhizomorph formation with laccase activity in *Armillaria* spp. *J. Gen. Microbiol.* 132, 2527-2533.
- Yaver, D. S., Xu, F., Golightly, E.J., Brown, K.M., Brown, H.S., Rey, W.M., Schneider, P., Halkier, T., Mondorf, K. & Dalboge, H. (1996). Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from white-rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* vol 62 No.3, 834-841.
- Yoshida, H. *J. Chem. Soc.*, 43 (1883) 472, citado por Wood 1980a.