



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Purificación y caracterización de la enzima
comercial lacasa del hongo de podredumbre
blanca *Trametes versicolor*.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACEÚTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A:
ARLETTE LETICIA MARTÍNEZ CRESPO**

ASESOR: JOSÉ ANTONIO GARDUÑO ROSAS

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Purificación y caracterización de la enzima comercial lacasa del hongo de podredumbre blanca *Trametes versicolor*

Que presenta la pasante: Arlette Leticia Martínez Crespo
Con número de cuenta: 095376253 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 08 de abril de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	DAR. Juan José Díaz Esquivel	
VOCAL	QFB. Elia Granados Enríquez	
SECRETARIO	QFB. José Antonio Garduño Rosas	
1er. SUPLENTE	Q. Arcadia Hernández Beltrán	
2do. SUPLENTE	Dr. José Juan Escobar Chávez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

AGRADECIMIENTOS:

A DIOS, Agradezco infinitamente a Dios por haber estado conmigo en este camino y colmarme de palabras de aliento en los momentos de debilidad a través de su palabra. Por ser mi fortaleza, por darme una hermosa familia, pero sobretodo por toda la felicidad que todos los días me da.

A MIS PADRES, por darme la vida, por todo el cariño, amor y confianza que me han dado, por iluminar mi camino y darme la pauta para realizarme en mis estudios y en mi vida, por esas palabras sabias de ánimo que siempre han sabido darme, por todo su apoyo GRACIAS.. Los amo!!!

A MI ESPOSO: por llegar a mi vida, ser mi soporte, mi impulso, por brindarme el tiempo necesario para desarrollarme profesionalmente, por toda tu paciencia y apoyo, pero sobre todo por hacerme sentir tu amor. Te amo mi vida!!!

A MIS HIJOS, Uriel y Alexa por llegar a mi vida y que con su luz han iluminado mi camino y ser el motivo para superarme día a día y ser para ustedes un ejemplo de lucha constante, por sus risas, sus besos y abrazos, por hacerme sentir orgullosa de sus logros. Los adoro!!!

A MIS SUEGROS, por todo su apoyo, ya que sin ellos hubiera sido imposible este logro, gracias por su cariño y por hacerme parte de su familia.

A MI ASESOR QFB. ANTONIO GARDUÑO un especial agradecimiento por confiar en mí y darme la oportunidad de presentar este trabajo.

A Lilly, soy muy feliz por tenerte como hermana, tú has sido parte muy importante en este logro, gracias por tu apoyo, por tus palabras, por animarme a continuar, por despertar en mí el amor por la docencia. Te quiero mucho.

A Mario por esos momentos en tu habitación cuando éramos adolescentes y la pasábamos escuchando música. Porque aun que tu forma de ser no sea muy expresiva sé que me quieres mucho y yo a ti.

A ANITA Y ADOLFO por su apoyo incondicional y todo su cariño, por abrirme las puertas de su casa y hacer de su familia mi familia.

A ELSITA por su apoyo en uno de los momentos clave de mi vida como estudiante que nunca olvidaré.

“Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente, no temas ni desmayes que Yo estaré contigo donde quiera que fueres”

Purificación y caracterización de la enzima comercial lacasa del hongo de podredumbre blanca *Trametes versicolor*

INDICE

1.- Resumen	3
2.- Introducción	4
3.- Generalidades	5
3.1 Proteínas	3
3.1.1 Composición	3
3.1.2 Aminoácidos	3
3.1.3 Enlace peptídico	10
3.1.4 Niveles de organización proteica	12
3.1.5 Plegamiento de las cadenas polipeptídicas	17
3.1.6 Desnaturalización de las proteínas	18
3.1.7 Funciones de las proteínas	19
3.1.8 Métodos separación de proteínas	20
3.1.9 Métodos de cuantificación de proteínas	24
3.2 Hongos de pudrición blanca	24
3.2.1 Características del género <i>Trametes</i>	25
3.3 Enzimas ligninolíticas	25
3.3.1 Peroxidasas	25
3.3.2 Lacasas	26
3.4 Las lacasas	26
3.4.1 Características de las lacasas	26
3.4.2 Estructura y sitio activo	27
3.4.3 Mecanismo de acción	28
3.4.4 La enzima lacasa y la biotecnología	28
3.5 Métodos de estudio de las proteínas	29
3.5.1 Gel de Electroforesis SDS-PAGE	29
3.5.2 Cinética Enzimática	32
4.- Hipótesis	38
5.- Objetivos	39
5.1 Objetivo General	39
5.2 Objetivos particulares	39
6.- Materiales y Métodos	40
6.1 Listado de Reactivos	40
6.2 Listado de Equipos	40
6.3 Desarrollo Experimental	41
6.3.1 Purificación	41
6.3.2 Gel de electroforesis SDS-PAGE	42
6.3.3 Cuantificación	43
6.3.4 Cinética Enzimática	44
6.4 Diagramas de flujo	45
7.- Resultados y Análisis	46
7.1 Purificación	46
7.2 Pruebas de actividad	48
7.3 Gel de electroforesis SDS-PAGE	49
7.3 Cuantificación	50

7.4 <i>Cinética Enzimática</i>	52
8.-Conclusiones	60
9.- Anexos	61
9.1 <i>Diagramas de Flujo</i>	61
9.1.1 Diagrama de flujo de la primer cromatografía	61
9.1.2 Diagrama de flujo para las pruebas de actividad	62
9.1.3 Diagrama de flujo para la ultraconcentración	62
9.1.4 Diagrama de flujo para la recromatografía	63
9.1.5 Diagrama de flujo de la cuantificación por Bradford	63
9.1.6 Diagrama de flujo para el gel de electroforesis (PAGE-SDS)	64
9.1.7 Diagrama de flujo para la cinética enzimática	66
9.2 <i>Índice de figuras</i>	67
9.3 <i>Índice de tablas</i>	68
9.4 <i>Índice de gráficas</i>	69
9.5 <i>Índice de abreviaturas</i>	70
9.-Bibliografía	71

1.- RESUMEN

Las enzimas lacasas son polifenol oxidasas producidas por plantas, bacterias y hongos. Participan en procesos biológicos, tales como producción de pigmento y degradación de la lignina. Se utiliza en la industria para la degradación de la lignina y blanqueamiento del papel, en la industria alimenticia se utiliza para la eliminación de compuestos fenólicos responsables del oscurecimiento y turbidez de jugos de cerveza y vino entre otros. Todo esto hace que las enzimas lacasas sean sometidas a diversos estudios.

En el presente trabajo se estudió la enzima lacasa del hongo *Trametes versicolor* partiendo de la enzima comercial (Sigma) la cual fue sometida a una cromatografía de intercambio iónico para purificarla utilizando un cromatógrafo ATKA con una columna mono Q s/50 GL. Durante esta prueba se verificó la presencia de la enzima lacasa mediante la oxidación del sustrato específico el ácido 2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-6-sulfónico] (ABTS) y para comprobar la pureza se realizó un gel de electroforesis SDS-PAGE con una concentración de acrilamida al 4% en la fase de compactación y al 10% de acrilamida en la fase de separación.

La enzima purificada fue cuantificada por medio del reactivo de Bradford (Sigma) utilizando albúmina bovina estándar (Bio-Rad) para realizar la curva de calibración. El complejo proteína-colorante del reactivo de Bradford (azul de Coomassie) fue seguido a una longitud de onda de 595 nm.

Una vez cuantificada la enzima pura se realizó una cinética enzimática para determinar las constantes K_m (constante de Michaelis) la K_{cat} (constante catalítica).

Para llevar a cabo la cinética enzimática se utilizó el sustrato ABTS preparando 10 tubos con diferentes concentraciones de dicho sustrato que van de 2.5 mM hasta 4.88×10^{-3} mM, a estos se les adicionó una solución de concentración conocida de la enzima uno a la vez y se leyó el incremento en la absorbancia con respecto a un blanco cada 10 segundos a una longitud de onda de 420 nm.

Para cada concentración de ABTS se determinó la velocidad inicial y posteriormente se utilizó una de las formas algebraicas de la ecuación de Michaelis –Menten conocida como la representación doble inversa o representación de Lineweaver-Burk que utiliza el recíproco de la concentración del sustrato y el recíproco de la concentración de la velocidad inicial, de esta manera se obtiene una ecuación lineal donde la intersección con el eje de las "x" es el inverso de la velocidad máxima V_{max} y la pendiente es igual a K_m sobre la V_{max} .

Para determinar la K_{cat} se utilizó la fórmula $K_{cat} = V_{max}/[E]$ donde [E] es la concentración de la enzima lacasa en el tubo donde se llevó a cabo la reacción de oxidación del ABTS.

Se determinó para la enzima lacasa del hongo de podredumbre blanca *Trametes versicolor* la $V_{max} = 1.1 \times 10^{-5}$ mM, la $K_m = 17.8 \mu\text{M}$ y la $K_{cat} = 7.7 \text{ s}^{-1}$.

2.- INTRODUCCIÓN

Desde tiempos antiguos la humanidad ha utilizado a los seres vivos para su beneficio, a veces por accidente otras por ingenio, por lo cual se han ido descubriendo procedimientos para poder utilizarlos con mayor eficiencia. De esta manera podemos definir a la biotecnología como la utilización de organismos vivos o derivados de ellos en procesos industriales, dando como resultado una mejor calidad de vida para el ser humano.

Actualmente las aplicaciones comerciales de la proteínas manipuladas biotecnológicamente son conocidas en todo el mundo por una gran diversidad de industrias; ejemplo de este tipo de proteínas es el caso de la enzima lacasa, la cual fue descrita por primera vez en 1983 por Yoshida, caracterizada como una oxidasa metálica por Bertrand (1985) y en 1996 introducida a la industria donde ha sido utilizada en una amplia variedad de procesos como: El blanqueamiento de la industria del papel, la destoxicación (biorremediación) de suelos y aguas contaminadas, clarificación de vinos, pasando por la producción del alcohol a través de expresión heteróloga en levaduras, producción de moléculas químicas de bajo peso molecular a partir de la lignina y su uso como biosensor en el monitoreo de la oxidación de fármacos entre otros. (Díaz 2008).

Esta enzima se encuentra presente en plantas superiores tales como *Rhus vernifera*, *Rhus sucedánea*, *Lactarius piperatus* y *Prunus pérsica*, en cultivos de tejidos vegetales de *Acer pseudoplatanus* y en el xilema del pino *Pinus tadea*. (Sato y col. 2001). También en la familia de los hongos tales como *Polyporus versicolor*, *Pholiota*, *Podospora anserina*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans* y *A. oryzea*, en *Coprinus cinereus*, y en hongos de pudrición blanca como *Trametes versicolor*. (Gardiol y col. 1998)

La lacasa es una polifenol oxidasa que tiene una amplia variedad de sustratos. La enzima ataca polifenoles, fenoles o- y p- metoxi sustituidos, difenoles, hidroquinonas, catecol, guayacol, 2,6-dimetoxifenol (DMP), diaminas, aminofenoles como la p-fenilendiamina y ácido ascórbico, compuestos sintéticos como la 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído de azina o siringaldazina, el ácido 2'2-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-6-sulfónico] (ABTS), sustratos específicos de esta enzima; así como la oxidación de varios compuestos con sustituyentes orgánicos diversos. (Mayer 2002).

El sitio catalítico en las enzimas lacasas de muchos hongos parece conservado, aunque comparativamente el resto de la molécula muestra una variabilidad muy amplia tanto en el resto de la cadena como en las cadenas glucosídicas que las acompañan. Sin embargo la estructura secundaria que presentan las lacasas son predominantemente β .(Toledo 2013).

Por lo anterior la enzima lacasa es una de las más estudiadas, desde el punto de vista evolutivo, porque tiene una actividad ligada a tres diferentes sitios de cobre que poseen diferentes estados de oxidación.

3.- GENERALIDADES

3.1.- PROTEÍNAS

3.1.1 Composición

Las proteínas son las biomoléculas más abundantes de la naturaleza. Estas son polímeros lineales contruidos a partir de monómeros llamados aminoácidos. Se encuentran en todas las partes de la célula y son fundamentales en todos los aspectos de la estructura y función celular. (Berg 2008).

3.1.2 Aminoácidos

Estructura de los aminoácidos

Los aminoácidos son moléculas conformadas por un carbono central tetraédrico llamado carbono α unido a un grupo amino, un ácido carboxílico, un átomo de hidrógeno y un grupo R característico. En la figura 1 se muestra la estructura general de los aminoácidos

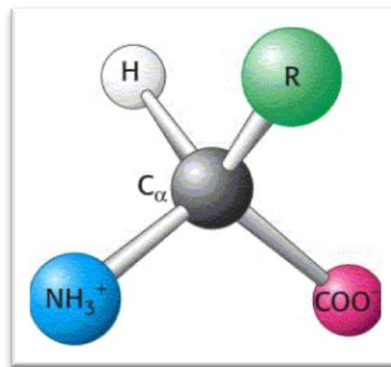


Fig 1. Fórmula estructural general de los aminoácidos

Los aminoácidos se diferencian entre sí en la estructura de sus grupos R, llamadas cadenas laterales. Estas son grupos funcionales que incluyen alcoholes, tioles, tioésteres, ácidos carboxílicos, carboxiamidas y una serie de grupos más básicos.

La mayoría de estos grupos son químicamente activos. Esta diversidad de grupos funcionales, combinada en distintas secuencias, es la responsable del amplio espectro de funciones de las proteínas. (Müller 2008)

Propiedades ácido-básicas de los aminoácidos

La mayor parte de la bioquímica se produce en el margen fisiológico próximo a la neutralidad.

Algunos aminoácidos en disolución a pH neutro, existen predominantemente como iones dipolares, también llamados zwitteriones.

El pKa de los grupos carboxilo y amino de los aminoácidos es aproximadamente 2 y 10 respectivamente, por consiguiente a un pH neutro el grupo carboxilato se encuentra desprotonado ($-\text{COO}^-$) y el grupo amino está protonado ($-\text{NH}_3^+$). (Mathews 2002)

Con esto podemos ver que los aminoácidos son anfotéricos, es decir, que cuando se disuelve en agua el ión híbrido cristalizado puede actuar como ácido (donador de protones) o como base (aceptor de protones). (Lehninger 1995).

En una disolución ácida, por ejemplo pH 1, el grupo amino está protonado ($-\text{NH}_3^+$) y el grupo carboxilo no está disociado ($-\text{COOH}$). Cuando se eleva el pH, el grupo carboxilo es el primero en perder un protón, ya que su pKa es cercano a 2. Esta forma bipolar persiste hasta que el pH se acerca a 9 cuando el grupo amino protonado pierde un protón. Esto se puede observar en la figura 2. (Berg 2008).

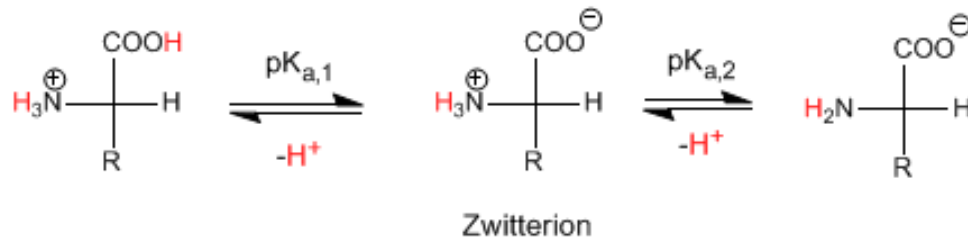
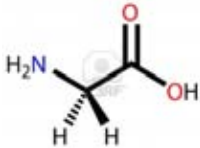

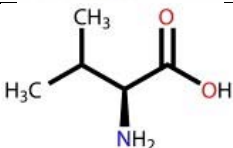


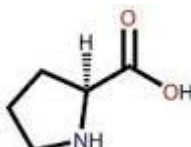
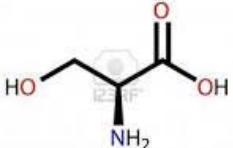

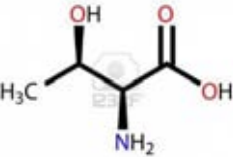
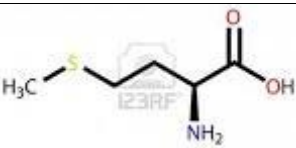
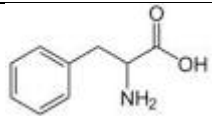
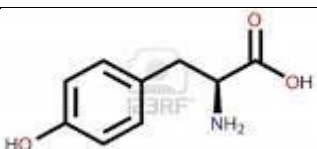





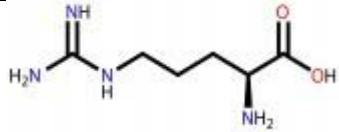
Fig.2 Imagen de la formación de un zwitterion

Clasificación de los aminoácidos y propiedades de las cadenas laterales

En la tabla 1 se enlista la clasificación, estructura y propiedades de los diferentes aminoácidos.

CLASIFICACIÓN	PROPIEDADES	AMINOÁCIDOS	ESTRUCTURA	CARACTERÍSTICAS ESPECIALES
Aminoácidos con cadenas laterales alifáticas	<p>Sus grupos R o cadenas laterales alifáticas son alcanos. Son no polares.</p> <p>Presentan carácter hidrófobo.</p> <p>A mayor tamaño de la cadena alifática, mayor es el grado de hidrofobia.</p> <p>Regularmente se encuentran en el interior de las proteínas para protegerse del agua.</p>	Glicina		Es el aminoácido más pequeño. Es el único aminoácido aquiral.
		Alanina		Es el menos hidrófobo de este grupo.
		Valina		Contiene unas de las cadenas laterales más largas, por lo que es uno de los más hidrófobos.
		Leucina		Contiene unas de las cadenas laterales más largas, por lo que es uno de los más hidrófobos.
		Isoleucina		Contiene unas de las cadenas laterales más largas, por lo que es uno de los más hidrófobos. Contiene un centro quiral adicional.
		Prolina		Es un aminoácido cíclico. Su anillo representa rigidez en comparación con otros aminoácidos. Suele dificultar el

				plegado de los residuos de prolina en estructuras proteicas.
Aminoácidos polares sin carga	<p>Son aminoácidos débilmente polares.</p> <p>Son menos hidrófobos que los alifáticos.</p> <p>Sus cadenas laterales contienen grupos hidroxilo o azufre.</p>	Serina		Aminoácido polar sin carga que contiene un grupo OH.
		Cisteína		Este aminoácido contiene un grupo sulfhidrilo o grupo tiol (-SH) el cual es muy reactivo y favorece la formación de puentes disulfuro.
		Treonina		Aminoácido polar sin carga que contiene un grupo OH. Contiene un centro quiral adicional.
		Metionina		Es bastante hidrófobo. Contienen azufre.
Aminoácidos aromáticos	Presentan cadenas laterales aromáticas.	Fenilalanina		Es al más hidrófobo de los aromáticos. Contiene un anillo fenólico.
		Tirosina		Es ligeramente hidrófobo. Tiene un OH en su

	Absorben luz con fuerza en la región del espectro ultravioleta cercano.			anillo aromático lo que lo hace muy reactivo.
		Triptófano		Es ligeramente hidrófobo. Tiene un grupo indol unido a un grupo metileno.
Aminoácidos básicos	<p>Contienen grupos básicos en sus cadenas laterales.</p> <p>Son muy polares.</p> <p>Son muy hidrofílicos.</p> <p>Suelen hallarse normalmente en las superficies exteriores de las proteínas.</p>	Histidina		Es el menos básico. Tiene un anillo de imidazol. Es muy importante en la catálisis enzimática debido a que puede intercambiar protones de su cadena lateral. A menudo se encuentra en centros activos enzimáticos.
		Lisina		Es un aminoácido muy básico. Sus cadenas laterales están siempre cargadas positivamente. Contiene un grupo amino primario.
		Arginina		Es un aminoácido muy básico. Sus cadenas laterales están siempre cargadas



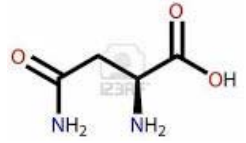
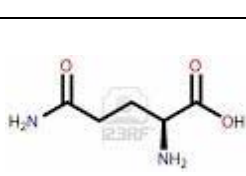
				positivamente. Contiene un grupo guanidino.
Aminoácidos Ácidos	Únicos aminoácidos que se encuentran cargados negativamente a pH fisiológico.	Ácido aspártico		Contiene un segundo grupo carboxilo.
		Ácido glutámico		Contiene un segundo grupo carboxilo.
Aminoácidos con amidas	Son derivados sin carga de los ácidos. Contienen un grupo terminal carboxilamida en vez de un ácido carboxílico. Son hidrófilos. Son polares. Regularmente se encuentran en la superficie de las proteínas.	Asparagina		Cadena lateral sin carga. Contiene un grupo metileno.
		Glutamina		Cadena lateral sin carga. Contiene un grupo metileno.

Tabla 1. Clasificación, estructura y propiedades de los aminoácidos

3.1.3 Enlace peptídico

Los aminoácidos pueden unirse entre ellos de forma covalente por la formación de un enlace amida. Este enlace se da mediante una reacción de condensación donde el grupo carboxilo de un aminoácido se une al grupo amino de un segundo aminoácido acompañado por la pérdida de una molécula de agua. En la figura 3 se muestra la imagen de la formación del enlace peptídico. (Müller 2008).

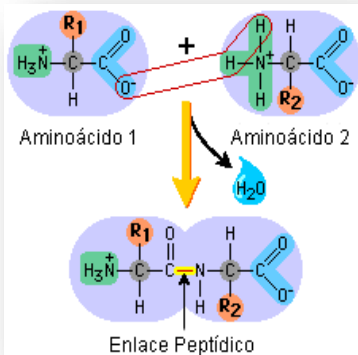


Fig.3 Formación del enlace peptídico

Los productos que se forman a partir de esta unión se llaman péptidos. Dos aminoácidos unidos forman un dipéptido; el grupo carboxilo libre del dipéptido puede hacer otro enlace peptídico con el grupo amino de un tercer aminoácido. Este proceso de condensación se repite durante la biosíntesis de las proteínas hasta cientos y miles de veces.

Una serie de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos forman una cadena polipeptídica y cada unidad aminoacídica de un polipéptido se denomina residuo, ya que cada vez que un aminoácido se une a la cadena se pierde una molécula de agua y queda unido el resto del aminoácido. (Mathews 2002)

Los péptidos cortos de hasta diez residuos se denominan oligopéptidos y los más largos polipéptidos. Todas las proteínas son polipéptidos.

Una cadena polipeptídica presenta polaridad, ya que sus extremos son diferentes; en el extremo izquierdo se tiene al grupo amino el cual puede tener carga positiva y en el otro al grupo carboxilo que puede tener carga negativa. Por convención el extremo aminoterminal se le considera el inicio de la cadena polipeptídica o primer aminoácido. Así la secuencia de la cadena se escribe comenzando por este residuo y termina con el aminoácido donde se encuentra el grupo carboxiloterminal. (Mathews 2002)

El equilibrio de esta reacción está más desplazado hacia la hidrólisis que hacia la síntesis. Por ello la biosíntesis de los enlaces peptídicos requiere un aporte de energía libre.

α -hélice

La α -hélice es una estructura en forma de cilindro que se genera por la torsión uniforme de la cadena polipéptica. El esqueleto helicoidal forma la parte interior de un cilindro mientras que las cadenas laterales se extienden hacia fuera de la distribución helicoidal, se disponen como espinas hacia el exterior.

La α -hélice se estabiliza por puentes de hidrógeno entre los grupos NH y CO de la cadena principal. Los aminoácidos cercanos al final no participan en estos enlaces. En la figura 5 se muestra la formación de la estructura α -hélice. (Müller 2008).

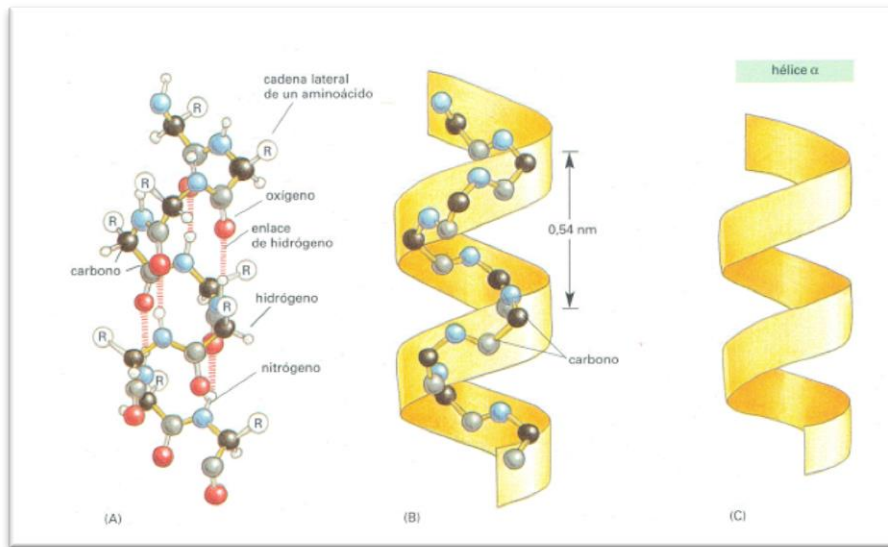


Fig. 5 Estructura secundaria de las proteínas. Formación de α -hélice.

El sentido de giro de una hélice puede ser dextrógiro (en sentido de las agujas del reloj) o levógiro (contrario a las agujas del reloj) ambas conformaciones están permitidas. Las hélices dextrógiras son las más favorables energéticamente debido a que hay menos choques estéricos entre las cadenas laterales y el esqueleto. Prácticamente todas las α -hélices que se encuentran en las proteínas son dextrógiras; solo en algunas proteínas como el colágeno podemos encontrar hélices levógiras. (Berg 2008, Müller 2008).

La mayoría de los aminoácidos pueden colocar sin problema su cadena lateral en una estructura α -helicoidal. Una excepción importante a esta regla es la prolina, cuya estructura está integrada por un anillo de cinco átomos de carbono. Si se incorpora un resto de prolina a una cadena polipéptica se origina un grupo amino terciario, ya que no posee ningún átomo de hidrógeno y por lo tanto, no puede formar ningún puente de hidrógeno con un grupo CO. La prolina a menudo actúa como un aminoácido que interrumpe la formación de la α -hélice.

Lámina plegada β

La lámina plegada β o simplemente hoja β es otro elemento de estructura secundaria importante. A diferencia de la α -hélice, en la hoja β no interaccionan segmentos continuos de una única cadena polipeptídica, sino diferentes combinaciones de secciones que no necesariamente van seguidas una después de la otra y que pertenecen a una o más cadenas polipeptídicas.

Las láminas plegadas β se forman uniendo dos o más hebras β , mediante puentes de hidrógeno entre el CO y NH de cadenas vecinas. Las hebras β están casi completamente extendidas en vez de estar enrolladas y empaquetadas como en la α -hélice. En la figura 6 se muestra la formación la lámina plegada β . (Mathews 2002)

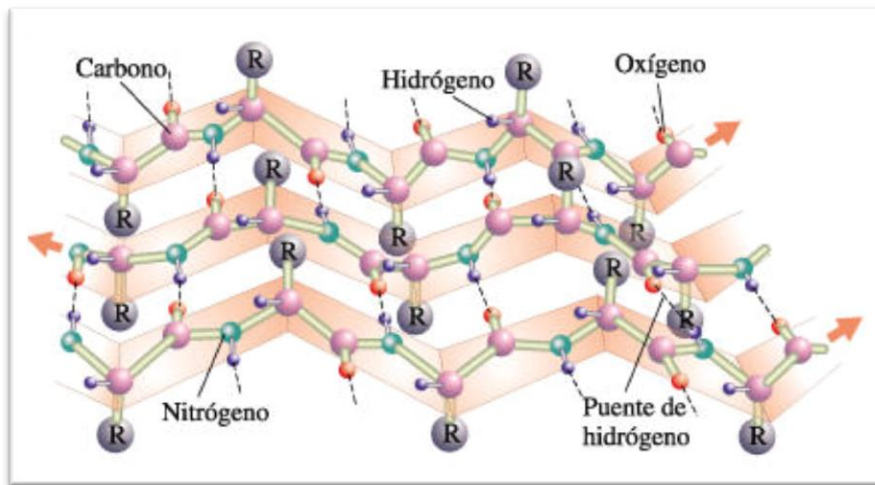


Fig.6 Estructura secundaria. Hoja plegada β

Las dos cadenas que interaccionan en las hojas β pueden ser paralelas (en el mismo sentido) o antiparalelas (en sentidos opuestos).

Las cadenas se pliegan en forma de acordeón y las cadenas laterales se van situando de forma alterna por encima y por debajo del nivel de la lámina plegada.

En el ordenamiento antiparalelo los grupos NH y CO de cada aminoácido están unidos respectivamente a un grupo CO y NH situados en la cadena adyacente. En cambio en el ordenamiento paralelo en cada aminoácido el grupo NH forma puentes de hidrógeno con el grupo CO de un aminoácido de la cadena adyacente, mientras que el grupo CO forma puentes de hidrógeno con el grupo NH del aminoácido situado dos residuos más lejano de la cadena.

Normalmente pueden unirse cuatro, cinco, diez o más cadenas en una hoja β y estas pueden ser estrictamente paralelas, antiparalelas o mixtas.

Se cree que aminoácidos tales como isoleucina, valina, treonina, fenilalanina y tirosina favorecen la formación de estructuras de láminas plegadas β , mientras que la prolina es raro encontrarla.

Giros β

El giro β es el tercer elemento de la estructura secundaria. Esta estructura conecta normalmente dos segmentos de cadena mediante una curva en horquilla. Este giro se estabiliza por la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo CO de un aminoácido y el NH del tercer aminoácido. Las variantes más frecuentes del giro β son los llamados tipo I y tipo II, cada uno contiene cuatro restos de aminoácidos. (Mathews 2002)

Generalmente los giros β se encuentran en la superficie de las proteínas donde posibilitan que la cadena polipeptídica invierta la dirección en forma abrupta. Cada uno de ellos puede lograr una inversión completa de la dirección de la cadena polipeptídica en solo cuatro residuos.

La glicina y la prolina son los dos aminoácidos más abundantes en este elemento de la estructura secundaria.

En estos giros se dan con frecuencia las modificaciones proteicas covalentes como la fosforilación o glucosilación. (Müller 2008).

Bucles Ω

Los bucles Ω no tienen estructuras periódicas regulares, sin embargo las estructuras en bucle son a menudo rígidas y bien definidas.

Los bucles también se encuentran invariablemente en la superficie de las proteínas y por ello participan en interacciones entre las proteínas y otras moléculas. (Müller 2008).

Estructura terciaria

La forma global de la cadena polipeptídica de una proteína se conoce como su estructura terciaria.

Existen varias fuerzas que unen los elementos de la estructura secundaria para formar la estructura terciaria: primero tenemos a las interacciones no covalentes como enlaces iónicos, fuerzas de Vander Waals y puentes de hidrógeno. Sin embargo, existen otro aspecto importante para la formación de la estructura proteica: el efecto hidrofóbico. (Mathews 2002)

El principio del efecto hidrofóbico dice que se puede minimizar la pérdida de entropía del entorno acuoso mediante la agregación máxima de grupos hidrofóbicos en la proteína.

En un entorno acuoso, el plegamiento proteico está dirigido por la fuerte tendencia de los residuos hidrofóbicos a ser excluidos del agua (un sistema es más estable termodinámicamente cuando los grupos hidrofóbicos están agrupados en vez de estar expuestos al entorno acuoso). Es decir que el interior de la proteína consta casi completamente de residuos no polares como la leucina, valina, metionina, fenilalanina, etc.

Así en el interior de proteína, las cadenas no polares están densamente amontonadas y prácticamente libres de agua. (Müller 2008).

Los residuos cargados como el aspartato, glutamato, lisina, etc. que tienen cadenas laterales polares se encuentran predominantemente en la superficie de la proteína en contacto con el medio acuoso.

A menudo el efecto hidrofóbico contribuye más a la estabilidad de una estructura proteica que a la suma de las interacciones.

En la figura 7 se muestra la imagen de una proteína con estructura secundaria y terciaria .

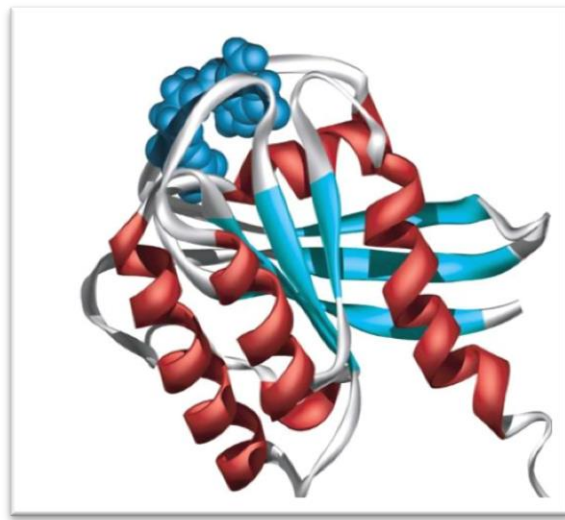


Fig.7 Estructura terciaria de las proteínas

Dominios

Hay cadenas polipeptídicas que se pliegan en dos o más regiones compactas por un segmento flexible de la cadena polipeptídica como perlas en un collar. Estas unidades globulares compactas se llaman dominios y tienen un tamaño entre 30 y 400 residuos de aminoácidos. (Berg 2008).

Estructura cuaternaria

Existen proteínas con más de una cadena polipeptídica. Tales proteínas contienen un cuarto nivel de organización estructural. Cada cadena polipeptídica en estas proteínas se conoce como subunidad. (Berg 2008).

La estructura cuaternaria se refiere al ordenamiento espacial de las subunidades y a la naturaleza de sus interacciones. La forma más simple de este nivel de organización es un

dímero, el cual consta de dos subunidades idénticas, o lo que sería un complejo homomérico. También son comunes encontrar proteínas con más de un tipo de subunidades conocidos como heteroméricos. Por ejemplo: la hemoglobina, esta proteína contiene dos subunidades de un tipo llamadas α y dos subunidades de otro tipo conocidas como β , de esta manera la molécula de la hemoglobina es un tetrámero $\alpha_2\beta_2$. (Müller 2008). Ver figura 8.

En la estructura cuaternaria actúan las mismas interacciones covalentes que en la estructura terciaria, además pueden encontrarse entre las subunidades puentes disulfuro que aseguran de forma covalente la estructura cuaternaria. (Berg 2008).

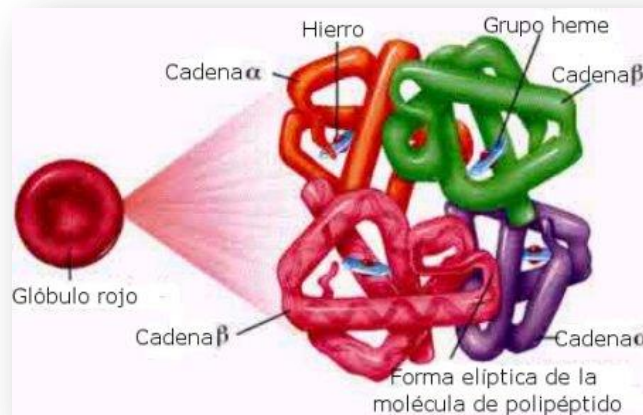


Fig. 8 Estructura cuaternaria de las proteínas.
Imagen de la hemoglobina la cual contienen cuatro dominios.

3.1.5 Plegamiento de las cadenas polipeptídicas

Una vez que la cadena de aminoácidos es sintetizada esta inicia su proceso de plegamiento para lo que generalmente requieren de un segundo.

La cadena polipeptídica primero inicia con el plegamiento jerárquico, es decir con la formación local espontánea de estructuras secundarias. Si estas son estables, o sea favorables desde el punto de vista energético, estas pueden formar estructuras supersecundarias más extensas como motivos $\beta\alpha\beta$. Después la cadena forma núcleos de plegamiento alrededor de los cuales se construye la estructura proteica posterior. El proceso sigue de este modo la formación de dominios individuales hasta el plegamiento final del polipéptido. (Müller 2008)

La información necesaria para especificar la estructura catalíticamente activa está contenida en su secuencia de aminoácidos: la secuencia especifica la conformación.

La dependencia de la conformación con respecto a la secuencia es especialmente significativa debido a la conexión íntima entre la conformación y la función.

3.1.6 Desnaturalización

La desnaturalización de una proteína se conoce como la ruptura de la estructura espacial ordenada de la proteína nativa, donde la estructura proteica presenta un estado desordenado. Existen varios factores que desnaturalizan una proteína: el calor, el pH o desnaturalizantes químicos como la urea o el cloruro de guanidino. La urea es un caótropro corriente, es decir un componente que aumenta la solubilidad de los grupos hidrofóbicos en agua y favorece así el desplegamiento de las proteínas globulares. (Berg 2008).

Agentes como la urea y el cloruro de guanidino rompen eficazmente los enlaces no covalentes. Los puentes disulfuro necesitan un agente reductor como el β -mercaptoetanol este reactivo rompe reversiblemente estos enlaces haciendo que los disulfuros (cistinas) se conviertan completamente en sulfhidrilos (cisteínas).

Cuando se libera a la proteína de estas sustancias, la mayoría de las proteínas se repliegan espontáneamente en su forma activa. Con esto se demuestra que la información necesaria para especificar la estructura catalíticamente activa está contenida en su secuencia de aminoácidos. Sin embargo el desplegamiento reversible no funciona en todas las proteínas, para muchas es prácticamente irreversible. (Müller 2008). Ver figura 9.

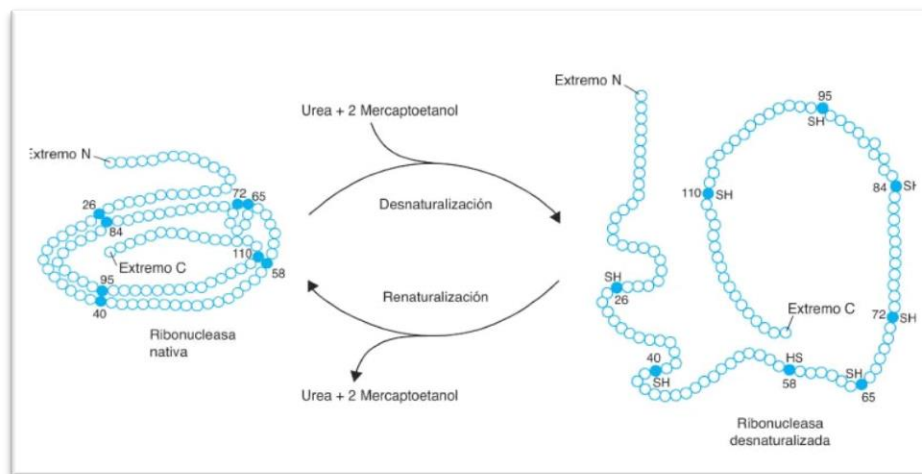


Fig. 9. Desnaturalización y renaturalización de la ribonucleasa.

3.1.7 Funciones de las proteínas

La gran heterogeneidad estructural de las proteínas les permite cumplir múltiples funciones en el ser vivo.

La gran mayoría de las reacciones metabólicas tienen lugar gracias a la presencia de un catalizador de naturaleza proteica específico para cada reacción. Estos biocatalizadores de naturaleza proteica reciben el nombre de **enzimas**. La gran mayoría de las proteínas presentan actividad enzimática. (Berg 2008).

Las estructuras encargadas del **reconocimiento de señales** químicas de cualquier tipo son proteínas. Así, los receptores hormonales y los receptores de neurotransmisores son estructuras proteicas, que por lo general, interactúan con sus ligandos por complementariedad entre sus estructuras. Muchos de estos ligandos (hormonas y neurotransmisores) son, a su vez, de naturaleza proteica. (Mathews 2002).

En los seres vivos son esenciales los **fenómenos de transporte**, bien para llevar una molécula hidrofóbica a través de un medio acuoso (transporte de oxígeno o lípidos a través de la sangre) o bien para transportar moléculas polares a través de barreras hidrofóbicas (transporte a través de la membrana plasmática). Los transportadores biológicos son siempre proteínas.

Hay proteínas cuya principal función es **estructural**. Las células poseen un citoesqueleto de naturaleza proteica que constituye un armazón alrededor del cual se organizan todos sus componentes, y que dirige fenómenos tan importantes como el transporte intracelular o la división celular. En los tejidos de sostén (conjuntivo, óseo, cartilaginoso) de los vertebrados, las fibras de colágeno son las encargadas de conferir resistencia mecánica tanto a la tracción como a la compresión. (Mathews 2002).

La propiedad fundamental de los **mecanismos de defensa** es la de discriminar lo propio de lo extraño. Así, tanto en los sistemas de restricción bacteriana como en las defensas de los vertebrados superiores (sistema inmunitario), las proteínas juegan un papel fundamental. En bacterias, las llamadas endonucleasas de restricción se encargan de identificar y destruir moléculas de ADN que no identifica como propias, y en los vertebrados superiores, las inmunoglobulinas reconocen moléculas extrañas y se unen a ellas para facilitar su destrucción por las células del sistema inmunitario. (Berg 2008).

Todas las funciones de **motilidad** de los seres vivos están relacionadas con las proteínas. Así, la contracción del músculo resulta de la interacción entre dos proteínas, la actina y la miosina. El movimiento de la célula mediante cilios y flagelos está relacionado con las proteínas que forman los microtúbulos.

Los fenómenos de **transducción** (cambio en la naturaleza fisico-química de señales) están mediados por proteínas. Así, la rodopsina de la retina convierte un fotón luminoso (una señal física) en un impulso nervioso (una señal eléctrica), y un receptor hormonal convierte una señal química (una hormona) en una serie de modificaciones en el estado funcional de la célula. (Mathews 2002).

3.1.8 Métodos de separación de proteínas

Para poder separar proteínas y otras biomoléculas se aprovechan las diferencias que existen entre ellas, tales diferencias pueden ser solubilidad, carga iónica, polaridad, tamaño, masa o afinidad por otras biomoléculas.

A continuación se describen brevemente algunos métodos de separación:

Solubilidad

La multiplicidad de los grupos ácidos y básicos de una proteína hace que su solubilidad dependa de las concentraciones de las sales disueltas, la polaridad del solvente, el pH y la temperatura. Las distintas proteínas varían en gran medida en sus solubilidades en un conjunto dado de condiciones. Algunas proteínas precipitan en condiciones en que otras aún están bastantes solubles. Este efecto suele utilizarse como base para la purificación proteica. (Müller 2008).

Efectos de la concentración salina

La solubilidad de una proteína en solución acuosa es sensible a las concentraciones de sales disueltas. En un medio poco salino, la solubilidad de las proteínas aumenta al incrementar la concentración de sales. Este efecto se conoce como “salting in” o solubilización por salado y se explica mediante la teoría de Debye-Hückel. Según se añaden sales al medio (o lo que es lo mismo, según aumentamos la fuerza iónica del medio), los iones en que éstas se disocian rodean a las proteínas, interaccionando con sus grupos ionizables, evitando así que se establezcan interacciones atractivas entre las cadenas laterales o extremos cargados de las proteínas; es decir, se dificulta la aglomeración de las proteínas y por tanto su precipitación. En estas condiciones, la solubilidad aumenta al incrementarse la fuerza iónica del medio. (Lehninger 1995).

En cambio, en un medio con altas concentraciones de sal, la repulsión entre cargas del mismo signo se reduce y las proteínas se solvatan menos al ir aumentando la concentración de sal. Es decir, que al solubilizar la sal, sus iones se rodean de moléculas de agua, limitando las moléculas de agua disponibles para solubilizar las proteínas. Así, al potenciarse las interacciones proteína-proteína frente a las interacciones proteína-disolvente, las proteínas precipitarán según aumente la fuerza iónica del medio (disminuye su solubilidad). A este efecto se le denomina salting out o insolubilización por salado. (Lehninger 1995).

Efectos del uso de solventes orgánicos

El agua se caracteriza por su alta constante dieléctrica, lo cual significa que los iones en solución acuosa presentan interacciones más débiles que con otros medios. La adición de un solvente orgánico (etanol o acetona) produce agregados de moléculas proteicas que tienden a precipitar, esto se debe a que el solvente presenta una constante dieléctrica menor

que la del agua, lo cual produce un incremento en las fuerzas de atracción entre cargas opuestas y una disminución en el grado de ionización de los radicales de las proteínas, y en consecuencia una disminución en la solubilidad de esta. Los solventes más utilizados son el alcohol isopropílico, el butanol, el etanol y acetona. (Lehninger 1995).

Cromatografía

Los métodos cromatográficos se refieren al paso de una solución (fase móvil) a través de un medio (fase estacionaria) que presentan una adsorción selectiva para distintos componentes solutos. La rapidez con la que pasa cada componente de la fase móvil depende de manera inversa de la fuerza con la que interactúan con la fase estacionaria. De manera general, se puede decir que para llevar a cabo una cromatografía en columna, esta es empacada con un material que pueda adsorber las moléculas de modo selectivo debido a alguna diferencia de su estructura química. Inicialmente se humedece la columna con la solución amortiguadora adecuada; posteriormente se coloca la muestra de las moléculas que se desea separar en la parte superior de la columna y se hace pasar lentamente a lo largo de la columna una solución problema. Se toman fracciones utilizando un colector automático de fracciones, mientras continúa este proceso de elución (paso a través de la columna). Algunas moléculas solo se adsorben débilmente o no se adsorben en absoluto, y son las primeras que eluyen. Las que adsorben con más intensidad son las últimas en eluir. (Mathews 2002).

Existen diferentes tipos de cromatografía en columna, los cuales se describirán brevemente a continuación.

Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico se utiliza para separar moléculas de acuerdo con su carga eléctrica. Depende básicamente de las propiedades ácido-base de la proteína, las cuales están determinadas por el número y el tipo de los grupos R ionizables de las cadenas laterales. Cada proteína difiere y tiene propiedades ácido-base características.

El punto isoeléctrico (pI) de una proteína es aquel en el que la carga neta de la proteína es cero, por lo cual es incapaz de migrar en un campo eléctrico. Si la proteína se encuentra en una solución con un pH por encima de su pI, esta se carga negativamente y migra hacia el ánodo. Si la solución en la que se encuentra la proteína tiene un pH por debajo del pI, la proteína se carga positivamente y esta se desplazará hacia el cátodo.

Para llevar a cabo la cromatografía de intercambio iónico se emplean columnas empacadas con resinas de intercambio iónico, que son polianiones o policationes. Si se utiliza una columna con resina aniónica, esta lleva grupos cargados negativamente; al introducir una mezcla de moléculas cargadas positiva y negativamente, las moléculas cargadas negativamente pasarán a través de la columna sin adsorberse y se encontrarán en las fracciones iniciales; las moléculas con carga positiva será ligada por la fase estacionaria. Después se hace pasar una solución salina con un gradiente de concentración el cual tiende

a romper las interacciones electrostáticas entre la molécula y la fase estacionaria. A medida que aumenta la concentración salina, los iones de Na^+ pueden competir cada vez mejor por los lugares negativos en la resina, con ello las moléculas cargadas positivamente empiezan a eluir a través de la columna colectándolas en las siguientes fracciones. (Lehninger 1995). Ver figura 10.

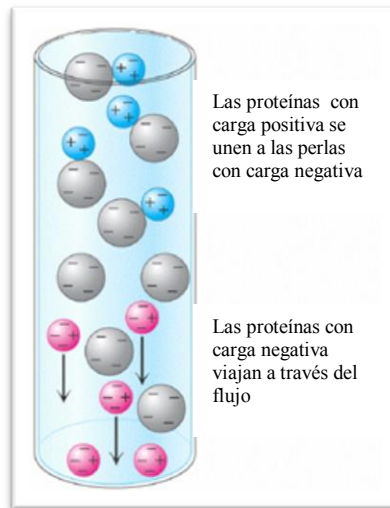


Fig.10 Esquema de cromatografía de intercambio iónico.

Cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad es una clase de cromatografía más específica, ideal para aislar una o unas pocas proteínas de una mezcla compleja. Muchas proteínas presentan interacciones bastantes fuertes con otras moléculas. Las moléculas adecuadas, acopladas de modo covalente a una matriz inerte actuarán como “anzuelos” moleculares para captar la proteína deseada. Todas las proteínas restantes simplemente pasarán a través de la columna. Las moléculas proteicas capturadas pueden liberarse posteriormente eluyendo la columna con una solución amortiguadora que contenga copias libres de las moléculas “anuelo”, o algún otro reactivo que pueda romper la interacción. (Lehninger 1995).

Cromatografía de filtración en gel

La filtración en gel también llamada cromatografía de exclusión molecular es un tipo de cromatografía en que la base de la separación es el tamaño molecular en lugar de las propiedades químicas. A menudo constituye un método adecuado para separar las macromoléculas de tamaño diferente o para eliminar los contaminantes de peso molecular bajo de las disoluciones de moléculas grandes.

Para llevar a cabo esta técnica se llena una columna con esferas de un gel poroso, normalmente un polisacárido entrecruzado. Se elige la porosidad del gel de modo que las moléculas más pequeñas de la mezcla puedan penetrar en las esferas mientras que las mayores no puedan hacerlo. La muestra es aplicada en la parte superior de la columna y se eluye con un amortiguador. A medida que la muestra desciende por la columna, las

moléculas más grandes se mueven más rápidamente, ya que no pueden entrar en las esferas de gel y solo pueden fluir por los intersticios que hay entre ellas. Las moléculas pequeñas pueden entrar en las moléculas de gel y en consecuencia se rezagan. Si se recogen las fracciones cuando se pasa la disolución amortiguadora a través de la columna, las primeras fracciones contendrán las moléculas más grandes. Si se elige adecuadamente la porosidad de las esferas, pueden separarse mezclas de distintos tipos de tamaños. (Mathews 2009).

Diálisis y Ultraconcentración

Existen membranas semipermeables con poros suficientemente grandes para permitir que las moléculas pequeñas pasen libremente pero que sean una barrera para las proteínas y otras macromoléculas. Este tipo de membranas se utilizan para la purificación y concentración de biopolímeros. (Lehninger 1995).

La diálisis se utiliza habitualmente para eliminar las pequeñas moléculas contaminantes o para cambiar las condiciones de una disolución amortiguadora. Para realizar esta técnica puede realizarse de dos maneras:

1.- Se coloca una solución de una proteína en una bolsa cerrada fabricada con una membrana de cierto tamaño de poro la cual es sumergida en un volumen mucho mayor de una solución amortiguadora. Tras varias horas los contaminantes de peso molecular bajo salen fuera de la bolsa y el entorno original de las moléculas proteicas se reemplaza por la disolución amortiguadora exterior.

2.- Se introduce la solución de la proteína en un sistema de ultraconcentración en el que previamente se coloca una membrana con cierto tamaño de poro en la parte inferior de dicho sistema y posteriormente aplica presión para hacer salir el solvente y las moléculas pequeñas a través de la membrana; cada vez que el volumen es mínimo se adiciona solución amortiguadora para cambiar las condiciones de la solución inicial. Este sistema sirve también para concentrar la solución deseada. (Mathews 2009). Ver fig. 11.



Fig. 11. Sistema de ultraconcentración Amicón.
En él se coloca una membrana de cierto tamaño de poro, se introduce la muestra y se aplica presión para desplazar el líquido.

3.1.9 Métodos de cuantificación de proteínas

Método de Biuret

Se basa en la formación de un complejo coloreado entre el Cu^{2+} y los grupos NH de los enlaces peptídicos en medio básico. Un Cu^{2+} se acompleja con cuatro NH. La intensidad de coloración es directamente proporcional a la cantidad de proteínas (enlaces peptídicos) y la reacción es bastante específica, de manera que pocas sustancias interfieren. La sensibilidad del método es muy baja y sólo se recomienda para la cuantificación de proteínas en preparados muy concentrados (por ejemplo en suero).

Método de Bradford

Se basa en la unión de un colorante, Coomassie Blue G-250 (también Serva Blue) a las proteínas. El colorante, en solución ácida, existe en dos formas una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Este método es sensible (desde 1 μg), simple, rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación. Entre las sustancias que interfieren están los detergentes y las soluciones básicas.

Método de ABC

El ácido bicincoanínico, sal sódica, es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con inones Cu^{1+} en medio alcalino. Este reactivo forma la base de un método analítico capaz de monitorizar el ión cuproso producido en una reacción entre las proteínas con Cu^{2+} en medio alcalino (reacción de Biuret). La estabilidad del reactivo y el cromóforo proporciona un método para la cuantificación de proteínas que es sencillo, rápido, muy sensible, y que muestra una gran tolerancia a compuestos que afectan a otros métodos.

3.2 HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA.

Hongos de pudrición blanca es el nombre que se le da a un grupo de basidiomicetos por su capacidad de mineralización de la lignina y sus derivados, que dan a la madera un aspecto blanquecino. (Pointing, 2001). Estos hongos realizan una función natural y esencial que es la conversión de la lignina a CO_2 y agua. La lignina es un polímero polifenólico heterogéneo que es sintetizado a partir de tres alcoholes precursores: alcohol coniferílico, alcohol sinapílico y alcohol p-cumarílico. (Dávila y Vázquez-Duhalt 2006).

La lignina junto con la celulosa y la hemicelulosa, son los tres polímeros más importantes que componen el tejido de la madera, siendo la lignina la más difícil de degradar por su composición química y el que da protección a los otros dos polímeros, además comprende del 20 al 30% del contenido total de la madera. La degradación de la lignina por los hongos de podredumbre blanca involucra la participación de una gran variedad de enzimas, las cuales pueden ser de tres tipos: lignino peroxidasas (LiP), manganeso peroxidasas (MnP) y lacasas (Lac). Las dos primeras dependientes de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y la última

utiliza O₂ como aceptor final de electrones. El patrón de actividad de estas enzimas es específico para cada género y especie de hongo, algunos excretan LiP, MnP y no Lac ó MnP, Lac y no LiP. Este complejo enzimático inespecífico tiene potencial en la eliminación de xenobióticos con estructura química similar a la lignina, tales como compuestos aromáticos, nitroaromáticos, policíclicos aromáticos, herbicidas, pesticidas, detergentes clorofenoles y colorantes. (Leonowicz et al. 1999, Pointing 2001).

3.2.1 Características del género *Trametes*

El hongo del género *Trametes* pertenece al orden de los Aphyllophorales superiores, se encuentran dentro de los macromicetes y como todos los de su orden son considerados como hongos parásitos o patogénicos del bosque; crecen atacando a varias especies de árboles. Son imputrescibles, conservando su integridad y algunos de ellos crecen en forma laminar sobre la madera, por lo cual son conocidos como repisas de la madera. En el género *Trametes* frecuentemente su receptáculo es estacionario, la trama espesa y clara y los tubos huecos son de dimensiones considerables, frecuentemente lameloides, separados por tabiques algo espesos. Sus esporas son hialinas, lisas y sin cistides.

3.3 ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

3.3.1 Peroxidasas

La Lignino peroxidasa (LiP) y Manganese peroxidasa (MnP) fueron descubiertas a mediados de los 80's en *Phanerochaete chrysosporium*, se describieron como verdaderas ligninasas, debido a sus altos potenciales redox. LiP degrada unidades de lignina no fenólicas, MnP genera Mn³⁺ el cual actúa como agente oxidante que difunde sobre unidades de lignina fenólicas y no fenólicas. También se describió una peroxidasa versátil (VP) en los géneros *Pleurotus* y *Bjerkandera* (Mester y Field 1998) como un tipo de peroxidasa ligninolítica que combina las propiedades catalíticas de LiP y MnP oxidando compuestos fenólicos (Martínez 2005). Estas enzimas comparten la estructura del grupo prostético férrico protoporfirina IX (grupo hemo) presente en su sitio activo y a pesar de la baja homología en secuencia entre diversas peroxidasas, el plegamiento y la estructura secundaria se encuentran conservadas. La enzima se divide en dos dominios estructurales (proximal y distal) que envuelven el grupo prostético y su estructura está conformada principalmente de 10311 hélices (Dávila y Vazquez-Duhalt 2006). Algunos géneros de hongos que producen estas enzimas son: *Bjerkandera adusata*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes hirsutus*, *Coriolus versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, los cuales se han estudiado para la degradación de xenobióticos como colorantes y pesticidas (Mester y Field et al., 1998).

3.3.2 *Lacasas*

Las lacasas pertenecen al grupo de las multicobre oxidasas, son glicoproteínas con actividad fenoloxidasas llamadas “oxidasas azules”, contienen cuatro átomos de cobre en el centro catalítico. Son secretadas al medio por el micelio del hongo y se caracterizan como enzimas de baja especificidad de sustrato, por lo que oxidan una amplia gama de sustratos naturales e industriales mediante la reducción de átomos de cobre de su sitio activo y la transferencia de electrones con la conversión de O₂ a agua.

Las lacasas tienen otras propiedades que las hacen ser muy atractivas para diversas aplicaciones en biotecnología: a diferencia de las peroxidasas no necesitan la adición o síntesis de un cofactor como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), las lacasas utilizan como su cosustrato al oxígeno, el cual se encuentra presente en el ambiente. Muchas de las lacasas al ser secretadas, hacen que los procesos de purificación sean fáciles debido a que exhiben un considerable nivel de estabilidad en los ambientes extracelulares (Baldrian 2005).

3.4 LAS LACASAS

3.4.1 *Características de las lacasas*

Las lacasas son típicas del grupo de hongos basidiomicetos que causan la pudrición de la madera “Hongos de pudrición blanca”. Así todas las especies de este grupo son productoras de lacasas y algunas de estas enzimas han sido purificadas y caracterizadas.

La enzima lacasa fue encontrada por primera vez en el látex del árbol *Rhus vernicifera* en Japón por Yoshida en 1883; años más tarde la actividad de la lacasa se encontró en hongos, plantas y algunas bacterias (Gianfreda et. al.1999).

Las lacasas son comúnmente monoméricas, aunque existen algunas estructuras multiméricas que se han descrito en algunas especies de ascomicetos como *Podospora anserinay* basidiomicetos como *Agadicus bisporus*, *Trametes villosa* y *Pleurotus ostreatus* (Giardina et al., 2007). Estas enzimas se pueden encontrar en distintos procesos biológicos tales como: la esporulación, la producción de pigmento, la formación rizomorfos y la degradación de la lignina

Las lacasas varían en sus propiedades y estructura molecular, tienen una masa molecular de un rango de 60 a 80 KDa, un punto isoeléctrico en un rango de 3 a 6, el contenido de carbohidratos es generalmente de 15 a 20% de su peso (Thurston 1994), su pH óptimo es del rango de 3 a 6 dependiendo del sustrato y son enzimas estables a temperaturas alrededor de 50-60°C. la secuenciación de los genes de lacasas demuestra que tienen entre 520 y 550 aminoácidos (incluyendo el péptido señal). Varios hongos secretan más de una isoforma de la misma enzima, esto puede deberse a la expresión de genes diferentes pero casi siempre es el resultado de un procesamiento post-traduccional y/o proceso de glicosilación. (Díaz 2008).

3.4.2 Estructura y sitio activo

La lacasa es una cupoproteína que tiene cuatro átomos de cobre por molécula de enzima, que están distribuidos en dos dominios, uno mononuclear y uno trinuclear. Un cobre tipo 1 (CuT1) confiere el color azul a la enzima, lo cual es debido a las uniones covalentes π (angostelli y col 1995) que absorbe a una longitud de onda de 600 nm; un cobre tipo 2 (CuT2) y dos cobres tipo 3 (CuT3) acoplados binuclearmente y son responsables de la absorción de luz a 330 nm (Ducros et al., 1998).

Las moléculas de cobre están coordinadas por residuos de histidina, leucina y cisteína principalmente. El CuT1 está unido a un átomo de azufre perteneciente a un residuo de cisteína, a dos anillos de imidazol de los residuos de histidina y a un azufre del residuo de metionina. El CuT2 está ligado al menos a dos grupos imidazol de los residuos de histidina. Los CuT3 están enlazados a tres nitrógenos de los cuales al menos uno es de un grupo imidazol del residuo de la histidina y a un cuarto ligando que puede ser H₂O ó OH (Garavaglia y col. 2004).

Piontek y col, (2002) cristalizaron una lacasa de *Trametes versicolor* describiendo la estructura de la lacasa como un monómero organizado en tres dominios con una arquitectura tipo Barril- β , los tres dominios están formados por una combinación de hojas- β con α -hélices, unidos por estructuras en forma de loops. El cluster trinuclear de CuT2/CuT3 se encuentra entre los dominios 1 y 3 y el CuT1 se encuentra en el dominio 3 ambos dominios proveen los residuos de aminoácidos (H; L; C) para la coordinación de los cobres. Además la proporción del carboxilo terminal se estabiliza por un puente disulfuro hacia el dominio 1 (Cys-85-Cys-488) y un segundo puente disulfuro (Cys-177-Cys-205) conecta los dominios 1 y 2. En la figura 12 se muestra la imagen de la enzima lacasa donde se muestran los tres diferentes dominios y su estructura predominantemente hoja laminada β .



Fig.12. Estructura terciaria de la enzima lacasa LacIIIb. Dominio 1 en color amarillo, dominio dos en rosa, y dominio 3 en azul. Los átomos de cobre están indicados como pequeñas esferas en azul claro.

3.4.3 Mecanismo de acción

La enzima lacasa cataliza la oxidación de una gran variedad de sustratos con la concomitante reducción de oxígeno molecular a agua. Se cree que este proceso se lleva a cabo en tres pasos: 1) el CuT1 se reduce por el sustrato que se oxida, 2) la transferencia del electrón ganado del CuT1 al grupo trinuclear de los CuT2 y CuT3, y finalmente 3) la reducción de O₂ a agua en el centro trinuclear. Este proceso de tres pasos permite la oxidación de compuestos fenólicos incluyendo polifenoles, monofenoles, aminofenoles y un rango considerable de otros compuestos como hidroxiquinonas, catecol, guayacol, 2,6-dimetoxifenol (DMP), diaminas y ácido ascórbico, y compuestos sintéticos como [N,N'-bis(3,5-dimetoxi-4-hidroxilbenzilideno hidracina] o siringaldazina, el ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotialin-6-sulfónico) o ABTS sustratos específicos de esta enzima, así como la oxidación de varios compuestos con sustituyentes orgánicos diversos.

3.4.4 Aplicaciones de la enzima lacasa en biotecnología

Las lacasas han recibido mucha atención en los últimos años debido a su habilidad para oxidar una amplia variedad de sustratos incluyendo compuestos fenólicos y no fenólicos así como contaminantes ambientales; lo cual hace que estas enzimas sean muy útiles en procesos biotecnológicos. Estos procesos incluyen procesamiento del papel, prevención de la decoloración del vino, detoxificación de contaminantes ambientales, oxidación de tintes y sus precursores, conversión enzimática de intermediarios químicos y producción de químicos a partir de lignina.

Industria alimenticia

Las lacasas pueden ser aplicadas a ciertos procesos que mejoran o modifican la apariencia de alimentos y bebidas. La aplicación de las lacasas en esta área implica la eliminación de compuestos fenólicos responsables del oscurecimiento y la formación de turbidez para producir jugos, cerveza y vinos más claros. (Rodríguez 2006).

Industria del papel

La preparación del papel requiere la separación y degradación de la lignina de la pulpa de la madera que causa el amarillamiento del papel. Esto comúnmente se consigue usando ClO₂ y O₃, pero este proceso genera compuestos organoclorados (altamente cancerígenos) al medio ambiente, razón por la cual se trabaja en sustituir el cloro en estos procesos. En los últimos años se ha introducido a la industria papelera el pretratamiento de la pulpa de la madera con enzimas ligninolíticas, lo cual proporciona estrategias de deslignificación más amigables con el medio ambiente y una celulosa más íntegra. (Kunamneni 2007).

Industria Textil

La industria cuenta con dos terceras partes de los colorantes del mercado, además consume grandes cantidades de agua y químicos en sus procesos textiles. Las sustancias químicas usadas tienen una composición y estructuras químicas muy diversas que van de compuestos inorgánicos a polímeros y productos orgánicos; además muchos colorantes son del tipo azo que son carcinogénicos. (Mayer 2002).

Debido a su estructura química muchos colorantes son resistentes a la degradación por la exposición a la luz, agua o diferentes químicos. Este es un problema de especial importancia en el tratamiento de agua. Una alternativa para la eliminación de estos colorantes sería el uso de reactores de flujo continuo con lacasas inmovilizadas. (Medina 2002).

Combustible etanol

Para mejorar la producción del combustible etanol, a partir de materias primas renovables, la lacasa del hongo de pudrición blanca *Trametes versicolor*, fue expresada bajo el control del promotor PGK1 en *Saccharomyces cerevisiae*, para incrementar la resistencia a inhibidores fenólicos de la proteína heteróloga en hidrolizados de lignocelulosa. (Mayer 2002).

Biorremediación

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos HPA's juntos con otros xenobióticos son la principal fuente de contaminación de suelos, por lo tanto su degradación es de vital importancia para el ambiente. Las propiedades catalíticas de las lacasas pueden ser usadas para degradar dichos compuestos. Estudios han demostrado la capacidad de los hongos de podredumbre blanca en la mineralización de HPA's. Se ha reportado que la aplicación de las lacasas de *Trametes versicolor*, *Coriolopsis gallica* en la degradación de HPA's pueden alcanzar porcentajes de un 60% (Pickard et al., 1999).

3.5 MÉTODOS DE ESTUDIO DE LAS ENZIMAS

3.5.1 Gel de Electroforesis SDS-PAGE

Antecedentes

La electroforesis es un método analítico semipreparativo, en el que se separan biomoléculas, en dependencia de su carga y bajo la acción de un campo eléctrico, fue empleado por primera vez por Tiselius en el año 1937. Raymond y Weintraub en 1959 emplearon como soporte para la electroforesis un gel de poli(acrilamida) (PAGE), posteriormente el método fue perfeccionado por varios investigadores como Davis y Ornstein. La popularidad de este creció rápidamente y se logró un aumento de la

resolución. El dodecil sulfato de sodio (SDS) se introduce en esta técnica en 1970, y ya en 1992 se emplean agentes reductores y SDS en la determinación del peso molecular de proteínas en lo que se denominó electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS). (García, 2000).

Fundamentos

La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos – y +) en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional.

Cabe destacar que a escala analítica, los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas donde aportan un potente criterio de pureza. Esta técnica también es útil para determinar otros parámetros como peso molecular, punto isoelectrico y número de cadenas polipeptídicas de las proteínas. (García, 2000).

La velocidad de migración (v) de la partícula es directamente proporcional al producto de su carga efectiva (q) y el gradiente de potencial eléctrico (E) e inversamente proporcional al coeficiente de fricción (f) relativo al tamaño y forma de la molécula, o sea, a la resistencia que le ofrece el medio.

$$V=qE/f$$

La movilidad electroforética (Me) es un caso particular de la velocidad de migración de un ión, cuando se aplica un campo eléctrico de 1V/cm. Su signo es igual al de la carga de la partícula.

La velocidad de migración electroforética depende de la densidad de carga de la molécula (relación carga/peso), del voltaje aplicado y de la porosidad del gel de electroforesis. El voltaje no se puede incrementar indiscriminadamente por que se genera un excesivo calor. En contraste, al aplicar bajo voltaje puede ocurrir una pobre separación, por causa de la difusión por tiempo muy prolongado de la corrida electroforética. (Chávez y col.1990).

La mayoría de las biomacromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos) poseen determinada carga eléctrica con grupos aniónicos y catiónicos capaces de disociarse. La carga neta de la partícula está dada por el pH del medio y puede ser modificada por la interacción con pequeñas moléculas de iones u otras macromoléculas. De lo anterior se deduce que el pH influye sobre la velocidad de migración de las moléculas. El punto isoelectrico de la biomolécula, es decir, el pH al cual su carga neta es igual a cero, esta no migra. Por debajo del punto isoelectrico tiene carga neta positiva y migra hacia el cátodo, y por encima del punto isoelectrico tiene carga neta negativa y migra hacia el ánodo. (García, 2000).

Formación del gel de poliacrilamida

La poliacrilamida es un soporte empleado frecuentemente en la electroforesis en gel, es químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible. Forma además geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permiten buena visualización de las bandas durante tiempo prolongado. Además tiene la ventaja de que variando la concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada el tamaño del poro.

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización vinílica del monómero acrilamida $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ y del monómero entrecruzador N,N'-metilen-bis-acrilamida $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$. La polimerización se inicia con la formación de radicales libres del monómero, que se producen por radicales libres de oxígeno, por causa de la acción de iones persulfato. (García, 2000). Las aminas terciarias como el N,N,N,N'-tetrametilen-diamina (TEMED) se emplean como catalizadores de esta reacción, por que causan la formación de radicales libres de persulfato.(Garfin1990). Esta reacción es fuertemente inhibida por altos niveles de oxígeno, (Mio et. al. 1999), por lo que la solución debe de ser desgasificada para lograr una formación de gel reproducible. (García, 2000).

Concentración de acrilamida

La concentración de acrilamida (%T) representa el porcentaje en peso del monómero total empleado (acrilamida + entrecruzador en gramos por 100 mL) y determina la longitud promedio de la cadena del polímero. La concentración bis-acrilamida (%C) representa el porcentaje de este monómero en el gel y determina el grado de entrecruzamiento.

Los factores que determinan el tamaño del poro del gel son muchos, pero en general el tamaño del poro disminuye con el incremento del %T. (Alpenfels, et.al. 1998). Las proporciones en que ambas se encuentran determinan las propiedades físicas del gel como son densidad, elasticidad resistencia mecánica y el tamaño del poro. En general se recomiendan valores de T de 5 a 15% y de C de 2 al 4 %. (Gaal, et.al. 1984)

Uso de catalizadores

La polimerización se lleva a cabo con la utilización de sistemas catalíticos redox como por ejemplo:

- Persulfato de amonio (PSA) agente oxidante y TEMED como agente reductor.
- PSA y 3-dimetilaminopropionitrilo (DMAPN)
- Peróxido de hidrógeno, sulfato de hierro y ácido ascórbico.

La polimerización no ocurre a bajo pH, ya que requiere radicales de monómeros libres formados por catálisis básica de radicales oxígeno del persulfato. (García 2000).

Sistemas tampón

La fuerza iónica (m) determina el potencial electrocinético ya que reduce la carga neta de los grupos con cargas efectivas. Se ha determinado que la movilidad de las partículas cargadas es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de la fuerza iónica, a baja m se eleva la velocidad de migración y es menor la difusión, de manera que la zona de separación es más ancha y mayor la resolución. (Chávez 1990). Con el aumento de la m , se incrementa el desprendimiento de calor y la evaporación. En la electroforesis, los efectos de absorción de agua, no-homogeneidad del material, intercambio iónico con grupos cargados del soporte y electroendósmosis puede influir sobre la movilidad y calidad de la separación. La electroendósmosis generalmente ocurre porque los grupos cargados del soporte se ionizan en soluciones tampón neutras o ácidas y los contraiones libres hidratados (H_3O^+) migran hacia el cátodo, esto provoca un movimiento relativo del solvente respecto al soporte sólido y que las moléculas no cargadas sean transportadas hacia el cátodo a pesar de no tener grupos ionizados.

La electroforesis en geles de poliacrilamida puede realizarse en el rango de pH de 2 a 11, sin embargo la desaminación de la proteínas o las reacciones hidrolíticas pueden ser severas a valores de pH inferiores a 3 y superiores de 10. La mayoría de las proteínas con puntos isoeléctricos comprendidos entre pH 4 y 7.5 son separadas en geles con pH entre 8 y 9. (García 2000).

Comportamiento de las proteínas en la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS)

La electroforesis con SDS es un excelente método para identificar y monitorear las proteínas durante un proceso de purificación; también se emplea para la determinación del peso molecular de las subunidades de proteínas. (Garfín 1990).

La estructura del detergente SDS empleado en esta variación de la electroforesis en el gel de poliacrilamida es $CH_3(CH_2)_{10}CH_2SO_3-Na^+$. El catión se une a las proteínas por absorción no específica (aproximadamente una molécula de SDS por cada dos residuos de aminoácidos, con una relación SDS/ proteína máximo de 1.4 g/g). El SDS desnatura por completo las proteínas y rompe las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria. Los grupos alifáticos dodecil se colocan en el interior, mientras que los grupos sulfato en la superficie y todos los complejos SDS-proteína toman carga neta negativa (que excede la carga intrínseca de las cadenas de aminoácidos). Las proteínas reaccionan con SDS a relativamente alta concentración, pero se ha demostrado que 0.4% de SDS es el nivel mínimo necesario para saturar los sitios de unión de la proteína, sin embargo se emplea 1% para lograr en margen de seguridad. (García 2000).

El complejo SDS-proteína tiene forma de varilla con un diámetro de 18 angstroms y una longitud proporcional al peso molecular de la cadena polipeptídica. El tratamiento concomitante con un agente reductor de puentes bisulfuro, como el beta mercaptoetanol (β ME) o el DTT desnatura las proteínas y las rompe en las subunidades que la componen. Por lo que el complejo SDS-proteína tiene generalmente mayor densidad de carga y menor tamaño que las proteínas nativas. Se ha determinado que con 5 min a 95-100 °C es suficiente para la formación de enlaces estables SDS-proteína a una concentración del 1% de SDS, en presencia de EDTA y condiciones reductoras. (Gaal, et.al. 1984)

Tinción

Las proteínas coloreadas naturales como la mioglobina, hemoglobina, ferritina y citocromo C pueden ser observadas directamente en los geles, sin embargo la visualización de la mayoría de la proteínas requiere el uso de colorantes.

Existen diferentes tipos de tinción, entre ellos la plata que es muy sensible y tiene la característica de producir generalmente coloraciones carmelita o negro, sin embargo algunas proteínas tienen colores característicos como las lipoproteínas que tienden a colorearse de azul y algunas glicoproteínas que aparecen amarillas, carmelitas o rojas. Este efecto cromático se ha demostrado que está dado por la difracción de la luz en la plata. (Gaal, et.al. 1984)

La tinción con Azul de Coomassie (colorante orgánico) puede emplearse en la determinación de proteínas cuando estas son abundantes, Esta tinción requiere un medio ácido para la generación de la atracción electrostática entre las moléculas del colorante y los grupos amino de las proteínas. La atracción iónica es a través de las fuerzas de Van Der Walls, que une a las proteínas y al colorante formando un complejo. Esta unión es totalmente reversible en condiciones apropiadas. (García 2000).

3.5.2 Cinética enzimática

Las reacciones químicas se pueden clasificar en reacciones de orden cero, primer orden, segundo orden y tercer orden dependiendo de cómo la velocidad de reacción es influenciada por la concentración de los reactivos.

En una reacción de orden cero, la velocidad de formación del producto es independiente de la concentración de sustrato:

$$V = k$$

En una reacción de primer orden la velocidad de formación de los productos es directamente proporcional a la concentración del sustrato:

$$V = k [A]$$

Una reacción de segundo orden es aquella en la que la velocidad de formación del producto depende:

- de la concentración de dos sustratos (como en una reacción de condensación):

$$V = k [A1] [A2]$$

- del cuadrado de la concentración de un único sustrato (reacción de dimerización):

$$V = k [A]^2$$

Existen muchas reacciones que para llevarse a cabo pueden requerir de muchas horas sin la presencia de catalizador que ayude a acelerar dicha reacción.

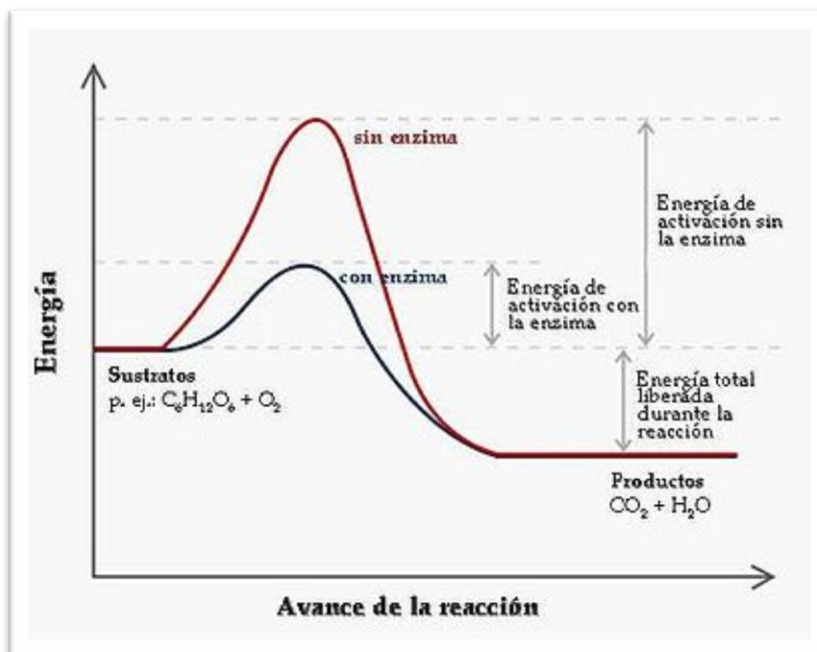
Un catalizador es una sustancia que aumenta la rapidez o velocidad de una reacción química, sin verse alterada ella misma en el proceso global. La mayor parte de los catalizadores biológicos, aunque no todos ellos, son proteínas que se denominan **enzimas**. Las sustancias sobre las que actúa la enzima se llaman **sustratos**.

El método principal para estudiar el mecanismo de una reacción catalizada cuando esta cambia en respuesta a cambios en los parámetros experimentales es la **cinética enzimática**.

Una molécula que interviene en una reacción de primer orden solo alcanza ocasionalmente un estado energético en el que puede producirse el proceso; de lo contrario todas las moléculas ya habrían reaccionado. Esto indica que tan solo una fracción de las moléculas, que están suficientemente activadas pueden sufrir la reacción. En una reacción de segundo orden no todos los reactantes pueden ser productivos, puesto que algunas colisiones pueden no ser energéticas, o las moléculas que colisionan pueden no estar adecuadamente orientadas unas respecto a otras para reaccionar. (Lehninger 1995).

Para que el sustrato se convierta en producto, sus moléculas deben superar la barrera energía de activación o energía libre (ΔG) y llegar a un estado de transición (ΔG^+) el cual se cree que es una fase a través de la cual deben pasar las moléculas que reaccionan a menudo de una forma en que las moléculas están tensionadas o distorsionadas o tienen una estructura electrónica determinada, en que las moléculas colisionan adecuadamente.

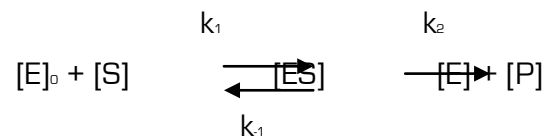
La función que cumple la enzima es reducir la barrera de energía para una reacción con lo que aumenta la fracción de moléculas que tienen energía suficiente para alcanzar el estado de transición y acelerar la reacción. (Müller 2008). Ver Gráfica 1.



Gráfica 1. Energía de activación para una reacción catalizada o no por una enzima.

La presencia de un catalizador no tiene efecto alguno sobre el equilibrio, el valor de la constante de equilibrio es la misma. Así mismo, la energía libre total (ΔG°) que es la diferencia entre energía libre al inicio de la reacción y la energía libre al final de la reacción tampoco se modifica.

Para la mayoría de las enzimas la velocidad varía linealmente según la concentración de sustrato a bajas concentraciones (cinética de primer orden), y se hace independiente de la concentración de sustrato (cinética de orden cero) a concentraciones más altas. Este tipo de comportamiento fue explicado por primera vez en 1913 por Leonor Michaelis y Maud Menten en términos del mecanismo:



donde E es la enzima, S el sustrato, P el producto y ES un complejo de adición. En general la concentración de sustrato es mucho mayor que la de la enzima, y en este caso es válido aplicar el tratamiento de estado estable para obtener la ecuación de velocidad. Esto puede hacerse porque en estas condiciones la concentración del complejo enzima-sustrato [ES] debe ser muy inferior a la de sustrato y, por lo tanto, la velocidad de cambio de su concentración será muy inferior a la del sustrato. Así

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0 \quad (1)$$

$$[E]_0 = [E] + [ES] \quad (2)$$

Expresando [E] en términos de [ES]:

$$[E]_0 = [ES] \left[\frac{k_{-1} + k_2}{k_1[S]} + 1 \right]$$

y, por lo tanto,

$$[ES] = \frac{k_1[E]_0[S]}{k_1 + k_2 + k_1[S]}$$

La velocidad es



Esta ecuación se expresa como

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_M + [S]} \quad \text{Ecuación de Michaelis-Menten}$$

donde

$$V_{m\acute{a}x} = k_2[E]_0$$

y

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \text{que es la constante de Michaelis (3)}$$

Hay dos casos limitantes de la ecuación (3). Cuando $[S] \gg K_m$, la velocidad se transforma en $V_{m\acute{a}x} = k_2[E]_0$ de manera que la cinética es de orden cero con respecto al sustrato. A la velocidad $V_{m\acute{a}x}$ suele llamarse velocidad limitante. En estas condiciones, la descomposición del complejo sustrato-enzima es el paso que controla la velocidad.

Por otra parte, cuando $[S] \ll K_m$,

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_m} = \frac{k_2}{K_m}[E]_0[S] = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2}[E]_0[S]$$

y la cinética es entonces de primer orden con respecto al sustrato. En ocasiones se dice que la reacción 1, la formación del complejo enzima-sustrato, es el paso que controla la velocidad, pero es conveniente observar que k_1 y k_2 tienen efectos igualmente fuertes en la velocidad total, de manera que es preferible decir que no hay paso que controle la velocidad en este caso. El segundo paso, la descomposición del complejo enzima-sustrato suele llamarse paso limitante de la velocidad, en el sentido de que coloca un límite en la

velocidad a determinada concentración enzimática. Sin embargo, cabe destacar que este paso sólo controla la velocidad en el límite de concentraciones de sustrato muy altas. (Toledo 2013).

Cuando $[S]=K_m$ la ecuación (3) se transforma en

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m + [S]} = \frac{V_{m\acute{a}x}}{2}$$

En consecuencia, el significado de la constante de Michaelis es que se trata de la concentración de sustrato a la cual la velocidad equivale a la mitad de la velocidad limitante.

La cinética es el estudio de la velocidad a la que tienen lugar las reacciones químicas. Uno de los objetivos principales de tal estudio es conseguir el conocimiento de un mecanismo de reacción. La velocidad de una reacción y la forma en que cambia esta velocidad en respuesta a diferentes condiciones están íntimamente ligadas a la ruta seguida por la reacción y es, por consiguiente, indicativa de su mecanismo de reacción. La cinética enzimática es un tema de enorme importancia en bioquímica según (Voet y Voet 1990):

- Mediante estudios cinéticos se pueden determinar las afinidades de fijación de sustratos e inhibidores a una enzima, a su vez se puede establecer la máxima tasa catalítica de una enzima.
- Observando la forma en que varía la velocidad de una reacción enzimática con las condiciones de reacción y combinando esta información con la obtenida a partir de estudios químicos y estructurales de la enzima, se puede elucidar el mecanismo catalítico de la enzima.
- El estudio de la cinética de una reacción enzimática conduce a un conocimiento sobre el papel de la enzima en un proceso metabólico global.
- La determinación de las velocidades de reacciones catalizadas enzimáticamente se encuentran entre los procedimientos más utilizados en análisis bioquímico y clínico.

4.- HIPÓTESIS

La determinación de algunas constantes bioquímicas como la Constante Catalítica K_{cat} y Constante de Michaelis K_m son fundamentales para la caracterización de una enzima, lo cual es posible lograr encontrando las condiciones óptimas para la separación de la enzima lacasa del hongo de podredumbre blanca *Trametes versicolor*.

5.- OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Purificar la enzima comercial lacasa del hongo *Trametes versicolor* a través de una cromatografía de intercambio iónico para determinar la constante catalítica (K_{cat}) y constante de Michaelis (K_M).

5.2 Objetivos Particulares:

- Purificar la enzima lacasa del hongo *Trametes versicolor*, a partir de una muestra comercial (sigma), mediante la cromatografía de líquidos FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) con una columna de intercambio iónico.
- Realizar un gel de electroforesis en poliacrilamida para comprobar la pureza de la enzima.
- Determinar la Constante Catalítica (K_{cat}) y la Constante de Michaelis (K_M) en la reacción de oxido reducción catalizada por la enzima lacasa del hongo *Trametes versicolor* utilizando como agente reductor ABTS (ácido 2,2' azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) para determinar la eficacia de la enzima y compararla con lacasas de otros microorganismos.

6.- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 LISTADO DE REACTIVOS

- Enzima comercial lacasa marca Sigma (70 % pureza)
- Fosfato de sodio monobásico
- Fosfato de sodio dibásico
- ABTS marca Sigma
- Reactivo de Bradford marca Bio-Rad
- Albúmina bovina estándar
- Acrilamida
- Bis acrilamida
- Tris HCl
- Tris base
- Dodecil sulfato de sodio (SDS)
- N,N,N,N'-tetrametilen-diamina (TEMED)
- Persulfato de Amonio (PSA)
- Glicina
- Mercaptoetanol
- Azul de bromofenol
- Marcador de peso molecular bajo marca Bio-Rad
- Azul de Coomassie
- Membrana de 0.45nm marca millipore

6.2 LISTADO DE EQUIPOS

- Potenciómetro
- Microcentrífuga marca eppendorf
- Cromatógrafo FPLC marca General Electric modelo AKTA
- Columna de intercambio iónico Mono Q s/50 GL la cual contiene una matriz de poliestireno divinilbenceno con moléculas de una amina secundaria $-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)$.
- Sistema de ultraconcentración ámicon con una membrana semipermeable de tamaño de poro 10 KDa y 30 KDa (kilodaltons).
- Incubadora
- Espectrofotómetro UV/VIS marca Orion AM 800
- Aparato de Electroforesis en gel marca Bio-Rad
- Fuente Eléctrica de 180 V

6.3 DESARROLLO EXPERIMENTAL

6.3.1 Purificación

Se pesó 1gr de liofilizado de lacasa comercial del hongo *Trametes versicolor* (Sigma) se disolvió en 15 mL solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7.0, se centrifugó durante 30 minutos a 12,000 rpm.

El sobrenadante se dividió en tres volúmenes de 5 mL y se inyectaron una a la vez en el cromatógrafo ATKA, donde es introducida en una columna de intercambio iónico Mono Q s/50 GL la cual contiene una matriz de poliestireno divinilbenceno con moléculas de una amina secundaria $-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)$ a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Se colectaron fracciones de 2 mL.

Se realizan pruebas de actividad con ABTS 50 mM para detectar las fracciones en las cuales se encuentra presente la enzima lacasa.

Este procedimiento se repite para los otros dos volúmenes de la solución de la enzima.

Los tubos con actividad se juntaron y son concentrados a un volumen de 5 mL en un sistema de ultraconcentración ámicon (ver figura 11) con una membrana semipermeable de tamaño de poro 10 KDa (kilodaltons).

El concentrado se vuelve a inyectar al cromatógrafo ATKA para introducirla nuevamente a la columna de intercambio iónico bajo las mismas condiciones.

Se realizan pruebas de actividad con ABTS para detectar las fracciones que tienen a la enzima. Las fracciones con actividad se juntaron de dos en dos y fueron introducidas al sistema de ultraconcentración ámicon donde se filtran a través de una membrana semipermeable con un tamaño de poro de 30 KDa. Llevado cada una de ellas a un volumen de 700 μL . Posteriormente se realizó un gel de electroforesis para comprobar la pureza de las fracciones; las fracciones que fueron purificadas se juntaron nuevamente y se concentraron a 700 μL (solución de lacasa purificada) y se cuantificó.

6.3.2 Gel de electroforesis SDS-PAGE

Para la electroforesis se preparó una solución de polímero de acrilamida por combinación de los reactivos de las tablas 2 y 3 para el gel de separación y para el gel compactación respectivamente.

GEL DE SEPARACION	
Reactivo	10%
Acrilamida/bis (30%)	2.0 mL
Tris HCl 1.5M pH 8.8	1.5 mL
Agua destilada	2.37 mL
SDS 10 % (p/v)	60 µL
PSA 10 % (fresco)	45 µL
TEMED	4.5 µL
Monómero total	6 mL

Tabla 2. Reactivos y cantidades para el gel de separación.

GEL DE COMPACTACION	
Reactivo	4 %
Acrilamida/bis (30%)	400 µL
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	750 µL
Agua destilada	1.8 mL
SDS 10 % (p/v)	30 µL
PSA 10 % (fresco)	15 µL
TEMED	3 µL
Monómero total	3 mL

Tabla 3. Reactivos y cantidades para el gel de compactación.

Se añaden las cantidades de reactivos en el orden de la tabla excepto el persulfato de amonio (PSA) y N, N, N', N'-tetrametil etilendiamina (TEMED), catalizadores que inician la polimerización de la acrilamida y que se adicionan al final. Se monta el aparato para la electroforesis y se agregan 4.5 mL de la mezcla del gel de separación al 10% y se deja polimerizar aproximadamente 25 minutos. Posteriormente se prepara la mezcla del gel de compactación y se adicionan 2 mL, sobre el gel de separación ya polimerizado, se coloca el peine para formar los pocillos y se añade la mezcla hasta que polimerice. Una vez polimerizado el gel, se coloca en la cámara de electroforesis y se adicionan 500 mL de amortiguador 1X de corrimiento (se toma 1 volumen de la solución de 5X (Tris-base 15g/L, glicina 72 g/L, SDS 5 g/L) por 4 volúmenes de agua desionizada) en el espacio intermedio de la cámara, hasta un nivel mayor al de los pocillos formados y se retira el peine. (Toledo (2013).

Se prepara un buffer muestra con Tris-HCl, glicerol, SDS, mercaptoetanol y azul de bromofenol que se añade a las soluciones de la enzima para preparar las muestras. Éstas se incuban a 94 °C en un baño maría durante 4 minutos para que se efectúe el desplegamiento proteico. Se añaden 50 µL de estas muestras en cada pocillo del gel, incluyéndose la muestra de referencia de proteínas de bajo peso molecular (BioRad). Las condiciones de electroforesis son: fuente eléctrica 180 V, durante 55 minutos. Una vez que las muestras migran se desmonta el aparato y se retiran las placas de vidrio para separar el gel. Se lava con agua desionizada y se revela con tinción de azul de Coomassie. (Laemmli, 1970).

6.3.3 Cuantificación mediante Bradford

Para llevar a cabo la cuantificación por el método de Bradford se realizó una curva de calibración con proteína albúmina bovina estándar (Bio-Rad) y la muestra de la proteína lacasa. Para ello se colocó 1 mL de reactivo de Bradford (Bio-Rad) en un tubo de ensaye y posteriormente se adicionó 33µL de la solución de lacasa o albúmina bovina estándar. Se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y después se determinó la absorbancia a 595 nm.

6.3.4 Cinética enzimática

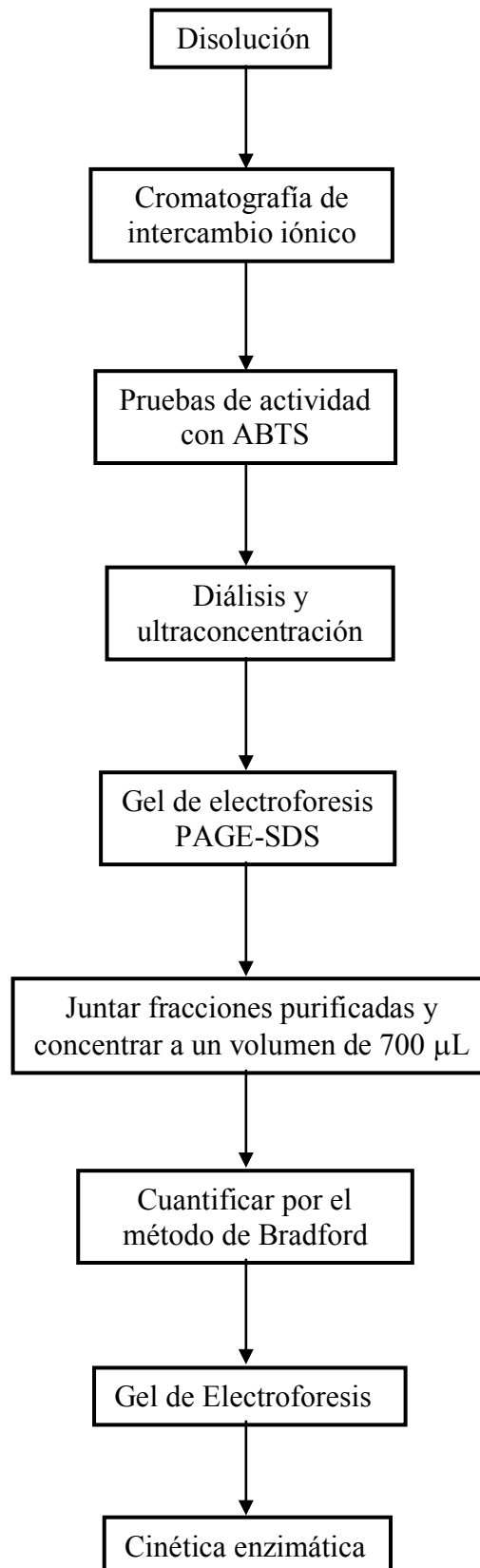
Para estimar las constantes cinéticas K_m , V_{max} y K_{cat} se llevó a cabo la reacción de oxidación del ABTS para lo cual se preparó una solución del sustrato ABTS 5 mM en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0. Se efectuaron diluciones en tubos de ensaye de tal forma que el volumen en cada tubo sea de 900 µL. Las diluciones se muestran en la tabla 4.

No. tubo	Sustrato ABTS	Solución fosfatos 50 mM pH=7	Concentración de ABTS
Tubo 1	900 μ L ABTS 5 mM	900 μ L buffer	2.5 mM
Tubo 2	900 μ L tubo 1	900 μ L buffer	1.25 mM
Tubo 3	900 μ L tubo 2	900 μ L buffer	0.625 mM
Tubo 4	900 μ L tubo 3	900 μ L buffer	0.313 mM
Tubo 5	900 μ L tubo 4	900 μ L buffer	0.156 mM
Tubo 6	900 μ L tubo 5	900 μ L buffer	$7.8 \cdot 10^{-2}$ mM
Tubo 7	900 μ L tubo 6	900 μ L buffer	$3.9 \cdot 10^{-2}$ mM
Tubo 8	900 μ L tubo 7	900 μ L buffer	$1.95 \cdot 10^{-2}$ mM
Tubo 9	900 μ L tubo 8	900 μ L buffer	$9.76 \cdot 10^{-3}$ mM
Tubo 10	900 μ L tubo 9	900 μ L buffer	$4.88 \cdot 10^{-3}$ mM

Tabla 4. Diluciones del sustrato ABTS para la cinética enzimática

Se adicionaron 100 μ L de solución de enzima con una concentración $2.38 \cdot 10^{-8}$ mM, se agita y de inmediato se lee el incremento en la absorbancia con respecto a un blanco de sustrato y solución amortiguadora sin enzima. Las condiciones son: $\lambda_{\text{ABTS}}=420$, $\epsilon_{\text{ABTS}}=36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, (Berka y col., 1997) y las mediciones de absorbancia se realizan cada 10 segundos durante 7 minutos. Se define una unidad de actividad enzimática (UE) como la cantidad de enzima que transforma un micromol de sustrato en un minuto ($\mu\text{mol} / \text{mL min}$).

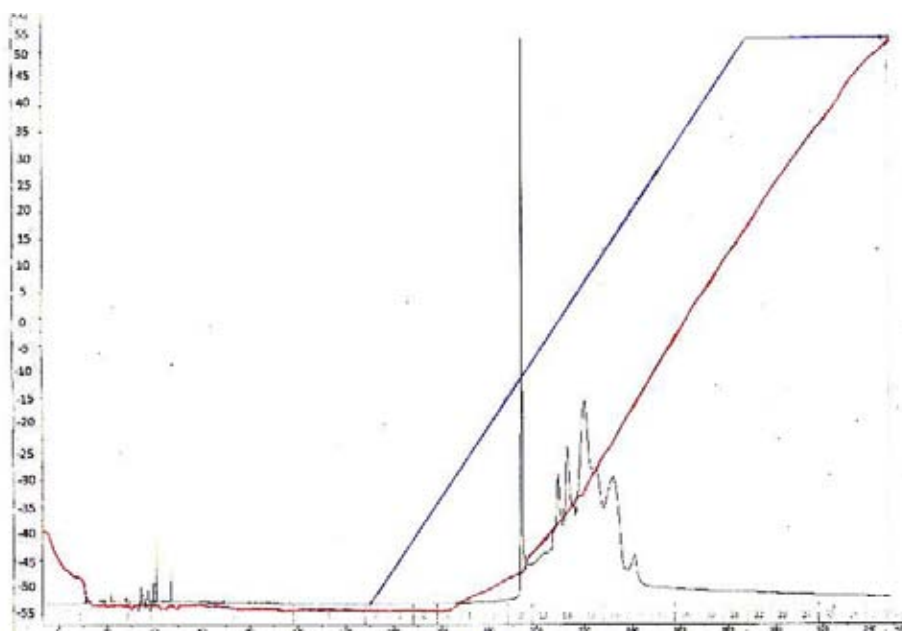
6.4 DIAGRAMA DE FLUJO GENERAL



7.-RESULTADOS Y ANÁLISIS

7.1 Purificación

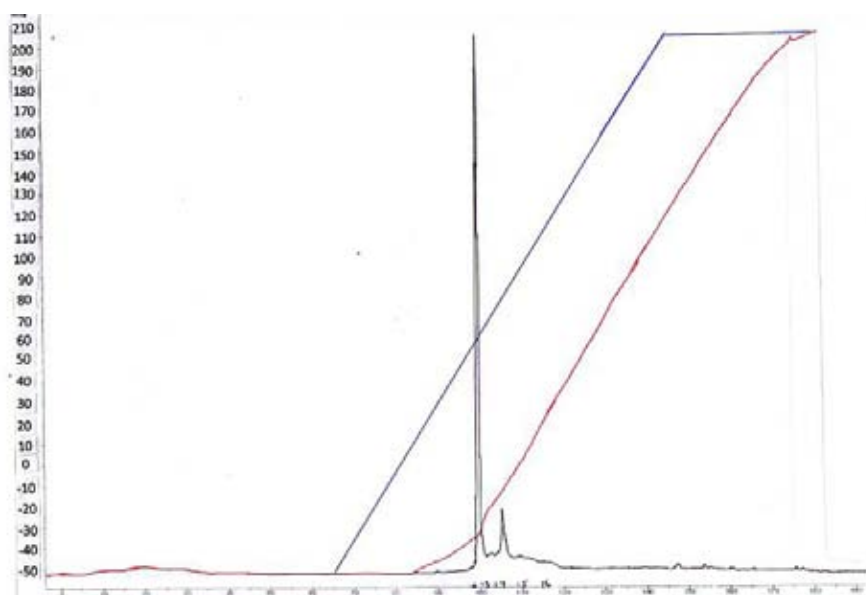
De acuerdo al procedimiento indicado anteriormente para la purificación de la enzima lacasa, por medio de cromatografía de intercambio iónico en un cromatógrafo ATKA con una columna Mono Q s/50 GL previamente equilibrada con solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH = 7.0, se obtuvo un primer cromatograma que se muestra a continuación en la gráfica 2:



Gráfica 2. Cromatograma de la primera cromatografía de intercambio iónico.
La línea negra es la señal de la enzima lacasa en miliunidades de absorbancia;
La línea roja es el incremento en la conductividad;
La línea azul es el gradiente concentración salina

Tras la primera elución podemos observar en el cromatograma varias bandas o picos, de acuerdo a las pruebas de actividad cualitativas realizadas con el sustrato ABTS, las fracciones que mostraron un cambio de color debido a la oxidación de dicho sustrato fueron de la 9 a la 20, y que debido a la intensidad del color, el primer pico correspondía a la enzima lacasa, sin embargo la mayor parte del pico todavía contiene muchas impurezas debidas a otras sustancias de la enzima lacasa comercial como excipientes o estabilizantes, por lo cual se realizó una segunda cromatografía. Se tomaron las fracciones de la 9 a la 13 se juntaron, y se concentraron en un sistema de ultraconcentración ámicon con una membrana de 10 KDa para ser introducidas nuevamente en el ATKA bajo las mismas condiciones.

El segundo cromatograma se muestra a continuación en la gráfica 3:



Gráfica 3. Cromatograma de la segunda cromatografía de intercambio iónico
La línea negra es la señal de la enzima lacasa en miliunidades de absorbancia (mAu)
La línea roja es el incremento en la conductividad; La línea azul es el gradiente concentración salina

En este segundo cromatograma se observa un pico con mayor resolución y con una mínima contaminación.

Se realizaron pruebas de actividad cualitativa con ABTS, para corroborar la presencia de la enzima.

La cromatografía de intercambio iónico realiza la separación de la muestra proteica basado en la carga de la molécula. Para este experimento se utilizó una columna Mono Q S/50 GL la cual consta de una matriz de poliestireno cargada con moléculas de una amina secundaria la que posee una carga neta positiva. La enzima lacasa del hongo *Trametes versicolor* tienen un pI teórico de 4.7, esta enzima fue disuelta en la solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7.0 con lo cual se consigue que la enzima obtenga una carga neta negativa. Al pasar la muestra a través de la columna, las moléculas de proteína son atraídas electrostáticamente por la matriz de dicha columna y es retenida, posteriormente se hizo pasar una solución salina con un gradiente de concentración para desplazar a la enzima, ya que las moléculas de sal tienden a romper las interacciones electrostáticas entre la enzima lacasa cargada negativamente y la moléculas de la amina secundaria la cual posee una carga positiva. Con esto podemos decir que se trató de una cromatografía de intercambio aniónico.

También se puede observar en el primer cromatograma que la absorbancia para el pico de la enzima lacasa es de 55 mAu (microunidades de absorbancia), mientras que en la segunda cromatografía la absorbancia para la lacasa es de 210. Esto se puede explicar con la ley de Lambert-beer la cual nos dice que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de la enzima, por lo tanto debido a que en la segunda cromatografía la enzima ya se encuentra más pura o más concentrada, la absorbancia es mayor.

7.2 Pruebas de actividad

Se realizó la prueba de actividad cualitativa a las fracciones para detectar en cuál de estas se encontraba la lacasa. La figura 13 muestra la reacción del ABTS con muestras de las fracciones de obtenidas de la cromatografía:

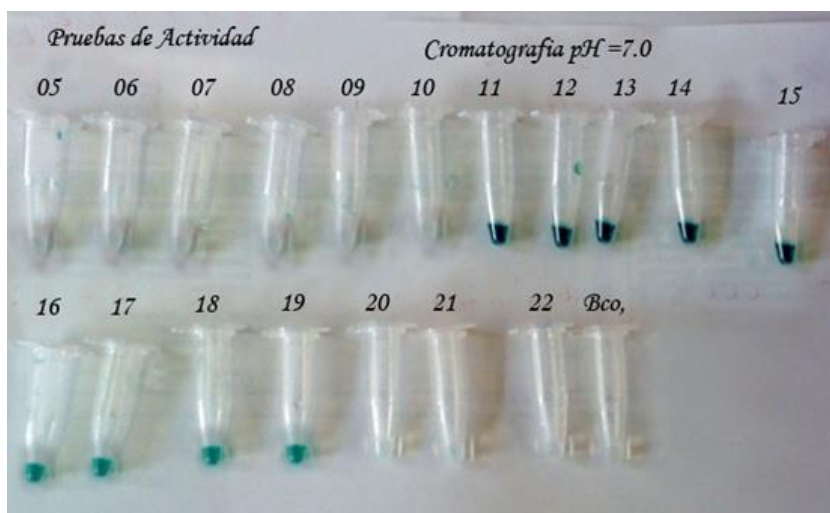


Fig.13. Pruebas de actividad cualitativa de la enzima lacasa con el sustrato ABTS.
Las muestras azul intenso indican mayor presencia de lacasa

Como se puede observar en la figura 13, la enzima se encuentra presente en las fracciones 11 a la 19.

En la figura 14 se muestra el mecanismo de oxido-reducción del ABTS

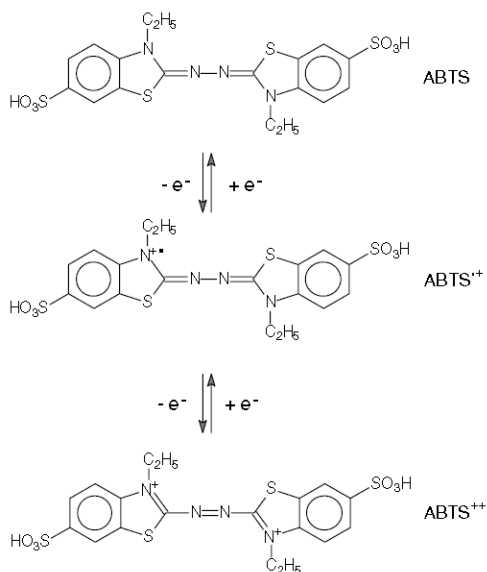


Figura 14. Reacción de óxido reducción del ABTS a radical catión ($ABTS^+$) y dication ($ABTS^{2+}$) el cual es de color verde intenso y da un incremento en la absorbancia a 480 nm. (Solis et al 2005).

La enzima lacasa cataliza la oxidación de una gran variedad de sustratos entre ellos el ABTS. Como se muestra en la figura 19 el ABTS pierde uno de sus electrones el cual es captado por el sitio activo de la enzima CuT1 posteriormente este electrón es transferido al sitio CuT2 y CuT3 (Fig. 14), donde ocurre la reducción de oxígeno molecular a agua. La oxidación del ABTS produce un cambio de color de blanco a verde intenso que podemos observar en la figura 18. Todas las muestras contienen 20 μL de ABTS y 40 μL de la muestra de la enzima. Se puede observar en las primeras fracciones no hay un cambio de color debido a que no está presente la enzima lacasa; de las fracciones 11 a la 19 se observa un cambio de color, sin embargo de la 11 a la 15 el color es más intenso lo que indica que la concentración de enzima es mayor o bien, se encuentra más pura. De esta manera se entiende que las fracciones 16 a la 19 si contienen la enzima lacasa pero probablemente en menor concentración y contaminada con otras sustancias.

7.3 Gel de electroforesis SDS-PAGE

Las fracciones con actividad fueron seleccionadas para realizar un gel de electroforesis (SDS-PAGE) y comprobar la pureza de las muestras obtenidas. A continuación se muestra la foto del gel obtenido en la figura 15.

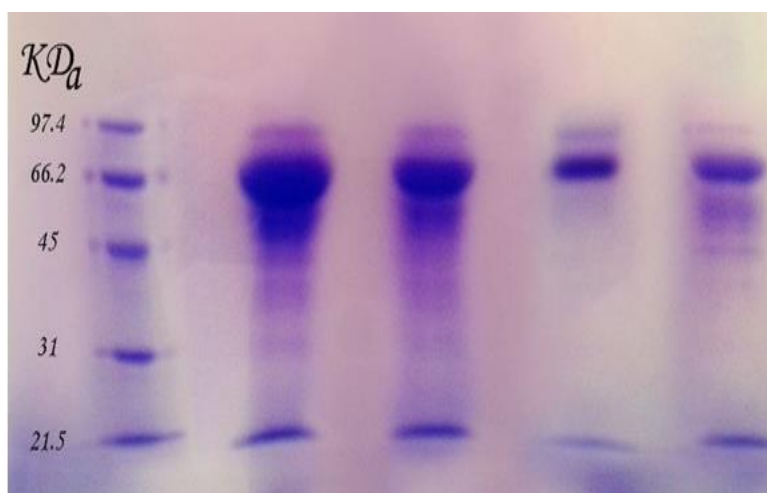


Fig. 15 Imagen del gel de electroforesis. (SDS-PAGE). Carril 1 Marcador de peso molecular. Carril 2 Extracto crudo de la primera cromatografía. Carril 3 extracto crudo de la segunda cromatografía. Carril 4 fracciones de la 11 a la 15. Carril 5 fracciones de la 16 a la 19.

En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular de bajo rango. La primer marca es referente a la fosforilasa β que tiene un peso molecular de 97.4 KDa; a continuación se encuentra la albúmina sérica con un peso molecular de 66.2 KDa. La tercer marca es de la ovoalbúmina con un peso molecular de 45 KDa.

En el carril número 2 se encuentra el extracto crudo de la primer cromatografía, es decir una pequeña muestra de la solución proteica que se inyectó al equipo para su separación a

través de la columna. La enzima lacasa del hongo *Trametes versicolor* tiene un peso molecular de 53.3 kDa.

En este carril se observa a la enzima lacasa como la marca más grande sin embargo de acuerdo con el marcador de peso molecular la enzima tiene un peso aproximadamente de 62KDa, esto puede ser debido a que probablemente se encuentre glicosilada. Existen otras marcas debajo de esta lo que indica la presencia de otras sustancias (no está pura). En la imagen del gel se puede observar que la enzima lacasa aparece casi a la misma altura que la albúmina sérica, es decir, alrededor de los 65 KDa, teóricamente la enzima lacasa del hongo *Trametes versicolor* tiene una masa de 53KDa, esta diferencia puede deberse a que esta lacasa puede estar glicosilada, es decir que contiene carbohidratos adheridos a la molécula.

En el carril número 3 se encuentra el extracto crudo de la cromatografía dos que representa las fracciones con actividad obtenidas de la cromatografía uno. En este carril podemos ver a la lacasa pero siguen presentes otras sustancias.

En el carril número 4 se encuentran las fracciones con mayor actividad obtenidas en la segunda cromatografía. Estas fracciones se juntaron y concentraron siendo pasadas a través de un sistema de ultracentrifugación Amicón (Fig. 13), con una membrana de tamaño de poro de 30 KDa. Como se puede observar la enzima se encuentra pura puesto que ya no aparecen las bandas debajo de ella.

El carril número 5 representa las fracciones que también presentaron actividad correspondientes a las fracciones 16 a la 19, pero que no se encontraban puras, lo que se puede observar al ver las bandas que aparecen debajo de ella.

7.4 Cuantificación por Bradford

Para este método se utiliza el reactivo de Bradford el cual contienen el colorante azul de Coomassie que se une de forma no covalente a la proteína formando un complejo proteína-colorante que cambia de color rojo a azul y absorbe a 595 nm. Esta reacción se expresa en la figura 16.

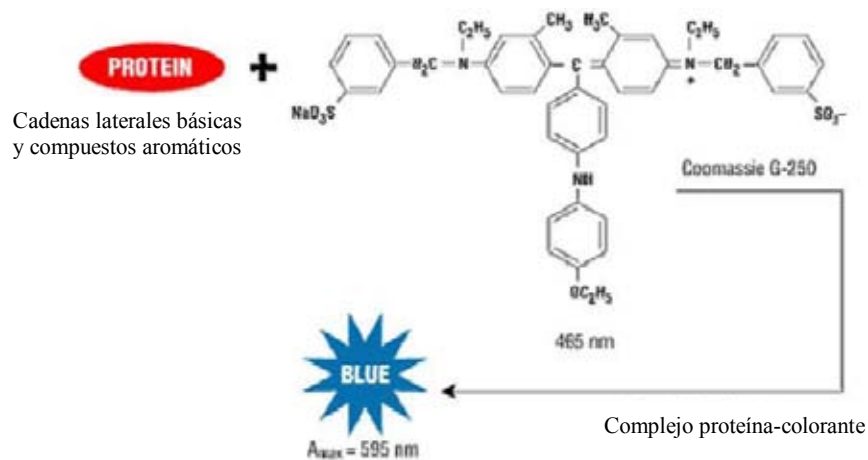


Fig. 16 Imagen de la formación del complejo proteína-colorante en el método de Bradford para la cuantificación de la proteína

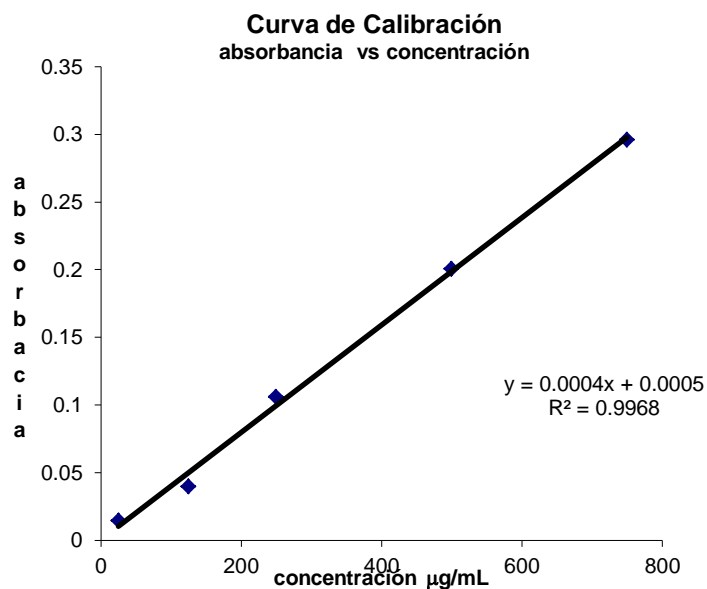
Se cuantificaron las muestras por el método de Bradford usando albúmina bovina estándar para realizar la curva de calibración.

En la tabla 5 se encuentran los datos para la curva de calibración. En las columnas 1 y 2 se encuentran el nombre y la concentración de la muestra respectivamente de acuerdo al kit de albúmina bovina estándar (Bio-Rad). En la columna 3 se presentan las absorbancias indicadas por el equipo a esas concentraciones. Y en columna 4 se presenta la absorbancia corregida a la cual se le resta la absorbancia de la muestra I en la que únicamente contienen agua destilada y reactivo de Bradford (esta muestra es el blanco).

MUESTRA	CONCENTRACIÓN µg/mL	ABSORBANCIA	ABSORBANCIA CORREGIDA
D	750	0.68819	0.29605
E	500	0.59254	0.2004
F	250	0.49808	0.10594
G	125	0.43165	0.03951
H	25	0.40668	0.01454
I		0.39214	

Tabla 5. Datos de la curva de calibración con albúmina bovina estándar
La muestra I es el blanco.

En la gráfica 4 se cuenta la curva de calibración



Grafica 4. Curva de calibración de albúmina bovina estándar por el método de Bradford.

Debido a que la muestra se encontraba muy concentrada y sobrepasaba los valores obtenidos en la curva de calibración se realizó una dilución 1:3 con solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH=7.

La muestra tuvo una absorbancia corregida de 0.2396 que de acuerdo a la ecuación de la recta se obtienen lo siguiente:

$$y = \frac{0.2396 - 0.0005}{0.0004} = 597.75 \mu\text{g/mL}$$

Multiplicada por el factor de dilución 3, se obtiene un resultado de **1793.25 $\mu\text{g/mL}$**

Esta concentración está en una solución de 1 ml con lo cual se puede decir que tenemos 1.8 mg totales de enzima lacasa purificada.

7.5 Cinética enzimática

Para determinar los parámetros cinéticos se llevó a cabo la cinética enzimática descrita anteriormente en la página 44. En ella se sigue la velocidad de oxidación del ABTS la cual se registra por el incremento en la absorbancia a 420 nm.

Se preparó la solución del sustrato ABTS a 5 mM en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7.0 y se realizaron las siguientes diluciones para obtener las concentraciones de la tabla 5.

Posteriormente se adicionó 100 μL de una solución de lacasa con una concentración de $2.38\text{E-}07\text{mM}$, se agitó e inmediatamente se leyó el incremento en la absorbancia con respecto a un blanco de sustrato sin enzima cada 10 segundos. El volumen total en el tubo de reacción fue de 1 mL.

Se determinó la velocidad inicial para cada una de las concentraciones del sustrato ABTS. Se grafica para cada concentración de ABTS tiempo (s) contra absorbancia. La velocidad inicial se determina en la parte lineal de la recta con el valor de la pendiente. El experimento se realiza por duplicado y se promediaron las velocidades iniciales.

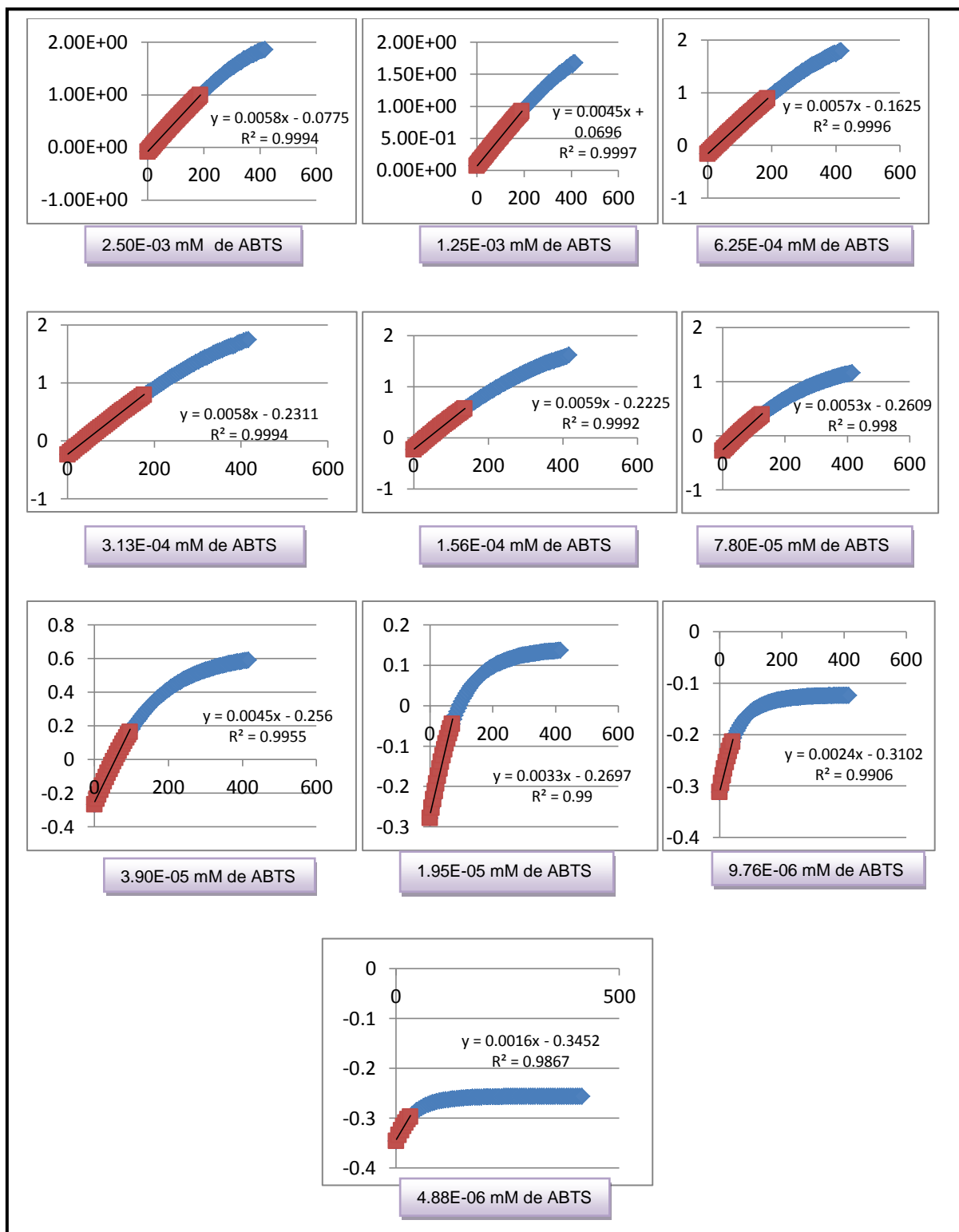
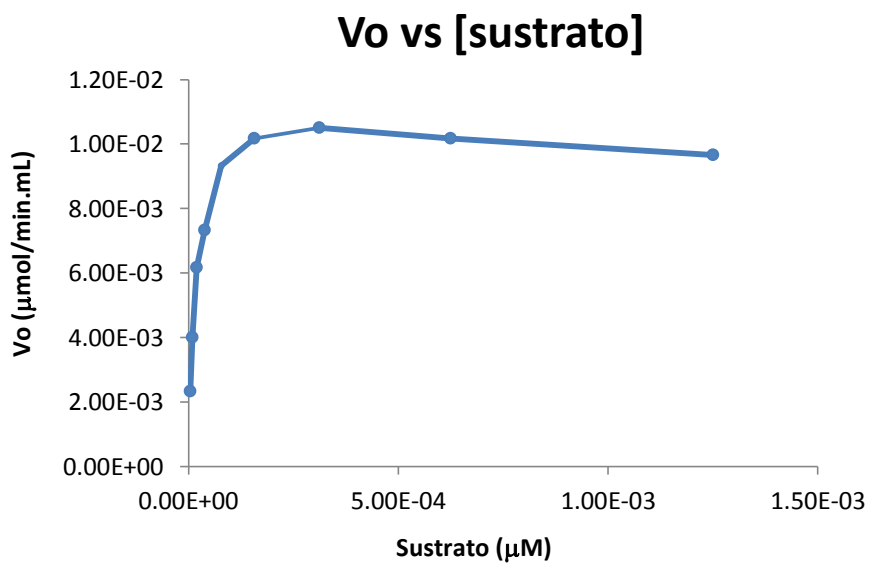


Fig. 17. cálculo de la velocidad inicial para la cinética enzimática a diferentes concentraciones del sustrato ABTS

En la tabla 6 se muestran los resultados de dichas velocidades a las diferentes concentraciones del sustrato ABTS.

[sustrato] μM	V_o ($\mu\text{mol}/\text{min.mL}$)
2.50E-03	9.00E-03
1.25E-03	9.67E-03
6.25E-04	1.02E-02
3.13E-04	1.05E-02
1.56E-04	1.02E-02
7.80E-05	9.33E-03
3.90E-05	7.33E-03
1.95E-05	6.17E-03
9.76E-06	4.00E-03
4.88E-06	2.33E-03

Tabla 6. Velocidades iniciales a cada concentración de sustrato



Grafica 5. [sustrato] vs V_o . Comportamiento micasaleano de la enzima lacasa

En la gráfica 5 se puede observar el comportamiento micasaleano de la enzima lacasa del hongo *Trametes versicolor*.

A una concentración de sustrato baja, la velocidad inicial de la reacción V_0 es proporcional a la concentración del sustrato; y la reacción, por tanto, es aproximadamente de primer orden con respecto al mismo. Sin embargo, a medida que la concentración del sustrato aumenta, la velocidad inicial de la reacción disminuye y deja de ser aproximadamente proporcional a la concentración del sustrato; en esta zona el orden de la reacción es mixto. Con el aumento posterior de la concentración del sustrato la velocidad de la reacción llega a ser esencialmente independiente de la concentración de sustrato y se aproxima asintóticamente a una velocidad constante. En este intervalo de concentraciones de sustrato la reacción es esencialmente de orden cero y se dice entonces que la enzima se encuentra saturada con el sustrato.

Para realizar los cálculos de la K_m y K_{cat} comúnmente se utilizan otras formas algebraicas de la ecuación de Michaelis-Menten. Una de esas formas es tomando los recíprocos de ambos miembros de la ecuación conocida como representación doble inversa o representación de Lineweaver-Burk:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{max} [S]}$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max} [S]} + \frac{[S]}{V_{max} [S]}$$

$$\frac{1}{V} = \left(\frac{K_m}{V_{max}}\right) \left(\frac{1}{[S]}\right) + \frac{1}{V_{max}}$$

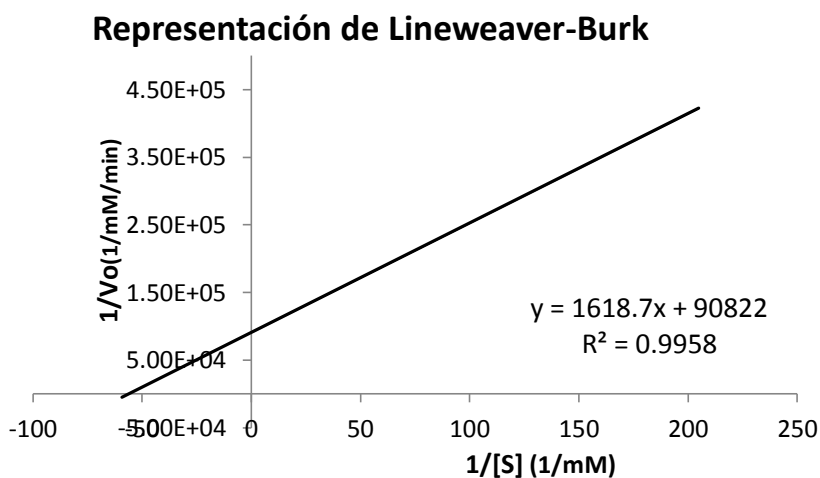
De esta manera se representa una ecuación lineal. Así podemos determinar $1/V_{max}$ a partir de la intersección de la recta con el eje $1/V$. para calcular K_m , extrapolamos hasta el punto hipotético en que $1/V = 0$. (Mathews 2002).

La tabla 7 se muestra los inversos de las concentraciones del sustrato ABTS y los inversos de las velocidades iniciales promedio para cada concentración de sustrato.

[sustrato] mM	V _o (mM/min)	1/[s] (mM ⁻¹)	1/V _o (mM/min) ⁻¹
2.50E+00	9.00E-06	4.00E-01	1.11E+05
1.25E+00	9.67E-06	8.00E-01	1.03E+05
6.25E-01	1.02E-05	1.60E+00	9.84E+04
3.13E-01	1.05E-05	3.20E+00	9.52E+04
1.56E-01	1.02E-05	6.40E+00	9.84E+04
7.80E-02	9.33E-06	1.28E+01	1.07E+05
3.90E-02	7.33E-06	2.56E+01	1.36E+05
1.95E-02	6.17E-06	5.13E+01	1.62E+05
9.76E-03	4.00E-06	1.02E+02	2.50E+05
4.88E-03	2.33E-06	2.05E+02	4.29E+05

Tabla 7. Datos de los recíprocos de la [sustrato] y V_o para la representación doble inversa o representación de Lineweaver-Burk:

A continuación se presenta la gráfica 6 donde se grafica la representación doble inversa o la representación de Lineweaver-Burk



Gráfica 6. Representación de Lineweaver-Burk

Si tenemos que:

$$\frac{1}{V} = \left(\frac{K_m}{V_{max}}\right) \left(\frac{1}{[S]}\right) + \frac{1}{V_{max}}$$

entonces:

$$\frac{1}{V_{max}} = 90822 \text{ min /mM}^{-1}$$

Por lo tanto:

$$V_{max} = 1.10105E^{-5} \text{ mM/min}$$

Así también:

$$\frac{K_m}{V_{max}} = 1618.7 \frac{\text{mM}}{\text{mM/min}}$$

Despejando K_m :

$$K_m = \left(1618.7 \frac{\text{mM}}{\text{mM/min}}\right) V_{max}$$

entonces:

$$K_m = \left(1618.7 \frac{\text{mM}}{\text{mM/min}}\right) 1.10105E^{-5} \text{ mM/min}$$

de esta manera obtenemos:

$$K_m = 0.01782 \text{ mM}$$

igual a:

$$K_m = 17.8 \mu\text{M}$$

Para calcular la K_{cat} se utiliza la fórmula:

$$K_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]}$$

Donde $[E]$ es la concentración de la enzima lacasa en el tubo de reacción, por lo tanto:

$$K_{cat} = \frac{1.10105\text{E}^{-5}\text{mM}}{2.38\text{E}^{-8}\text{mM}}$$

$$K_{cat} = 7.710468 \text{ s}^{-1}$$

Para determinar la eficacia y especificidad enzimática se calcula la relación K_{cat}/K_m

$$\frac{K_{cat}}{K_m} = \frac{7.710468 \text{ s}^{-1}}{0.017822774 \text{ mM}}$$

$$\frac{K_{cat}}{K_m} = 432.62 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$$

En la tabla 8 se enlistan las constantes cinéticas de la enzima lacasa del hongo *Trametes versicolor*

V_{max} (mM M^{-1})	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$)
1.10E-05	17.8	7.7	432.6

Tabla 8. Constantes catalíticas para la enzima comercial lacasa del hongo *Trametes versicolor*.

En la tabla 9 se muestran las constantes catalíticas para lacasas de diferentes microorganismos de acuerdo con otros autores:

Microorganismo	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)	Referencia
<i>Pleurotus ostreatus</i>	90	5.8	64.8	Palmieri 1993
<i>Coprinus cinereus</i>	21	3.3	157	Yaver 1999
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	210	1.5	7.24	De-souza and Peralta 2003
<i>Agaricus blazei</i>	63	21	333.3	Ullrich 2004
<i>Myceliophthora thermophila</i>	51	35	686.3	Toledo 2013

Tabla 9. Tabla de constantes catalíticas para lacasas producidas por diferentes organismos para el sustrato ABTS.

La constante de Michaelis K_m es una medida de la concentración de sustrato necesaria para que se produzca una catálisis eficaz. Normalmente se asocia con la afinidad de la enzima por el sustrato, dicho de otra manera, la K_m es una medida inversa de la fuerza de unión de la enzima-sustrato, por lo cual a mayor K_m la generación del producto es baja; así mismo, cuando la K_m es baja la afinidad de la enzima por el sustrato es elevada. Comparada la enzima lacasa del hongo *Trametes versicolor* con lacasas de otros microorganismos (tabla 7), esta lacasa posee la K_m más baja, por lo cual se dice que existe una fuerte afinidad de esta enzima por el sustrato ABTS (mayor a la de las otras enzimas).

La constante catalítica K_{cat} es una medida directa de la producción catalítica de producto en condiciones óptimas, es decir, de saturación; la K_{cat} también puede interpretarse como el número de moléculas de sustrato transformadas por moléculas de enzima por segundo por lo que a veces también se le nombra número de recambio. La enzima lacasa del hongo *Trametes versicolor* tiene una K_{cat} de 7.7, lo que indica que un único centro activo puede transformar 7.7 moléculas del sustrato en un segundo, lo cual no parece ser un número muy alto, pero para determinar realmente la eficacia de la enzima se utiliza la relación K_{cat} / K_m .

Comparando la eficacia de las lacasas de la tabla 7 con la lacasa del hongo *Trametes versicolor*, esta presenta una eficacia muy alta, lo cual indica que la conversión del sustrato es más rápida y más eficiente.

8.- CONCLUSIONES

Se purificó y caracterizó a la enzima comercial lacasa del hongo *Trametes versicolor* estableciéndose las condiciones óptimas para la purificación de la enzima como lo fue la cromatografía de intercambio iónico la cual consistió en pasar una solución de la enzima lacasa en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7.0 por una columna de intercambio iónico Mono Q s/50 GL la cual contiene una matriz de poliestireno divinilbenceno con moléculas de una amina secundaria $-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)$ a una velocidad de flujo de 1 mL/min.

Se realizó el gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para comprobar la pureza de la enzima, para lo cual se elaboró un gel que consiste en dos partes, la parte concentradora al 4% y una parte separadora al 10%; en él se pudo observar que la enzima lacasa se purificó tras la cromatografía de intercambio iónico.

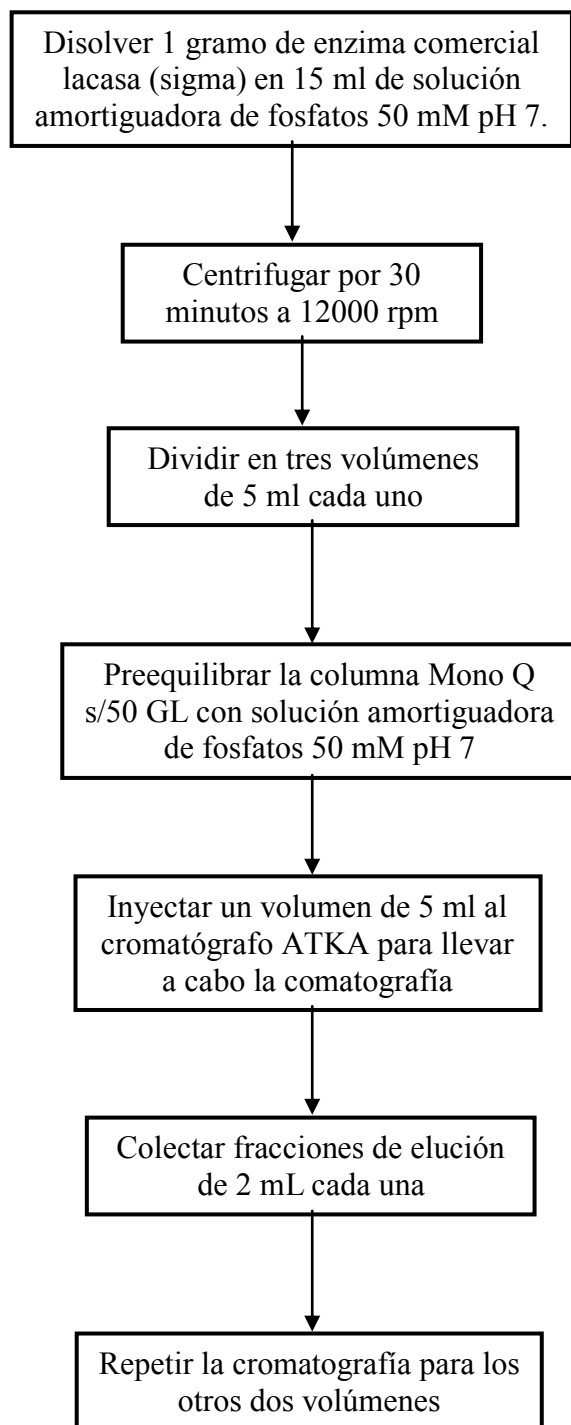
Por medio de una cinética enzimática se determinó que la enzima lacasa del hongo *Trametes versicolor* tiene una K_m relativamente baja lo que indica que la disociación del complejo enzima-sustrato para la formación del producto es un tanto lenta, así mismo esta enzima tiene una K_{cat} de 7.7, lo que indica que un único centro activo puede transformar 7.7 moléculas del sustrato en un segundo, sin embargo la relación K_{cat} / K_m que determina la eficacia de la enzima es de $432.6 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ lo que representa una eficacia muy alta.

La eficacia y especificidad de la enzima lacasa de hongo *Trametes versicolor* sugiere que esta enzima puede ser potencialmente útil para muchas aplicaciones biotecnológicas como la biorremediación, en la industria textil, en la industria alimenticia, en la elaboración del papel y otras.

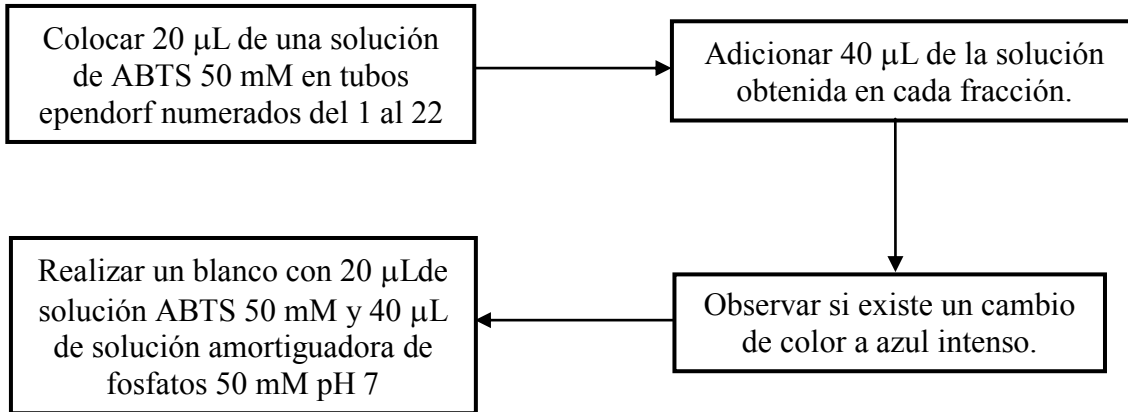
9.- ANEXOS

9.1 DIAGRAMAS DE FLUJO

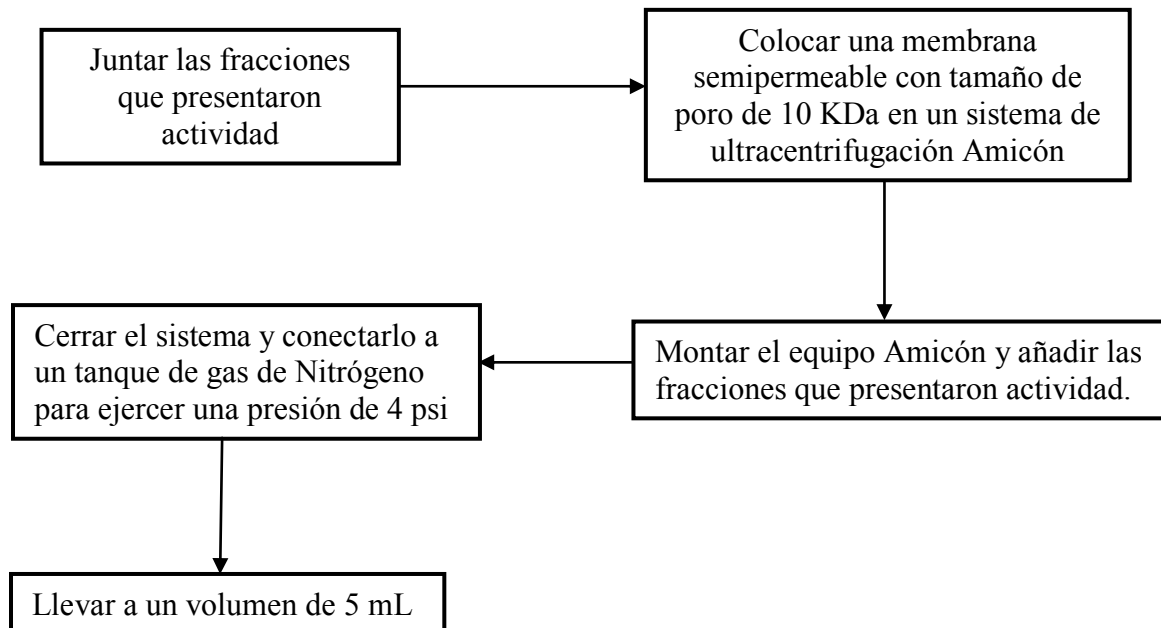
9.1.1 Diagrama de flujo para la primer cromatografía.



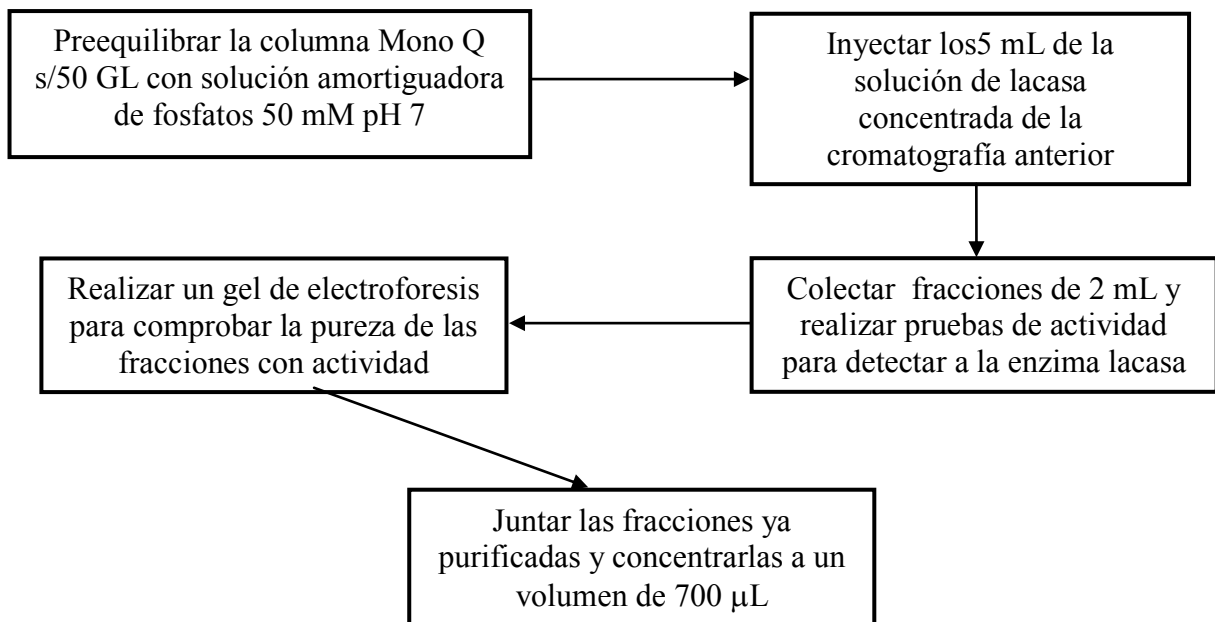
9.1.2 Diagrama de flujo para las pruebas de actividad



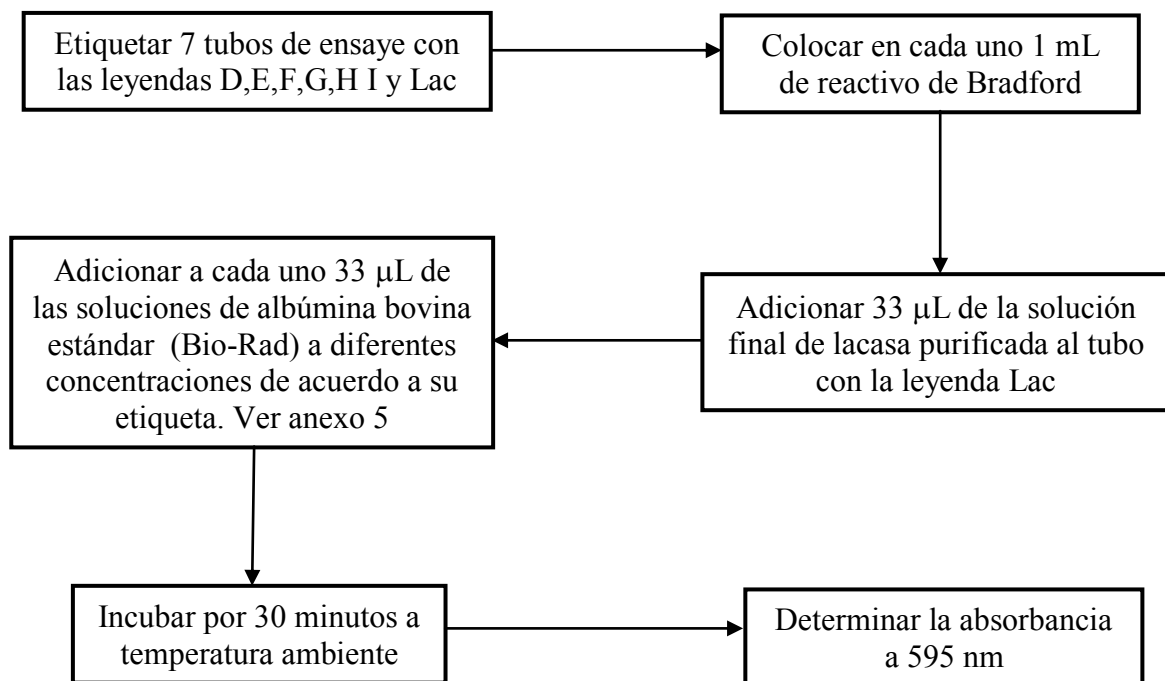
9.1.3 Diagrama de flujo para la ultraconcentración de la solución de lacasa



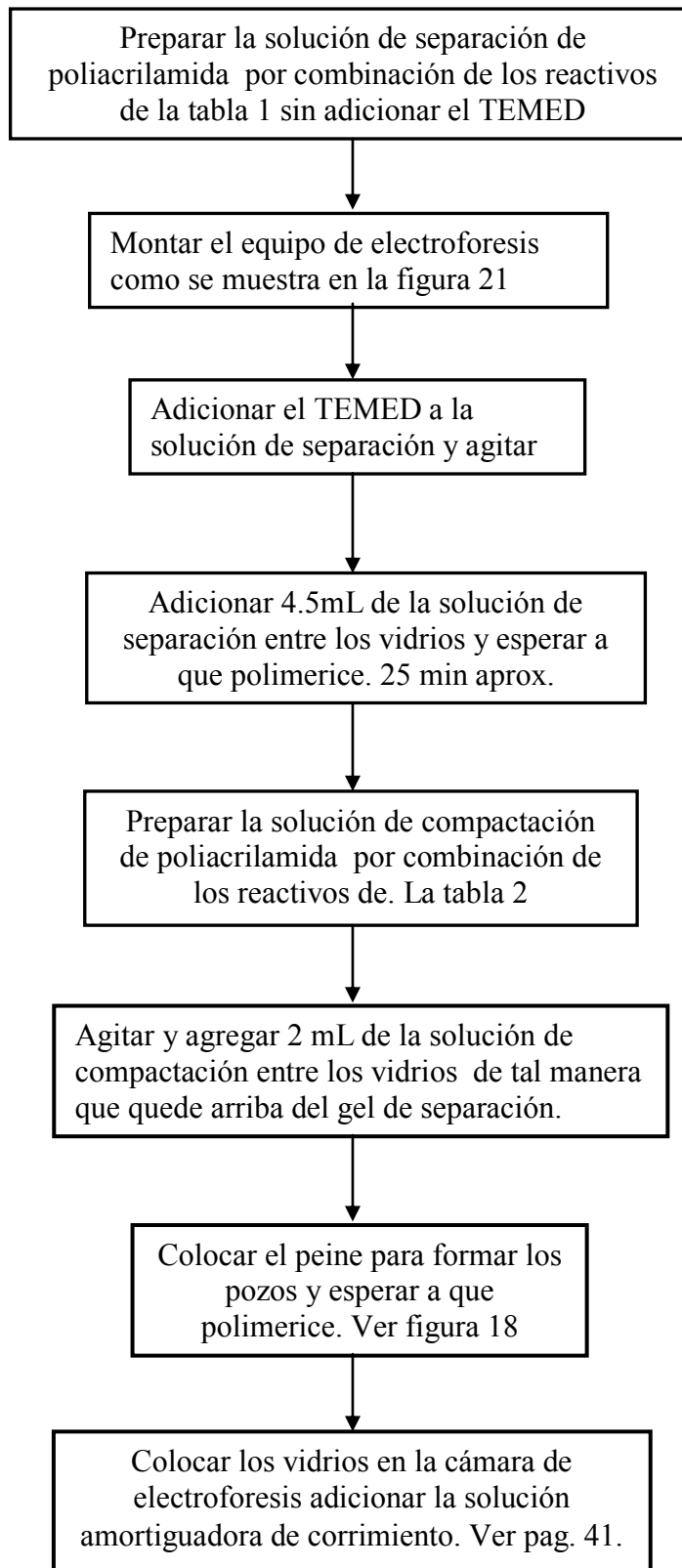
9.1.4 Diagrama de flujo para la recromatografía

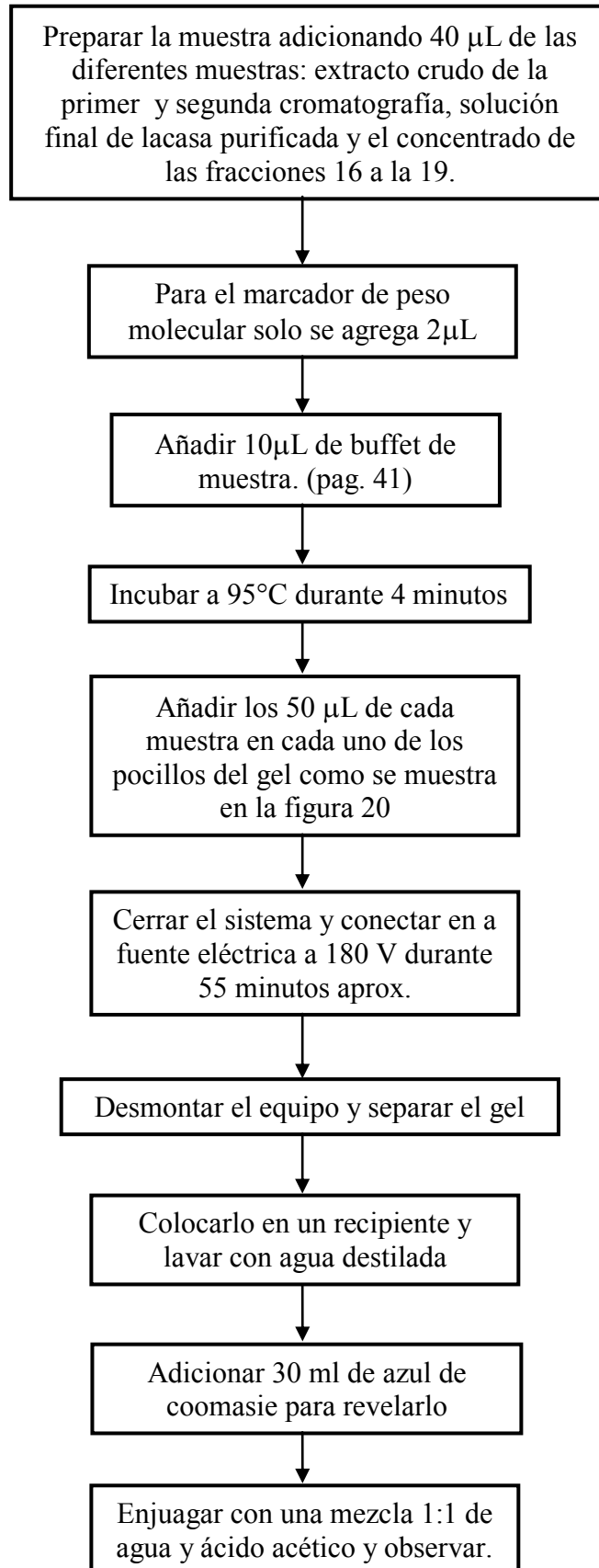


9.1.5 Cuantificación por el método de Bradford

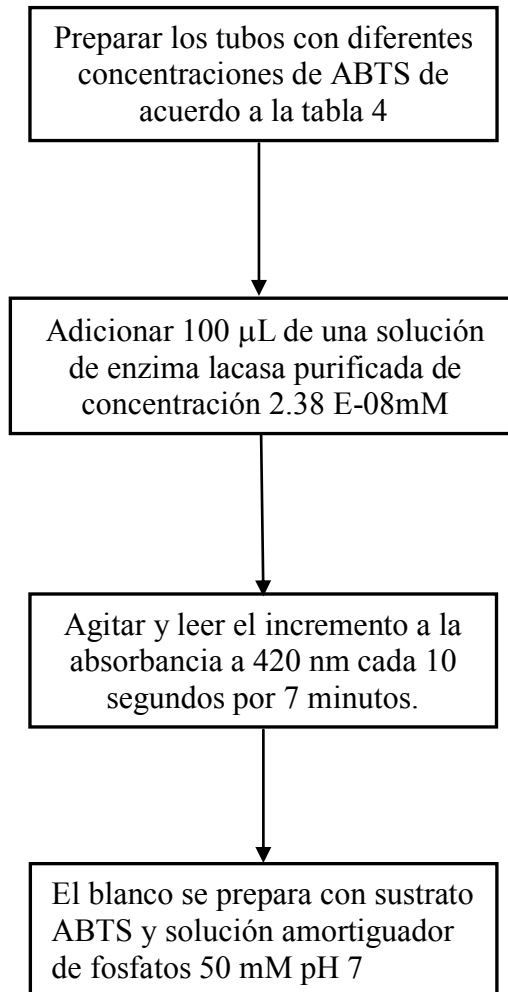


9.1.6 Diagrama de flujo para el gel de electroforesis SDS-PAGE





9.1.7 Diagrama de flujo para la cinética enzimática



9.2 Índice de figuras

Figura 1	Fórmula estructural general de los aminoácidos.....	5
Figura 2	Imagen de la formación de un zwitterion.....	6
Figura 3	Formación del enlace peptídico.....	11
Figura 4	Estructura primaria de las proteínas.....	12
Figura 5	Estructura secundaria de las proteínas α -helice.....	13
Figura 6	Estructura secundaria de las proteínas Hoja plegada β	14
Figura 7	Estructura terciaria de las proteínas.....	16
Figura 8	Estructura cuaternaria de las proteínas.....	17
Figura 9	Desnaturalización y renaturalización de la ribonucleasa.....	18
Figura 10	Esquema de cromatografía de intercambio iónico.....	22
Figura 11	Sistema de concentración amicón.....	23
Figura 12	Estructura terciaria de la enzima la casa LacIIIb.....	27
Figura 13	Pruebas de actividad cualitativa de la enzima lacasa con el sustrato ABTS.....	48
Figura 14	Reacción de óxido reducción del ABTS.....	48
Figura 15	Imagen del gel de electroforesis. (SDS-PAGE).....	49
Figura 16	Imagen del complejo proteína-colorante en el método de Bradford.....	50
Figura 17	Cálculo de la velocidad inicial para la cinética enzimática.....	51
Figura 18	Elaboración del gel de electroforesis.....	71
Figura 19	Formación de los pocillos en el gel de electroforesis.....	71
Figura 20	Llenado de los pocillos en el gel de electroforesis.....	71
Figura 21	Equipo montado para la electroforesis en gel de poliacrilamida.....	71

9.3 Índice de Tablas

Tabla 1	Clasificación y propiedades de los aminoácidos.....	7
Tabla 2	Reactivos y cantidades para el gel de separación.....	42
Tabla 3	Reactivos y cantidades para el gel de compactación.....	42
Tabla 4	Diluciones del sustrato ABTS para la cinética enzimática.....	44
Tabla 5	Datos de la curva de calibración con albúmina estándar.....	51
Tabla 6	Velocidades iniciales a cada concentración de sustrato.....	54
Tabla 7	Datos para la representación doble inversa de Lineweaver-Burk.....	56
Tabla 8	Constantes catalíticas para la enzima lacasa del hongo <i>Trametes versicolor</i>	58
Tabla 9	Tabla de constantes catalíticas de lacasas producidas por diferentes organismos..	59

9.4 Índice de Gráficas

Gráfica 1 Energía de activación para una reacción catalizada o no por una enzima.....	34
Gráfica 2 Cromatograma de la primer cromatografía de intercambio iónico.....	46
Gráfica 3 Cromatograma de la segunda cromatografía de intercambio iónico.....	47
Gráfica 4 Curva de calibración de albúmina bovina estándar por Bradford.....	51
Gráfica 5 Comportamiento micaleano de la enzima lacasa [sustrato] vs V_o	54
Gráfica 6 Representación de Lineweaver-Burk.....	56

9.5 Índice de Abreviaturas

ABTS	2'2-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-6-sulfónico]
AND	Ácido desoxirribonucleico
β ME	β mercaptanoetanol
CuT1	Cobre tipo 1
CuT2	Cobre tipo 2
CuT3	Cobre tipo 3
ΔG°	Energía libre
DMAPN	3-dimetilaminopropionitrilo
DMP	2,6-dimetoxifenol
E	Enzima
[E]	Concentración de enzima
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
ES	Complejo enzima-sustrato
EU	Unidad de actividad enzimática
FPLC	Fast Protein Liquid Cromatography
HPA's	Hidrocarburos policíclicos aromáticos
Kcat	Constante catalítica
KDa	Kilodaltons
Km	Constante de Michaelis
K1	Constante de formación del complejo enzima-sustrato
K2	Constante de formación del producto
Lac.	Lacasas
Li	Lignino Peroxidasas
λ_{ABTS}	Longitud de onda para el ABTS
mAu	Miliunidades de absorbancia
MiP	Magnesoperoxidasas
μ L	Micromolar
mM	Milimolar
nm	Nanómetros
OH	Grupo hidroxilo
P	Proteína
PAGE	Electroforesis un gel de poliacrilamida
pH	Potencial de hidrógeno
pI	Punto isoeléctrico
pKa	Constante de acidez
PSA	Persulfato de amonio
rpm	Revoluciones por minuto
S	Sustrato
SDS-PAGE	Electroforesis un gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
TEMED	N,N,N,N'-tetrametilen-diamina
Vmax	Velocidad máxima
Vo	Velocidad inicial

9.6 Figuras para el gel de electroforesis (PAGE-SDS)



Fig. 18 La imagen muestra la elaboración de la parte concentradora del gel cuando se le inserta el peine para formar los pocillos

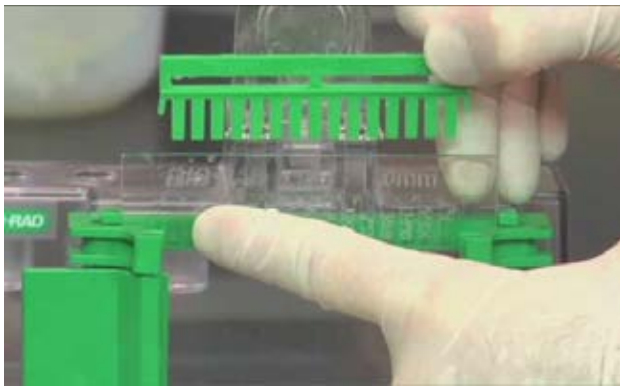


Fig. 19 Se Muestra la formación de los pocillos una vez que se ha polimerizado el gel y se retira el peine.

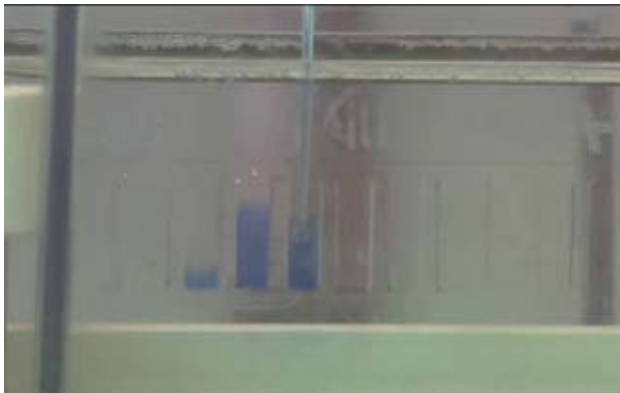


Fig. 20 La imagen muestra la forma en que se llenan los pocillos con la muestra.

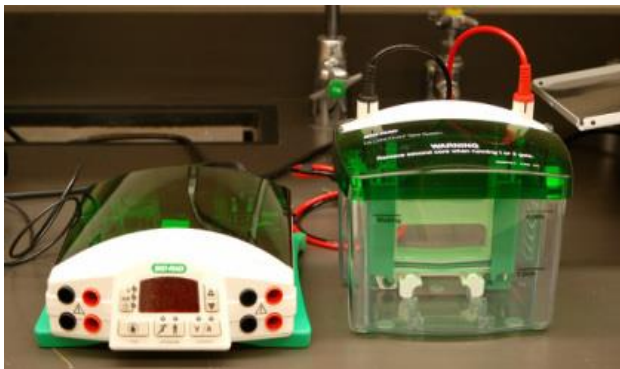


Fig. 21 La imagen muestra como se monta el equipo para llevar a cabo la electroforesis cuando se conecta a una fuente eléctrica.

10.- BIBLIOGRAFIA

- Acosta N., Beldarraín A., y col. Caracterización estructural de proteínas recombinantes integrando diversos métodos e implicaciones en sus procedimientos de obtención y aplicación. *Biotecnología aplicada*. Vol. 18, Num 2. 2001. pp 97-98
- Alpenfels, W. et.al. (1998). Novel experimental technology, assignee. Plastic mold for electrophoresis gel. US patent 5,753,095.
- Andreasson L. E., Bräden R. y Reinhammar B. (1979) *Biochemical and Biophysica*. 568, 145-156.
- Arana, Ainhoa. (2003). Aspectos generales de la biodegradación de la madera: aplicaciones industriales de la lacasa. *Biotecnología*. México. pp 40-55.
- Angostelli, E. et. al. (1995). Stability of Japanese-lacquer-tree (*Rus vernicefera*) laccase to thermal and chemical danaturisation: comparison with ascorbate oxidase. *Journal of Biochemistry*. 306:697-702.
- Baldrian, P. (2005). Fungal laccases ocurrence and properties. *FEMS Microbiology Rev*. 30:215-242.
- Berg Jeremy. (2008). *Bioquímica* 6ª edición. Editorial Reverté. España.. 65-77
- Berka R. M., Schneider P., Golightly E. J., Brown S. H. (1997). Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(8), 3151-3157.
- Bertrand G. (1985) Sur la laccase et sur le pouvoir oxydant de cette diastase *CR Acad. Sci. Paris*. 120, 266-269.
- Bohlin, C., Jonsson.(2006). Heterologous expression of *Trametes versicolor* lacasse in *Pichia pastoris* and *Aspergillus niger*. *Applied biochemical biotechnology*. 129.132 pp 195-204
- Brown, M.A., Zhao, Z. (2002). Expression and characterization of a recombinant multi-copper oxidase: lacasse IV from *Trametes versicolor*. *Inorgánica chimica*. 331: 232-238.
- Chávez MA., et.al (1990). *Temas de enzimología*. Tomo 2. Facultad de Biología Universidad de La Habana.

- Dávila, G y Vázquez-Duhalt, R. (2006). Enzimas ligniolíticas fúngicas para fines ambientales. Mensaje Bioquímico, Vol.XXX. Depto Bioquímica. Fac. Medicina, UNAM. pag 29-55
- Díaz, Silva. (2008). Expresión heteróloga del gen *laccα* que codifica para una lacasa de *Trametes versicolor* en las levaduras *Kluyveromyces lactis*, *Pichia pastoris* y *Yarrowia lipolytica*. Tesis de maestría. Morelos. Pp 4-15.
- De-souza, S.C and Peralta R. (2003). Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. Journal Basic Microbiology 43(4): 278-286.
- Ducros, V., et.al. (1998). Crystal structure of the type-2 depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. Nat. Struct. Biol. 5:310-315.
- Gaal, O. et.al. (1984). Electrophoresis in the separation of biological macromolecules. Akademiai Kiado Budapest: Jhon Wiley & Sons.
- Garavaglia S., Cambria M. T., Miglio M., Ragusa S., Lacobazzi V., Palmieri F., D' Ambrosio C., Scaloni A. y Rizzi M. (2004) Journal of Molecular Biology. 342, 1519-1531.
- García, H. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: Fundamentos, actualidad e importancia. Laboratorios Beterá. Univ Diag.1(2):31-41.
- Gardiol A. E., Hernández R. J. y Harte B. R. (1998) United States Patent. 5,804,401.
- Garfin. D. (1990). One dimensional gel electrophoresis. Methods in enzymology. Vol.182. Academy Press.
- Gianfreda, L., Xu, F. and Bollag, J.M. (1999). Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. Biorem. J. 3:1-25.
- Giardina, P., et.al. (2007). Structural characterization of heterodimeric laccases from *Pleurotus ostreatus*. Applied Microbiology Biotechnology. 75:1293-1300.
- Kunamneni A. (2007). Fungal laccase – a versátil enzyme for biotechnological applications. Applied Microbiology. Spain 233-245.
- Laemmli U. K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature, 227:680.
- Lehninger Albert. (1995). Bioquímica 2ª Edición. Editorial Omega. España. 161-218.

- Leonowics, A. et.al (1999). Biodegradation of lignin by White-rot fungi. *Fungal Genetic Biology*. 27:175-185
- Loera Corral O. (2004). Determinación de patrones de inducción de lacasas del hongo *Trametes* sp. EUM1. UAM. Tesis de doctorado.
- López Cruz I. (2007). Efecto de la temperatura y disolventes orgánicos sobre la actividad de la enzima lacasa de *Myceliophora thermophila* modificada con polietilenglicol. UAM. Tesis de doctorado.
- Majcherczyk, A., Johannes, and A. Hüttermann. (1998). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PHA) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.* 22: 335-341.
- Márquez, Eduardo. (2004). Determinación de patrones de inducción de lacasas en el hongo *Trametes* sp EUM1. México. Tesis UAM-I. pp 5-16.
- Mathews Christopher. *Bioquímica 3ª Edición*. Editorial Pearson Addison Wesley. España 2002. 141-232.
- Mayer A.M. and Staples R.C., Laccase: new functions for an old enzyme *Phytochemistry*. 60, (2002) 551-65.
- Martínez, A.T. et. al. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol. Research Review*. 8:195-204.
- Medina, E. (2003). Caracterización de lacasas producida por un hongo termofílico silvestre aislado a partir de desechos lignocelulósicos. Tesis de maestría UAM-I. México.
- Mester, T. y Field, J. A. (1998). Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese. *Journal Biology Chemical*. 273:15412-15417.
- Moi M. et. al. (1999). Horizontal gel electrophoresis casting cassette. US patent 5 938 906.
- Müller-Esterl *Bioquímica: Fundamentos para la medicina y ciencias de la vida*. Editorial Reverté. España 2008. 79-114.
- Palmieri, G., et. al. (1993). A novel White laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biological Chemistry*.

- Pickard, M. A. et. al. (1999). High production of ligninolytic enzymes from white rot fungi in cereal bran liquid medium. *Journal. J. Microbiol.* 45:627-631.
- Pionteck, K., Antorini, M. y Choinowski, T. (2002). Cristal structure of laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1:90 Å resolution containing a full complement of coppers. *Journal Biology Chemical.*
- Pointing, S.B. (2001) Feasibility of bioremediation by White rot fungi. *Applied Microbiology Biotechnology.* 57: 20-33.
- Rodríguez, C,S, Toca, H.L.J. (2006). Industrial and Biotechnological applications of laccases: A Review. *Biotechnology Adv.* 24: 500-513.
- Sato Y., Wulli B., Sederoff R. y Wetten R. (2001) *Journal of Plant Research.* 114, 147-155.
- Solís M., Ugalde V., González I., and Viniestra G. (2005). An electrochemical-spectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediator 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by immobilized laccase, *Journal. of Electroanalytical Chemistry* 579 59-66.
- Thurston, C.F. (1994). The structure and function of fungal laccase. *Microbiology.* pp 19-26.
- Toledo Núñez (2013). Desnaturalización térmica de una lacasa de cobre azul: formación de un estado desnaturalizado compacto con estructura residual ligada a cambios de pH en la región de protonación de histidinas. UAM. Tesis de doctorado.
- Ullrich R. et al. (2005). Laccase from the medicinal mushroom *Agaricua blazei*: Production, purification and characterization. *Applied Microbiology Biotechnology* 67(3): 357-363
- Voet, Donald. Voet Judith. (1990). *Fundamentos de Bioquímica.* Editorial Médica Panamericana. Pp 95-107.
- Xiao Y., et.al (2003). Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of laccase from basidiomycete *Trametes* sp. Strain AH 28-2. *Applie Microbiology and biotechnology* 2003. 60:700-707.
- Yaver, D. et.al (1999). Molecular characterization of laccase genes from Basidiomycetes *Coprinus cinereus* and heterologous expression of the laccase Lcc1. *Applied and Environmental Microbiology.*
- Yoshida H. (1983) *Journal of the American Chemical Society.* 43, 472-486.