

# DETERMINACIÓN DE pI DE HIDROLASAS SECRETADAS POR HONGOS *OPHIOSTOMATALES*

Sergio Iván Dueñas Vera (1), Julio César Villagómez Castro (2)

1 [Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato, Noria Alta s/n, C.P. 37000, Gto, Gto.] | Dirección de correo electrónico: [sergio.bons@hotmail.com]

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [castroj2407@hotmail.com; castroj@ugto.mx] (Candara o pts. Color blanco 50%)

## Resumen

Los hongos del orden Ophiostomatales son organismos saprobios y, algunos de ellos parásitos, que ocasionan daños en árboles maderables como el pino ya sea por efecto de daño directo a la albura o por la coloración (manchado azul) de la misma. Su estudio se ha abordado desde enfoques moleculares y bioquímicos. Un método alternativo de estudio y que al mismo tiempo sirve para separar proteínas, es el isoelectrofoque y la determinación del pI de las proteínas. En este trabajo se determinó el pI de algunas hidrolasas ácidas secretadas por *Ophiotoma piceae* en medio de cultivo mínimo (medio de Mathur) adicionado de diferentes fuentes de carbono: xilana, glucosa o alga Nori. El patrón de actividades recuperadas en el medio de cultivo libre de células fue muy complejo, presentándose pI principalmente en el rango de pH 3 a 5, y dependiente de la fuente de carbono empleada para su inducción. La xilana adicionada al medio mínimo a una concentración del 1%v p/v resultó una fuente de carbono óptima para la inducción de hidrolasas secretadas por este hongo, sugiriendo que en un futuro es necesario realizar un estudio más detallado de este efecto.

## Abstract

The fungi in the order Ophiostomatales are saprobios organisms and some of them are parasites causing damage to timber such as pine by effect either direct damage or sapwood staining (stained blue) thereof. Their study has been addressed from molecular and biochemical approaches. An alternative method of study and at the same time serves to separate proteins, it is isoelectric focusing and determining of the pI of proteins. In this work the pI of some acid hydrolases secreted by *Ophiotoma piceae* were determined in minimal media (through Mathur) added of different carbon sources: xylan, glucose or Nori. The recovered pattern in cells free culture medium was very complex. Enzymatic activities reveled pI mainly in the pH range 3 to 5, and dependent on the carbon source used for induction. Xylan added to minimal media at a concentration of 1% w / v resulted the carbon source of choice for induction of hydrolases secreted by the fungus, suggesting that in future need a more detailed study of this effect.

## INTRODUCCIÓN

La carga eléctrica de una molécula es la resultante de las cargas de todos sus grupos ionizables. Las moléculas cuya carga eléctrica neta es positiva, negativa o cero, según el pH del medio, se denominan *anfolitos*. Pueden ser aminoácidos, nucleótidos o proteínas. Esta propiedad se aprovecha en técnicas bioquímicas de separación de moléculas, al colocar estas últimas en un líquido amortiguado con anfolitos al que se le aplica corriente eléctrica para generar un gradiente de pH en el cual migran las moléculas hasta alcanzar un punto donde la carga eléctrica neta de la molécula es cero, denominado *punto isoelectrico (pI)*.

El género *Ophiostoma* es el más grande de los cuatro géneros teleomórfos de la familia Ophiostomatacea. La mayoría de los hongos que conforman las aproximadamente 160 especies del género *Ophiostoma*, son saprófitos que habitan la madera. Los hongos de la mancha azul que incluyen, además del género *Ophiostoma*, los géneros *Ceratocystis*, *Leptographium* y *Sphaeropsis*, contienen en sus hifas y conidios melanina, sustancia responsable de la coloración que éstas promueven en la madera colonizada al secretarla al medio circundante (Scheffer 1973, Zimmerman *et al.* 1993, Zink y Fengel 1988).

Los hongos del género *Ophiostoma* promueven la ocurrencia de la mancha azul en madera de coníferas, afectando significativamente la calidad y apariencia en los productos de madera. Para la prevención de la mancha azul se han empleado productos químicos de diferente naturaleza. El control biológico de la mancha azul con cepas albinas del género *Ophiostoma* aparece como una alternativa de promisorio potencial. Algunos de estos hongos cuando son cultivados en medio líquido presentan un crecimiento dimórfico, con alta proporción de micelio, que dificulta su utilización. El dimorfismo, transformación reversible de las morfologías levadura y micelio, es controlado por factores químicos y del entorno.

Los hongos causantes del azulado de madera mayoritariamente metabolizan sustancias de reserva de las células leñosas, principalmente monosacáridos de la pared celular (Troya *et al.*, 1990). No obstante, se ha observado que estos

hongos son capaces de degradar en menor medida polisacáridos y pectinas. Las especies de *Ceratocystis* y *Ophiostoma* son capaces de metabolizar todo tipo de monosacáridos, ya sean hexosas o pentosas (glucosa, manosa, galactosa, fructosa, xilosa y arabinosa).

*Ophiostoma piceae* es un hongo de la mancha azul de la madera que crece en la albura de los troncos de coníferas y madera. *O. piceae* es un saprobio que se dispersa por los escarabajos de la corteza como aquellos del género *Dendroctonus*. Esta especie de hongo ha sido reportada en América del Norte, Europa y Asia y normalmente se establece en el interior del árbol a dos a tres centímetros del inicio de la albura. Las especies del complejo de *O. piceae* han retenido la atención de los investigadores de la industria de madera, ya que causan manchas también en madera procesada y son las especies de hongos más comúnmente aisladas de manchas de savia en aserraderos canadienses.

Las hidrolasas son enzimas que catalizan reacciones que implican la ruptura hidrolítica de enlaces químicos. Particularmente, la enzima  $\beta$ -glucosidasa cataliza la hidrólisis de  $\beta$ -D-glucopiranosidos para liberar azúcares como la glucosa a partir de celobiosa o en los extremos reductores de oligosacáridos de glucosa. Juega un papel importante en la degradación de carbohidratos, representando un aporte significativo en la patógenesis y energética de los microorganismos. Papeles semejantes presentan la  $\beta$ -xilosidasa, la pectinasa y la celobiosidasa sobre sus sustratos respectivos: xilana, pectina y celulosa,

En el presente estudio, se determinó el punto isoelectrico de varias hidrolasas fúngicas determinando la actividad enzimática extracelular en las fracciones recuperadas en el Rotofor® y el pH en un potenciómetro.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismo y condiciones de cultivo.

Se utilizó la cepa de *Ophiostoma piceae* mantenida en medio YPD líquido o sólido a pH 4.5 y 28°C. Para comparar las actividades secretadas

por el hongo se inoculó en medio mínimo adicionada de xilana 1%, alga Nori 0.1% y Glucosa 0.2% p/v. Los inóculos fueron de 25000 conidios/mL. Los medios con xilana 1% y glucosa 0.2% se incubaron a 28°C durante 10 días y el medio con alga Nori 0.1% únicamente 3 días.

### Recuperación de las muestras

Al término de la incubación se recuperó el medio de cultivo sobrenadante y se filtró al vacío a través de papel filtro Whatman #1. El filtrado se recuperó y las muestras se centrifugaron a 20,000 x g durante 15 minutos.

### Concentración de las muestras

Las muestras centrifugadas se liofilizaron durante 8 horas aproximadamente. Después se resuspendieron en 5 mL de agua desionizada y se eluyeron en una columna de BioGel-P6 (Volumen total, 40 mL).

### Obtención de las fracciones enzimáticas

Las muestras recolectadas de la columna, aproximadamente 8 mL se mezclaron con 1.2 mL de anfolitos (Sigma, pH 3-10) y se procesaron en el Rotofor® (Figura 1.) durante 3-4 horas hasta su enfoque completo (sin evidencia de cambio en la conductividad de la muestra durante 20 minutos) y se colectaron en 20 fracciones utilizando el colector del equipo (Figura 2). El isoelectroenfoco se repitió con las tres muestras recuperadas de los cultivos en medio mínimo adicionados de xilana, alga nori y glucosa (usado como control).



Figura 1: Rotofor



Figura 2: Colector de fracciones.

### Determinación de actividad β-D-Xilosidasa

La mezcla de reacción: (hasta completar 200 μl como volumen final) contenía:

5 μl de 4-metilumbeliferil β-D-xilopiranosido 5 mM, como sustrato.

15 μl de muestra.

180 μl de regulador citratos fosfatos 100 mM pH 5.5

Después de incubar durante 45 minutos a 60°C y la reacción se detuvo por la adición de 2.5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.5 M pH 10.4, y se incubó por 5 minutos en oscuridad. Posteriormente se midió la fluorescencia emitida por la metilumbeliferona liberada utilizando una λ de excitación de 350 nm y de emisión de 440 nm. La concentración de 4-MU liberada se calculó con base en una curva de calibración preparada bajo condiciones semejantes.

### Determinación de actividad de β-D-glucosidasa

La mezcla de reacción: (hasta completar 200 μl como volumen final) contenía:

2.5 μl de 4-metilumbeliferil-α-D-glucósido 0.2 mM como sustrato.

15 μl de muestra.

183 μl de regulador citratos fosfatos 100mM pH 5.5

Después de incubar durante 30 minutos a 37°C; y la reacción se detuvo por adición de 2.5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.5 M pH 10.4, y se incubó 5 minutos en oscuridad. Posteriormente se midió la fluorescencia emitida por la metilumbeliferona liberada a una λ de excitación de 350 nm y de emisión de 440 nm. La concentración de 4-MU liberada se calculó con base en una curva de calibración preparada bajo condiciones semejantes.

### Determinación de actividad de 1,4-celobiohidrolasa

La mezcla de reacción: (hasta completar 200 μl como volumen final) contenía:

5 μl de 4-metilumbeliferil-celobiosido 0.4 mM como sustrato.

15 μl de muestra.

180 μl de regulador citratos fosfatos 100 mM, pH 5.5

Después de incubar por 30 minutos a 45°C, las mezclas de reacción se adicionaron con 2.5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.5 M pH 10.4 y se incubaron 5 minutos en oscuridad. Posteriormente se midió la fluorescencia emitida por la metilumbeliferona liberada a una  $\lambda$  de excitación de 350 nm y de emisión de 440 nm. La concentración de 4-MU liberada se calculó con base en una curva de calibración preparada bajo condiciones semejantes.

### Ensayo de azúcares reductores (ensayo de DNS). para Pectinasa

La mezcla de reacción contenía:

50  $\mu$ l pectina 0.5% p/v.

100  $\mu$ l de muestra

200  $\mu$ l de regulador acetatos pH 5, 100 mM

Después de incubar las mezclas de reacción por 1h a 37°C, se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se tomaron 300  $\mu$ l y se mezclaron con 300  $\mu$ l de ácido-3,5-dinitrosalicílico adicionado de 3  $\mu$ l de metabisulfito de sodio 50 mg/ml (10  $\mu$ l de metabisulfito de sodio por cada mL de DNS). Después de calentar los tubos en baño a ebullición por 10 minutos, se enfriaron en baño de hielo por 2 minutos y se añadieron 100  $\mu$ l de tartrato de sodio y potasio al 40% p/v y 1.3 mL de agua destilada. El color liberado se midió en un espectrofotómetro utilizando una longitud de onda de 540 nm y se calculó la pectina hidrolizada utilizando una curva de calibración preparada con glucosa.

### Determinación de pH y Densidad Óptica

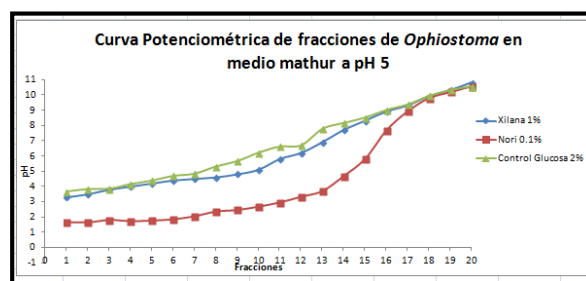
Adicionalmente a la determinación de las actividades enzimáticas se calculó el pH de cada fracción con el potenciómetro y al mismo tiempo se determinó la absorbencia a 280 nm para determinar espectrofotométricamente la proteína presente en cada fracción.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

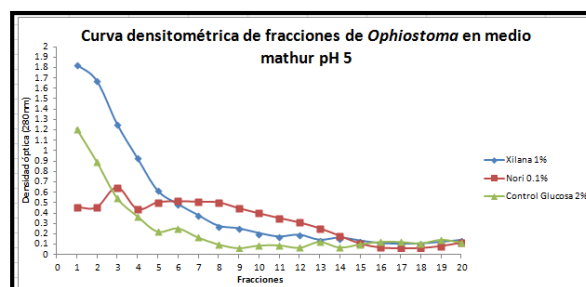
Inicialmente al realizar el recuperado de muestras se realizaron ensayos de actividad de las 4 enzimas ( $\beta$ -D-xilosidasa,  $\beta$ -D-glucosidasa, celobiohidrolasa y pectinasa) dando resultados de actividad significativos que posteriormente tras una

separación en el sistema Rotofor se determinó la actividad, el pH y la proteína en cada fracción.

Como se muestra en las Grafica 1 y 2., el pH de las fracciones recuperadas del medio adicionado con xilana y glucosa se observa como una línea recta, mientras que la del medio adicionado con alga Nori presentó un comportamiento diferente, un mayor número de fracciones con pH ácido, mientras que la proteína (D.O. 280 nm) se reparte preferencialmente en la región de pH ácido.

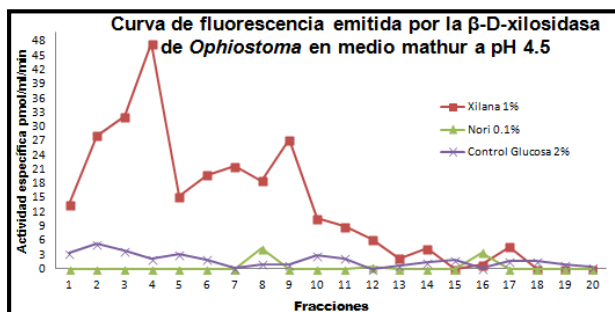


**Gráfico 1.** pH de las fracciones recuperadas después del isoelectoenfoque en el Rotofor. Se analizaron los diferentes medios de cultivo libres de células (*O. piceae*) adicionados de xilana 1%, alga Nori 0.1% y glucosa 0.2%.



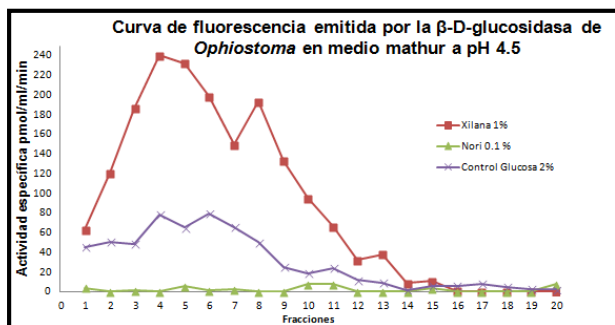
**Gráfico 2.** Perfil de proteína (DO 280 nm) de las fracciones recuperadas después del isoelectoenfoque en el Rotofor. Se analizaron los diferentes medios de cultivo libres de células (*O. piceae*) adicionados de xilana 1%, alga Nori 0.1% y glucosa 0.2%.

Como se observa en el Grafico 3, la actividad de xilosidasa presentó dos picos de actividad con pl de 4 y 4.2 cuando el hongo se creció en presencia de xilana, mientras que en el control y en el cultivo con alga Nori no se recuperó actividad enzimática.



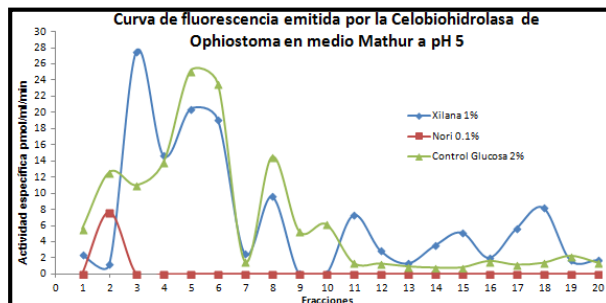
**Gráfico 3.** Actividad de xilosidasa recuperada en las fracciones enfocadas en el Rotofor. Se analizaron los diferentes medios de cultivo libres de células (*O. piceae*) adicionados de xilana 1%, alga Nori 0.1% y glucosa 0.2%.

En lo que respecta a la actividad de glucosidasa también se recuperó un perfil con dos picos de actividad enzimática a pH ácido en el cultivo con xilana y una ligera actividad en el control. Igualmente en las fracciones cultivadas con alga Nori no se recuperó actividad alguna (Gráfica 4.).



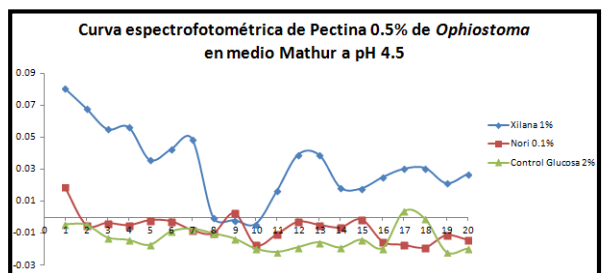
**Gráfico 4.** Actividad de glucosidasa recuperada en las fracciones enfocadas en el Rotofor. Se analizaron los diferentes medios de cultivo libres de células (*O. piceae*) adicionados de xilana 1%, alga Nori 0.1% y glucosa 0.2%.

En el caso de la celobiohidrolasa el patrón de actividad fue muy irregular mostrando en el cultivo realizado con xilana un patrón de 6 picos de actividad y con alga Nori un patrón de 3 picos mientras que el control mostro un solo pico a pH ácido. Los picos de actividad en los otros medio presentaron una heterogeneidad muy grande en cuanto al pl correspondiente a los picos de actividad (Gráfica 5.).



**Gráfico 5.** Actividad de celobiohidrolasa recuperada en las fracciones enfocadas en el Rotofor. Se analizaron los diferentes medios de cultivo libres de células (*O. piceae*) adicionados de xilana 1%, alga Nori 0.1% y glucosa 0.2%.

Como se muestra en la Gráfica 6., la actividad de pectinasa solamente se secretó cuando el hongo se cultivó en presencia de xilana, mientras que en glucosa o alga Nori no se recupero actividad. El patrón de actividad obtenido en presencia de xilana presenta 3 picos de actividad, uno neutro y dos en pH ácido, manifestando un posible patrón enzimático complejo.



**Gráfico 6.** Actividad de pectinasa recuperada en las fracciones enfocadas en el Rotofor. Se analizaron los diferentes medios de cultivo libres de células (*O. piceae*) adicionados de xilana 1%, alga Nori 0.1% y glucosa 0.2%.

## CONCLUSIONES

El análisis de hidrolasas ácidas secretadas por *O. piceae* presenta un patrón complejo en función de su pl el cual depende además de la fuente de carbono usada en el medio mínimo; xilana, alga Nori o glucosa, sugiriendo que la xilana es un mejor inductor de actividades enzimáticas secretadas por este hongo.



## AGRADECIMIENTOS

El presente proyecto se realizó gracias al apoyo de la Universidad de Guanajuato otorgado al Dr. Julio César Villagómez Castro por la DAIP en su convocatoria 2014 y la beca otorgada al estudiante de QFB Sergio Iván Dueñas Vera.

Hacemos patente nuestro reconocimiento al apoyo brindado por los integrantes de los laboratorios del Dr. Julio César Villagómez Castro y Dr. Alberto Flores Martínez del Departamento de Biología de la DCNE de la Universidad de Guanajuato.

## REFERENCIAS

[1] Fuentes X., Castiñeiras M.J., Queraltó J.M., (1998), Bioquímica clínica y patología molecular, Barcelona, Vol. 1, pp. 169.

[2] Berroca, Alexander; Navarrete, José y Oviedo, Claudia. (2012). Efecto de diferentes condiciones de crecimiento en el dimorfismo levadura-micelio de la cepa albina PcF2A29 de la especie *Ophiostoma piceae*. Maderas, Cienc. tecnol. [online]. vol.14, n.1, pp. 91-102. ISSN 0718-221X. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-221X2012000100008>.

[3] Villarreal M, Troya M.T., Linares F, Rubio V, Muñoz-Mingarro D, Pozuelo MJ, De Acero N, Rodríguez-Borrajó C, Rubio F, González V, Navarrete A. (2010). CARACTERIZACIÓN DE HONGOS CAUSANTES DE AZULADO EN Pinus spp.

[4] Haridas S, Wang Y, Lim L, Massoumi Alamouti S, Jackman S, Docking R, Robertson G, Birol I, Bohlmann J, Breuil C (2013). The genome and transcriptome of the pine saprophyte *Ophiostoma piceae*, and a comparison with the bark beetle-associated pine pathogen *Grosmannia clavigera*. BMC Genomics. Jun 2;14:373. doi: 10.1186/1471-2164-14-373.