

PRODUCCIÓN DE LACASAS FÚNGICAS EN GARBANZO Y MAÍZ COMO FUENTE DE LIGNINA

Sofía Guadalupe Ramírez Cardona (1), M.C. Juana López Godínez (2), Dra. Claudia Erika Morales Hernández (3)

1 [Escuela de nivel Medio Superior de Guanajuato, Colegio de Nivel Medio Superior, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [sofiaramirezcardona@hotmail.com]

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias naturales y exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [godinez@ugto.mx]

3 [Escuela de nivel medio Superior de Guanajuato, Colegio de Nivel Medio Superior, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [clauerimh7@gmail.com]

Resumen

Las lacasas son cuproproteínas capaces de degradar la lignina, un polímero que forma la pared celular de vegetales. Estas enzimas son inespecíficas, es por ello que su utilidad es muy amplia. El principal uso de las lacasas en la actualidad es como biorremediador pues degradan agentes tóxicos de los suelos. Los mejores productores de estas enzimas son los hongos de podredumbre blanca. Previamente se demostró que estos hongos pueden crecer en fuentes comerciales de lignina (All-Bran®) y desarrollar una actividad enzimática óptima para degradar colorantes y realizar otras actividades. Las fuentes naturales de lignina aún no han sido muy estudiadas. El garbanzo y el maíz son granos que contienen lignina, estas fuentes pueden representar una forma más sencilla y barata de inducir la secreción de lacasas. En el presente proyecto se trabajó con cepas propias de la región de hongos de podredumbre blanca, se probó su crecimiento en garbanzo y maíz, se determinó su actividad de lacasa en el medio de cultivo y se determinó el perfil de proteínas extracelulares después de la inducción. La cepa denominada H2DP mostró tener el mejor crecimiento y actividad de lacasa en presencia de garbanzo aún sobre los resultados obtenidos previamente con fuentes comerciales.

Abstract

Laccases are copper proteins capable to degrade lignin, a polymer forming the vegetable cell wall. These enzymes are nonspecific, their utility is very wide. Laccases are mainly used as a biorremediator since they can degrade toxic agents from soils. The best producers of these enzymes are white rot fungi. Previously it was shown that these fungi can grow on commercial sources of lignin (All-Bran®) and develop an optimal enzymatic activity to degrade dyes and perform other activities. Natural sources of lignin have not yet been studied. Cowpea and maize grains are lignin sources can be an easier and cheaper way to induce the secretion of laccases. In this project we worked with strains of white rot fungi collected in the region growth in cowpea and corn tested. Laccase activity was determined in the culture medium and extracellular protein profile was determined after induction. Studied showed strain H2DP have the best growth and activity of laccase in cowpea yet on other commercial sources.

Palabras clave: Lacasa, biodegradación, cepa, cereales, peroxidasa.

INTRODUCCIÓN

Lacasas

Las Lacasas tienen actividad de fenol oxidasa en presencia de cobre, que oxida anillos fenólicos de la molécula de lignina. Deben su nombre a que fue descubierta por Yoshida, en el año de 1883, en el árbol japonés de laca: *Rhus vernicifera*. El uso que mayor interés tiene en la actualidad es de biorremediador, ya que permite la remoción de contaminantes o sustancias indeseables en aguas y suelos. Las lacasas son glicoproteínas con peso molecular descrito en diferentes organismos de 60-80 kDa [1]. Estas enzimas catalizan la oxidación de un amplio espectro de compuestos fenólicos y aminas aromáticas utilizando el oxígeno como aceptor de electrones, reduciéndolo a agua [2]. Las lacasas son ampliamente distribuidas en plantas, bacterias, hongos e insectos elevados. Las lacasas son de los más estudiados sistemas enzimáticos [3].

Lignina

La lignina, después de la celulosa, es el mayor componente de la materia vegetal. La mayor parte de éste se encuentra dentro de las paredes celulares [4]. Posee enlaces covalentes y es heterogénea por lo cual no puede ser degradado por mecanismos típicos de hidrólisis, cualquier enzima o grupo de enzimas capaces de atacarla inicialmente, deben ser inespecíficas [3].

Maíz

Fuentes naturales que contienen lignina son los granos, como el maíz y el garbanzo. Sandstead et al. (1978) determinaron que el salvado de maíz está formado por un 75% de hemicelulosa, un 25% de celulosa y 0.1% de lignina, en peso en seco [5].

Garbanzo

Es una planta anual, tiene raíces profundas, tallos pelosos y ramificado [6]. El contenido de polisacáridos en el garbanzo varía entre 37.5% y 50.8%, en la tabla 1 se muestran los carbohidratos complejos presentes en garbanzo [6].

Hongos de podredumbre blanca

Los hongos que crecen en la madera se clasifican en tres grupos: pudrición blanca, parda y oscura

en el grano de garbanzo	
Componente	Concentración (%)
Almidón	50.4
Amilosa	20.0 - 46.5
Almidón resistente	3.4 - 16.4
Celulosa	1.1 - 13.7
Hemicelulosa	0.6 - 16.0
Lignina	Trazas a 7.1
Fibra dietética total	8.2 - 24.0
Fibra dietética soluble	3.7
Fibra dietética insoluble	7.9
NSP polisacáridos no almidón	5.5 - 35.4

Tabla 1: Carbohidratos presentes en el garbanzo.

según el daño que le ocasionan a la madera. Los hongos de podredumbre blanca son el grupo más hábil para llevar a cabo la eliminación rápida y efectiva de la lignina [7]. Los hongos ligninolíticos han desarrollado un sistema enzimático único que funciona en el ambiente extracelular. El mecanismo del sistema degradador de lignina está basado en la producción de radicales libres. Los contaminantes son todos mineralizados a CO_2 y H_2O [3]. Esta maquinaria enzimática versátil coopera con metabolitos secundarios secretados por estos hongos, permitiéndoles atacar eficientemente la barrera que constituye la lignina.

El sistema enzimático ligninolítico extracelular está formado por dos tipos de actividades enzimáticas: peroxidasas y oxidasas. Los hongos de podredumbre blanca secretan tres enzimas extracelulares oxidativas: Lignina-Peroxidasa (LiP), Manganese-Peroxidasa (Mn-P) y Lacasa, ésta última es una enzima que se ha sugerido que es inducida por fuentes comerciales como All-Bran® [1].

Usos de las lacasas

Las lacasas son poco específicas al degradar lignina, por lo que se puede plantear el usarlas para degradar compuestos aromáticos o tóxicos, además sus características son viables para usarlas, por ejemplo pueden tolerar grandes concentraciones de agentes tóxicos; cuando se obtienen de hongos es fácil la colonización del suelo, son más resistentes que las bacterias y propiciar las condiciones para su crecimiento tiene un bajo costo. La importancia en la actualidad de este sistema enzimático radica en la posibilidad de usarlo como biorremediador y biodegradante.

Los usos de las lacasas son muchos y muy variados, es por ello que la investigación en la obtención de estas enzimas a partir de hongos de podredumbre blanca en fuentes naturales de lignina puede traer mayores beneficios.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con las cepas: H2DP, Muestra Desconocida, Cepa industrial y Tronco caído de la presa de la Esperanza. [1].

1.-Crecimiento del hongo en medios comerciales sólidos.

Se sembraron placas de Petri con medio dextrosa Sabouraud de las 4 cepas por el método de espatulado o de estría. Todas las cepas se incubaron a 28°C.

2.- Crecimiento en medios líquidos en presencia de All-Bran®, garbanzo y maíz.

Los matraces contenían 37.5 mL de solución amortiguadora de fosfatos de pH: 6, 38 mL de agua destilada y las fuentes de lignina en distintas concentraciones.

Los medios líquidos estériles se inocularon con 4 cuadros de las placas en crecimiento. Esto se realizó en dos fechas: 15 y 22 de junio. Los cultivos se colocaron a 28°C. Cada 24 horas se tomó 1 ml de cada matraz, se centrifugaron a 14,000 rpm por 15 min, se recuperó el sobrenadante y se congelaron a -20 °C.

Tabla 2. Medios de cultivo inoculados el 15 de junio

Fuente de lignina	%	Cepa
All-Bran®	4.0	-----
All-Bran®	4.0	H2DP
All-Bran®	4.0	Cepa industrial
All-Bran®	4.0	Tronco caído
All-Bran®	4.0	Muestra desconocida
Garbanzo	8	H2DP
Garbanzo	8	Muestra desconocida
Garbanzo	15.9	Tronco caído
Maíz	8	Muestra desconocida

Tabla 3. Medios de cultivo inoculados el 22 de junio

Fuentes de lignina	%	cepa
All-Bran®	4.0	-----
All-Bran®	4.0	H2DP
Garbanzo	3.0	-----
Garbanzo	3.0	H2DP
Maíz	3.0	-----
Maíz	3.0	H2DP

3.-Prueba de identificación de enzimas con guayacol.

Al medio de cultivo sólido con la cepa en crecimiento se adicionaron 2 gotas de guayacol concentrado y se incubó a 28°C. Para los medios líquidos, en una placa de ELISA se colocó 100 µL del sobrenadante de muestra del cultivo, se agregó 10µL de guayacol puro y 1µL de peróxido de hidrógenos (H₂O₂). Se incubó a 28°C por 24 h.

4.-Cuantificación de proteína (Método Micro-Lowry).

Se cuantificó la concentración de proteína de los sobrenadantes de los cultivos líquidos por el método de Lowry empleando una curva de estándar de proteína con albúmina sérica de bovino (BSA).

5.-Separación de proteínas por PAGE-SDS.

Se preparó un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturantes al 10 %, se cargó con aproximadamente 30 µg de proteína de sobrenadantes de diferentes muestras. Se llevó a cabo la electroforesis a 110 V, por un tiempo de 1.25 h. Al término de la corrida el gel se tiñó con plata [1].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación del crecimiento en medio sólido y líquido de diferentes cepas de hongos en presencia de fuentes naturales de lignina.

Las diferentes cepas se adaptaron bien a las tres fuentes de lignina. Todas las cepas tuvieron un crecimiento similar en medio sólido. La figura 2 muestra el crecimiento de la cepa H2DP en medio sólido.

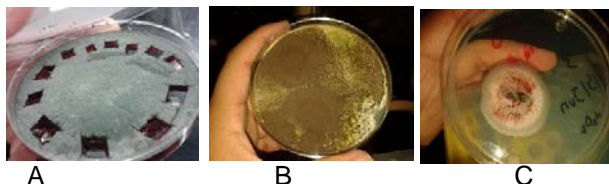


Figura 2. A) H2DP resembrado el 15/junio (espatulado). B) H2DP resembrado el 22/junio (espatulado). C) H2DP resembrado el 15/junio directo de un trozo de corteza.

Los medios líquidos presentan característica similares, la cepa crece en la superficie del líquido y la apariencia algodonosa se mantiene. El medio con garbanzo en ambas concentraciones presentó un mejor crecimiento que el medio con maíz y All-Bran®.

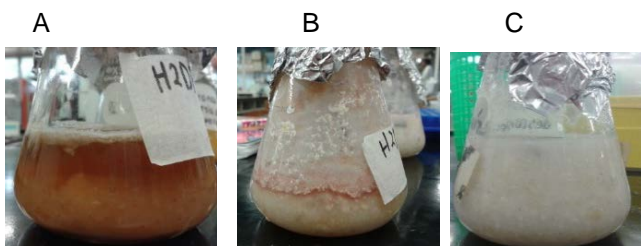


Figura 2. A) H2DP en medio con All bran; B) H2DP en garbanzo; C) H2DP en maíz.

Determinación cualitativa de la actividad de lacasa extracelular en medio sólido y líquido.

A las cepas crecidas en medio sólido se le adicionó guayacol para revelar la actividad de lacasa extracelular. Este compuesto al oxidarse presenta una coloración café-rojiza, lo cual sugiere la presencia de lacasas en el medio (Figura 3).



Figura 3. H2DP en medios sólidos después de incubar a 28°C con guayacol, cepas resembradas el 15 de junio.

Para probar el crecimiento en líquido, los sobrenadantes de la resiembra del 15 de junio crecidos en diferentes fuentes de lignina fueron tomados el 29 junio. Después de una centrifugación se aplicaron 100 µl de estas

muestras en pozos de placas de Elisa y se adicionaron un 1 µl de H₂O₂ y 10 µl de guayacol. En la figura 4 se muestra el cambio de coloración de cada cepa crecida en All-Bran®, garbanzo y maíz. Observándose en todos los casos una mayor actividad en los cultivos crecidos con garbanzo, principalmente en la cepa H2DP.

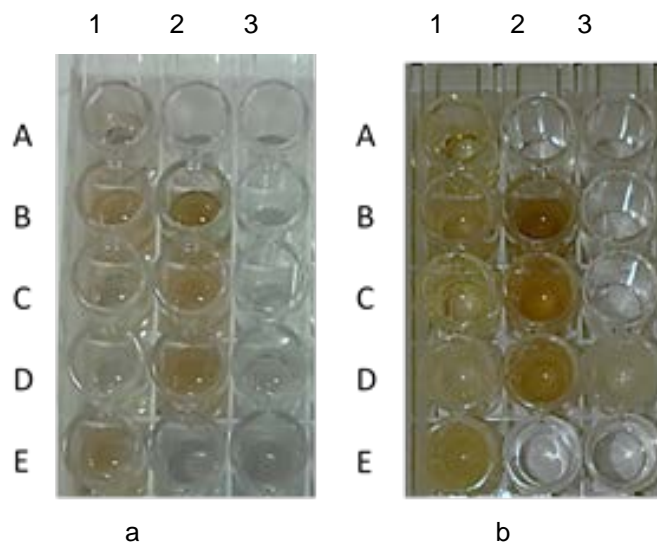


Figura 4. a) Sobrenadantes de las Cepas con guayacol antes de su incubación. b) Sobrenadantes de las cepas con Guayacol con 24h de incubación. A: Medio con sin hongo, B: Cepa H2DP, C: Cepa de Tronco caído, D: Muestra desconocida, E: Cepa industrial. 1: Medio con All-Bran®, 2: Medio con garbanzo, 3: medio con maíz.

Determinación del perfil electroforético de proteínas extracelulares secretadas por la cepa H2DP crecida en fuentes de lignina

Se ha reportado que las lacasas tienen un peso molecular entre 60-80 kDa, también se han encontrado con un peso de 30 kDa. Por lo cual se realizó una PAGE-SDS para determinar la presencia de bandas de proteínas en el rango de PM mencionado. Las muestras fueron obtenidas a partir del medio extracelular de la cepa H2DP crecida en presencia de maíz, garbanzo y All-Bran®. Se calculó el PM de las bandas más representativas. Como se observa en la figura 5, la muestra crecida en garbanzo presenta la mayor número de bandas, incluidas las bandas entre el marcador de 55 y 72 kDa. Para las muestras de maíz y All-Bran® se observa una banda mayoritaria en el rango de 30 kDa como se esperaba.

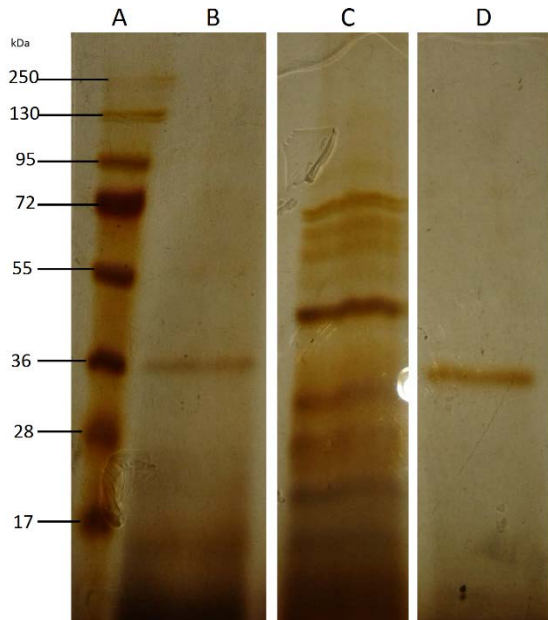


Figura 5. A) Marcadores de peso molecular; B) H2DP crecido en maíz, bandas de PM 34.6 y 17.5 kDa.; C) H2DP en garbanzo, bandas de PM 69.1, 63.8, 57.5 40.7 30.9, 24.5, 19.0 y 15.1 kDa; D) H2DP en All-Bran® Bandas de PM 30.9 y 76.7 kDa.

CONCLUSIONES

Las cepas tuvieron un buen crecimiento en presencia de maíz y garbanzo en concentraciones entre 3% y 8%.

La cepa H2DP crecida en garbanzo mostró la mayor actividad de lacasa en comparación con el crecimiento en maíz y All-Bran®.

El medio extracelular de la cepa H2DP crecida en garbanzo presenta bandas de PM entre 60-80 kDa, pesos reportados para las lacasas.

El medio extracelular de la cepa H2DP crecida en medios con maíz y All-Bran® presentan una notoria banda de PM de 30 kDa, reportada también para las lacasas.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a la Dra. Rosa María García Nieto y a la M. en C. Juana López Godínez por su apoyo en la realización de este proyecto, gracias por su paciencia y disponibilidad. Agradezco a mis compañeras de laboratorio Alejandra y Leticia por hacer de este verano toda

una experiencia. A la Dra. Claudia Erika Morales Hernández por su invitación y constante ayuda.

REFERENCIAS

- [1] Torres Navarro, Viridiana Habacuc (2014) *Utilización de lacasas secretadas por hongos para la degradación de colorantes* (tesis de licenciatura inédita), DCNE, Universidad de Guanajuato
- [2] Mayer A.M., Staples R.C. (2002) *Laccase: new functions for an old enzyme*. *Photochemistry*, pag:60.
- [3] Sánchez Paz, Judith (2012) *Estudio de lacasas provenientes de hongos degradadores de madera para eliminación de contaminantes de lixiviado del relleno sanitario de León, Gto* (tesis de licenciatura inédita) DCNE, Universidad de Guanajuato.
- [4] Sharaddha, Ravi Shekher, Simran Sehgal, Mohit Kamthania, Ajay Kumar, (2011), *Laccase: Microbial sources, production, purificación an potential biotechnological applications*, Mangalayatan University,
- [5] <<http://www.fao.org/docrep/t0395s/t0395s03.htm>> Deposito de documentos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, *El maíz en la nutrición humana*, Departamento de agricultura (última consulta 9/07/2015) cap:1-2
- [6] Aguilar, Raymundo; Vélez-Ruiz, J.F (2013) *Propiedades nutricionales y funcionales del garbanzo (Cicer arietinum L.)*, Universidad de la Americas Puebla, Departamento de ingeniería química, alimentos y ambiental.
- [7] Rodríguez Sanchez Enrique, (2006) *Caracterización molecular de lacasas de pleurotus eryngii: expresión heteróloga de estas enzimas y aplicaciones en la degradación de contaminantes aromáticos*, Universidad Complutense de Madrid, pag: 11-13.