Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.

# ACTIVIDAD DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS TERMOESTABLES EN *Podaxis pistillaris* (L.) Fr.

**Por:**

**TANIA ELISA GONZÁLEZ SOTO**

**TESIS APROBADA POR LA**

**COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

**HERMOSILLO, SONORA** **DICIEMBRE 2012**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la Ing. Biotecnóloga Tania Elisa González Soto, lo han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.

Dr. Agustín Rascón Chu
Director de Tesis

Dra. Carmen A. Contreras Vergara
Asesor

M. C. Ciria G. Figueroa Soto
Asesor

Dr. Martin Esqueda Valle
Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se de crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

Dr. Pablo Wong González
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante el período de estudios de maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C., por abrirme las puertas de su institución y por haberme permitido cumplir una meta más en mi vida.

A la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal especialmente al laboratorio de Biotecnología de Hongos por permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

A mi comité de Tesis, Dra. Carmen A. Contreras Vergara, M.C. Ciria Figueroa Soto, al Dr. Martin Esqueda Valle y al Dr. Agustín Rascón Chu. Un agradecimiento muy especial por su paciencia y consejos brindados, pero sobre todo por el apoyo y los conocimientos brindados para enriquecerme como estudiante y persona. ¡Muchísimas Gracias!

Al laboratorio de Biopolímeros, Biología molecular de plantas y Biotecnología de Hongos por el apoyo, la confianza y el préstamo de las instalaciones y equipo necesario para el cumplimiento de mi trabajo.

## DEDICATORIA

***A Dios.***
*Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.*

***A mis Padres***
*A mi Mama y a mi Papa, por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor. Por los ejemplos de perseverancia y constancia que los caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante*

***A mis hermanas***
*Luisa, Fernanda y Ana Lucia, por ser siempre mi motivo para salir adelante, para poder brindarles el ejemplo a seguir y más que nada por el amor incondicional como hermanas, prestando siempre atención a mis necesidades e inquietudes como persona, las quiero mucho hermanitas son lo más preciado que tengo en la vida.*

***A mis Familiares***
*Primas, Abuelas, Tíos y Tías, familia en general por ser parte de mi apreciada familia y apoyarme en mi educación con valores para ser una persona de bien.*

***A mis maestros.***
*Dr. María A. Islas O., Dr. Humberto González, Dra. Elizabeth Carvajal, Dr. Carmen Contreras, Dr. Agustín Rascón por su gran apoyo y motivación para la culminación de nuestros estudios profesionales, por su tiempo compartido y por impulsar el desarrollo de nuestra formación profesional gracias por apoyarme en su momento*

***A mis amigos.***
*Que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que hasta ahora, seguimos siendo amigos: Mitzuko, Isabel Cristina, Many, Marquitos, Pedro, Shena, Damián, Eduardo por haber pasado tantos momentos agradables a su lado. Una dedicatoria y agradecimiento especial a mis amigos de laboratorio,Geo, Alfonso Sanchez, Alberto Estrada, Javier Ojeda, Aldo y los que me faltaron, gracias por mostrar siempre disposición ante mis necesidades.*

***Al equipo de Volibol***
*Mónica Villegas, Juanita, Alejandra Zamorano, Ana Lilia, Mayra Salmerón, entre otras por ser unas grandes amigas y por demostrarme su cariño día a día.*

## ÍNDICE


| | Página |
|---|---|
| Lista de Figuras | ix |
| Lista de Tablas | x |
| Resumen | xi |
| Abstract | xii |
| Capítulo I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| Capítulo II. MARCO TEÓRICO | 2 |
| Los hongos | 2 |
| Mecanismo de adaptación | 3 |
| *Podaxis pistillaris* | 3 |
| Descripción taxonómica de *P. pistillaris* | 4 |
| Distribución geográfica de *P. pistillaris* | 5 |
| Usos y aplicaciones de *P. pistillaris* | 5 |
| Generalidades de las Enzimas | 5 |
| Variables que afectan la catálisis enzimática | 6 |
| pH | 6 |
| Especificidad | 6 |
| Temperatura | 7 |
| Enzimas Fibrolíticas | 8 |
| Materiales lignocelulósicos | 8 |
| Principales enzimas fibrolíticas, sustratos y aplicaciones. | 9 |
| Celulasas | 9 |
| Celulosa | 10 |
| Aplicaciones industriales de las enzimas celulasas | 11 |
| Xilanasas | 11 |
| Hemicelulosa | 12 |
| Aplicaciones industriales de las enzimas xilanasas | 14 |
| Lacasas | 14 |
| Lignina | 14 |
| Aplicaciones industriales de las enzimas lacasas | 15 |
| Enzimas fibrolíticas fúngicas termoestables | 15 |

Capítulo III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 17
Hipótesis 17
Objetivo 17
Objetivos específicos 17

Capítulo IV. MATERIAL Y MÉTODOS 18
Recolección e identificación del hongo *P. pistillaris* 18
Aislamiento del micelio de *P. pistillaris* 18
Extracción de ADN de *P. pistillaris* 18
Ampliación y clonación de ITS de *P. pistillaris* 19
Determinación de Biomasa 20
Determinación de la temperatura óptima de crecimiento de *P. pistillaris* 20
Determinación del pH inicial óptimo de incubación sobre el Crecimiento de *P. pistillaris* 21
Selección del medio mínimo óptimo para cultivos sumergidos de *P. pistillaris* 21
Medio Vogel 21
Medio M9 22
Medio Kirk 22
Medio Mínimo para Actividad enzimática de *P. pistillaris* 23
Cultivo sumergido de *P. pistillaris* 23
Determinación de Actividad Enzimática 24
Actividad de celulasas 24
Actividad de xilanasas 24
Actividad de lacasas 25
Determinación de la concentración de proteínas 25
Determinación de la Termoestabilidad de la actividad enzimática (celulasas, lacasas y xilanasas) 26
Capítulo V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 27

Recolección e Identificación de *P. pistillaris* 27
Identificación molecular mediante secuencias ITS de *P. pistillaris* 29
Aislamiento de *P. pistillaris* 30
Efecto de la Temperatura sobre el crecimiento de *P. pistillaris* 32
Efecto del valor de pH inicial sobre el crecimiento de *P. pistillaris* en cultivo sumergido 35
Selección del medio mínimo para la determinación de actividad enzimática de *P. pistillaris* 36
Actividad enzimática de *P. pistillaris* 37
Actividad enzimática de celulasas 37

Actividad enzimática de xilanasa 39
Actividad enzimática de lacasas 40
Termoestabilidad de la actividad enzimática 41
Termoestabilidad de la actividad enzimática de celulasas 42
Termoestabilidad de la actividad enzimática de xilanasa 43
Termoestabilidad de la actividad enzimática de lacasas 44
Actividad Fibrolítica y Rendimiento de cultivo de *P. pistillaris* 45

Capítulo VI. CONCLUSIONES 47

Capítulo VII. BIBLIOGRAFÍA 48

Anexo 1 61

## LISTA DE FIGURAS


| Figuras | | Página |
|---|---|---|
| **1** | Hongo basidiomiceto *P. pistillaris*. Aspecto general, hifas y esporas | 2 |
| **2** | Esquema de la configuración de la celulosa | 10 |
| **3** | Estructura química de una hemicelulosa | 13 |
| **4** | Lugares muestreados en el oeste, este y centro del municipio de Hermosillo, Son., México | 27 |
| **5** | Esporas de *P. pistillaris* por microscopia electrónica de barrido | 28 |
| **6** | Morfología de *P. Pistillaris* | 29 |
| **7** | Gel de electroforesis con la banda de DNA genómico de *P. pistillaris* | 29 |
| **8** | Gel de electroforesis para el producto de PCR de *P. pistillaris* | 30 |
| **9** | Crecimiento de *P. pistillaris* en dos distintos medio de cultivo Agar extracto de malta (EMA) y Agar dextrosa de papa (PDA) | 32 |
| **10** | Crecimiento miceliar a distintas temperaturas de *P. pistillaris* | 33 |
| **11** | Crecimiento miceliar a 25 y 40°C de *P. pistillaris* | 34 |
| **12** | Estudio de pH en cultivo sumergido PDB de *P. pistillaris* | 35 |
| **13** | Termoestabilidad de la actividad enzimática de Celulasas | 42 |
| **14** | Termoestabilidad de la actividad enzimática de Xilanasas | 43 |
| **15** | Termoestabilidad de la actividad enzimática de Lacasas | 45 |

## LISTA DE TABLAS


| Tabla | | Página |
|---|---|---|
| **1** | Componentes del medio mínimo de Vogel (1959) | 21 |
| **2** | Componentes de la solución de elementos traza del medio Vogel´s | 22 |
| **3** | Componentes del medio mínimo M9 | 22 |
| **4** | Composición del medio mínimo Kirk con modificaciones realizadas por Cabrera (2010) | 22 |
| **5** | Modificaciones del medio mínimo de Kirk | 23 |
| **6** | Producción de biomasa de P. pistillaris en distintos medios de cultivo. | 37 |
| **7** | Actividad celulolítica en *P. pistillaris* | 38 |
| **8** | Actividad Xilanolítica de *P. pistillaris* en cultivo sumergido | 39 |
| **9** | Actividad de lacasas en *P. pistillaris* bajo condiciones de cultivo sumergido | 40 |
| **10** | Actividades fibrolíticas de *P. pistillaris* en medio de Kirk modificado | 46 |

## RESUMEN

*Podaxis pistillaris* es un hongo que presenta el peridio en forma ovalada, el estípite es rígido y leñoso, un tamaño de espora de 10-15 µm de diámetro, común a la mayor parte de las zonas desérticas del planeta. A pesar de ser usado para el consumo humano, y en diversos remedios tradicionales por distintas culturas, no hay reportes acerca de su sistema enzimático fibrolítico (enzimas celulasas, xilanasas, y lacasas). El hongo *P. pistillaris* silvestre se recolectó en la región central del desierto de Sonora (29° 07´23 97”N 110° 53’58 02”O, 238 msnm) identificándose taxonómicamente y molecularmente por medio de secuencias ITS presentando el 99% de identidad con respecto a las secuencias de *P. pistillaris* reportadas para otros países. Se determinaron las condiciones más favorables para el crecimiento de *P. pistillaris* en cultivo sumergido en el medio de Kirk modificado, a 40 °C, y pH 8 con agitación constante a 120 rpm. Asimismo, se determinó la actividad de celulasa (25,33 U / mg), xilanasa (50,14 U / mg), y la lacasa (31,9 U / mg) en el sobrenadante de cultivo sumergido de *P. pistillaris.* Las actividades enzimáticas en el sobrenadante se mantuvieron alrededor de 60% del valor inicial cuando se incubaron a 60 °C durante tres horas para celulasas, lacasas, y xilanasas. Este estudio constituye el primer informe sobre la actividad fibrolítica, y su termoestabilidad en cultivo sumergido de *P. pistillaris*.

**Palabras claves: *Podaxis pistillaris,* enzimas termoestables, actividad enzimática, actividad residual.**

## ABSTRACT

*Podaxis pistillaris* is a fungus that has the oval shaped peridium, the stipe is hard and woody, presenting a spore size of 10-15 microns in diameter, common to most of the desert areas of the planet. Despite being used for human consumption, and various traditional remedies for different cultures, little is known about its fibrolytic enzymatic system (cellulases, xylanases and laccases). The fungus *P. pistillaris* wild strain was collected in the central region of the Sonoran Desert (29 ° 07'23 97 "N 110 ° 53'58 02" W, 238 m) and ribosomal ITS sequence analysis showed 99% identity with the sequences of *P. pistillaris* reported for other countries. We determined the most favorable conditions for growth of *P. pistillaris* in submerged culture with a modified Kirk's medium, at 40 °C, and pH 8 with constant agitation at 120 rpm. Likewise, we determined *P. pistillaris* cellulase activity (25.33 U / mg), xylanase (50.14 U / mg), and laccase (31.9 U / mg) in the supernatant submerged culture. Remarkably, enzymatic activities in the supernatant remained around 60% of the initial values when incubated at 60 °C for three hours for cellulases, laccases, and xylanases. This study constitutes the first report on fibrolytic activity, its thermostability, in submerged culture of *P. pistillaris*.



**Keywords: *Podaxis pistillaris,* thermostable enzymes, enzyme activity, residual activity.**

# CAPÍTULO I.

# INTRODUCCIÓN

El hongo *Podaxis pistillaris* (L.) Fr. es una especie ampliamente distribuída y frecuentemente citada para las zonas áridas y semiáridas en la micobiota sonorense; sobre todo en áreas que presentan suelos perturbados, a orillas de caminos, terrenos baldíos y soleados. Los suelos en donde se encuentra este hongo son salinos, con alto contenido de nitrógeno pero con concentraciones de material orgánico e inorgánico variable. Las estrategias que permiten a *P. pistillaris* prevalecer ante condiciones extremas son evidentes desde la morfología y estructura del hongo, hasta el sistema enzimático que posee. Esto le otorga características como resistencia a altas temperaturas y el crecimiento con deficiencia de nutrientes. El sistema enzimático de *P. pistillaris* hasta hoy no había sido estudiado, por lo que se desconocía si su adaptación a las condiciones del medio ambiente en esta región, incluía su termoestabilidad/ termotolerancia; características que pueden ser aprovechadas a nivel industrial.

Además de la aportación al conocimiento de *P. pistillaris,* la información generada en este trabajo puede tener usos potenciales a nivel industrial

En base a lo anterior, en el presente trabajo se identificó la actividad fibrolítica termoestable en el organismo, complementando su estudio taxonómico y molecular para coadyuvar la identificación de la especie, ayudándonos a comprender el papel que juega *P. pistillaris* en los ecosistemas desérticos.

## CAPÍTULO II

## MARCO TEÓRICO

### Los Hongos

Son seres vivos clasificados dentro del reino fungi, conformados por una parte vegetativa (micelio) que se encuentra en el interior del sustrato del que se alimentan, produciendo fructificaciones las cuales son estructuras multicelulares sobre la cual se forman las esporas que constituyen lo conocemos con el nombre de hongos (Herrera y Ulloa, 2004). Los hongos, setas, bejines y otros basidiomas están constituídos por hifas dicarióticas que suelen presentar fíbulas. Este micelio puede crecer durante años en el suelo o la madera hasta que bajo la influencia de diversas condiciones ambientales forma los basidiomas (Deacon, 1993). *P. pistillaris* es un basidomiceto ya que presenta basiodiosporas las cuales son utilizadas para su propagación (Figura 1).

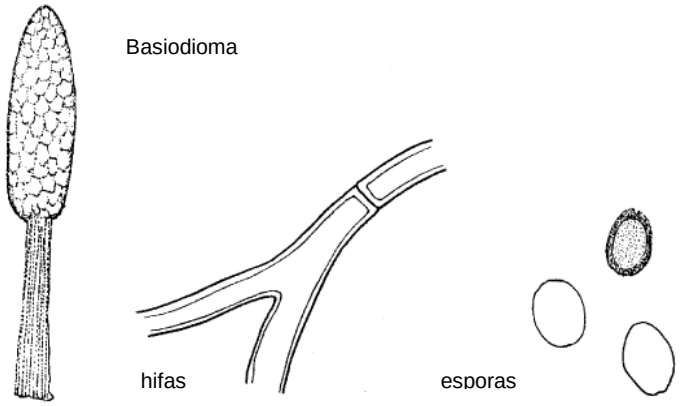


Figura 1. Hongo basidiomiceto *P. pistillaris*. Aspecto general del basidioma, hifas y esporas (Baseia y Galväo, 2002).

## Mecanismo de Adaptación de los Hongos

Los hongos realizan una digestión externa de sus alimentos, secretando enzimas, para absorber luego las moléculas disueltas resultantes de la digestión. A esta forma de alimentación se le llama osmotrófia, la cual es similar a la que se da en las plantas, pero, a diferencia de aquéllas, los nutrientes que toman son orgánicos (Herrera, 2005). Según las enzimas que producen, los hongos son capaces de vivir de formas distintas y sobre diferentes sustratos (Lutzoni *et al.,* 2004). *P. pistillaris* se ha encontrado en suelos donde predomina la vegetación matorral subinerme y espinoso, con un conteniendo de materia orgánica de 2.5-4% (Esqueda *et al*., 2000).

## *Podaxis pistillaris*

Se encuentra ampliamente distribuído en regiones áridas y semiáridas del globo terrestre, en países como Australia, África, Afganistán, Brasil, E.U, Noroeste de México, Pakistán, Iraq entre otros (Priest y Lenz, 1999; Young *et al*., 2002). Presenta distintos morfotipos dependiendo de las condiciones climáticas y edáficas del lugar donde crece, resistiendo temperaturas comprendidas entre los 30-60°C (Domínguez, 1933).

### Descripción taxonómica de *P. pistillaris*

Es un hongo gasteroide que pertenece a la familia Agaricaceae (Basidiomicota), presenta el píleo ovalado, el estípite leñoso y rígido, puede alcanzar alturas de 7 a 15 cm (Esqueda *et al.,* 2000). Los ejemplares frescos tienen un peridio blanco que al madurar forma escamas blanquecinas (Dring ,1973). Al madurar estas escamas se caen, revelando una gleba marrón con textura esponjosa. Cuando las escamas se pierden, las esporas se dispersan por el viento, la lluvia y el movimiento de los animales. Esta característica, combinada con una fibra

resistente del estípite permiten que las esporas se distribuyan independientemente de las condiciones ambientales (Guzmán y Herrera ,1969).

Ademas de la identificación morfológica de *P. pistillaris* es importante realizar una identificación molecular, debido a que por las condiciones climáticas estos organismos pueden presentar distintos morfotipos haciendo complicada la identificación. En las últimas décadas, los investigadores han confirmado que determinadas secuencias del ADN ribosómico sirven para clarificar los límites y la identidad de las especies en hongos (Emilianoff *et al.,* 2008). Estas secuencias llamadas ITS (Internal Transcribed Spacer), están situadas entre dos regiones que se transcriben para ARN ribosomal (18S ARNr, ITS1, 5.8S ARNr, ITS2, 28S ARNr), y son regiones candidatas para convertirse en códigos de barras genéticos por su variabilidad y porque son más susceptibles de acumular mutaciones. La naturaleza tan laboriosa de la identificación y análisis microscópico, han impulsado el desarrollo de tales métodos moleculares, como la verificación de morfotipos de hongos identificados mediante PCR-RFLP (Horton y Bruns, 2001).

**Distribución geográfica de *P. pistillaris***

*P. pistillaris* está ampliamente distribuído en el globo terrestre, entre las latitudes de 40°N y 40°S (Khan y Khan, 1979), encontrándose en algunos países como Argentina (Martínez, 1971) y Brasil (Baseia y Galväo , 2002); además se habían reportado asociaciones de algunas especies del género Podaxis en Australia (Priest y Lenz, 1999; Young *et al*., 2002), Nigeria (Alasoadura, 1966; Zoberi, 1972), Sudáfrica (Bottomley, 1948) y México (Guzmán y Herrera, 1969), en este último representada en el Noreste del país (Rocabado *et al.,* 2007).

Su hábito es terrícola, principalmente en suelos arenosos de desierto, en total exposición y solitarios; suelos alcalinos, con alto contenido de nitrógeno, pero con materia orgánica e inorgánica variable (Esqueda *et al.,* 2000).

**Usos y aplicaciones de *P. pistillaris***

Los cuerpos fructíferos de *P. pistillaris* se utilizan en algunas partes de Yemen para el tratamiento de enfermedades de la piel, en el sur de África en la medicina popular contra las quemaduras solares y en China para reducir la inflamación (Al Fatimi *et al.,* 2006; Levin y Branch, 1987; Mao, 2000). En India, Afganistán y Arabia Saudita, se ha utilizado como alimento (Gupta y Singh, 1991). En Australia, el hongo se utilizó para oscurecer el color del pelo en las barbas de los ancianos y como repelente para moscas. Los cuerpos fructíferos son ricos en proteínas conteniendo todos los aminoácidos esenciales, carbohidratos, lípidos y minerales (Khaliel *et al.,* 1991). En los últimos años se ha visto que posee actividad antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus mirabilis* (Panwar y Purohit, 2002).

En algunos procesos industriales como en la papelera, textil, entre otras se utilizan enzimas para el blanqueo de telas y biorremediación las cuales son extraídas de organismos como los hongos (Martínez *et al*., 2008). *P. pistillaris*, como otros hongos, presenta enzimas las cuales forman parte de su mecanismo de adaptación, utilizándolas para digerir la materia orgánica presente en el suelo a moléculas más sencillas.

## Generalidades de las Enzimas

Son catalizadores biológicos capaces de acelerar las reacciones químicas en ambos sentidos, sin consumirse en ellas, ni formar parte de los productos. Su característica fundamental es que tienen gran especificidad de reacción por el

sustrato sobre el cual actúan, además de que disminuyen la energía de activación de la reacción (Brandan *et al.,* 2008).

**Variables que afectan la catálisis enzimática**

**pH.** La mayoría de las enzimas poseen un pH característico en el cual la actividad es máxima; por encima o por debajo de este pH la actividad disminuye (Mckee, 2003). Aunque los perfiles de las curvas de actividad enzimática en función del pH de muchas enzimas son acampanados pueden variar considerablemente de forma (Mckee, 2003). La relación entre el pH y la actividad de cualquier enzima depende del comportamiento ácido–base de la enzima y del sustrato (Dergal, 1993). El pH afecta el grado de ionización de los aminoácidos del sitio activo tanto del sustrato como del complejo enzima-sustrato, e influyen en la afinidad que tenga la enzima por el sustrato (Dergal , 1993).

La forma de la curva de actividad vs pH varía con la concentración del sustrato, ya que el valor de $K_m$ de muchas enzimas varían con el pH (Whitaker , 1994).

En el caso de las enzimas proteasas extraídas de hongos los valores de pH varían desde pH 8-12, existiendo también proteasas acidas y neutras (Reyes y Aguilar, 2011). La hidrólisis de la celulosa con celulasas de origen fúngico se lleva a cabo alrededor de pH 5 (Martínez *et al*., 2008). *P. pistillaris* puede crecer en suelos salinos con pH entre 7 y 8, sin embargo se desconoce el pH óptimo o el rango de pH's en que tienen actividad sus enzimas.

**Especificidad.** Está relacionada con la estructura tridimensional de la molécula enzimática, así como con la interacción entre el sustrato y la enzima a través del centro activo. Esto a su vez depende de la naturaleza de las interacciones

entre enzima y sustrato, normalmente de las fuerzas débiles, tales como puentes de hidrógeno, fuerzas de Van Der Waals e interacciones hidrofóbicas (Madigan y Parker , 1999). En el caso de las enzimas de origen fúngico, podemos encontrar una amplia gama de sustratos, entre estos encontramos los residuos vegetales y fibras, que están compuestos por polisacáridos principalmente (Reyes *et al.,* 2011). Los hongos ligninolíticos han desarrollado un sistema enzimático único y no específico que funciona en el ambiente extracelular; el mecanismo del sistema degradador de lignina está basado en la producción de radicales libres. Este mecanismo permite que estas enzimas sean catalíticamente activas sobre una gran diversidad de sustratos orgánicos (Dávila y Vázquez, 2006). Los vegetales y sus residuos son una importante fuente para el crecimiento de hongos, los cuales utilizan como sustratos a los principales constituyentes de las paredes celulares como hemicelulosas, pectinas, ligninas, celulosa usándolos como sustrato para su desarrollo (Papinutti *et al*., 2003).

**Temperatura.** Cada enzima tiene una temperatura óptima con la que actúa con mayor eficiencia. Esta normalmente se encuentra cerca de la temperatura normal del organismo del que procede, como es el caso de las enzimas de organismos termófilos, que presentan enzimas termoestables. En base a los rangos de temperatura de catálisis se ha generado una clasificación de las enzimas termoestables en tres grupos, de acuerdo al rango de temperatura de estabilidad: termoestables moderadas (45-65°C), termoestables (65-85°C) y termoestables extremas (>85°C) (Demijaran *et al*., 2001). Además de la resistencia y capacidad de catálisis a elevadas temperaturas, las enzimas procedentes de microorganismos termófilos o termozimas presentan también mayor resistencia que sus homólogas procedentes de mesófilos frente a agentes desnaturalizantes como cosolventes, agentes caotrópicos y detergentes, no requieren refrigeración para su mantenimiento en forma activa y presentan vidas medias prolongadas (Mozhaev, 1993). Aunque la presencia y

concentración de metabolitos protectores específicos (poliaminas, azúcares, fosfogliceratos de azúcares) ayuda a proteger parcialmente (unos 5ºC) a las enzimas en el interior del citoplasma de muchos de los microorganismos termófilos, éstas presentan óptimos de actividad próximos a los de crecimiento del organismo de procedencia (Alkorta *et al.*, 1998; Santos y da Costa, 2001; Bruins *et al.*, 2001).

## Enzimas Fibrolíticas

La mayoría de los carbohidratos consumidos por hongos degradadores como lo es *P. pistillaris,* provienen de las paredes celulares de tejidos vegetales formados principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina. Estos pueden ser convertidos en azúcares solubles por la acción de enzimas, las cuales reciben el nombre de enzimas fibrolíticas. Dentro de estas enzimas podemos encontrar al complejo de celulasas, xilanasas y lacasas obtenidas en su mayoría de microorganismos como hongos, bacterias y protozoos (Chesson y Forsberg, 1997). En base a las características descritas anteriormente, el interés del presente trabajo está enfocado en aquellas enzimas hidrolíticas excretadas por *P. pistillaris* cuyo sustrato son polisacáridos que constituyen las principales fibras de las paredes celulares de residuos lignocelulósicos.

### Materiales lignocelulósicos.

La pared celular de las células vegetales está formada por 3 capas denominadas lámina media, pared primaria y pared secundaria (García y Peña, 1995). La lámina media está conformada por materias pécticas, hemicelulosas, extensinas y celulosa, las paredes primaria y secundaria contienen fibras longitudinales y transversales de celulosa y hemicelulosas (Orpin, 1984).

Además de estos polisacáridos, gran cantidad de compuestos fenólicos se encuentran presentes en la estructura de la lignina, la cual se encuentra principalmente en la lámina media de la pared celular y en las capas de la pared celular, formando una matriz alrededor de las microfibrillas de celulosa.

En los ambientes áridos los procesos de descomposición son muy lentos debido a que las condiciones climáticas no favorecen la actividad microbiana, existiendo una gama de sustratos, entre los principales encontramos a la celulosa, lignina y hemicelulosas que son derivadas principalmente de la caída de hojas, o material orgánico presente en el suelo (Noe y Abril, 2008). Entre las enzimas que degradan estos compuestos están las celulasas, xilanasas, lacasas, arabinoxilanasas, entre otras.

## Principales Enzimas Fibrolíticas, Sustratos y Aplicaciones

### Celulasas

La celulasa es un complejo de enzimas que se encargan de la degradación de la celulosa y consta de dos unidades importantes como mínimo. La celulasa unidad C: 1 rompe los enlaces de hidrógeno liberando cadenas de glucosa las cuales por la acción de la unidad C:X son hidrolizadas para formar celobiosa y glucosa (Beauchemin y Rode, 1996). Las enzimas del complejo celulasas más comunes son las endo ß−1,4−glucanasas (E.C. 3.2.1.4) estas rompen al azar los enlaces internos de la molécula en las regiones amorfas, producen un rápido decremento en la longitud de la cadena y un lento incremento de los grupos reductores libres. Las exo−ß−1,4−glucanasas (E.C. 3.2.1.91) remueven unidades de glucosa o celobiosa a partir del extremo libre no reductor de la cadena de celulosa, dando como resultado un incremento rápido en los azúcares o grupos reductores y poco cambio en el tamaño del polímero. La ß−glucosidasa (E.C. 3.2.1.21) hidroliza la celobiosa producida por las actividades anteriores, dando como producto final la glucosa (Ponce y Pérez,

2002). En el caso de las enzimas celulasas provenientes de *P. pistillaris* no existe información acerca de dicha actividad, sin embargo se ha visto la presencia de dichas enzimas en otros hongos como por ejemplo *Trichoderma reessei, Trichoderma koningii, Sporotrix sp., Alternaria sp., Trametes sp*. (Lynd *et al.,* 2002).

**Celulosa.** La celulosa es el principal componente de las paredes celulares de las plantas. Es una fibra vegetal que al ser observada en el microscopio es similar a un cabello humano, cuya longitud y espesor varía según el tipo de planta (Béguin y Aubert, 1994). Es un polímero natural, constituido por una larga cadena de carbohidratos, cuya estructura se forma por la unión de moléculas de glucosa a través de enlaces ß-1,4-glucosídicos, lo que hace que sea insoluble en agua. La celulosa tiene una estructura lineal o fibrosa, en la que se establecen múltiples puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de distintas cadenas yuxtapuestas de glucosa, haciéndolas muy resistentes e insolubles al agua como se muestra en la figura 2. De esta manera, se originan fibras compactas que constituyen la pared celular de las células vegetales, dándoles así la rigidez necesaria (Béguin y Aubert , 1994).

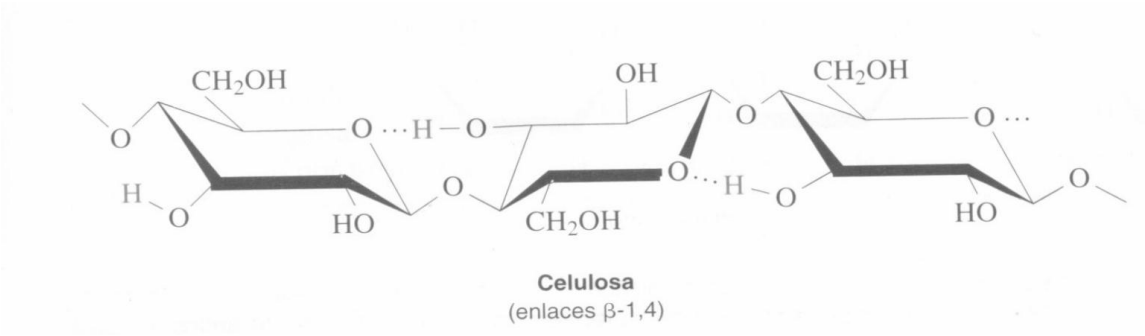


Figura 2. Esquema de la configuración de la celulosa. La estructura se estabiliza por puentes de hidrógeno entre unidades de glucosa adyacentes de la misma cadena (Stryer, 1998).

En la pared celular, la celulosa se encuentra formando láminas en las cuales las microfibrillas se organizan en paralelo presentando una orientación

diferente en cada lámina. Éste arreglo puede tener implicaciones importantes en relación a los procesos de degradación por las enzimas microbianas. Las microfibrillas se encuentran en una matriz de hemicelulosa y lignina (Béguin y Aubert, 1994).

Los residuos de pastos estacionales y residuos de vegetación aportan estos materiales al suelo. En los suelos podemos encontrar microfibrillas de celulosa, inmersa en una matriz amorfa, compuesta de polisacáridos no celulósicos (hemicelulosa) pectinas, proteínas y lignina (Lam *et al.,* 1990).

**Aplicaciones industriales de las enzimas celulasas.** Una de las aplicaciones industriales de estas enzimas es en la elaboración de la pulpa para el papel, jugando un papel importante en la refinación y molienda de la madera para reducir la aspereza (Pere *et al.,* 1995). Las celulasas también son utilizadas en la industria de los detergentes.

Dentro de la industria alimenticia, las celulasas se usan para favorecer la extracción y filtración de jugos de frutas o verduras, filtración de mostos y de aceites comestibles (Ovando  y Waliszewski, 2005).

El reto principal de la industria y la biotecnología en la producción de combustibles es la bioconversión de la celulosa, por lo que las celulasas recientemente han recibido gran atención ya que estas enzimas presentan altas actividades en diferentes condiciones de temperatura, salinidad y pH, constituyendo un punto crítico (Sun y Cheng, 2002).

**Xilanasas**

Las xilanasas son capaces de hidrolizar los enlaces glucosídicos de los xilanos. Las endoxilanasas o xilanasas (endo-β-1,4-xilanasas; EC 3.2.1.8) son las

enzimas que actúan sobre la cadena principal del xilano hidrolizando los enlaces internos β (1→4) entre moléculas de xilosa, dando lugar a una mezcla de xilooligosacáridos de diferentes tamaños (Biely, 1985). Para que la degradación de materiales xilanolíticos sea eficaz las enzimas endo-ß-D-xilanasas (E.C. 3.2.1.8), rompen al azar los enlaces glicosídicos de la cadena principal de la molécula. La arabinofuranosidasa (E.C. 3.2.1.55) hidroliza las cadenas laterales de arabinosa, mientras que las acetil xilanesterasas (E.C. 3.1.1.72) liberan grupos acetatos. La glucoronidasa (E.C. 3.2.1.139) remueve las cadenas laterales de ácido glucorónico a partir de unidades de xilosa. Las ß-xilosidasas (E.C. 3.2.1.37) son enzimas activas sobre oligosacáridos cortos, llevando a cabo la hidrólisis de los enlaces ß-1,4-aril-xilopiranósido produciendo xilosa (Biely,1993). Los productores potenciales más importantes de enzimas xilanolíticas a escala industrial son especies de hongos pertenecientes a los *Aspergillus* y *Trichoderma.* Sin embargo, existe un vacío de información sobre la actividad xilanolítica de *P. pistillaris*.

Las xilanasas utilizan a la hemicelulosa como su sustrato, si bien en los suelos donde fructifica *P. pistillaris* podemos encontrar microfibrillas de celulosa, hemicelulosa, pectinas, proteínas y lignina que permiten el desarrollo en estos suelos debido a la capacidad del organismo para hidrolizar estos compuestos y hacerlos asimilables para su desarrollo (Lam *et al.,* 1990)

**Hemicelulosas.** Son polisacáridos solubles en álcali constituídos principalmente por pentosas estrechamente asociadas a la celulosa, que forman parte de la pared celular. Este polisacárido puede estar formado estructuralmente por unidades D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, D-xilosa y L-arabinosa unidas en diferentes combinaciones por enlaces glucosídicos (Van Soest, 1982) (figura 3) produciendo glucoxilanos, xiloglicanos, arabinogalactanos, arabinoxilanos, según las proporciones de los azúcares monoméricos antes mencionados. Las hemicelulosas forman parte de las

paredes de las diferentes células de los tejidos del vegetal, recubriendo la superficie de las fibras de celulosa y permitiendo el enlace de pectina (Van Soest, 1982).

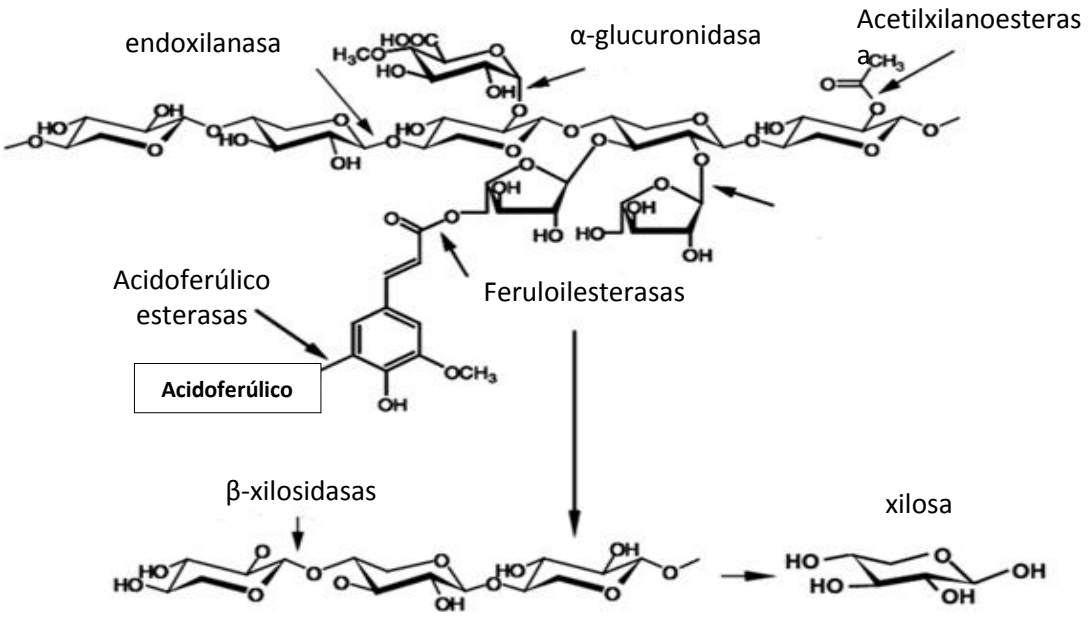


Figura 3. Estructura química de una hemicelulosa. Formada estructuralmente por unidades D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, D-xilosa y L-arabinosa unidas en diferentes combinaciones por enlaces glucosídicos. Tomada de www.ec.asm.org

Basado en los principales residuos de azúcares presentes en el esqueleto del polímero, las hemicelulosas pueden ser xilanos, glucomananos, galacturonanos o arabinanos, siendo los más importantes los xilanos y glucomananos (Bhat y Hazlewood, 2001).

El xilano es un polisacárido muy abundante en la naturaleza; el más abundante después de la celulosa (Collins *et al.,* 2005). Forma parte de las hemicelulosas presentes en la matriz de la pared celular secundaria de los tejidos lignificados de las plantas leñosas (Timell, 1967), aunque también se puede encontrar en la matriz de las paredes primarias de células en crecimiento de semillas y bulbos teniendo una función de reserva.

**Aplicaciones industriales de las xilanasas.** Una de las aplicaciones de las xilanasas en la industria es en la filtración lenta del macerado o de la cerveza final, ya que a veces hay presencia de polisacáridos viscosos como xilanos. En la industria de la panificación las xilanasas, especialmente la endo-1,4-ß-xilanasa, se adicionan a la masa para mejorar su calidad, obteniéndose productos de panadería con mejor textura y sabor (Poutanen, 1997).

**Lacasas**

Son enzimas multicúpricas que pertenecen al grupo de oxidasas azules y existen ampliamente en la naturaleza (Zabel y Morrol, 1992; Bourbonnais *et al.,* 1997). En contraste, con la mayoría de las enzimas, que son muy específicas hacia el sustrato, las lacasas tienen una amplia gama de sustratos, incluyendo difenoles, polifenoles, diferentes fenoles sustituidos, diaminas, aminas aromáticas, e incluso algunos compuestos inorgánicos, tales como el yodo (Rodríguez *et al.,* 2008). Cuando se oxida por una lacasa, el sustrato se reduce perdiendo un solo electrón teniendo como aceptor final al oxígeno y por lo general forma un radical libre (Rodríguez *et al.,* 2008). Se ha estudiado la actividad de enzimas lacasas en hongos como *Phellinus* sp. *,Corticiaceae , Trametes* sp., *Earliella* sp., *Ramaria* sp. entre otros basidomicetos (Chaparro *et al.,* 2009), no así para *P. pistillaris*. Sin embargo, debido a que en los suelos donde se encuentran *P. pistillaris* podemos encontrar pedazos de madera, y hojas en descomposición los cuales contienen a la lignina, podemos suponer que este material vegetal está siendo degradado por las enzimas lacasas.

**Lignina.** La lignina es el constituyente intercelular de las células fibrosas de los vegetales. Se concentra en la laminilla media y funciona prácticamente como relleno para impartir rigidez al tallo de la planta, siendo el segundo elemento en importancia de la composición vegetal (Rodríguez *et al.,* 2008).

La molécula de lignina presenta un elevado peso molecular, que resulta de la unión de varios ácidos y alcoholes, cuyas estructuras son de naturaleza fenilpropílica (ácido cumarílico, coniferílico y sinapílico) (Taiz y Zeiger, 2006). El acoplamiento aleatorio de estos radicales origina una estructura tridimensional, polímero amorfo característico de la lignina. La lignina es el polímero natural más complejo en relación a su estructura y heterogeneidad. Por esta razón no es posible describir una estructura definida de la lignina; sin embargo, se han propuesto numerosos modelos que representan su estructura (Ralph, 1997).

**Aplicaciones industriales de las enzimas lacasas.** Una aplicación de esta enzima es en la eliminación de compuestos fenólicos indeseables responsables de la turbidez de jugos, vino y cervezas (Rodríguez y Toca, 2006). La lacasa estimula la formación de redes en el gluten de trigo para dar estabilidad a la harina al momento de hornear (Rodríguez y Toca, 2006). Otra aplicación es que puede formar radicales reactivos en lignina para modificar ciertas fibras de la madera (Bajpai, 1999). En medicina se ha evaluado a la enzima como inhibidora de la transcriptasa reversa del virus del VIH-1 (Wang y Ng, 2004).

## Enzimas Fibrolíticas Fúngicas Termoestables

Durante las últimas décadas se ha buscado la fuente de extracción de enzimas termoestables, destacando los hongos termófilos por la resistencia a temperaturas elevadas en el medio ambiente natural. *Thermomyces lanuginosus* es un hongo termófilo, el cual posee enzimas fibrolíticas como xilanasas que muestran una actividad remanente al 60%, después de una incubación a 70°C por un período de tiempo de 1h en muestras recolectadas en Tailandia (Parichart *et al.,* 2011).

Otro ejemplo de enzimas industriales extraídas a partir de hongos es en *Lentinula edodes* donde se estudió la termoestabilidad de la enzima xilanasa

manteniéndose su actividad estable a 50, 60 y 65°C durante 21h perdiendo solamente del 15-25% de actividad (Costa *et al*., 2012). En base a lo anterior, el presente trabajo presta particular atención a la termoestabilidad del sistema enzimático de *P. pistillaris.*

# CAPITULO III

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## Hipótesis

*Podaxis pistillaris* sintetiza enzimas fibrolíticas termoestables.

## Objetivo

Identificar la actividad fibrolítica termoestable en cultivo sumergido de *Podaxis pistillaris*.

## Objetivos Específicos

1. Recolectar, identificar y aislar a *P. pistillaris* en el municipio de Hermosillo, Sonora.
2. Seleccionar el medio mínimo que produzcan la mayor biomasa en cultivo sumergido, así como las distintas fuentes de carbono para la detección de actividad fibrolítica.
3. Determinar la actividad fibrolítica extracelular de *P. pistillaris* en cultivo sumergido.
4. Caracterizar la termoestabilidad de la actividad fibrolítica en el sobrenadante de los cultivos de *P. pistillaris*

# CAPITULO IV

# MATERIAL Y MÉTODOS

Recolección e Identificación del Hongo *P. pistillaris*

El cuerpo fructífero de *P. pistillaris* se recolectó en el municipio de Hermosillo, Sonora, México, tomando en cuenta las características macroscópicas y microscópicas para la identificación de la especie propuesta por Guzmán y Herrera (1969), tales como tamaño de espora (12-15µm), forma del peridio, color del peridio, altura y color de esporas.

## Aislamiento del micelio

El aislamiento del micelio consistió en la recolección de la especie inmadura, realizando cortes transversales y longitudinales del peridio para obtener parte del contexto ya que es la sección más estéril. Estas muestras fueron sembradas en placas con Agar dextrosa de papa (Difco) y Agar extracto de malta (Difco) y puestos a incubar a 27°C por 15 días. Posteriormente, se realizaron resiembras con el fin de obtener micelio joven para los siguientes estudios. Para conservar el micelio se utilizó el medio Agar de Avena.

## Extracción de ADN de *P. pistillaris*

Para la identificación genética de *P. pistillaris* se llevó a cabo la extracción de ADN genómico siguiendo la metodología de Plaza y colaboradores (2004). Para este proceso se utilizó como muestra el cuerpo fructífero del hongo, a partir de

la cual se realizó la extracción utilizando una solución de lisis y perlas de vidrio para el rompimiento celular, seguido por la eliminación del debris celular por centrifugación (10 min a 12,000 rpm) y finalmente una precipitación del ADN con isopropanol frio. El ADN genómico o total obtenido, que se observa en forma de un precipitado, se lavó con una solución de etanol al 70% y se centrifugó a 4°C para dejarse secar a medio ambiente. El ADN así obtenido, se resuspendió en agua bidestilada estéril y se visualizó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

**Amplificación y clonación de ITS de *P. pistillaris***

Una vez obtenido el ADN de *P. pistillaris* se llevó a cabo la identificación por medio de las secuencias ITS (Internal Transcribed Spacer) técnica mediante la cual se puede relacionar filogenéticamente a las distintas especies de hongos (Peay *et al*., 2008). Los ITS de *P. pistillaris*, se obtuvieron por medio de PCR, utilizando como templado el ADN genómico y los oligonucleótidos iniciadores ITS1 (5´ TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3'), ITS4 (5´ TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3´) e ITS5 (5´ GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G 3´). Se realizaron reacciones de 25 µl preparadas con la mezcla para PCR Go Taq Green Master Mix (Promega), que contiene una ADN polimerasa. Los productos de amplificación (amplicones) obtenidos, se analizaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio.

Para obtener la secuencia nucleotídica del fragmento amplificado por PCR, se llevó a cabo la ligación de los amplicones obtenidos al plásmido pCR 2.1 (Invitrogen) utilizando la enzima ADN ligasa T4, posteriormente esta mezcla se incubó durante toda la noche a una temperatura de 4°C. Se transformaron las células de *E. coli* TOP 10 con el plásmido que contenía los insertos por medio de un choque térmico a 42°C durante 1 minuto, y se agregaron 250 µl de medio SOC y se incubaron a 37°C por una hora en agitación constante. Enseguida se inocularon las placas con medio LB y ampicilina incubándose por

toda la noche a 37°C. A partir de las células transformadas, se llevó a cabo la extracción de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina (Sambrook y Russel, 2001)

Las muestras que resultaron positivas a la inserción del DNA se enviaron al laboratorio Genomic Analysis and Technology Core (GATC) de la Universidad de Arizona (Tucson, AZ. USA) para determinar la secuencia nucleotídica. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el algoritmo de BLASTx comparando las secuencias ITS de *P. pistillaris* con otras secuencias reportadas utilizando la base de datos GenBank del National Center for Biology Infomation (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

## Determinación de Biomasa

La biomasa se determinó de la siguiente manera, se llevó a peso constante el papel filtro Whatman #1 reportándose esto como el peso inicial. Posteriormente se filtró el medio con el micelio a través del papel para después ponerlo a secar a 60°C durante 2 días. Finalmente se registró el peso y por diferencia se determinó el peso seco. Se reportó la cantidad de biomasa en miligramos (mg) de peso seco producidos a los 21 días de inoculación.

## Determinación de la Temperatura Óptima de Crecimiento de *P. pistillaris*

Una vez aislado el micelio de *P. pistillaris,* éste fue inoculado en placas con PDA, siguiendo el diámetro de crecimiento cada tercer día, incubándose a temperaturas 25, 30, 35, 40 y 45°C durante un periodo de 21 días, los resultados del crecimiento miceliar se reportaron en centímetros (cm). El micelio con mayor densidad y crecimiento a las distintas temperaturas, fue el seleccionado para estudios posteriores.

Determinación del pH Óptimo de Crecimiento de *P. pistillaris.*

Se inoculó el micelio *P. pistillaris* en matraces con medio de cultivo líquido Caldo Dextrosa de Papa, con valores de pH de 4, 5, 6, 7 y 8; inoculando con 3 rodajas de *P. pistillaris* de aproximadamente 1 cm de diámetro en cada matraz. Después de incubaron en agitación constante a 120 rpm y a una temperatura de 40°C, se determinó la biomasa producida al día 21 de inoculado el medio. Se reportó la cantidad de biomasa en miligramos (mg) de peso seco producidos a los 21 días de inoculación.

Selección del Medio Mínimo Óptimo para el Cultivo Sumergido de *P. pistillaris*

Se determinó la biomasa generada a los 21 días de inoculado el micelio de *P. pistillaris* en los medios mínimos de Vogel (Vogel, 1956), el medio M9 (Miller, 1972) y el medio de Kirk (Kirk *et al.,* 1978), según modificaciones de Cabrera (2010), colocados en agitación contante a 120 rpm y 40°C.

**Medio de Vogel***:* Los constituyentes del medio de Vogel se disolvieron en 1 L de agua milliQ (tabla 1 y 2) y se añadió 1 ml de cloroformo como conservador. Posteriormente, este medio se filtró para esterilizarse en autoclave a 121°C y 15 psi durante 15 min.

Tabla 1. Componentes del medio mínimo por 1 L de medio de Vogel

| **Componentes** | **Cantidad/L** |
|---|---|
| Citrato de sodio | 2.5 g |
| $KH_2PO_4$ | 5.0 g |
| $NH_4NO_3$ | 0.2 g |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.1 g |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0.01 g |
| Sol. elementos traza | 1 ml |
| Sol. Biotina | 20 mg |
| Agar | 20 g |

Tabla 2. Componentes de la solución de elementos traza del medio de Vogel.

| Componentes | Cantidad (g/100ml) |
|---|---|
| Acido cítrico | 5.0 g |
| $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 5.0 g |
| $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ | 1.0 g |
| $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ | 0.25 g |
| $MnSO_4 \cdot H_2O$ | 0.05 g |
| $H_3BO_3$ | 0.05 g |
| $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ | 0.05 g |

**Medio M9:** En la tabla 3, se muestran los componentes del medio M9, según Miller (1972). Los constituyentes del medio M9 fueron disueltos en 1 L de agua milliQ y el medio fue esterilizado en autoclave a 121°C y 15 psi durante 15 min.

Tabla 3. Componentes del medio mínimo M9

| Componentes | Cantidad |
|---|---|
| $Na_2HPO_4$ | 30 g |
| $KH_2PO_4$ | 15 g |
| $NH_4Cl$ | 5.0 g |
| Nacl | 2.5 g |
| $CaCl_2$ | 15 g |

**Medio Kirk:** En la tabla 4, se muestran los componentes del medio de Kirk, según la modificación Cabrera (2010). Los constituyentes se disolvieron en 1 L de agua milliQ, y se procedió a esterilizar el medio en autoclave a 121°C y 15 psi durante 15 min.

Tabla 4. Composición del medio mínimo Kirk con modificaciones realizadas por Cabrera (2010).

| Componentes | Cantidad |
|---|---|
| $KH_2PO_4$ | 2.0 g |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.5 g |
| $CaCl_2$ | 0.1 g |
| $NH_4NO_3$ | 2 .0 g |
| CMC | 20 g |

Medio Mínimo para Actividad Enzimática de *P. pistillaris*

El medio mínimo utilizado fue el medio de Kirk realizándose modificaciones para la determinación de cada actividad enzimática (Tabla 5). Las modificaciones del medio de Kirk se dieron en función de la actividad enzimática a evaluar. Para celulasas la fuente de carbono fue carboximetilcelulosa (CMC), en lacasas se utilizó glucosa y CMC y para xilanasas se utilizo xilano. Adicionalmente y solo para lacasas se añadió un inductor.

Tabla 5. Modificaciones del medio mínimo de Kirk.

| **Medio mínimo Componentes** | **Celulasas** | **Xilanasas** | **Lacasas** |
|---|---|---|---|
| 2gr de $KH_2PO_4$ | ✓ | ✓ | ✓ |
| 0.5 gr de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | ✓ | ✓ | ✓ |
| 0.1 gr de $CaCl_2$ | ✓ | ✓ | ✓ |
| 2 gr de $NH_4NO_3$ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Fuente de Carbono | CMC | Xilano | CMC y glucosa |
| Inductor de actividad | NP | NP | $Cu_2SO_4$0.001mM |
| Agua | ✓ Qsp 1L | ✓ Qsp 1L | ✓ Qsp 1L |

Cultivo Sumergido de *P. pistillaris*

Se realizaron cortes de aproximadamente 1 cm² de los cultivos puros del medio PDA para utilizarse como inóculo en el Medio Kirk. Los matraces fueron inoculados con tres cortes e incubados por un período de 24 días para el seguimiento de la determinación de cada actividad enzimática. Las condiciones de cultivo fueron de 120 rpm, a una temperatura de 40°C.

Determinación de Actividad Enzimática

**Actividad de celulasas**

La actividad de celulasas se determinó por la técnica de azúcares reductores de Dubois (Dubois *et al.,* 1956) expresándose como glucosa (mg/ml). El cultivo de *P. pistillaris* en Medio Kirk se incubó a una temperatura de 40°C y una agitación constante de 120 rpm. El sustrato utilizado fueron 15 mg. de papel filtro Whatman #1, incubándose con el extracto enzimático (sobrenadante del medio de cultivo) durante 60 min, cada 15 min se tomó una alícuota para realizar la reacción de Dubois (tiempo 15, 30 y 60 min). La mezcla de reacción consistió en 250 µl de extracto crudo, 1000 µl de fenol al 5% y 5000 µl de ácido sulfúrico concentrado. Se define la unidad de actividad enzimática (U) como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 µmol de glucosa en un minuto. Todos los datos se ajustaron a la curva patrón de comparación con glucosa (0, 10, 20, 40, 60 y 80 mg/ml).

**Actividad de xilanasas**

La actividad de xilanasas se determinó por la técnica de azúcares reductores de Dubois (Dubois *et al.,* 1956) utilizando una curva estándar con xilosa (mg/ml). Las condiciones de cultivo del Medio Kirk inoculado con el micelio de *P. pistillaris,* fueron de 120 rpm de agitación constante a una temperatura de 40°C.

El sustrato que se utilizó fue xilano, incubándose 15 mg. del sustrato con el extracto enzimático durante 60 min, cada 15 min; se tomó una alícuota realizándose la reacción de Dubois. La mezcla de reacción consistió en 250 µl de extracto crudo, 1000 µl de fenol al 5% y 500 µl de ácido sulfúrico concentrado. La unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 µmol de xilosa en un minuto. Todos

los datos se ajustaron a la curva patrón de comparación con xilosa con distintas concentraciones (0, 10, 20, 40, 60 y 80 mg/ml).

**Actividad de lacasas**

Se determinó midiendo la oxidación de siringaldazina a 530 nm, durante 3 min. La mezcla de reacción contenía siringaldazina a una concentración de 0.216 mM, en un buffer de reacción citrato-fosfato 0.1 M, pH 5.5 (Carvajal *et al.,* 2005). Se tomaron 167 µl del sobrenadante, y 730 µl del buffer, posteriormente se colocaron 64µ de siringaldazina, midiendo la absorbancia durante 3 min. Se sustituyeron los datos en la ecuación:

$$Actividad\ Enzimática\ (\frac{U}{\mu l}) = \frac{\text{pendiente} * 10^6 * \text{dilución}}{\epsilon\ *\ \text{V}}$$

Donde Є siringaldazina equivale a 65, 000 litros/mol/cm, la pendiente es el cambio de absorbancia cada 30 de la reacción y el V es el volumen de enzima en la reacción (µl). Se define la unidad de actividad enzimática (U) como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 µmol de sustrato en un minuto.

Determinación de la Concentración de Proteínas

El método utilizado en este trabajo fue el de Bradford (1976). Se usaron 300 µL de muestra (extracto enzimático), a la cual se le adicionaron 200 µL de reactivo de Bradford (Bio-Rad) y 500 µL de agua destilada. La solución se agitó y después de 5 minutos en reposo, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. Para conocer la concentración de proteína en la muestra se construyó una curva estándar con 1.5, 3, 6, 9, 12, 15 y 18 mg/ml de albúmina sérica bovina. Las determinaciones de proteína se hicieron por triplicado.

## Determinación de la Termoestabilidad Enzimática (Celulasas, Lacasas y Xilanasas)

En la medición de la termoestabilidad enzimática para cada tipo de actividad, el extracto se incubó durante 4 horas, a temperaturas de 40, 50, 60 y 70°C. Cada hora se tomó una alícuota de 300 µl del extracto para llevar a cabo la determinación enzimática de acuerdo a las técnicas antes mencionadas para cada actividad fibrolítica.

# CAPÍTULO V

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Recolección e Identificación de *P. pistillaris*

En el presente trabajo se recolectó el cuerpo fructífero de *P. pistillaris* en el oeste, este y centro del municipio de Hermosillo, Son., México. Las latitudes de muestreo fueron 29°07´24.04”N 110°53´38.41”O 238msnm, 29°04´19.83”N 110°56´47.13”O 202msnm, 28°46´52.90”N 111°27´01.38”O 63msnm, para los especímenes recolectados (figura 4).

Figura 4. Lugares muestreados en el oeste, este y centro del municipio de Hermosillo, Son., México, donde se recolectaron los especímenes para su identificación y aislamiento.

En base a los estudios previos, se recolectaron especímenes cuyas características morfológicas se asemejaban a la descripción reportada por Guzmán y Herrera (1969). Los cuerpos fructíferos de *P. pistillaris* en el desierto de Sonora presentaron una altura entre los 12 y los 15 cm, presentando un peridio ovalado, blanquecino, con escamas en ejemplares maduros (figura 5).

Figura 5. Morfología de *Podaxis pistillaris*.

Las esporas se observaron esféricas bajo microscopía electrónica de barrido de 13 a 15 µm diámetro (figura 6), blanco a amarillo inmaduras, hasta verde olivo o marrón al llegar a su madurez en el cuerpo fructífero. Morse (1933) reportó la taxonomía de *P. pistillaris* en especímenes recolectados en el Norte de América y en otros países, presentando un peridio ovalado con color blanco amarillento, con escamas y esporas de 12-15 µm, valores y características similares al presente estudio. De igual manera Baseia y Galväo (2002) reportaron tamaños de esporas entre 13 y 15 µm diámetro y peridio escamoso y blanquecino.

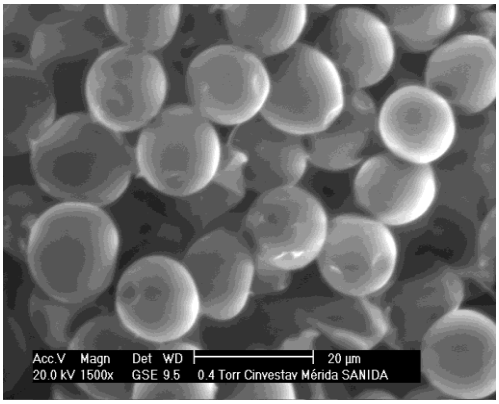


Figura 6. Esporas de *Podaxis pistillaris* observadas por microscopia electrónica de barrido.

Identificación molecular mediante secuencias ITS de *P. pistillaris*

La buena calidad de las muestras de ADN genómico, es de suma importancia para su análisis posterior. En la evaluación del ADN obtenido a partir del cuerpo fructífero del hongo, éste resultó íntegro, es decir sin degradar, observándose como una banda bien definida de aproximadamente 13,000 pb al observarse en gel de agarosa (figura 7).

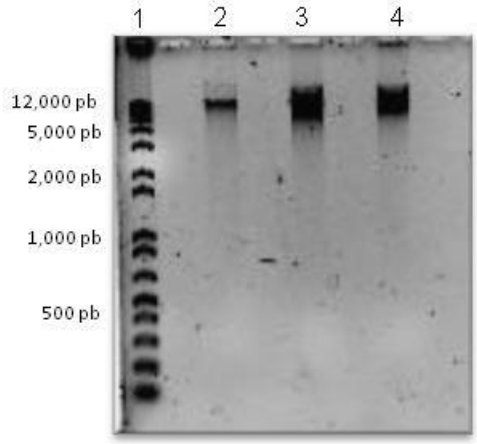


Figura 7. Electroforesis de muestras de ADN genómico de *P. pistillaris*. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Muestras de Carril 1: Marcador de peso molecular; carriles 2, 3 y 4, muestras de ADN genómico.

Una vez establecida la integridad del ADN, se llevó a cabo la amplificación de las secuencias ITS por medio de PCR, presentando los resultados obtenidos en la figura 8. Se utilizaron los primers ITS 1 y 4, así como los ITS 4 e ITS 5 con los cuales se obtuvieron productos de amplificación de aproximadamente 650 pb, que es el tamaño esperado cuando se utilizan estos iniciadores. Una forma rápida y eficaz de identificar los hongos es analizar la secuencia de regiones de DNA específicas (Seifert *et al*., 2007) por medio de la unidad ribosomal 5.8S flanqueada por sus espaciadores (ITS1-5.8S-ITS4). Esta información, junto con las características morfológicas y bioquímicas específicas, constituye la base de la identificación y clasificación taxonómica del hongo.

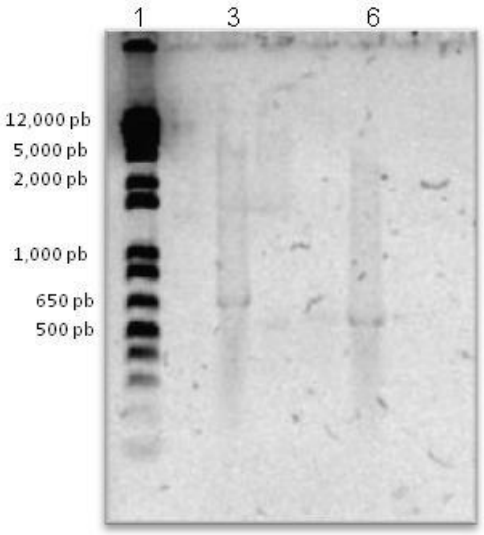


Figura 8. Gel de electroforesis para el producto de PCR de *P. pistillaris*. Carril 1: marcador de peso molecular; carriles 3 (ITS1y 4) y 6 (ITS1 y 5): Producto de amplificación correspondientes a secuencias ITS de *P. pistillaris*.

Las secuencias de ITS amplificadas, se clonaron y se determinó su secuencia nucleotídica, la cual se comparó con otras depositadas en el banco de datos del GenBank con el fin de identificar genéticamente al hongo *P. pistillaris*. La secuencia de 791 pb obtenida, confirmó la identidad del hongo,

mostrando un alto grado de homología al ser comparadas con otras de *P. pistillaris.*

Durante el análisis se encontró en la base de datos del GenBank, una secuencia nucleotídica de 744 pb obtenida de un hongo *P. pistillaris* (GenBank U85336.1), secuencia que presenta un 99% de homología con respecto a la secuencia obtenida en este trabajo. De la misma manera se encontraron 5 secuencias más identificadas como ITS de *P. pistillaris,* con valores superiores al 95% de homología con los resultados obtenidos en este trabajo (Anexo1).

Con lo anterior se confirmó que la identidad del organismo de estudio es *P. pistillaris*, y esta identificación es complementada por las características morfológicas reportadas con fines taxonómicos. La elevada homología de nuestra secuencia con otras reportadas indica que presentan un mismo origen evolutivo, correspondiendo todas a *P. pistillaris*.

Aislamiento de *Podaxis pistillaris*

Para el aislamiento de micelio de *P. pistillaris* se emplearon dos medios comerciales utilizados en estudios previos. El hongo se inoculó en los medios EMA y el PDA, y se siguió el diámetro de crecimiento durante 21 días. Como resultado se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el crecimiento del hongo entre ambos medios, con valores promedio de 4 cm en el medio PDA mientras que para el medio EMA se presentó un valor de 2.8 cm (figura 9).

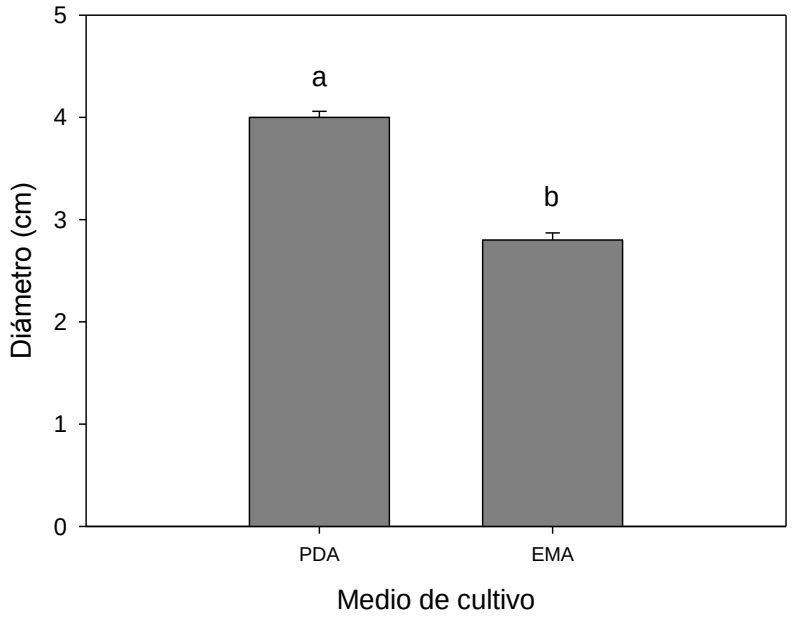


Figura 9. Crecimiento de *P. pistillaris* en dos distintos medio de cultivo, Agar extracto de malta (EMA) y Agar dextrosa de papa (PDA).

El medio de cultivo sintético que mejor resultado arrojó para el aislamiento y producción de micelio de *P. pistillaris,* fue PDA. El PDA es un medio de cultivo universal y se ha recomendado para el aislamiento y crecimiento de hongos en general (Agrios, 1988). El medio PDA contiene infusión de papa, dextrosa y agar, mientras que el medio EMA contiene maltosa, dextrosa, glicerol, peptona y agar, por lo que la infusión de papa ayuda a promover el crecimiento abundante de los hongos (Agrios, 1988). Además, se ha reportado que el PDA es el medio más eficiente para el desarrollo diametral del hongo y en la producción de conidias, debido a que aumenta la velocidad de crecimiento del hongo, generando la multiplicación mitótica produciendo mayor numero de conidios (Narrea y Malpartida, 2006).

Efecto de la Temperatura sobre el Crecimiento de *P. pistillaris*

En la figura 10 se muestra el crecimiento miceliar del hongo *P. pistillaris* a distintas temperaturas, entre los 25 y 45°C, sin existir diferencias significativas

(P≤0.5) entre las distintas temperaturas. Se observa una tendencia decreciente de los 25°C a los 40°C, posteriormente este crecimiento disminuyó hasta obtener un valor aproximado de 5 cm de diámetro a 45°C.

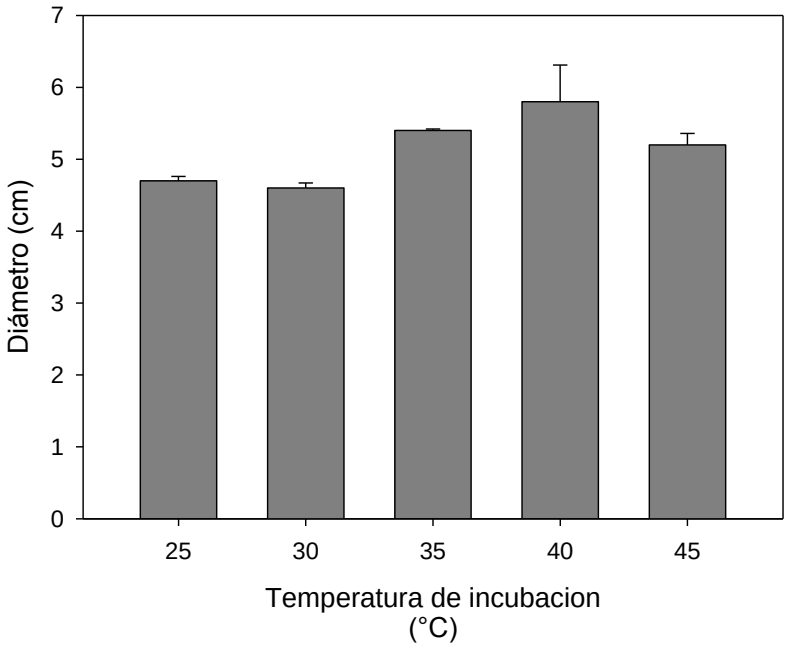


Figura 10. Crecimiento miceliar a distintas temperaturas de *P. pistillaris.*

Con el fin de establecer una temperatura de incubación como condición de cultivo, en base a la observación se obtuvo que el crecimiento a los 40°C mostraba una mayor densidad miceliar, comparada con las distintas temperaturas (figura 11), ya que a temperaturas menores de los 40 °C los micelios se extendían en el interior de la caja Petri, presentando una morfología poco densa. Con respecto a *P. pistillaris*, Aparicio y colaboradores (1991) encontraron que la mayoría de los especímenes crecen en zonas áridas, sobre todo en áreas que presentan suelos perturbados, a orillas de caminos, terrenos baldíos y soleados, en total exposición al sol por lo que las temperaturas son más elevadas y están completamente expuestos a los rayos ultravioletas del sol. Se ha reportado que algunos ejemplares se encuentran en regiones con vegetación de matorral subtropical libres de influencia de desierto, por lo que *P. pistillaris* presenta una diversidad de crecimiento en los distintos climas, que

oscilan desde los 0°C hasta las 40°C, concluyendo que debido a esta diversidad de microclimas *P. pistillaris* presentó un crecimiento a las distintas temperaturas de incubación propuestas en nuestro trabajo.

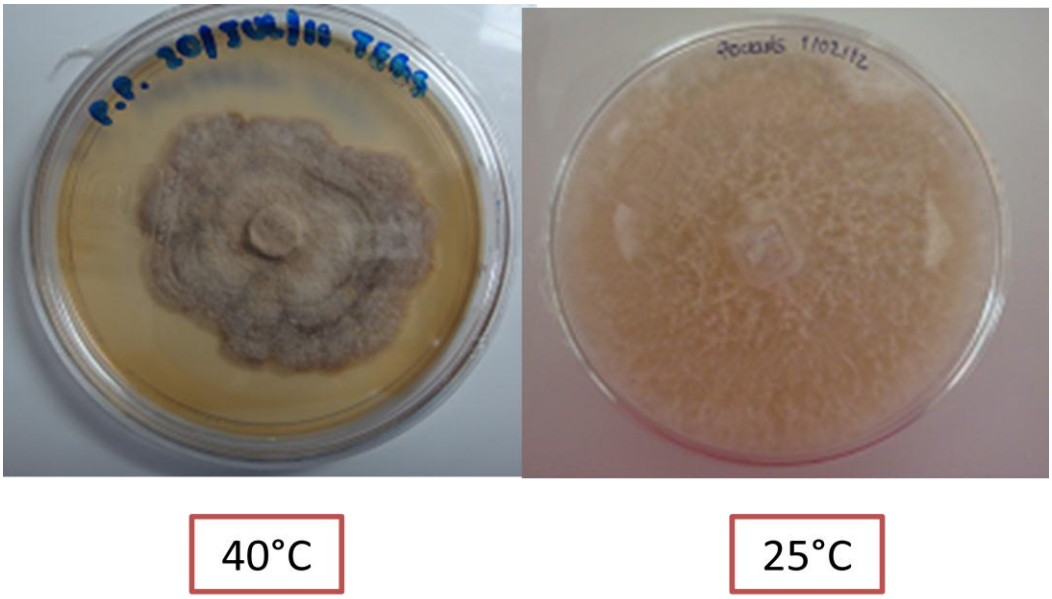


Figura 11. Crecimiento miceliar a 25 y 40°C de *P. pistillaris.*

Cabe mencionar que la temperatura de crecimiento de los cuerpos fructíferos en el desierto es variable, por lo que el desarrollo del micelio tiende a presentar esta variabilidad, presentando crecimiento a las distintas temperaturas, sin la existencia de una diferencia significativa, lo que sucedió en este estudio. Ordaz y colaboradores (2009) mencionan que dependiendo del hábitat del organismo, este factor estará asociado a la temperatura de incubación, una vez aislado. Con estudios a distintas temperaturas, podemos visualizar el rango de temperatura óptimo para que el hongo pueda crecer con mayor facilidad.

Efecto del Valor de pH Inicial Sobre el Crecimiento de *P. pistillaris* en Cultivo Sumergido

El ensayo sobre el efecto del pH se realizó en cultivo sumergido, en caldo PDB por triplicado con el fin de establecer las condiciones de cultivo para estudios posteriores. Para determinar el rango óptimo de *P. pistillaris* se analizaron distintos valores de pH, de 4 hasta 8, presentando diferencias significativas entre los valores de biomasa seca obtenidos (figura 12). En donde se observa una tendencia de mayor biomasa a pH's alcalinos, lo que concuerda con lo reportado por Esqueda y colaboradores (2000), quienes mencionan que el sustrato donde se encontraron los cuerpos fructíferos de *P. pistillaris* presentan un pH ligeramente alcalino, por lo que es de esperar que se den mejores crecimientos en estos rangos de pH.

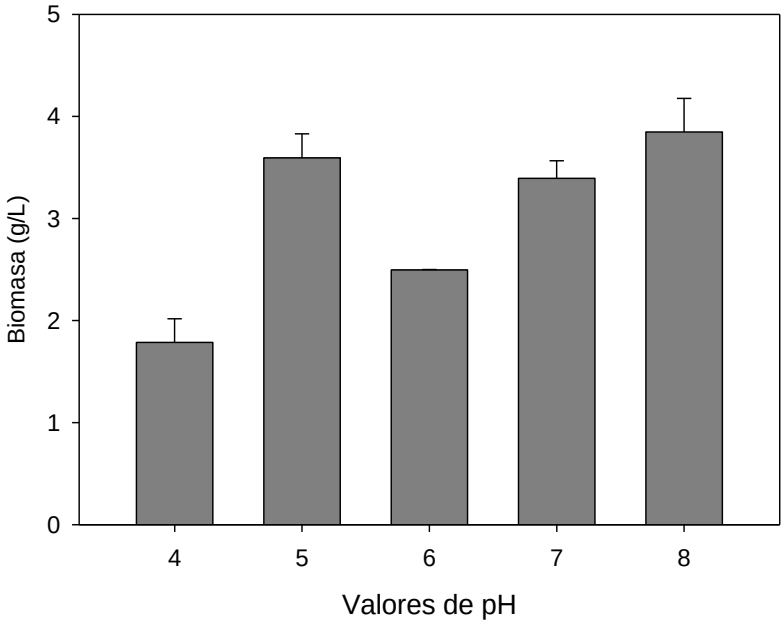


Figura 12. Estudio de pH en cultivo sumergido PDB de *P. pistillaris.*

La mayor cantidad de biomasa de *P. pistillaris* acumulada durante 21 días de cultivo fue a pH de 8 con 4 g/L, mientras que la menor cantidad de se produjo a un pH de 4, con 2 g/L, no obstante no existe diferencia significativa entre un pH de 7 y un pH 5, sin contar con información suficiente para la discusión de esta producción de biomasa.

El resultado de mayor biomasa de *P. pistillaris* a pH 8 concuerda con lo publicado por Aparicio y colaboradores (1991), quienes encontraron que *P. pistillaris* crece en suelos alcalinos con altos contenidos de nitrógeno y con concentraciones variables de materia orgánica. Asimismo observaron una relación entre la composición fisicoquímica del suelo y el contenido protéico y mineralógico de los ejemplares. Con nuestros hallazgos podemos establecer una concordancia entre los valores de pH para la producción de biomasa en cultivo sumergido, y los valores de pH del suelo en su hábitat natural.

La baja producción de biomasa a pH 4 pudiese explicarse por lo reportado por Guillén y colaboradores (1998), quienes observaron que *Pleurotus ostreatus,* al crecer a pH fuera del rango del valor óptimo se modificaba la actividad enzimática así como el transporte de nutrientes a través de la membrana, lo que alteraba su crecimiento.

## Selección del Medio Mínimo para la Determinación de Actividad Enzimática de *P. pistillaris*

La mayor producción de biomasa de *P. pistillaris* se obtuvo en el Medio Kirk (4.85 g), seguido por el medio de Vogel (3.65 g), y el menor en el medio mínimo M9 (2.68 g) (tabla 6).

Tabla 6. Producción de biomasa de *P. pistillaris* en distintos medios de cultivo

| Medios de Cultivo | Biomasa (g/L) |
|---|---|
| **Kirk** | 4.85 ± 0.06 |
| **Vogel** | 3.65 ± 0.07 |
| **M9** | 2.68 ± 0.02 |

Es importante mencionar que los medios han sido utilizados anteriormente por varios autores, por mencionar algunos ejemplos en el caso del medio M9, en la bacteria *E. coli* se utilizó el medio para la crioconservación (Alic y Gold, 1985). Del mismo modo, el medio de Vogel fue utilizado para el crecimiento del hongo *P. chrysosporium (*Alic y Gold, 1985) y el medio de Kirk para el crecimiento de hongos de pudrición blanca (Morgan, 1991). Sin embargo, este trabajo representa el primer reporte para cultivo sumergido de *P. pistillaris* utilizando estos medios de cultivo.

En base a los resultados obtenidos y debido a que el Medio Kirk presentó la mayor producción de biomasa de *P. pistillaris* se escogió este medio para los siguientes estudios

Actividad Enzimática de *P. pistillaris*

**Actividad enzimática de celulasas**

En el tabla 7 se muestra la presencia de actividad enzimática de celulasas en el sobrenadante del cultivo sumergido en todos los días monitoreados. Al día 3 se encontró una actividad de celulasas de 82 U/mg de proteína aumentando seis veces su valor en el día 18 de incubación, con un valor promedio de 490 U/L. Posteriormente, la actividad disminuyó durante los siguientes días de incubación hasta tener al día 24 una actividad de celulasas del 308 U/L, actividad mayor a la encontrada al inicio del crecimiento.

Tabla 7. Actividad celulolítica en *P. pistillaris.*

| Edad del cultivo (Días) | Actividad Específica (U/mg de proteína) |
|---|---|
| 3 | 81.8 ± 0.0074 |
| 6 | 104.3 ± 0.0018 |
| 9 | 172.5 ± 0.0134 |
| 12 | 189.4 ± 0.0043 |
| 15 | 196 ± 0.0009 |
| 18 | 501.7 ± 0.0002 |
| 21 | 469.1 ± .0041 |
| 24 | 307.5 ± 0.0074 |

La actividad celulolítica reportada para otros hongos, es producto de un complejo de enzimas llamadas celulasas, y comprenden exo-, endo-glucanasas y celobiohidrolasa mientras que la actividad reportada en este trabajo en de celulasas totales por el tipo de sustrato utilizado. Muchos estudios se enfocan en la actividad enzimática de cada una de las enzimas, tal es el caso del hongo *Cookeina sulcipes* el cual presentó una actividad de celobiosa deshidrogenasa de 144 U/mg de proteína (Chaparro *et al*., 2009).Por otra parte, el hongo *Trametes ssp.* presentó una actividad específica de 80.72 U/g de proteína; este hongo es conocido como uno de los principales productores de enzimas celulasas y lignolíticas (Machado *et al*., 2005). En *P. pistillaris* la actividad celulolítica es mucho menor que la reportada para *Trametes* y mayor a la reportada para hongos como *C. sulcipes.* Esta divergencia en los valores de actividad celulolítica puede deberse a que cada organismo tiene la capacidad de presentar distintas actividades, dependiendo del hábitat de crecimiento, así como los usos de dichas enzimas en su sistema enzimático.

La descomposición de la pared celular de vegetales, hongos u otros organismos, que se encuentran presentes en el suelo donde se desarrolla *P. pistillaris,* está relacionada con la producción de enzimas y el desarrollo del mismo, debido a que este organismo utiliza estas fuentes como sustrato para su crecimiento, llevando a cabo una deslignificación gradual, por la presencia de enzimas encargadas de hidrolizar compuestos complejos como la celulosa, a

menos complejos y que puedan ser asimilables por el hongo para su alimentación (Umbreit, 1967). En *P. pistillaris* no se han reportado las actividades celulolíticas, por lo que en este trabajo se establecen las bases para estudios posteriores.

**Actividad enzimática de xilanasas**

Se determinó la actividad xilanolítica de *P. pistillaris* en cultivo sumergido en Medio Kirk (tabla 8), iniciando con una actividad de 82 U/Mg proteína al día 3 y mostrando una tendencia creciente durante los siguientes 15 días de inoculación. Los valores máximos se alcanzaron al día 18, mostrando una actividad específica promedio de 157 U/mg de proteína (2 veces la inicial), valores comparables con los reportados para *P. ostreatus* y *A. niger* (Marquez *et al*., 2007). Posteriormente, los valores fueron decreciendo durante los últimos 6 días finalizando con una actividad de 97 U/Mg de proteína, valor semejante al encontrado en el inicio del experimental.

Tabla 8. Actividad xilanolítica de *P. pistillaris* en cultivo sumergido.

| Edad del cultivo (Días) | Actividad Específica (U/mg de proteína) |
|---|---|
| 3 | 82.33 ± 0.0206 |
| 6 | 126.45 ± 0.0256 |
| 9 | 142.75 ± 0.0332 |
| 12 | 143.08 ± 0.0378 |
| 15 | 153.50 ± 0.0197 |
| 18 | 157.77 ± 0.0191 |
| 21 | 100.49 ± 0.0386 |
| 24 | 96.92 ± 0.0156 |

Durante la última década se han estudiando distintos hongos, para la extracción de enzimas xilanolíticas para usos o aplicaciones definidas. Por ejemplo, Márquez y colaboradores (2007), reportaron la actividad de xilanasas con 1145 U/mg de proteína para el hongo *Trametes y* en el caso del hongo *P. ostreatus*, 255 U/mg de proteína a los 19 días de inoculación; cabe mencionar

que estos hongos son hongos lignolíticos, mientras que *P. pistillaris* al ser un hongo que crece en suelos y solo degrada los materiales lignolíticos presentes en el suelo; tiende a existir una relación menor en cuanto a la actividad enzimática que la reportada para organismos lignolíticos.

**Actividad de la enzima lacasa**

Se determinó la actividad de la enzima lacasa de *P. pistillaris* en el Medio Kirk, en cultivo sumergido durante 24 días. En el tabla 9 se presentan los valores de actividad específica promedio, determinados cada tercer día. Los valores mostraron una tendencia creciente durante los primeros 15 días de inoculación, alcanzando valores máximos al día 15 (179.6 U/mg); los valores más bajos se observaron durante el tercer día de inoculación con 85 U/mg de proteína. Estos valores bajos durante los primeros días de incubación se deben principalmente a la adaptación del hongo a las condiciones de cultivo sumergido, posteriormente esta actividad va aumentando conforme el hongo presenta una mejor adaptación.

Tabla 9. Actividad de lacasas en *P. pistillaris* bajo condiciones de cultivo sumergido.

| Edad del cultivo (Días) | Actividad Específica (U/mg de proteína) |
|---|---|
| 3 | 85.366 ± 0.0738 |
| 6 | 98.035 ± 0.0626 |
| 9 | 129.632 ± 0.0740 |
| 12 | 156.841± 0.0642 |
| 15 | 179.562 ± 0.0764 |
| 18 | 148.987± 0.0135 |
| 21 | 134.766± 0.0124 |
| 24 | 112.097 ± 0.0475 |

Los valores de actividad específica de lacasa de *P. pistillaris* son significativamente menores a los reportados para diversos hongos de pudrición blanca, tales como *C. sulcipes* con una actividad específica de 229 U/g de proteína; otro ejemplo de lo anterior es el hongo *Earliella* sp., el cual presentó

una actividad específica de la enzima lacasa de 59 U/g de proteína. Sin embargo, es importante mencionar que estos hongos son de pudrición blanca, donde la enzima lacasa juega un papel importante en la deslignificación de la pulpa de la madera (Chaparro *et al*., 2009) y a *P. pistillaris* no se le encuentra sobre árboles o madera en descomposición, y en los suelos donde se encuentra, la cantidad de lignina disponible es menor que la encontrada en sustratos para hongos de pudrición blanca, esto explica el porqué se encuentren actividades tan diferente. Una hipótesis, es que *P. pistillaris* utiliza esta enzima en la construcción de su cuerpo fructífero para protegerlo del sol, pues se le encuentra en suelos arenosos y notoriamente sin una asociación obligatoria a plantas que le brinden un sombreado constante. Sin embargo, resta probar esta hipótesis en trabajos subsecuentes que relacionen composición del peridio y actividad de fenoloxidasas en general, que se sabe contribuyen a la melanización y cierto grado de lignificación en otros hongos, como *Trametes spp.* (Jonsson *et al*., 1995). Nuestro trabajo no aporta evidencias al respecto, por lo que infiere una hipótesis derivada de la observación durante los muestreos.

## Termoestabilidad enzimática

En este trabajo se ha hecho hincapié en la importancia de la termoestabilidad de diversas enzimas. Existen diferentes definiciones para una enzima termoestable, distintos autores establecen criterios según la aplicación de su enzima (Coolbear *et al*., 2001). En este trabajo, se estableció como termoestable aquella enzima con actividad residual por encima del 60% de la actividad inicial después de una hora de incubación a una temperatura evaluada. A continuación se presentan los resultados de termoestabilidad para la actividad de celulasas, xilanasas y lacasas secretadas al medio por *P. pistillaris*.

**Termoestabilidad enzimática de la actividad de celulasas de *P. pistillaris***

Los valores de actividad celulolítica realizados para explorar la termoestabilidad se muestran en la figura 13. Concerniente a la actividad enzimática celulolítica de *P. pistillaris ,* los valores determinados durante la primera hora de incubación fueron cercanos al 80% de actividad residual a una temperatura de incubación de 40, 50 y 60°C; no así a 70°C, donde esta actividad disminuyó hasta un 40% de la actividad inicial. Los valores decrecieron durante las siguientes tres horas de incubación a todas las temperaturas. A las 2 horas de incubación se tenían valores cercanos al 70% de actividad remanente a 40, 50 y 60°C en el extracto de *P. pistillaris* y a los 70°C esta actividad había decrecido hasta el 40%. En contraste, para el hongo *Moniliophtora perniciosa* se reportó una actividad remanente de β-1,3-glucanasa del 90%, al ser incubado a una temperatura de 90°C por un período de tiempo de 40 min y a temperaturas de 60,70 y 80°C la actividad se mantuvo constante, con valores cercanos al 95% (Sena *et al.,* 2011). Sin embargo, la actividad remanente de *P. pistillaris* y *M. perniciosa* puede calificar cómo termoestable, bajo el criterio de conservar el 60% de la actividad inicial a 10°C por encima de su temperatura óptima de crecimiento, comparable con otros hongos.

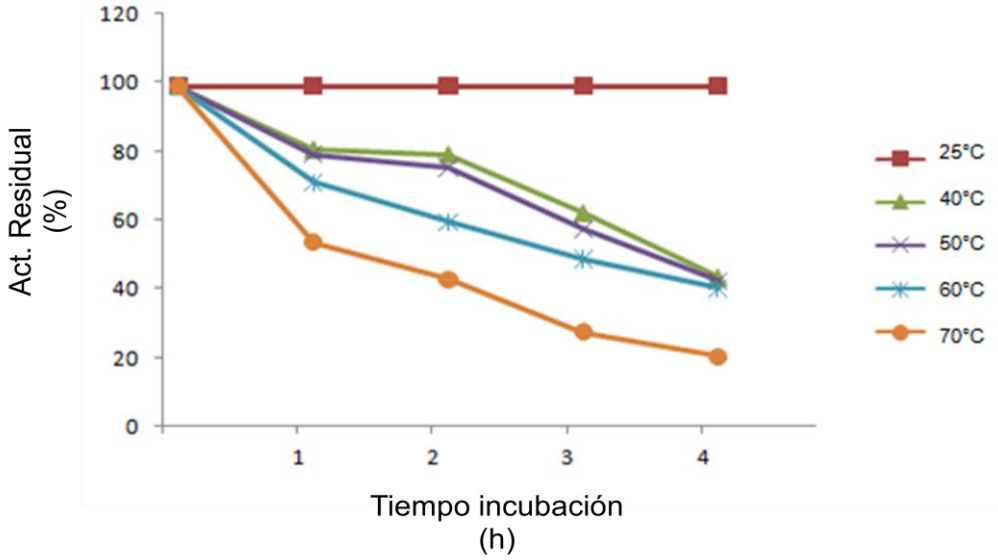


Figura 13.Termoestabilidad enzimática de celulasa de *P. pistillaris.*

La discusión sobre los criterios a tomar en cuenta para clasificar a los microorganismos como termófilos, ha conducido a considerar también la temperatura óptima a la cual se producen ciertos metabolitos; entre ellos, las enzimas u otros productos de la fermentación (Sonleitner y Fiechter , 1983).

Considerando lo anterior, si bien *P. pistillaris* no es un extremófilo, su capacidad de desarrollarse en las altas temperaturas del desierto de 40-50 °C, se ve reflejada en la termoestabilidad de sus enzimas hidrolíticas.

**Termoestabilidad enzimática de la actividad de xilanasas de *P. pistillaris***

La termoestabilidad enzimática xilanolítica de *P. pistillaris* durante la primera hora de incubación mostró valores cercanos al 80% de actividad residual, a una temperatura de 40 y 50 °C, esta actividad decreció hasta valores entre los 60 y 40% al incubar el extracto a temperatura de 60 y 70°C. Durante las siguientes horas de incubación esta actividad fue decreciendo hasta obtener valores que oscilaron entre el 60 y 30% de actividad residual a un período de 4 horas de incubación a 40, 50, 60°C, y se obtuvieron valores del 20% de actividad después de haber incubado el extracto por un período de 4h a 70°C perdiendo el 80% de actividad. (figura 14).

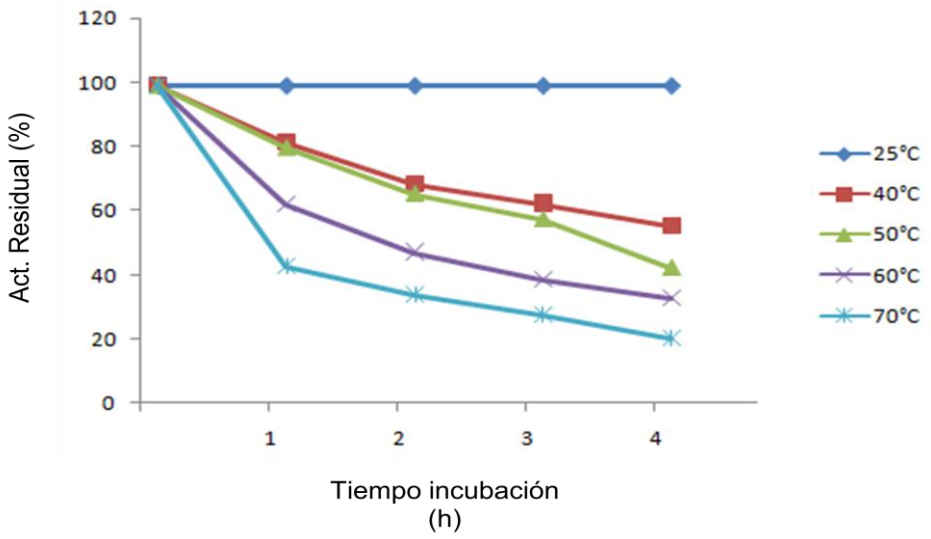


Figura 14.Termoestabilidad enzimática de xilanasas de *P. pistillaris.*

En distintos hongos termófilos se han encontrado enzimas xilanasas termoestables como en el caso de *Myceliophthora thermophila* el cual fue descrito como productor de celulasas y xilanasas termoestables (Berka *et al*., 1997). Por otra parte Triches y colaboradores (2003) estudiaron el efecto de la temperatura sobre la actividad xilanasa de *Thermomyces lanuginosus,* en enzimas nativas purificadas y recombinantes encontrando un perfil idéntico con máxima actividad a los 75°C y un 80% de actividad residual después de 4 horas de incubación a una temperatura de 50 °C; mientras que al cambiar la temperatura de incubación a 80°C por 40 min su actividad disminuyó en un 95%. Existen hongos termófilos como *P. pistillaris y M. thermophila* entre otros los cuales se desarrollan a temperaturas entre 35-45°C, encontrándose comúnmente sobre residuos de vegetales utilizando el xilano para su alimentación, y éstos tienden a presentar enzimas con la característica de termoestabilidad (Bath y Maheshwari, 1987).

**Termoestabilidad enzimática de la actividad de lacasas de *P. pistillaris***

En la figura 15 se presentan los valores de actividad residual en puntos porcentuales para la actividad de lacasas (25, 40, 50, 60 y 70°C). En ella se aprecia un perfil en el cual a 40°C se conserva el 90% de su actividad inicial. Sin embargo, ésta actividad posteriormente va decreciendo durante las 3 horas posteriores a la incubación con una permanencia de valores cercanos al 80% de actividad. Las lacasas del hongo *P. pistillaris* son estables a 40, 50 y 60ºC durante 4 horas de incubación conservando el 60% de actividad inicial; a 70ºC conservaron el 40 % de la actividad inicial después de una hora y posteriormente esta actividad decayó en un 95%. Nuestros valores se muestran muy por encima de lo reportado por Muñoz y colaboradores (1997) para la lacasa producida por *Pleurotus eryngii*; la cual es estable a 45ºC durante 10 minutos y a 50ºC disminuye en un 50 % su actividad después de 30 minutos.

Por otro lado, nuestros resultados coinciden con los presentados por la lacasa de *Chaetomium thermophilium*, que es estable a 50 y 60ºC durante 1 hora (Chefetz *et al*., 1998) y con la lacasa de *Myceliophtora thermophila* estable a 60ºC en el mismo tiempo (Berka *et al*., 1997). En base al criterio que establecimos concluimos que la actividad de lacasas de *P. pistillaris* es termoestable.

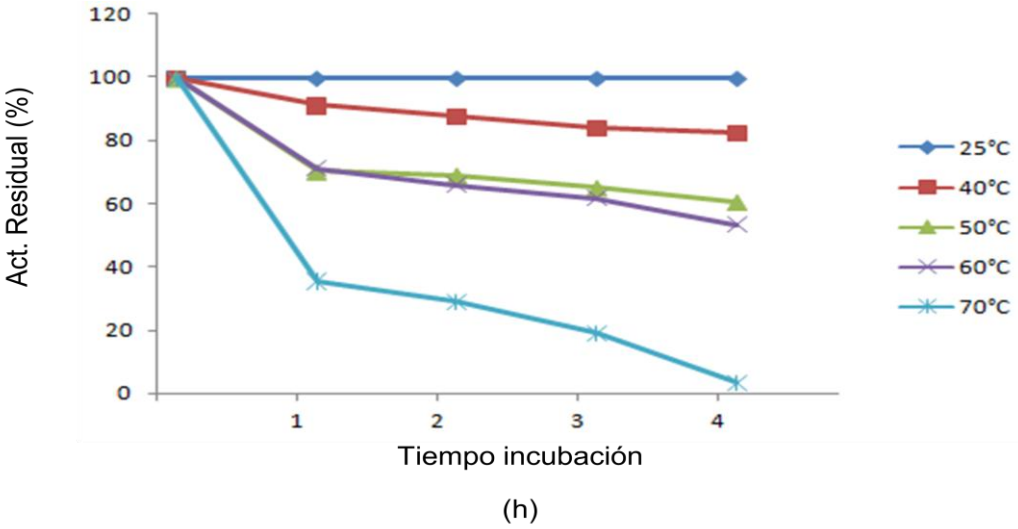


Figura 15.Termoestabilidad enzimática de lacasas.

La lacasa de *P. pistillaris* puede ser una gran contribución a la industria ya que su termoestabilidad le permitiría aumentar su actividad catalítica al haber un incremento en la temperatura, lo cual permite reducir la cantidad de enzima utilizada en el proceso (Kristjansson, 1989).

Actividad Fibrolítica y Rendimiento de Cultivo de *P. pistillaris*

En la tabla 10 se muestran las actividades fibrolíticas de cada una de las enzimas de *P. pistillaris* y su rendimiento de acuerdo al sustrato administrado, además de los tiempos de mayor producción de actividad enzimática. El rendimiento es la relación entre el producto obtenido y el sustrato consumido

(usualmente la fuente de carbono y energía). En nuestro caso el mayor rendimiento se obtuvo para el Medio Kirk con modificación para xilanasas con valores cercanos al 20% de rendimiento.

Tabla 10. Actividades fibrolíticas de *P. pistillaris* en medio de Kirk modificado.

| MEDIO DE CULTIVO | TIEMPO (d) | X(g/L) | Y x/s | Act. Enzimática (U/L) | Act. Específica (U/mg) |
|---|---|---|---|---|---|
| Celulasas | 18 | 2.849 | 0.189 | 4134.008 | 501.7 |
| Xilanasa | 18 | 3.04 | 0.202 | 1001.05065 | 157.77 |
| Lacasas | 15 | 2.855 | 0.190 | 1459.83906 | 179.562 |

Los tiempos de cultivo en los que se presentó mayor actividad enzimática de celulasas y xilanasas, fueron en ambos casos, a los 18 días de inoculación del medio, con valores de 501.7 y 157.77 U/mg de proteína, respectivamente. La mayor actividad de lacasas se presentó al día 15, y fue de 179.56 U/mg de proteína, con un rendimiento notable de casi un 19%.

Con estos datos podemos confirmar que la fuente de carbono influye en el crecimiento del micelio, ya que cuando existen grandes cantidades de carbono el hongo se adapta con mayor facilidad para empezar a degradar los sustratos, aunque en algunas ocasiones se requiere de inductores como en el caso de la actividad de la enzima lacasa la cual se utilizó como inductor en cobre y así poder hidrolizar los compuestos que no son asimilables pudiéndolos convertir en energía para la formación de biomasa. Sin embargo, es menester tomar en cuenta que en estado silvestre, esta degradación de sustratos está en función del contenido de diversos compuestos, tales como azúcares solubles, hemicelulosa, celulosa, almidón, proteínas, grasas, ligninas, ceras entre otros.

Por lo tanto, el hongo utiliza sus sistemas enzimáticos para degradar y adaptarse los sustratos utilizándolos como fuentes de energía de manera diferente que en cultivo sumergido a nivel laboratorio.

# CAPITULO VI

# CONCLUSIONES

Los morfotipos en el organismo de estudio en el municipio de Hermosillo corresponden a *Podaxis pistillaris* .

*Podaxis. pistillaris* presenta un sistema enzimático fibrolítico ya que se detectó actividad de celulasas, xilanasa y lacasas, lo que indica que es capaz de degradar los compuestos lignocelulósicos existentes en el suelo.

*Podaxis. pistillaris* presenta actividad de celulasas, xilanasas y lacasas termoestable bajo el criterio de poseer más del 60% de actividad residual al ser incubado por más de 3 horas a temperaturas de 25 a 60°C

El hongo *Podaxis pistillaris* es potencialmente importante para la extracción de enzimas fibrolíticas termoestables con distintas aplicaciones industriales.

Cabe reiterar que este es el primer trabajo de cultivo sumergido, de actividad celulolítica, xilanolítica y de actividad de fenoloxidasa para el hongo *P. pistillaris.*

Cabe destacar que en el presente estudio se ha trabajado exclusivamente con extractos crudos, por lo que nuestros resultados han de ser considerados como el primer acercamiento a los sistemas enzimáticos presentes en *P. pistillaris.* La producción optimizada, la purificación y caracterización de enzimas de *P. pistillaris* son los siguientes pasos para aportar evidencias concluyentes sobre la termoestabilidad de la(s) enzima(s) involucradas en las actividades fibrolíticas aquí presentadas.

## CAPITULO VII

## BIBLIOGRAFÍA


Agrios G. 1988. Plant pathology. 3er ed.Academic Press. San Diego, California, USA, 803 p.

Al Fatimi M. A., Jülich W. D., Jansen R., y Lindequist U. 2006. Bioactive Components of the Traditionally used Mushroom *Podaxis pistillaris.* Evid Based Complement Alternat Med. 3(1): 87-92 p.

Alasoadura S. O. 1966. Studies of the higher fungi of Nigeria II. Macrofungi associated with termite nests. Nova Hedwigia. 11(1):387–393 p.

Alic M. y Gold H. M. 1985. Genetic Recombination in the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Enviromental Microbiology. 50(1):27-30 p.

Alkort I., Garbisu C., Llama M.J. y Serra J.L. 1998. Industrial applications of pectic enzymes: a review. Process Biotechemistry. 33:21-28 p.

Aparicio N. A., Quintero T. y Esqueda M. 1991. Distribución y datos ecológicos de *Podaxis pistillaris* Fr. en Sonora. IV Congreso Nacional de Micología. Universidad Autónoma de Tlaxcala. Tlaxcala, Tlax., 14-18 de octubre, 65 p.

Bajpai P. 1999. Application of enzymes in the pulp and paper industry. Biotechnology progress. 15(2):147-157 p.

Baseia I. G. y Galväo T. C. O. 2002. Some interesting Gasteromycetes (Basidiomycota) in dry areas from northeastern Brazil. Acta Botanica Brasilica. 16(1):1−8 p.

Bath K. M. y Maheshwari R. 1987. *Sporotrichum thermophile* growth, cellulose degradation, and cellulase activity. Applied and Enviromental . Microbiology. 53:2175-2182 p.

Beauchemin K. A., y Rode L. M. 1996. Use of feed enzymes in rumiant nutrition. In: Animal Science Research Developmen. Meeting Future Challenges. Proceeding of the canadian society of animal science meeting. Ed. L. M. Rode. Lethbridge, Alberta, 103-130 p.

Béguin P. y Aubert J. P. 1994. The biological degradation of cellulose. FEMS. Microbiol. Rev.13:25-58 p.

Berka R. M., Schneider P., Golightly E. J., Brown S. H., Madden M., Brown K. Halkier T., Mondorf K. y Xu F. 1997. Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae* Applied and Enviromenatal. Microbiology. 63(8):3151-3157 p.

Bhat M. K. y G. P. Hazlewood. 2001. Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases in Enzymes in Farm Animal Nutrition. M. R. Bedford and G. G. Partridge, ed. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK. 11-60 p.

Biely P. 1985. Microbial xylanolytic systems. Trends in Biotechnology. 3: 286-290 p.

Bottomley A. M. 1948. Gasteromycetes of South Africa. Bothalia. 4:473–810 p.

Bourbonnais R., Paice M. O., Frejermuth B., Bodie E. y Borneman S. 1997. Reactivities of various mediators and laccases with Kfraft pulp and ligning model compounds. Applied and Environmental Microbiology. 63:4627-4632 p.

Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quanititation of microgramo quiantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochemestry. 72: 248-254 p.

Brandan N., Llanos C., Barrios B., Escalante M. A. P. y Ruíz D. D. 2008. Enzimas. Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Medicina. Cátedra de Bioquímica. 1-5 p.

Bruins M. E., Janssen A. E. M. y Boom R. M. 2001. Thermozymes and their applications. ApplBiochemBiotechno*.* 90(2):155-186 p.

Cabrera R. R. 2010. Efecto de la poda de vid sobre los parámetros de crecimiento y producción de enzimas lignolíticas de *Lentinula edodes*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora.

Carvajal M. E., Bruno G., Valérie B., Xavier R. y Valérie M. 2005. Storage stability of laccase induced arabinoxylan gels.Polymers*.* 59(2):181-188 p.

Chaparro D. F., Rosas D. C. y Varela A. 2009. Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madero (Quindío, Colombia). Rev IberoamMicol. 26(4): 328-243 p.

Chefetz B., Chen Y. y Hadar Y. 1998. Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilium* and role in humification. Applied and Enviromental Microbiology. 64: 3175-3179 p.

Chesson A., y Forsberg C. W. 1997. Polysacharide degradation by rumen microorganism.In: Hobson, P. and Stewart. C. (Eds) The rumen Microbial Ecosystem, 2nd Edn. Chapman & Hall Ltd, Andover, UK. 329-381 p.

Collins T., Gerday C. y Feller G. 2005. Xylanases families and extremophilic xylanases.FEMS. Microbiology Reviews. 29(1):3-23 p.

Coolbear T., Daniel R.M. y Morgan H.W. 2001. The enzymes from extreme thermophiles: bacterial sources, thermostabilities and industrial relevance. AdvBiochemEngBiotechnol .45:57-98 p.

Costa R. L. F., Marçal V. V. Marcelo G., Chaves A. V. M., Dantas V. M. C., Megumi K. M. C., Lopes P. F. M.,Galvão d. N. A.. 2012. Thermostability of xylanolytic enzymes produced by *Lentinula edodes* UFV70.Braz. J. Microbiol.43(1):201-204 p.

Dávila G. y Vázquez D.R. 2006. Enzimas lignolíticas fúngicas para fines ambientales. Mensaje Bioquímico, Vol XXX. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. 29-55 p.

Deacon J. W.1993. Introducción a la Micología Moderna. Limusa - Noriega Editores, México.

Demijaran D., Morris V., Cassidy F. 2001. Enzymes from extremophiles. CurrentOpinionChemical. 5: 144-150 p.

Dergal S. B. 1993. Química de los Alimentos, Longman de Mexico Editores SA de CV.Editorial. 279-326 p.

Domínguez de Toledo L.1933. Gasteromycetes (Eumycota) del centro y oeste de la Argentina. I. Análisis crítico de los caracteres taxonómicos, clave de géneros y orden Podaxales. Darwiniana. 32:195–235 p.

Dring DM. 1973. Gastemocycetes. In: The Fungi. Vol. IVB.GC Ainsworth, FK Sparrow, AS Sussman (Eds). Academic Press, New York

Dubois M., Gillesk A. Hamiltonj K., Rebersp A., y Smith F .1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances.Analytical Chemistry *28,* 350-356 p.

Emelianoff V., Le Brun N., Pagès S., Stock S.P., Tailliez P., Moulia C. y Sicard M. 2008. Isolation and identification of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from Hérault and Gard (Southern France) Journal of Invertebrate Pathology. 98(2): 211-217 p.

Esqueda V. M., Pérez S. E., Herrera T., Coronado A. M. y Estrada T. A. 2000. Composición de gasteromicetos en un gradiente de vegetación de Sonora, México. Anales del instituto de Biología. Serie Botánica. 71(002):39-62 p.

García H. E. R. y Peña V. C. B. 1995. La pared celular. Componente fundamental de las células vegetales. Universidad Autónoma Chapingo, México. 96 p.

Guillén N. G. K., Márquez R. F. J. y Sánchez V. J. E.1998. Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido.Rev IberoamMicol. 15: 302-306 p.

Gupta S. y Singh S. P. 1991. Nutritive value of mushroom *Podaxis pistillaris*.Indian J MycolPlantPathol. 21:273–6 p.

Guzmán G. y Herrera T. 1969. Macromicetos de las zonas áridas de México. II. Gasteromicetos. Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN 12 (1-4): 43-60 p.

Herrera T. 2005 El Reino de Los Hongos: Micología Básica y Aplicada Ciencia y Tecnología Series Sección de obras de ciencia y tecnología. Segunda edición. Editor Fondo de cultura económica USA. 552 p.

Herrera T. y Ulloa M. 2004. El reino de los hongos, Micología básica y aplicada. Fondo de cultura económica y la Universidad Nacional Autónoma de México. 19-24 p.

Horton T. R. y Bruns T. D. 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. Molecular Ecology: 10:1855–1871 p.

Jonsson L., Sjostrom K., Haggstrom I. y Nyman P. O. 1995. Characterization of a lacasse gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor* and structural features of basidiomycete lacases. Biochim Biophys Acta. 1251:210-5 p.

Khaliel A. S., Abou-Heilah A. N. y Kassim M. Y. 1991. The main constituents and nutritive value of *Podaxis pistillaris*. Acta Bot Hung. 36:173–9 p.

Khan S. M. y Khan D. A. 1979. Temperature studied on *Podaxis pistillaris*. Mycologia 71: 861-867 p.

Kirk T. K., Schultz E., Cornors W. J., Lorenz L.F. y Zeikus J. G. 1978. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete crhysosporium*. Archives of Microbiology. 11: 3144-3149 p.

Kristjansson S. 1989. Thermophilic organisms as sources of thermostable enzymes.Tibtech. 7: 349-353 p.

Lam T. B., Iiyama K. y Stone B. A.1990. Primary and secondary walls of grasses and other forage plants: taxonomic and structural considerations. In: Microbial and plant opportunities to improve lignocellulose utilization by ruminants. Elsevier, New York. 43-69 p.

Levin H. y Branch M. 1987. A Field Guide to the Mushrooms of South Africa.Cape Town, C. Strike 2nd Ed.

Lutzoni F., Kauff F., Cox C. J., McLaughlin D., Celio G., Dentinger B., Padamsee M., Hibbett D., James T. Y., Baloch E., Grube M., Reeb V., Hofstetter V., Schoch C., Arnold A. E., Miadlikowska J., Spatafora J., Johnson D., Hambleton S., Crockett M., Shoemaker R., Sung G. H., Lücking R., Lumbsch T., O'Donnell K., Binder M., Diederich P., Ertz D., Gueidan C., Hansen K., Harris

R. C., Hosaka K., Lim Y. W., Matheny B., Nishida H., Pfister D., Rogers J., Rossman A., Schmitt I., Sipman H., Stone J., Sugiyama J., Yahr R. y Vilgalys R. 2004. Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits.Am J Bot. 91(10):1446-80 p.

Lynd L., Weimer D., Zyl H. y Protorius I. 2002. Microbial cellulose utilization:fundamentals and Biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews.16:577-583 p

Machado K. M. G., Matheus D. R. y Bononi V. L. R. 2005. Ligninolitic enzymes production and Remazol Brilliant Blue R decolorization by tropical Brazilian basidiomycetes fungi. Braz. J. Microbiol. *36*: 246-252 p.

Madigan M. y Martinko P. J. 1999. Brock: Biología de los microorganismos. 8º edición, Editorial Prentice Hall, Madrid

Mao X. L. 2000. The Macrofungi of China, Henan Science and Technology Press, Beijing, 719 p. (available at www.hceis. com).

Martínez A. 1971. Notes sorbre el género Podaxis (Gasteromycetes) en Argentina. Biol Soc Argen Bot 14:73-87**.**

Martínez A. C., Balcázar L. E., Dantán G. E. y Folch M. J. L. 2008. Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. Revista latinoamericana de microbiología. 50 (3 y 4) 119–131 p.

Márquez A. A. T., Mendoza M. G. D., González M. S. S., Buntinx D. S. E. y Loera C. O. 2007. Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes ssp.* EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus niger* AD96.4 en fermentación solida. Interciencia. 32(11):780:785 p.

McKee T. 2003. Bioquímica La base molecular de la vida. 3a.Edición. Editorial McGraw- Hill.

Miller J. H. 1972. Experiments in molecular genetics.Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. 431- 433 p.

Morgan P., Lewis S. T. y Watkinson R. J. 1991. Comparison of abilities of white-rot fungi to mineralize selected xenobiotic compounds. Applied Microbiology and Biotechnology. 34:(5): 693-696 p.

Morse E. E. 1933. A study of the genus *Podaxis* .Mycologia. 25(1):1–33 p.

Mozhaev V.1993. Mechanism-based strategies for protein thermo stabilization.Trends Biotechnol.11: 88-95 p.

Muñoz C., Guillén A., Martínez A. T. y Martínez M. J. 1997. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn2+ oxidation. Applied and Enviromental Microbiology. 63: 2166-2174 p.

Narrea C. M. y Malpartida Z. J. 2006. NOTA TÉCNICA Evaluación de medios de cultivo en la producción de conidias y crecimiento diametral de cuatro cepas del hongo entomopatógeno *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch. Rev. perú. Entomol. 45:145-147 p.

Noe L. y Abril A. 2008. Interacción entre calidad de restos vegetales, descomposición y fertilidad del suelo en el desierto del Monte de Argentina. Ecol. Austral. 18:181-193 p.

Ordaz H. A., Favela T. E., Mendoza M. G., Meneses M. M. y Loera C. O. 2009. Respuesta enzimatica de *Trametes sp*. EUM1 al estrés por temperatura en cultivo solido. Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería XIII.

Orpin C. G. 1984. The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls.Anim. Feed Sci. Techno.10: 121-143 p.

Ovando Chacon S. L. y Waliszewski K. N. 2005. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. Universidad y Ciencia, 21(042):113-122 p.

Panwar Ch. y Purohit D. K. 2002. Antimicrobial activities of *Podaxis pistillaris* and *Phelloriniainquinans* against *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis*.Mushroom Res. ;11:43–4 p.

Papinutti V. L., Dorio L. A. y Forchiassin F. 2003. Degradación de la Madera de álamo por *Fomes Sclerodermeus*: producción de enzimas lignolíticas en aserrín de álamo y cedro. Rev. Iberoamericana de micología. 20:16-20 p.

Parichart K., Khwanchai K. E., Nantana S. y Vichien K. 2011. Selection and production of insoluble xylan hydrolyzing enzyme by newly isolated *Thermomyces lanuginosus.* African Journal of Biotechnology.10(10):1880-1887 p.

Fungal Community Ecology:A Hybrid Beast with a Molecular Master. BioScience. 58(9):799-810 p.

Pere J., Siika-aho M., Buchert J., y Viikari L.1995. Effects of purified *T. reesei* cellulases on the fiber properties of kraft pulp.Tappi Journal. 78(6):71–78 p.

Plaza M., Fernández de Palencia P., Peláez C. y Requena T. 2004. Biochemical and molecular characterization of *α*-ketoisovalerate decarboxylase, an enzyme involved in the formation of aldehydes from amino acids by *Lactococcus lactis.* FEMS MicrobiolLett. 238*:* 367–374 p.

Ponce T. y Pérez O. 2002. Celulasas y Xilanasas en la industria. Avance y Prospectiva 21: 273-277 p.

Poutanen K. 1997. Enzymes: An important tool in the improvement of the quality of cereal foods. Trends in Food Science & Technology 8(9):300-306 p.

Priest M. J. y Lenz M. 1999. The Genus Podaxis (Gasteromycetes) in Australia with a description of a new species from termite mounds. Australian Systematic Botany. 12(1):109−116 p.

Ralph J. 1997. Fake plastic trees.Chemestry and industry.708 p.

Reyes A. M. I. y Aguilar G. C. N. 2011. Residuos agroindustriales para la producción de proteasas fúngica. Cienciacierta No.27

Rocabado D., Wright J. E., Maillard Z. O. y Muchenik N. F. 2007. Catalogo de los gasteromycete (fungi: basidiomycotina) de Bolivia.Kempffiana. 3:3-13 p.

Rodríguez C. S. y Toca H. J. L. 2006.Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. Biotechnology Advances. 24(5):500-513 p.

Rodríguez E., Ruíz-Dueñas J., Kooistra R., Ram A., Martínez A. y Martínez M. J. 2008. Isolation of two gwwa from the White-rot fungus *Pleurotus eryngii* and heterologus expression of the pel3 encoded protein. Journal of Biotechnology. 134:9-19 p.

Sambrook J. y Russell D. 2001. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Santos H., y da Costa M. S. 2001. Organic solutes from thermophiles and hyperthermophiles. MethodsEnzymol. 334:302-315 p.

Sena A. R., Gildomar L. V., Göes N. A., Taranto A. G., Pirovani P. C., Cascardo J. C. M., Zingali R. B., Bezerra M. A. y Assis S. A. 2011. Production, purification and characterization of a thermostable β-1,3-glucanase (laminarinase) produced by *Moniliophthora perniciosa.* Anais da Academia Brasileira de Ciências. 83(2):599-609 p.

Seifert K. A., Samson R. A., Dewaar R. A., Houbraken J., Lévesque C. A., Monclavo J. M., Louis S. G. y Hebert P. D. 2007.Prospect for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with Penicillium as a test case. Proocedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 104:3901-3906 p.

Sonleitner B. y Fiechter A. 1983. Advantages of using thermophiles in biotechnological processes: expectations and reality. Trends Biotechnol.1(3):74-80 p.

Stryer L. 1998. Bioquímica. 4a (edición) Edit. Reverté, S. A. tomo II. México. 1010 p.

Sun Y. y Cheng J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. BioresourTechnol. 83:111 p.

Taiz L. y Zeiger E. 2006. Plant Physiology. Fourth Edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA 764 p.

Timell T. E. 1967. Recent progress in the chemestry of wood hemicelluloses. Wood science and Technology 1.45-70 p.

Triches D. M. C., Almeida M. S., Kurtenbach E., Martins O. B., Pereira N. Jr., Andrade C. M. y Albano R. M. 2003. Optimized Expression of a Thermostable Xylanase from *Thermomyces lanuginosus*in *Pichia pastoris.* Applied and Enviromental microbiology. 69(10):6064–6072 p.

Umbreit W. W. 1967.Advances in applied microbiology.Vol. 9.Academic Dress Inc. 141-154 p.

Van Soest P. J. 1982. In: Nutritional Ecology of the ruminant. O & Books, Inc., Corvallis, OR.

Vogel H. J. 1956. A convenient growth medium for Neurospora (Medium N).Microbial genetics bull. 13:42-43 p.

Wang H. y Ng T. 2004. Purification of a novel low-molecular-mass laccase with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the mushroom Tricholoma giganteum.Biochemical and biophysical research communications. 315(2):450-454 p.

Whitaker J. R. 1994. Effect of temperature on rates of enzyme-catalyzed reactions.*In* O.R. Fennema, M. Karel and G.W. Sanderson (eds.). Principles of Enzymology for the Food Science.2nd ed . Marcel Dekker, Inc. Atlanta, Georgia. 301-328 p.

Young A. M., Forster P. I. y Booth R. 2002. Notes on *Podaxis* Desv. in the 'wet tropics' & Einesleigh uplands bioregions of northern Queensland. Australasian Mycologist. 21(1):21−23 p.

Zabel, R. y Morrol, J. 1992. Wood Microbiology.Academic Press.San Diego, U.S.A.476 p.

Zoberi M. H. 1972.Tropical Macrofungi. Macmillan, London.

## Anexo 1

Alineamiento de las Secuencias de ITS en *P. pistillaris*

```
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

ITS CIAD        GGCTTGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAA
PPU85336        ------------------------------------GTGAACCTGCGGAA
DQ311086.1      --------------------------------------------------
HE863812.1      --------------------------------------------------
DQ311082.1      --------------------------------------------------
GQ249882.1      --------------------------------------------------
AM234060.1      --------------------------------------------------


ITS CIAD        GGATCATTATCGAATATA----CTTGATGGGCTGTAGCTGGCTCCCCGGA
PPU85336        GGATCATTATCGAATATACTTACTTGATGGGCTGTAGCTGGCTCCCCGGA
DQ311086.1      ------------------------------------------CTCCCCGGA
HE863812.1      --------------------------ATGGGCTGTAGCTGGCTCCCCGGA
DQ311082.1      ------------------------------------------CTCCCCGGA
GQ249882.1      ---------------------------------------------CCCGGA
AM234060.1      ----------------------------GGGCTGTAGCTGGCTCCCCGGA
                                                          ******

ITS CIAD        GCAATGTGCACGCCTGTCTTGACTTTATTCATCCACCTGTGCACCCTTTG
PPU85336        GCAATGTGCACGCCTGTCTTGACTTTATTCATCCACCTGTGCACCCTTTG
DQ311086.1      GCAATGTGCACGCCTGTCTTGACTTTATTCATCCACCTGTGCACCCTTTG
HE863812.1      GCAATGTGCACGCCTGTCTTGACTTTATTCATCCACCTGTGCACCCTTTG
DQ311082.1      GCAATGTGCACGCCTGTCTTGACTTTATTCATCCACCTGTGCACCCTTTG
GQ249882.1      GCAATGTGCACGCCTGTCTTGACTTTATTCATCCACCTGTGCACCCTTTG
AM234060.1      GCAATGTGCACGCCTGTCTTGACTTTATTCATCCACCTGTGCACCCTTTG
                **************************************************

ITS CIAD        TAGTCTCTGGGGGTTTGATAGCGGGGCTGATCGTCGAAGAAGGGG--CTC
PPU85336        TAGTCTCTGGGGGT-TGATAGCGGGGCTGACCGTCGAAGAAGGGG--CTC
DQ311086.1      TAGTCTCTGGGGGT-TGATAGCGGGGCTGACCGTCGAAGAAGGGGTTCTC
HE863812.1      TAGTCTCTGGGGGT-TGATAGCGAGGCTGACCGTCGAAGAAGGGG-TCTC
DQ311082.1      TAGTCTCTGGGGGT-TGATAGCGGGGCTGACCGTCGAAGAAGGGGTTCTC
GQ249882.1      TAGTCTCTGGGGGT-TGATAGCGGGGCTGACCGTCGAAGAAGGGGTTCTC
AM234060.1      TAGTCTCTGGGGGT-TGATAGCGGGGCTGACCGTCGAAGAAGGGGTTCTC
                ************** ******** ****** **************  ***
```

```
ITS CIAD        TCTGGCCTCTTCGCGGATGTGAGGGGTGCTGCGCGAAAGTGCTGCTCCCT
PPU85336        TCTGGCCTCTTCGCGGATGTGAGGGGTGCTGCGCGAAAGTGCTGCTCCCT
DQ311086.1      TCTGGCCTCTTCACGGATATGAGGGGTGCTGCGCGAAAGTGCTGCTCCCT
HE863812.1      TATGGCCCCTTCACGGATGTGAGGGGTGCTGCGCGAAAGTGCTGCTCCCT
DQ311082.1      TCTGGCCTCTTCACGGATATGAGAGGTGCTGCGCGAAAGTGCTGCTCCCT
GQ249882.1      TCTGGCCTCTTCACGGATATGAGGGGTGCTGCGCGAAAGTGCTGCTCCCT
AM234060.1      TCTGGCCTCTTCACGGATATGAGGGGTGCTGCGCGAAAGTGCTGCTCCCT
                * ***** **** ***** **** *************************

ITS-CIAD        TCAAATGGCCTTGTGACCTCTCCCCCAGAGGTCTATGTTGTTTCATACAC
PPU85336        TCAAATGGCCTTGTGACCTCTCCCCCAGAGGTCTATGTTGTTTCATACAC
DQ311086.1      TCAAGTGGCCTTGTGACCTCTCCCCCAGAGGTCTATGTTGTTTCATACAC
HE863812.1      TCAAGCGGCCTCATGACCTCTCCCCCGGAGGTCTATGTTGTCTCATACAC
DQ311082.1      TCAAGTGGCCTTGTGACCTCTCCCCCAGAGGTCTATGTTGTTTCATACAC
GQ249882.1      TCAAGTGGCCTTGTGACCTCTCCCCCAGAGGTCTATGTTGTTTCATACAC
AM234060.1      TCAAGTGGCCTTGTGACCTCTCCCCCAGAGGTCTATGTTGTTTCATACAC
                ****  *****  ************* ************** ********

ITS CIAD        CACAGTAGCATGTTGTAGAATGT-TATTCAATGGGCCTCTCGTGCCTATA
PPU85336        CACAGTAGCATGTTGTAGAATGT-TATTCAATGGGCCTCTCGTGCCTATA
DQ311086.1      CACAGTAGCATGTTGTAGAATGT-TATTCGATGGGCCTCTCGTGCCTATA
HE863812.1      CACAGTAGTATGTTGTAGAATGTTTATTCGATGGGCCTCTCGTGCCTATA
DQ311082.1      CACAGTAGCATGTTGTAGAATGT-TATTCGATGGGCCTCTCGTGCCTATA
GQ249882.1      CACAGTAGCATGTTGTAGAATGT-TATTCGATGGGCCTCTCGTGCCTATA
AM234060.1      CACAGTAGCATGTTGTAGAATGT-TATTCGATGGGCCTCTCGTGCCTATA
                ******** ************** ***** ********************

ITS CIAD        GAACTTGTAATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGAT
PPU85336        GAACTTGTAATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGAT
DQ311086.1      GAACTTGTAATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGAT
HE863812.1      GAACCTGTAATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGAT
DQ311082.1      GAACTTGTAATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGAT
GQ249882.1      GAACTTGTAATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGAT
AM234060.1      GAACTTGTAATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGAT
                **** *********************************************

ITS CIAD        GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGA
PPU85336        GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGA
DQ311086.1      GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGA
HE863812.1      GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGA
DQ311082.1      GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGA
GQ249882.1      GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGA
AM234060.1      GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGA
                **************************************************

ITS CIAD        ATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCA
PPU85336        ATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCA
DQ311086.1      ATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCA
HE863812.1      ATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCA
DQ311082.1      ATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCGCTTCTTGGTATTCCGAGGAGCA
GQ249882.1      ATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCA
AM234060.1      ATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCA
                ****************************** *******************
```

```
ITS CIAD        TGCCTGTTTGAGTGTCATTAAATTCTCAACCCCGCTCCAGTTTTTTTGAA
PPU85336        TGCCTGTTTGAGTGTCATTAAATTCTCAACCCCGCTCCAGTTTTTTTGAA
DQ311086.1      TGCCTGTTTGAGTGTCATTAAATTCTCAACTCCACTCCAGTTTT-TTGAA
HE863812.1      TGCCTGTTTGAGTGTCATTAAATTCTCAACTCCGCTCCGGTTTT-TTTAA
DQ311082.1      TGCCTGTTTGAGTGTCATTAAATTCTCAACTCCACTCCAGTTTT-TTGAA
GQ249882.1      TGCCTGTTTGAGTGTCATTAAATTCTCAACTCCACTCCAGTTTT-TTGAA
AM234060.1      TGCCTGTTTGAGTGTCATTAAATTCTCAACTCCAC---------------
                ****************************** ** *

ITS CIAD        GCTGGTG-TTCGGGGCTTGGATAATGGGGGGTCTATGCCGGCCTTTGTAA
PPU85336        GCTGGTG-TTCGGGGCTTGGATAATGG-GGGTCTATGCCGGCCTTTGTAA
DQ311086.1      GCTGGTG-TTCGGGGCTTGGACATTGG-GGGTCTATGCCGGCCTTTGTAA
HE863812.1      GCTGGTGATTCGGGGCTTGGATA-TGG-GGGTCTATGCCGGCCTTTGTAA
DQ311082.1      GCTGGTG-TTCGGGGCTTGGACATTGG-GGGTCTATGCCGGCCTTTGTAA
GQ249882.1      GCTGGTG-TTTGGGGCTTGGACATTGG-GGGTCCAATCCGGCCTTTGTAA
AM234060.1      --------------------------------------------------

ITS CIAD        AACGAGGTCGGCTCCTCTGAAATGCATTAGCGGAACCGTTTGCGGTCCAT
PPU85336        AACGAGGTCGGCTCCTCTGAAATGCATTAGCGGAACCGTTTGCGGTCCAT
DQ311086.1      AACGAGGTCGGCTCCTCTGAAATGCATTAGCGGAACCGTTTGCGGTCCAT
HE863812.1      AACGAGGTCGGCTCCTCTGAAATGCATTAGCGGAACCGTTTGCGGTCCAT
DQ311082.1      AACGAGGTCGGCTCCTCTGAAATGCATTAGCGGAACCGTTTGCGGTCCAT
GQ249882.1      AAATGAGTCGGGTCCCCTGAAATGGCTTAACGGAACCGTTTGCGGTCCAT
AM234060.1      --------------------------------------------------

ITS CIAD        CACAGGTGTGATAACTATCTACGCCGTGGGGCTGCTCTCTGTCTGTTCAG
PPU85336        CACAGGTGTGATAACTATCTACGCCGTGGGGCTGCTCTCTGTCTGTTCAG
DQ311086.1      CACAGGTGTGATAACTATCTACGCCGTGGGGCTGCTCTCTGTCTGTTCAG
HE863812.1      CACAGGTGTGATAACTATCTACGCCGTGGGGCTGCTCTCTGTCTGTTCAG
DQ311082.1      CACAGGTGTGATAACTATCTACGCCGTGGGGCTGCTCTCTGTCTGTTCAG
GQ249882.1      CACAGGTGTGATAACTATCTACGCCGTGGGGCTGCTCTCTGTCTGTTCAG
AM234060.1      --------------------------------------------------

ITS CIAD        CTTCCAATCGTCCTTCCAG-GGGACAATCTCTGAACATTTTGACCTCAAA
PPU85336        CTTCCAATCGTCCTTCCAG-GGGACAATCTCTGAACATTTTGACCTCAAA
DQ311086.1      CTGCCAATCGTCNTTCCAG-GGGACAATCNCTGAACATT-----------
HE863812.1      CTGCCAATCGTCCTTCCAGTGGGACAATCTCTGAACATT-TGACCTCAAA
DQ311082.1      CTGCCAATCGTCCTTCCAG-GGGACAATCTCTGAACATT-----------
GQ249882.1      CTGCCAATCGTCCTTCCAG-GGGACAATCTC-------------------
AM234060.1      ---------------------------------------------------

ITS CIAD        TCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAG
PPU85336        TCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAT-------------
DQ311086.1      --------------------------------------------------
HE863812.1      TC------------------------------------------------
DQ311082.1      --------------------------------------------------
GQ249882.1      --------------------------------------------------
AM234060.1      --------------------------------------------------
```

Identificación de las secuencias de ITS con número de GenBank, utilizadas en el alineamiento anterior. Se muestra el porcentaje de identidad con respecto a la secuencia ITS de *P. pistillaris* obtenida en este trabajo (ITS CIAD).

U85336.1

*Podaxis pistillaris* internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, partial sequence. Identidad: 99% .

DQ311086.1

*Podaxis pistillaris* strain RA-2G internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. Identidad: 97%.

HE863812.1

*Podaxis pistillaris* genomic DNA containing ITS1, isolate fallal. Identidad: 96%.

DQ311082.1

*Podaxis pistillaris* strain RA-2B internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. Identidad: 97%.

GQ249882.1

*Podaxis pistillaris* isolate CAW-10 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. Identidad: 96%.