



El Colegio de la Frontera Sur

Producción y caracterización de la fenol oxidasa de
Scytalidium thermophilum

TESIS

Presentada como requisito parcial para optar al grado de
Maestría en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural

Por

Yasmin Sánchez Rosario

2010

AGRADECIMIENTOS

A la comunidad de El Colegio de la Frontera Sur (Unidad Tapachula) por su experiencia académica, apoyo, críticas durante el tiempo que realice mis estudios.

A la comunidad (Dra. Lucía, Dra Marcela, Rosa, Edna, Cris, Julio César, Martha y Abraham) Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la UNAM, en Cuernavaca, Morelos por su apoyo durante mi estancia de posgrado.

A CONACYT por haberme brindado una beca para el estudio de maestría.

A Fondos Mixtos Conacyt-Gobierno del estado de Chiapas, dentro del proyecto “Cultivo de Agaricus bisporus (champiñón y portobelo) como estrategia de desarrollo rural en Chiapas

A ECOES, por el apoyo otorgado para la realización de la estancia de investigación.

Al Dr. José Ernesto Sánchez Vázquez por el apoyo paciencia y dedicación brindada así como la motivación y orientación tutelar durante el desarrollo de mi tesis de maestría.

Así mismo agradezco a la Q.F.B Lilia Moreno Ruíz por su apoyo incondicional durante éste tiempo, además de su amistad y sus valiosos conocimientos, consejos y anécdotas compartidas tanto en el ámbito académico como en el personal

Al Dr. Rafael Vázquez Duhalt por su tiempo y orientación académica durante mi estancia en el IBT y el desarrollo de mi tesis.

A la Biol. Rosa Román Miranda. por su apoyo técnico durante mi estancia en el Instituto de Biotecnología de la UNAM

Al M en C. René Humberto Andrade Gallegos por su tiempo, apoyo y orientación académica de maestría.

Al M. en C. Javier Valle Mora, por su apoyo, sus valiosos comentarios y sugerencias al trabajo.

A la C. Rosalba Morales Pérez por su apoyo logístico y administrativo durante mi posgrado.

A mis amigos M. en C. Ricardo Castro Chan, Carlos César Balboa, Javier de la Rosa y a Julieta Maya.

A todas y cada una de las personas que colaboraron para la obtención de esta tesis.....**gracias.**

DEDICATORIA

A DIOS:

Por permitirme vivir y compartir éste logro al lado de mi familia y mis amigos

A MIS PADRES (Maricela y Manuel):

Porque siempre han estado presentes en todo lo que emprendo y por el apoyo que me brindaron a lo largo de la obtención de ésta tesis.

A MIS HERMANOS (Mayren y Manuel):

Por la comprensión brindada a lo largo de éste proyecto.

A MIS AMIGOS (Javier, Carlos, Julieta, Hugo, Luz Elizabeth, Rosby, Flor, Brenda Magdalí, Karina, César Javier): Quienes estuvieron conmigo y me dieron consejos.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	iv
RESUMEN	V
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Compuestos fenólicos	3
2.1.1 Clasificación	3
2.2 Fenol oxidasas	5
2.2.1 Tirosinasas	7
2.2.2 Lacasas	8
2.2.3 Sitio y modo de acción	9
2.3 Hongos Termófilos	10
2.3.1 <i>Scytalidium thermophilum</i>	12
2.3.1.1 Descripción de <i>S. thermophilum</i>	13
3. OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo General	14
3.2 Objetivos Específicos	14
4 MATERIALES Y MÉTODOS	15
4.1 Material biológico	15
4.2 Medios de conservación y cultivo	15
4.3 Preparación del inóculo	16
4.4 Cinética de crecimiento	16
4.4.1 Obtención del extracto	16
4.5 Métodos Analíticos	17
4.5.1 pH	17
4.5.2 Biomasa	17
4.5.3 Azúcares	18
4.5.4 Proteínas solubles	18

4.5.5 Actividad enzimática	18
4.6 Efecto de pH y temperatura sobre la producción de fenol oxidasa	19
4.7 Purificación de la fenol oxidasa de <i>S. thermophilum</i>	19
4.7.1 Obtención del extracto proteico	19
4.7.2 Columna cromatográfica de intercambio iónico	21
4.8 Caracterización de fenol oxidasa de <i>S. thermophilum</i>	22
4.8.1 Efecto de pH y temperatura	22
4.8.2 Determinación de parámetros cinéticos (k_{cat} y K_M) de la fenol oxidasa	23
4.8.3 Determinación de actividad catalasa	23
4.8.4 Determinación de glicosilación de la enzima	23
4.8.5 Espectro UV-VIS del grupo hemo de fenol oxidasa de <i>Scytalidium thermophilum</i>	24
4.8.6 Análisis de metales	24
5. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	25
6. RESULTADOS	26
6.1 Cinética de crecimiento	26
6.2 Efecto de pH y temperatura sobre producción de fenol oxidasa	33
6.3 Purificación de la fenol oxidasa de <i>S. thermophilum</i>	35
6.4 Caracterización de la fenol oxidasa de <i>S. thermophilum</i>	37
6.4.1 Efecto de pH y temperatura sobre la actividad de fenol oxidasa	37
6.4.2 Actividad catalasa	38
6.4.3 Glicosilación de la enzima y espectro UV-VIS de la enzima	39
6.4.4 Contenido de metales	40
7 DISCUSIÓN	41
8 CONCLUSIONES	47
9 REFERENCIAS	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig 1	Estructura de Fenol.	3
Fig 2	Oxidación catalítica de la tirosinasa sobre fenol (Calabria y Goncalves 2006).	7
Fig 3	Oxidación catalítica de lacasa sobre fenol (Calabria y Goncalves 2006).	8
Fig 4	Crecimiento de <i>S. thermophilum</i> después de 48 hrs en fermentador de 10 L.	20
Fig 5	Supercentrífuga, equipo utilizado posterior al fermentador.	20
Fig 6	Equipo de ultrafiltración de 20 L.	20
Fig 7	Equipo de ultrafiltración de 350ml (a y b) usado para concentrar el extracto proteico.	21
Fig 8	Columna cromatográfica de intercambio iónico	22
Fig 9	Crecimiento de la cepa ECS-0601 de <i>S. thermophilum</i> en medio líquido a base de almidón (a), papa (b) y pasto (c). A 45°C y 135 rpm. Variables: —▲—, biomasa (g/L); —○—, glucosa (g/L); —●—, actividad enzimática (mU/ml); —*—, pH.	27

- Fig 10 Crecimiento de la cepa ECS-0602 de *S. thermophilum* en medio líquido a base de almidón (a), papa (b) y pasto (c). A 45°C y 135 rpm. Variables: \blacktriangle , biomasa (g/L); \circ , glucosa (g/L); \bullet , actividad enzimática (mU/ml); \ast , pH. 29
- Fig. 11 Crecimiento de la cepa ECS-0603 de *S. thermophilum* en medio líquido a base de almidón (a), papa (b) y pasto (c). A 45°C y 135 rpm. Variables: \blacktriangle , biomasa (g/L); \circ , glucosa (g/L); \bullet , actividad enzimática (mU/ml); \ast , pH. 30
- Fig. 12 Interacción de cepas, medio y tiempo, en base a la actividad enzimática obtenida en el extracto de dichos medios, durante la cinética de crecimiento a 45°C. 33
- Fig. 13 Crecimiento de la cepa ECS-0602 de *S. thermophilum* en medio líquido a base de pasto, a pH inicial de 7(a) y 8 (b). A 42°C y 135 rpm. Variables: \blacktriangle , biomasa (g/L); \circ , glucosa (g/L); \bullet , actividad enzimática (mU/ml). 34
- Fig. 14 Crecimiento de la cepa ECS-0602 de *S. thermophilum* en medio líquido a base de pasto a pH8, a temperaturas de 42°C (a), 45°C (b) y 48°C (c). A 135 rpm. Variables: \blacktriangle , biomasa (g/L); \circ , glucosa (g/L); \bullet , actividad enzimática (mU/ml). 35
- Fig. 15 Perfil de purificación de la enzima en columna de cromatografía de intercambio iónico. Datos obtenidos en ensayos enzimáticos con catecol como sustrato, usando el método de Ögel et al. (2006). 36

Fig. 16	Gel de electroforésis en el que se cargó el concentrado final de enzima de 6.869 U/mg de proteína. Línea 1, marcadores de peso molecular conocido; línea 2, 39.75 µg de proteína y línea 3, 13.25 µg de proteína.	36
Fig. 17	Efecto de pH y temperatura sobre la actividad de la fenol oxidasa (1.59 µg de proteína/ml). a) Actividad en función de pH (3 a 11) a 60°C. b) Actividad en función de temperatura (30 a 80°C) a pH 7.	37
Fig. 18	Cinética de Michaelis-Menten de la fenol oxidasa (0.795 µg de proteína) a pH 7 y 55°C.	38
Fig. 19	Efecto de pH sobre la actividad catalasa a temperatura ambiente.	38
Fig. 20	Gel de tinción de Coomassie (líneas 2 y 3) y de tinción de glicoproteínas, (líneas 4 y 5). Línea 1, marcadores de peso molecular conocido; línea 2, 3.19 µg de proteína; línea 3, 6.38 µg de proteína; línea 4, 3.19 µg de proteína y línea 5, 6.38 µg de proteína.	39
Fig. 21	Espectro UV-Vis del grupo hemo de fenol oxidasa de <i>Scytalidium thermophilum</i> en 2-butanona.	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Clasificación de compuestos fenólicos	4
Tabla 2	Clasificación taxonómica de <i>Scytalidium thermophilum</i>	12
Tabla 3	Tasa de crecimiento de tres cepas de <i>S. thermophilum</i> en tres medios de cultivo a 45°C y 135 rpm. Media de tres repeticiones.	32
Tabla 4	Consumo de glucosa de tres cepas de <i>S. thermophilum</i> en tres medios de cultivo a 45°C y 135 rpm. Media de tres repeticiones.	32

RESUMEN

En este trabajo se estudió la producción de fenol oxidasa de tres cepas de *Scytalidium thermophilum* y se caracterizó la enzima con mayor capacidad catalítica. Primeramente se desarrolló una valoración de la producción de enzima en tres medios de cultivo: Almidón (MA), Papa Dextrosa y Levadura (PDL) e infusión de pasto (IP) a distintas condiciones de temperatura (42, 45 y 48°C) y pH (6, 7 y 8). Se observó la mayor actividad enzimática (115 mU/ml) con la cepa ECS-0602 en infusión de pasto pangola, a pH 8 y 45°C. Posteriormente se hizo la purificación de la enzima por cromatografía de intercambio iónico y fue caracterizada. La enzima posee un peso molecular de 87 kDa en gel SDS-PAGE al 10% y presenta mayor actividad a pH 7 y 55°C. Su velocidad máxima (V_{max}) fue de $80.72 \mu\text{moles min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ y la constante de afinidad catalítica (K_m) es de 302.79 mM, ambas determinadas con catecol como sustrato. La enzima purificada presentó actividad catalasa a distintos pH (5.5 a 8) a temperatura ambiente, con una mayor actividad catalasa de 10, 636.6 U/mg de proteína a pH 6. También se determinó que es una hemoproteína que contiene 0.7 moles de Fe por mol de proteína y está altamente glicosilada con 10.83 mg de azúcares por mg de proteína.

Palabras clave: Hongos termófilos, biodegradación, enzimas extracelulares, compuestos fenólicos, oxidasas.

1. INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos naturales son resultado de operaciones industriales como la destilería del vino, la extracción de aceites, el descortezado de madera, el despulpado del café, los colorantes, las textileras, entre otras (Aggelis *et al.* 2002). Dichos compuestos representan un problema de contaminación ambiental, ya que son muy tóxicos. Además, frecuentemente determinan los tipos de degradación general de la materia orgánica, puesto que se ha encontrado que son la clave en los procesos de descomposición de muchos materiales orgánicos (Kang *et al.* 2009).

Las fenol oxidasas son de las pocas enzimas involucradas en la degradación de compuestos fenólicos. Dichas enzimas comprenden un grupo que puede catalizar la oxidación de compuestos aromáticos a quinonas, acompañados por la formación de agua por medio de oxígeno molecular. De manera particular, las fenol oxidasas provenientes de hongos son enzimas dependientes de oxígeno y glicoproteínas que contienen cobre. Los hongos filamentosos pueden ser una fuente importante de enzimas degradadoras de fenol, algunas especies de ellos crecen frecuentemente en madera donde las estructuras fenólicas están presentes (Ögel *et al.* 2006; Leatham y Stahmann 1981).

Recientemente se reportó que el hongo mitospórico *Scytalidium thermophilum* es productor de fenol oxidasas (Ögel *et al.* 2006; Sutay Kocabas *et al.* 2008). Este hongo es inocuo y de suma importancia para el cultivo de *A. bisporus* porque contribuye a que el champiñón duplique su velocidad de crecimiento e incremente su rendimiento (Straatsma *et al.* 1991; Wiegant 1992). Tiene también la particularidad de crecer rápidamente a altas temperaturas, en comparación con otros hongos; por lo que resulta de particular interés industrial y ambiental por sus posibles aplicaciones en la degradación de compuestos recalcitrantes, puesto que los hongos

termófilos son capaces de producir enzimas termoestables (Machuca y Durán 1993) funcionales a temperaturas elevadas.

Tomando en cuenta lo mencionado, se planteó estudiar la producción de enzimas fenol oxidasa de tres cepas de *S. thermophilum*, así como conocer las diferencias entre dichas cepas, procurando la búsqueda de una enzima con alta capacidad catalítica para aprovechamiento a nivel industrial y ambiental.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son grupos heterogéneos de sustancias naturales que poseen un anillo aromático, en el cual se encuentra unido directamente uno o mas grupos hidroxilos. El fenol (fig. 1) es la estructura en la cual esta basado el grupo entero.

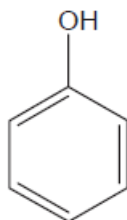


Fig. 1. Estructura de Fenol

El número de compuestos fenólicos identificados en 1994, superaba los 100,000 (Waterman y Mole 1994) y pueden aparecer como monómeros con un grupo hidroxilo (por ejemplo, el ácido ferúlico). Los compuestos con varios substituyentes hidroxilo fenólicos se conocen como polifenoles, entre éstos, los taninos que son de particular interés debido a que producen varios efectos ecológicos (Zucker 1983). En particular, los compuestos fenólicos juegan un papel importante contra los herbívoros y patógenos, debido a que pueden afectar a degradadores microbianos (Waterman y Mole 1994; Lill y Marquis 2001).

2.1.1 Clasificación

El término compuestos fenólicos abarca un muy amplio y diverso grupo de compuesto químicos, los cuales pueden ser clasificados de varias maneras. Para Harborne y Simmonds (1964), ésta se basa en el número de carbonos en la molécula (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de compuestos fenólicos

Estructura	Clase
C ₆	Fenólicos simples
C ₆ – C ₁	Ácidos fenólicos y compuestos relacionados
C ₆ – C ₂	Acetofenonas y ácidos fenilacéticos
C ₆ – C ₃	Ácidos cinámicos, aldehídos cinamílicos y alcoholes cinamílicos
C ₆ – C ₃	Cumarinas, isocumarinas y cromonas
C ₁₅	Calcones, auronos, dihidrocalcones
C ₁₅	Flavanos
C ₁₅	Flavones
C ₁₅	Flavanones
C ₁₅	Flavanoles
C ₁₅	Antocianidinas
C ₁₅	Antocianinas
C ₃₀	Biflavonilos
C ₆ – C ₁ – C ₆ , C ₆ – C ₂ – C ₆	Benzofenonas, xantonas, estilbenos
C ₆ , C ₁₀ , C ₁₄	Quinonas
C ₁₈	Betacianinas
Lignanós, neolignanós	Dímeros u oligómeros
Lignina	Polímeros
Taninos	Oligómeros o polímeros
Flobafenos	Polímeros

Los compuestos fenólicos son de mayor abundancia en metabolitos secundarios en plantas; por lo que otra alternativa de clasificación es en compuestos no solubles, tales como taninos condensados, ligninas, ácidos hidroxicinámicos unidos a la pared celular y compuestos solubles como ácidos fenólicos, fenil propanoides, flavonoides y quinonas (Rispaill *et al.* 2005). Todos estos grupos están involucrados en muchos procesos en plantas y animales.

Hay otra clasificación que ha sido usada por Swain y Bate-Smith (1962) puesto que ellos agruparon a los fenoles en “comunes” y “menos comunes” y Ribéreau-Gayon (1972) agruparon a los fenoles en tres familias:

1. Fenoles ampliamente distribuidos (en todas las plantas o de importancia en una planta específica).
2. Fenoles que son menos ampliamente distribuidos (número limitado de compuestos conocidos).
3. Compuestos fenólicos presentes en polímeros.

2.2 Fenol oxidasas

Las enzimas redox están clasificadas de acuerdo a su coenzima requerida, o alternativamente de acuerdo a la naturaleza de su sustrato (aceptor o donador de electrones) y los productos de reacción. En ésta clase de enzimas, el oxígeno sirve como el aceptor de electrones, distinguiéndolos de las deshidrogenasas. Las oxidasas y peroxidasas reaccionan con oxígeno (como oxígeno molecular ó peróxido, respectivamente) (Burton 2003). Dentro de éste tipo de enzimas se encuentran las fenol oxidasas.

Las fenol oxidasas están presentes generalmente en animales, plantas verdes y hongos (Mason 1955). Comprenden un grupo de enzimas que pueden catalizar la oxidación de compuestos aromáticos a quinonas, acompañadas por la formación de agua. Por medio de oxígeno molecular hacen que el sustrato forme radicales fenoxilo y quinonas, que a los pocos segundos sufren una polimerización espontánea. De manera particular, las fenol oxidasas provenientes de hongos son enzimas dependientes de oxígeno, son glicoproteínas que contienen cobre y están

clasificadas en dos principales grupos. El primer grupo consiste de las polifenol oxidasas, tirosinasa (monofenol monooxigenasa) y catecol oxidasa que frecuentemente exhiben similar especificidad a la tirosinasa pero no pueden hidroxilar monofenoles (*o*-difenol oxidasa). El segundo grupo consiste en multicobre oxidasas, es decir, lacasas que catalizan la oxidación de *o*- y *p*-fenoles y de compuestos diaminoaromáticos (*p*-difenol: dioxígeno oxidoreductasa) (Ögel *et al.* 2006; Leatham y Stahmann 1981).

Las fenol oxidasas catalizan la hidroxilación de monofenoles a *o*-difenoles (tirosinasa o actividad monofenolasa) y la oxidación de *o*-difenoles a *o*-quinonas (catecolasa o actividad difenolasa). Las enzimas que pueden catalizar ambas reacciones son algunas veces denominadas tirosinasas (EC.1.14.18.1), mientras que aquellas que llevan a cabo sólo la última reacción pueden ser definidas como catecol oxidasas (EC 1.10.3.1) (Terwilliger y Ryan 2006).

Como se mencionó anteriormente las fenol oxidasas son glicoproteínas, es decir, son enzimas que tienen unidades de carbohidratos que pueden tener la función principal de protección, como a la temperatura y a la deshidratación. Lo cual, puede ser un factor contribuyente para la sobrevivencia de los microorganismos, en ambientes con bajo potencial de agua (Kornfeld y Kornfeld 1976). Además, se ha reportado que las fracciones de carbohidratos de las glucoamilasas estabilizan la estructura tridimensional de éstas enzimas cuando permanece a bajas temperaturas (Darbyshire 1974).

Los azúcares que comúnmente se encuentran en las glicoproteínas incluyen galactosa, manosa, glucosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, ácido siálico, fucosa y xilosa (Kornfeld y Kornfeld 1976). Eylar (1965) señaló que la mayoría de las proteínas extracelulares son glicosiladas.

También se menciona que las fenol oxidasas contienen un grupo prostético ferroporfirina, es decir que son hemo proteínas. El grupo hemo que tienen algunas enzimas se refiere a un complejo de un ion metálico (Fe, Mg, Mn, Zn, Sn, Cd, Cu, Cr y Ag) quelato, en un anillo de porfirina; el anillo de porfirina es protoporfirina IX. El término sin embargo, es habitualmente utilizado en referencia al complejo de los quelatos de hierro (Maines 1988).

2.2.1 Tirosinasas

Las tirosinasas son polifenol oxidasas (EC 1.14.18.1) producidas por diversos tipos de organismos, tales como hongos, bacterias y plantas superiores. Este tipo de enzima cataliza dos reacciones: la inserción de un oxígeno en la posición orto de los hidroxilos fenólicos y la oxidación de *o*-difenoles (actividad cresolasa) a *o*-quinonas (actividad catecolasa) (fig. 2) (Calabria y Goncalves 2006).

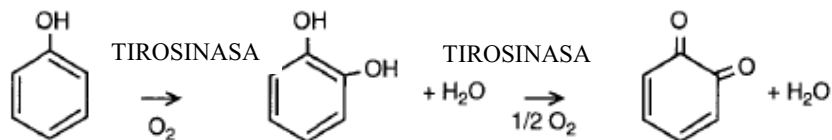


Fig. 2 Oxidación catalítica de la tirosinasa sobre fenol (Calabria y Goncalves 2006)

Las *o*-quinonas generadas polimerizan para formar melanina, a partir de una serie de reacciones enzimáticas y no enzimáticas. La tirosinasa participa en muchos procesos biológicos, como la defensa, el mimetismo, la protección de la luz UV, el endurecimiento de las paredes celulares o exoesqueleto en los artrópodos y en general la producción de melanina.

Las tirosinasas son frecuentemente llamadas fenolasas, fenol oxidasas (PO), polifenol oxidasas (PPO), o catecol oxidasas (CO), etc. dependiendo de la fuente en particular y también de los autores, quienes han descrito cualquier particular enzima (Khan 2007).

2.2.2 Lacasas

Las lacasas pueden oxidar monofenoles, *o*- y *p*-difenoles, aminofenoles y compuestos diaminoaromáticos (De Vries *et al.* 1986). Estas enzimas han sido implicadas en la degradación de lignina y/o la detoxificación de productos de degradación de lignina, la acumulación de pigmentación, etc (Score *et al.* 1997).

La lacasa producida por hongos puede catalizar la oxidación de compuestos fenólicos a la forma de radical libre altamente reactivo, haciendo posible la entrada de moléculas de oxígeno (fig. 3) (Calabria y Goncalves 2006).

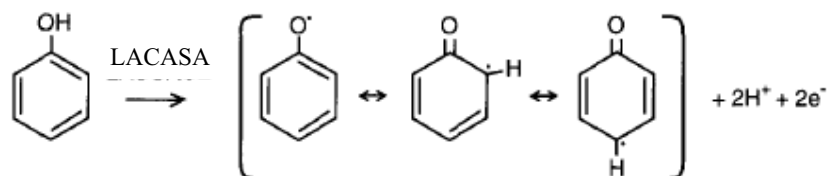


Fig.3. Oxidación catalítica de lacasa sobre fenol (Calabria y Goncalves 2006)

En los últimos años las lacasas han recibido mucha atención debido a su alta capacidad de oxidación de compuestos aromáticos. Esta característica de lacasa la hace muy adecuada para algunas aplicaciones biotecnológicas, tales como la degradación de compuestos xenobióticos (Collins *et al.* 1996) y el biodespulpado en la industria del papel (Fukushima y Kirk 1995).

Las tirosinasas y lacasas son capaces de oxidar un rango amplio de acumulación de compuestos difenólicos. Sin embargo, éstas enzimas han sido tradicionalmente diferenciadas sobre la base de especificidad de sustrato. Las diferencias más importantes entre los dos tipos de enzimas es que sólo la lacasa es capaz de oxidar algunos cromóforos aromáticos como la siringaldazina. La tirosinasa sólo muestra actividad cresolasa y la capacidad para oxidar L-tirosina (Dalfard *et al.* 2006)

2.2.3 Sitio y modo de acción

El sistema de secreción enzimática en los hongos filamentosos tiene como propósito principal el crecimiento y transporte de nutrientes hacia el ápice hifal, siendo ésta el área activa de secreción enzimática. No se descarta que exista una cierta actividad secretora a lo largo del resto del micelio con el fin de mantener la actividad metabólica (Papinutti 2003).

Las enzimas involucradas en la degradación de polímeros (no necesariamente polisacáridos) pueden tener dos estrategias de ataque. Pueden actuar sobre el polímero aleatoriamente fragmentado (en oligómeros), siendo responsables de esta forma de ataque las endoenzimas. O actuar a partir de un extremo (exoenzimas) generalmente el extremo no reductor de la molécula, liberando monómeros o dímeros de modo secuencial. Los sistemas se completan con enzimas capaces de actuar sobre oligómeros o dímeros, llevando a la completa degradación del polímero. Estos complejos de enzimas actúan de modo sinérgico (Moore 1998).

Las enzimas extracelulares son producidas dentro de la célula, pero actúan fuera de ella. Muchas de estas enzimas tienen una estructura particular que consiste

en un dominio de unión al sustrato y un dominio catalítico unidos por una zona más laxa (Aleshin *et al.* 1992; Rouvienen *et al.* 1990). En general las enzimas degradadoras de polisacáridos están sujetas a mecanismos de regulación de su síntesis. Es decir, no se producen de modo constante, constitutivo sino que su síntesis es inducida por el sustrato adecuado y es reprimida por azúcares fácilmente utilizables, en particular glucosa. El inductor mas eficiente es el polímero-sustrato de las enzimas que serán sintetizadas, sin embargo debido a su alto peso molecular, no son compuestos que puedan penetrar en las células y ejercer su efecto (Barr *et al.* 1996; Blanchette 1995; Carlile *et al.* 2001; Joselau y Ruel 1994).

2.3 Hongos Termófilos

Los hongos termófilos pueden desarrollarse en varios tipos de suelos y en los hábitats donde hay descomposición del material vegetal. Estos pueden ser compostas, pilas de madera, granos almacenados, tabaco y otras acumulaciones de materia orgánica, en la que el ambiente cálido, húmedo y aerobio establecen las condiciones fisiológicas básicas para su desarrollo. En estos hábitats, los termófilos pueden estar presentes en reposo como propágulos o como micelio activo en función de la disponibilidad de nutrientes y a las condiciones ambientales favorables (Maheswari *et al.* 1987). Tansey y Brock (1972) observaron que los hongos termófilos son mucho más comunes en hábitats ácidos, térmicos que los de pH neutral a alcalino.

Los hongos termófilos constituyen un grupo heterogéneo fisiológico de varios géneros, cuyo crecimiento a altas temperaturas es una característica rara, por lo cual, la capacidad de desarrollarse a altas temperaturas está presente en unos

pocos zigomicetos y varios ascomicetos y deuteromicetos (Hifomicetes) (Salar y Aneja 2007), la temperatura óptima de muchas especies está alrededor de 45-50°C.

La mayoría de los hongos termófilos crecen en medios simples que contienen fuentes de carbono y nitrógeno y un poco de sales minerales, lo que sugiere que ellos tienen requerimientos nutricionales muy simples. Fuentes de nitrógeno simples como nitratos de sodio y potasio, asparagina y extracto de levadura como soporte para el buen crecimiento de estos hongos (Satyanarayana y Johri 1984).

Los hongos termofílicos son considerados agentes potenciales para la bioconversión y biodegradación de diversos materiales (Satyanarayana *et al.* 1992). En una composta, éstos rápidamente reemplazan la población de los mesofílicos y persisten hasta que la composta está fría; además tienen un papel muy importante en la transformación de lignohemicelulosa de desechos agrícolas. Aparecen para ocupar aquellos hábitats donde el número de competidores potenciales y antagónicos es grande. Este es un inevitable ambiente competitivo del suelo donde altas condiciones de temperatura son comunes para inhibir otros grupos de organismos. Para tal situación de competencia, los termófilos secretan sustancias antimicrobianas y compuestos volátiles esporádicos (Subrahmanyam 1999).

La población de diferentes microorganismos, particularmente la flora termofílica, es muy importante puesto que ellos descomponen la materia orgánica y la convierten a una forma soluble de nitrógeno dentro de las células microbianas constituyentes. Un ejemplo de ello se puede observar en el cultivo de champiñón (*Agaricus bisporus*), donde la biomasa y la materia orgánica degradada por los termófilos llegan a ser una fuente de nutrición orgánica e inorgánica para el micelio del hongo que se cultiva. De manera particular *Scytalidium thermophilum* es sin duda invaluable en la preparación de composta para el cultivo del champiñón porque

estimula su crecimiento, duplicando su velocidad e incrementando su rendimiento (Ross y Harris 1983; Straatsma *et al.* 1989; Straatsma *et al.* 1991; Wiegant 1992; Wiegant *et al.* 1992).

2.3.1 *Scytalidium thermophilum*

De acuerdo a la nomenclatura global de hongos dada por Index fungorum (2008), la clasificación taxonómica de *S. thermophilum* corresponde a la que se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Scytalidium thermophilum*

Reino:	Fungi
División:	Ascomicota
Subdivisión:	Leotiomycetes
Clase:	Leotiomycetidae
Orden:	Helotiales
Familia:	Insertae sedis
Género:	<i>Scytalidium</i>
Especie:	<i>S. thermophilum</i>
Cepas:	ECS-0601 ECS-0602 ECS-0603

La sinonimia presentada por Straatsma y Samson (1993) para *Scytalidium thermophilum* (Cooney y Emerson) Austwick, es *Torula thermophila*, *Humicola insolens*, *H. fuscoatra* var. *longispora* forma *insolens*, *H. grisea* Traaen var. *thermoidea* (1964), *H. insolens* (1982) y para Narain *et al.* (1983) es *Scytalidium allahabadum*.

2.3.1.1 Descripción de *Scytalidium thermophilum*

S. thermophilum es un hongo mitospórico (deuteromiceto) que tiene una amplia distribución en el mundo con una variedad de hábitats que incluye: compostas, pilas de madera, rastrojos, granos almacenados, etc (Subrahmanyam 1999). Este hongo crece rápidamente y alcanza un diámetro de 9 cm en cinco días a 40°C. Presenta colonias efusas, con micelio de color verde oscuro, especialmente en los márgenes e hifas hialinas de 4-6 µm de diámetro, con paredes lisas. Los conidios son elipsoidales o globosos, con paredes lisas y gruesas, pigmentadas de color oscuro, con 8 –12 µm de diámetro (Straatsma y Samson 1993). La temperatura máxima de crecimiento es de alrededor de 55°C, las hifas mueren a 58°C y las colonias de sus conidios mueren a 68°C (Satyanarayana y Johri 1984).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Estudiar la producción de enzimas fenol oxidasas de tres cepas de *Scytalidium thermophilum* y caracterizar la enzima con mayor capacidad catalítica

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la capacidad catalítica de la fenol oxidasa de tres cepas de *S. thermophilum*
2. Estudiar el efecto del pH y de la temperatura sobre la actividad fenol oxidasa de *Scytalidium thermophilum*.
3. Obtener preparaciones de fenol oxidasa con alto nivel de pureza.
4. Determinar las constantes cinéticas de la fenol oxidasa de *S. thermophilum* así como su peso molecular.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Una primera parte de este trabajo consistió en la valoración de diferentes medios de cultivo a distintas condiciones para la producción de fenol oxidasa y fue desarrollado en el laboratorio de Micología de la línea de investigación sobre Hongos Tropicales de El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Tapachula, Chiapas, México. La segunda parte consistió en la purificación y caracterización de la fenol oxidasa y se desarrolló en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la UNAM, en Cuernavaca, Morelos.

4.1 Material biológico

Se utilizaron las cepas *Scytalidium thermophilum* ECS-0601, ECS-0602 y ECS-0603, depositadas en el cepario micológico de Ecosur.

4.2 Medios de conservación y cultivo

Se usaron los siguientes medios: medio de almidón (MA), constituido de extracto de levadura (0.4%), fosfato dipotásico (0.1%), sulfato de magnesio (0.05%) y almidón soluble (1.5%). El medio de papa-dextrosa-extracto de levadura (PDL), constituido de extracto de papa (20%), dextrosa (1%) y levadura (0.3%) de la marca Bioxón. La infusión de pasto (IP), que contiene 20 g de pasto Pangola *Digitaria decumbens*, preparado en 1L de agua, por la ebullición de cinco minutos de dicho pasto, al cual se le agregó dextrosa (1%) y extracto de levadura (0.3%).

4.3 Preparación del Inóculo

Después de cultivar *S. thermophilum* en PDA (papa-dextrosa-agar) por cuatro días a 45°C en caja de Petri, sobre la colonia del hongo ya esporulada, se agregaron

15 ml de agua estéril y se estirió suavemente a manera de remover las esporas, para con estas hacer las correspondientes diluciones. El conteo de esporas de los matraces finales, fue realizado al microscopio con ayuda de una cámara de Neubauer, posteriormente con una micropipeta se inocularon 2500 esporas en medio cultivo líquido, para una concentración final de 50 esporas/ml.

4.4 Cinética de crecimiento

Se monitoreó el crecimiento de las tres cepas de *S. thermophilum* en los tres medios de cultivo líquidos mencionados anteriormente (PDL, MA e IP) por inoculación por esporas. Los matraces inoculados (50 esporas/ml) se incubaron a 45°C y 135 rpm en un agitador orbital marca Lab-line Mod. Orbite 3526 del cual se sacaron tres matraces (repeticiones) por tratamiento cada 24 horas, durante cinco días.

4.4.1 Obtención del extracto

El contenido de los matraces que fueron tomados cada 24 horas (tres repeticiones por tratamiento) fueron filtrados a través de papel filtro Whatmann No. 6 (pesado previamente). El líquido obtenido se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min y se fraccionó en dos partes de la cuales una se almacenó a menos 20°C para determinar azúcares. La otra fracción del mismo día obtenido se sometió a ensayos enzimáticos.

4.5 Métodos analíticos

4.5.1 pH: al extracto colectado de los matraces se les determinó pH el mismo día, directamente con un potenciómetro.

4.5.2 Biomasa (g/L): por el método de gravimetría (Williams 1984). Se separó la biomasa del medio de cultivo por filtración con papel Whatmann # 6 (pesado previamente) y se colocó en un horno a 100°C por 24 horas, Posteriormente se volvió a pesar. El contenido de biomasa se obtuvo mediante la formula:

$$Biomasa = \frac{P_2 - P_1}{V}$$

Donde:

P_2 = peso seco de biomasa y papel filtro

P_1 = peso de papel filtro

V = volumen de medio de cultivo

A su vez se determinó la **tasa de crecimiento** mediante la fórmula:

$$\frac{dx}{dt} \approx \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$$

Donde:

y_2 = biomasa final (máxima producción)

y_1 = biomasa inicial (producción inicial)

x_2 = tiempo (días) de la biomasa final

x_1 = tiempo (días) de la biomasa inicial

4.5.3 Azúcares (g/L): para la determinación del consumo de azúcares de *S. thermophilum* durante la cinética de crecimiento, se usó el método de ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller 1959), usando glucosa como estándar de concentración de 1 mg/ml y lectura en el espectrofotómetro a 550 nm. Para la determinación de cantidad de azúcares presentes en la enzima purificada se usó el método con antrona como reactivo (Yemm y Willis 1954), usando glucosa como estándar a una concentración de 1 mg/ml y lectura en el espectrofotómetro a 630nm.

4.5.4 Proteínas solubles (g/L): Se determinó la cantidad de proteínas ($\mu\text{g/ml}$) por el método de Bradford (1976). La concentración de proteína se determinó con el reactivo de Bio-Rad[®] (Protein Reagent Assay) espectrofotométricamente a 595 nm, usando albúmina de suero bovino como estándar. El medio de ensayo consistió en 798 μl de agua destilada, 200 μl de reactivo Bradford y 2 μl del extracto enzimático, para ser leído después de 5 min.

4.5.5 Actividad enzimática (U/ml): La actividad fenol oxidasa fue medida espectrofotométricamente por el cambio de absorbancia durante 1 minuto a 60°C, con catecol como sustrato, con un coeficiente de extinción $\epsilon_{420 \text{ nm}} = 3,450 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. El medio del ensayo consistió en 250 μl de solución de catecol (a 0.1 M en 0.1 M de buffer fosfato pH 7) y 500 μl de buffer fosfato preincubados durante 3min, para posteriormente agregar 250 μl de extracto y leer a 420 nm (Ögel *et al.* 2006).

4.6 Efecto de pH y temperatura sobre la producción de fenol oxidasa

La combinación de cepa y medio con mayor actividad enzimática fue utilizada para el cultivo a diferentes valores iniciales de pH (6, 7 y 8), a 42°C y 135 rpm. El pH inicial del medio de cultivo fue regulado con HCl 1 M o NaOH 1 N, según el caso.

Utilizando los datos previos de mayor actividad en la combinación de cepa, medio y pH se estudió producción de fenol oxidasa y crecimiento en infusión de pasto a pH 8 a distintas temperaturas (42, 45 y 48°C).

4.7 Purificación de la fenol oxidasa de *S. thermophilum*

4.7.1 Obtención del extracto proteico

Se preparó un fermentador de 10 L (fig. 4) (marca New Brunswick Scientific Co; Inc, Modelo MF-114) con 10 L de medio de infusión de pasto a pH 8 ajustado con NaOH 1 M y esterilizado a 121°C durante 20 min. Posteriormente se le agregó inóculo de *S. thermophilum* (10%).

Las condiciones del fermentador fueron: 135 rpm y 45°C, con control de antiespumante a 30% (emulsión de grasa de silicón).



Fig. 4. Crecimiento de *S. thermophilum* después de 48 hrs en fermentador de 10 L

Después de 48 h de crecimiento del hongo, el medio fue filtrado a través de tamices de 40, 80 y 120 hilos de medida, el sobrenadante se centrifugó a 21,000 rpm en una supercentrífuga (fig. 5) a temperatura ambiente (marca Sharples, modelo CL-T.1) y concentró en un equipo de ultrafiltración de 20 L (fig. 6) (marca Amicon, modelo DC 10 L) con un cartucho de 50,000 Da. Enseguida se verificó la presencia de la proteína de interés, por medio de ensayos de actividad enzimática tanto al desecho como al concentrado.



Fig. 5. Supercentrífuga, equipo utilizado posterior al fermentador



Fig. 6 Equipo de ultrafiltración de 20 L

El extracto total con la enzima se concentró a un volumen aproximado de 100 ml en un equipo de ultrafiltración (Amicon) de 350 ml de volumen (fig. 7) con una membrana de 50,000 Da, y a su vez corroborando la presencia de proteína por medio de ensayos enzimáticos. Antes de fraccionar el extracto en la columna cromatográfica, dicho extracto fue centrifugado a 14,000 rpm durante 12 min. a 4°C.

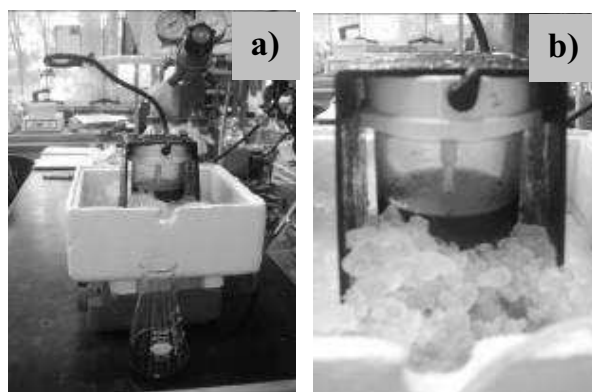


Fig. 7 Equipo de ultrafiltración de 350ml (a y b) usado para concentrar el extracto proteico

4.7.2 Columna cromatográfica de intercambio iónico

Teniendo el extracto crudo, se fraccionó por cromatografía de intercambio iónico sobre una matriz de DEAE Sephadex (resina), en una columna de 5 cm de diámetro y 20 cm de largo (fig. 8). Las proteínas fueron eluidas con un gradiente de NaCl de 100, 150, 200, 250, 300, 400 y 500 mM en buffer Tris-HCl pH 8, 10 mM. Se verificó la actividad fenol oxidasa en las fracciones obtenidas y las que mostraron actividad fueron concentradas nuevamente con una membrana de 30,000 Da, y a la vez lavadas tres veces con buffer fosfato 10 mM a pH 8. El volumen final de extracto concentrado constó de 7 ml, al cual se le determinó la concentración de proteína por el método de Bradford.



Fig. 8. Columna cromatográfica de intercambio iónico

La pureza de la preparación de fenol oxidasa fue probada por medio de electroforésis en SDS-PAGE al 10% y se calculó el peso molecular de acuerdo a su movilidad electroforética con un marcador de peso molecular conocido.

4.8 Caracterización de fenol oxidasa de *S. thermophilum*

4.8.1 Efecto de pH y Temperatura

El efecto de pH y temperatura sobre la actividad fenol oxidasa fue determinado por medio de la oxidación de catecol con el método de Ögel *et al.* (2006), con una concentración de 0.16 M de catecol en 1 ml de ensayo, en un espectrofotómetro (marca Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS) a 420 nm.

El pH óptimo de la reacción fue determinado por la variación de éste en un rango de pH 3-11 a 60°C. Para los distintos valores se utilizaron diferentes sales con una concentración de 0.1 M, como buffer de acetato (pH 3 a 5), fosfato (pH 6 a 8) y Borato (9 a 11) (Guiraud y Galzy 1980), y en las cuales se prepararon las respectivas soluciones de catecol.

Para el caso de temperatura óptima de reacción, se determinó la actividad enzimática a pH 7 y a distintas temperaturas entre 30 y 80°C.

4.8.2 Determinación de parámetros cinéticos (k_{cat} y K_M) de la fenol oxidasa

Para la determinación de la velocidad máxima (V_{max}) y la constante de afinidad (K_M) para catecol, se determinó la actividad inicial en base a la oxidación de dicho sustrato a distintas concentraciones a 55°C y pH 7. Las constantes cinéticas se obtuvieron de los datos experimentales, en base al modelo Michaelis-Menten usando el programa EnzFitter de Biosoft.

4.8.3 Determinación de actividad catalasa

La actividad catalasa fue medida espectrofotométricamente a 25°C por la disminución de la absorbancia a 240 nm. La mezcla de reacción contenida en un volumen total de 1 ml consistió de 10.5 mM de H_2O_2 , 50 mM de buffer fosfato de potasio a distintos valores de pH (con un rango de 5 a 8) y extracto enzimático (Mannheim 1975). Coeficiente de extinción $\epsilon_{240\text{ nm}} = 0.040\text{ cm}^2\ \mu\text{mol}$. Una unidad de enzima fue definida como la cantidad de enzima que cataliza la descomposición de 1 μmol de H_2O_2 por minuto.

4.8.4 Determinación de glicosilación de la enzima

Se determinó si la enzima estaba glicosilada, por medio de la técnica de tinción para glicoproteínas, para esto se hizo un gel de electroforesis en SDS-PAGE al 10% donde se cargó dos veces la misma muestra, una vez corrida la electroforesis el gel se dividió en dos, una parte se tiñó con azul de Coomassie y la

otra parte fue teñida siguiendo el protocolo para glicoproteínas (Gersten 1996). Éste último se alineó a lo largo del gel teñido con azul de coomassie para usarse como referencia de la región donde se ubicó la enzima glicosilada y a su vez se determinó la concentración de azúcares con el método con antrona (Yemm y Willis 1954).

4.8.5 Espectro UV-Vis del grupo hemo de fenol oxidasa de *Scytalidium thermophilum*

Para poder observar el espectro del grupo hemo de la enzima, se removió éste usando 500 µl del extracto de la enzima, se le agregaron dos gotas de ácido clorhídrico y 800 µl de 2-butanona, entonces se agitó y centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min. Se observó el espectro de la fase orgánica en el rango de 340 a 800 nm, usando como blanco 2-butanona.

4.8.6 Análisis de metales

Se colocó en un tubo previamente lavado con ácido nítrico al 10% y posteriormente con agua miliQ, 1 ml de la enzima (enzima con buffer fosfato 10 mM a pH 8) y 1 ml de ácido perclórico puro, en otro tubo (como blanco) se colocó 1ml de buffer fosfato 10 mM y 1 ml de ácido perclórico. Ambos tubos se calentaron directamente en una flama, hasta que la coloración de la muestra estuviera translúcida. Dichas muestras se enviaron a la Unidad de Servicio y Apoyo a la Investigación de la Facultad de Química de la UNAM, para el análisis de metales por espectrometría de absorción atómica de fierro.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

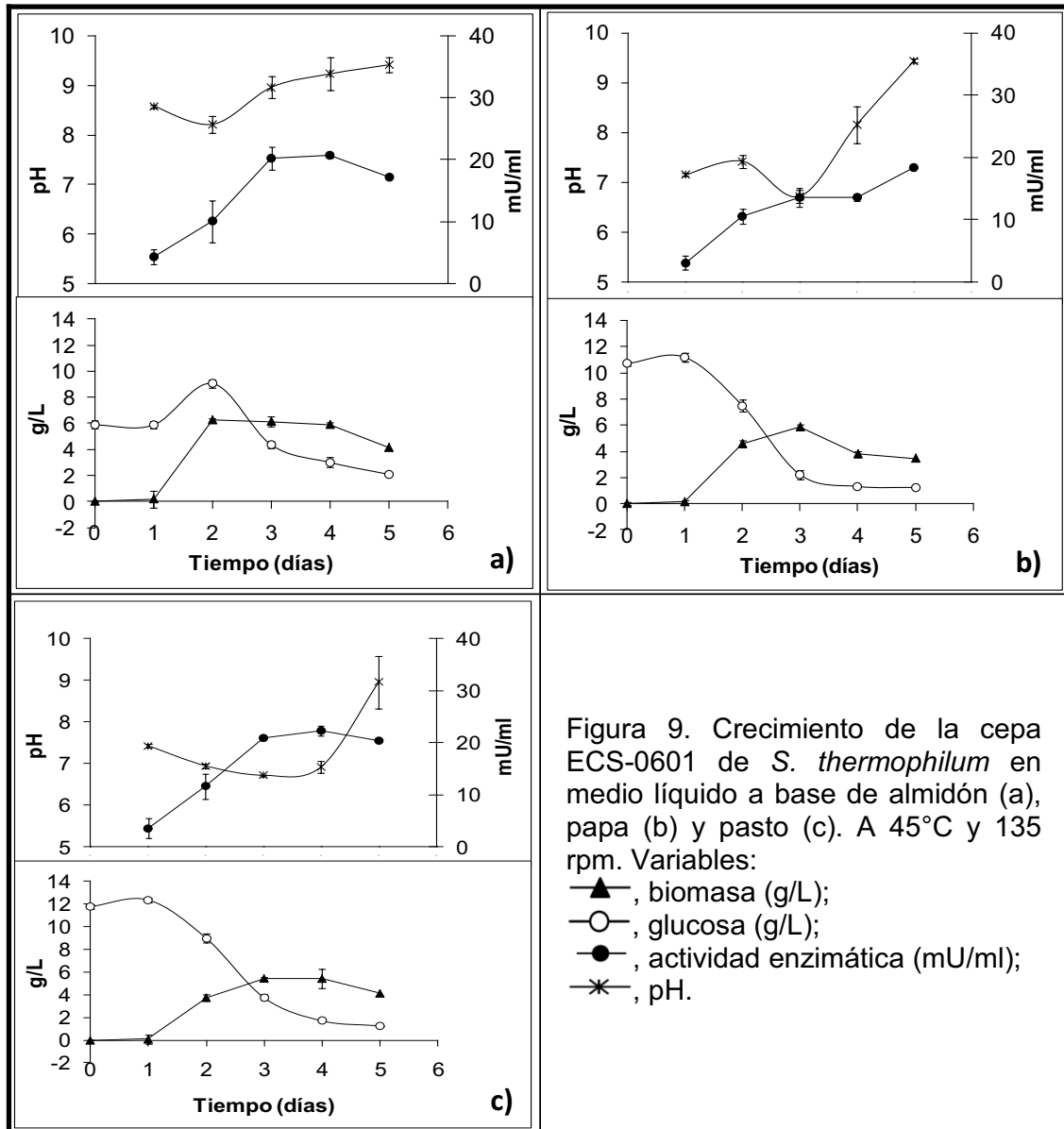
De los ensayos de actividad enzimática: en cinética de crecimiento se aplicó un diseño trifactorial (Montgomery 2006) teniendo como factores: medio de cultivo (tres niveles), cepa (tres niveles) y tiempo (cinco niveles). Para el efecto de pH se aplicó un diseño bifactorial y como factores: pH (tres niveles) y tiempo (cinco niveles). Para el efecto de temperatura se aplicó un diseño bifactorial, factores: temperatura (tres niveles) y tiempo (cinco niveles).

Para los análisis de producción de biomasa y el consumo de glucosa se realizaron análisis de covarianza (Montgomery 2006) unifactorial donde se tomó determinada cepa y el factor fue el medio (AM, PDL e IP) ó bien se tomó un medio y el factor fue la cepa (0601, 0602 y 0603), la respuesta fue por triplicado de biomasa ó glucosa (según el caso) y como covariable el tiempo usando transformaciones de Boxcox (Kemp 1996) y de Rangos (Conover y Ronald 1981). Para la separación de medias se utilizó la prueba de Tukey ($P=0.05$); excepto cuando se observó interacción con respecto al tiempo, donde se aplicó la prueba LSD con corrección de Bonferroni ($P= 0.016$).

6. RESULTADOS

6.1 Cinética de crecimiento

La figura 9 muestra el crecimiento de la cepa ECS-0601 en tres medios de cultivo, donde la tasa de crecimiento fue de $6.06 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$, $4.44 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ y $3.64 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ (tabla 3) y el consumo de glucosa de $3.01 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$, $4.48 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ y $3.71 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ (tabla 4) en medio líquido a base de almidón, papa y pasto, respectivamente. Con respecto a la tasa de crecimiento el análisis estadístico no mostró diferencias significativas del medio de almidón con respecto a papa y pasto ($P=0.018$ y $P= 0.168$, respectivamente), y papa con respecto a pasto ($P= 0.475$). En cuanto al consumo de glucosa el análisis estadístico demostró que hubieron diferencias significativas en el medio de almidón con respecto a papa y pasto ($P= 0.008$ y $P= 0.000$, respectivamente). Sin embargo en medio de papa con respecto a pasto, dicho análisis mostró que no había diferencia significativa ($P= 0.685$). El pH, en el día uno fue ligeramente superior a 7 en el medio PDL e IP mientras que en MA era superior a 8. Dicho pH tendió a incrementarse, hasta alcanzar un valor alrededor de 9 en los tres medios estudiados al cabo de los cinco días de crecimiento. La actividad enzimática pasó de alrededor 3 mU/ml el primer día, a 20 mU/ml como su mayor producción.



El crecimiento de la cepa ECS-0602 en los mismos medios de cultivo puede ser observado en la figura 10. Su tasa de crecimiento fue de $4.73 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$, $3.79 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ y $3.37 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ y consumo de glucosa de $1.56 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$, $5.68 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ y $5.32 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$, para almidón, papa y pasto, respectivamente. El análisis estadístico del crecimiento de dicha cepa en los medios de cultivo, mostró que hay diferencias significativas del medio de pasto, con respecto a almidón y papa ($P=0.000$, para

ambos), sin embargo; en el caso del medio de almidón con respecto a papa, no hubo diferencia significativa ($P= 0.866$). En el caso de consumo de glucosa, el análisis estadístico demostró que hubo diferencias significativas en medio de almidón con respecto a papa y pasto ($P=0.001$ y $P= 0.007$), aunque no hubo diferencia del consumo de glucosa en el medio de papa con respecto a pasto ($P= 0.124$). El pH, en el día 1 fue ligeramente superior a 7 en el medio PDL e IP mientras que en MA era superior a 8. Dicho pH tendió a incrementarse, hasta alcanzar un valor alrededor de 9 en los tres medios estudiados al cabo de los cinco días de crecimiento. La actividad enzimática pasó de alrededor de 2 mU/ml para los tres medios estudiados, a arriba de 30 mU/ml para IP; y arriba de 20 mU/ml para el resto de los medios como su mayor producción.

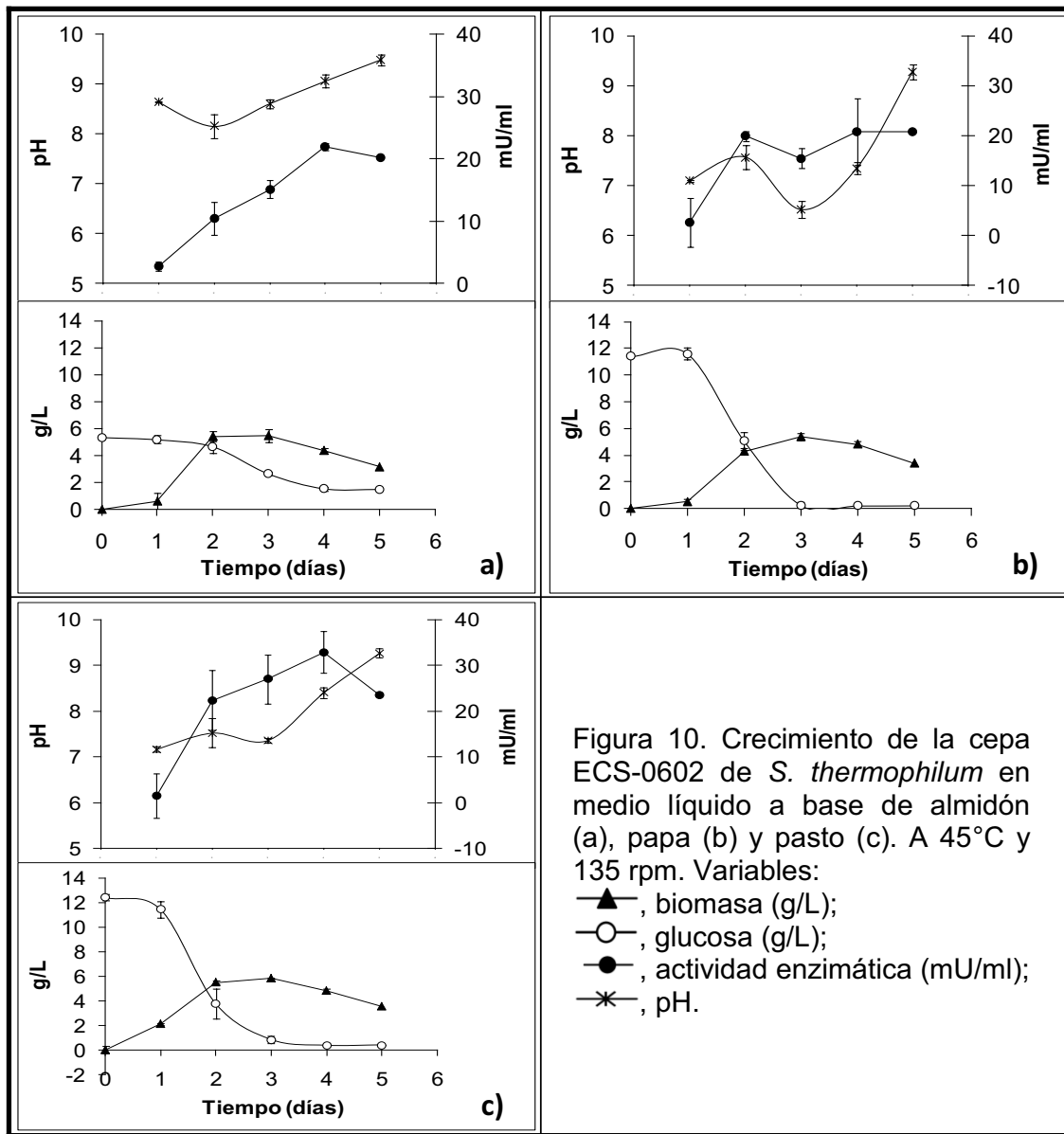
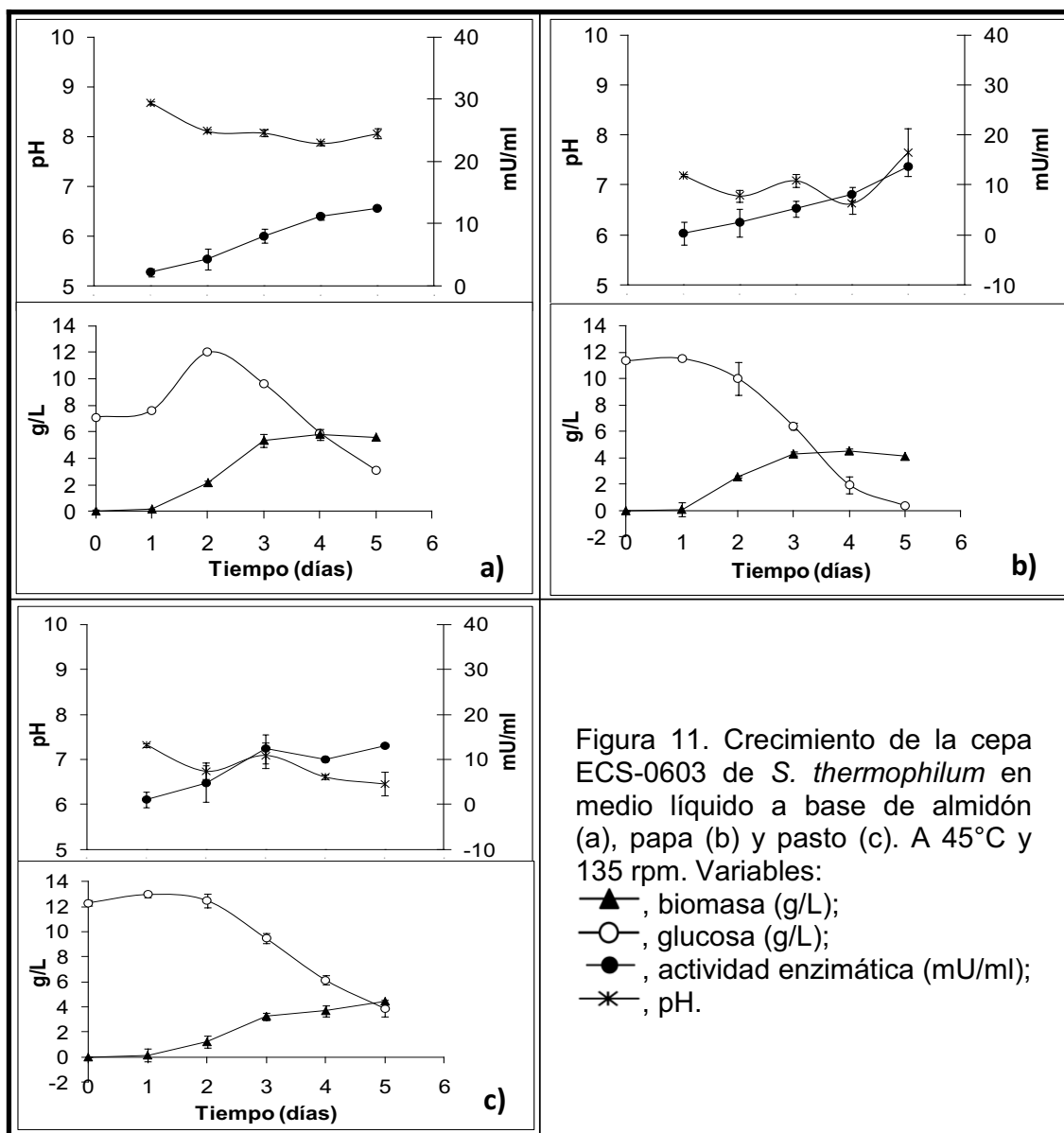


Figura 10. Crecimiento de la cepa ECS-0602 de *S. thermophilum* en medio líquido a base de almidón (a), papa (b) y pasto (c). A 45°C y 135 rpm. Variables:

La tasa de crecimiento de la cepa ECS-0603 en los medios almidón, papa y pasto fue de $2.6 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$, $2.1 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ y $1.55 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ y el consumo de glucosa de $3.04 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$, $3.23 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ y $2.91 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$, respectivamente (fig. 11). El análisis estadístico de dichas tendencias demostró que hubo diferencia significativa de la tasa de crecimiento en medio de almidón con respecto a pasto ($P= 0.000$) y no de papa con respecto a almidón y pasto ($P=0.022$ y $P=0.0320$, respectivamente). En

cuanto al consumo de glucosa el análisis estadístico mostró no haber diferencia significativa entre las tendencias, es decir, de almidón con respecto a papa ($P=0.738$) y pasto ($P= 0.366$) y papa con respecto a pasto ($P= 0.727$). El valor del pH se mantuvo estable, de 8.6 a 8.0 en el medio de MA, de 7.2 a 7.6 en medio PDL y un ligero descenso de 7.3 a 6.5 en IP, al cabo de los cinco días de crecimiento. La actividad enzimática pasó de alrededor 1 mU/ml a arriba de 12 mU/ml como su mayor producción.



La comparación de las tasas de crecimiento de las tres cepas (tabla 3), en medio de almidón (MA) se mostraron diferencias significativas entre ellas, es decir, de la cepa 0601 con respecto a la cepa 0602 y 0603 ($P= 0.000$, para ambas comparaciones) y la cepa 0602 con respecto a la 0603 ($P=0.000$). Para el medio de papa (PDL), el análisis estadístico mostró diferencias significativas entre ellas, es decir, de la cepa 0601 con respecto a la 0602 y 0603 ($P=0.005$ y $P=0.000$, respectivamente) y de la cepa 0602 con respecto a la 0603 ($P=0.003$). Finalmente para el medio de infusión de pasto (IP) las tasas de crecimiento presentaron diferencias significativas entre la cepa 0601 con respecto a la cepa 0602 y 0603 ($P=0.000$) y de la cepa 0602 con respecto a la cepa 0603 ($P= 0.003$).

En cuanto a la comparación de consumo de glucosa de las tres cepas estudiadas (tabla 4), en el medio de almidón sólo mostraron diferencias significativas la cepa 0602 con respecto a la cepa 0601 y 0603 ($P= 0.004$ y $P=0.000$, respectivamente) y no mostró diferencia significativa de la cepa 0601 con respecto a la cepa 0603 ($P= 0.962$). En el medio de papa (PDL) el análisis estadístico demostró diferencias significativas entre las tres cepas, la 0603 con respecto a la cepa 0601 y 0602 ($P= 0.000$ para ambas comparaciones) y de la cepa 0601 con respecto a la 0602 ($P=0.004$). En el medio de infusión de pasto (IP), las tres cepas estadísticamente mostraron diferencias significativas de la cepa 0603 con respecto a la cepa 0601 y 0602 ($P= 0.000$ para ambas comparaciones) y de la cepa 0601 con respecto a la 0602 ($P= 0.0005$).

Tabla 3. Tasa de crecimiento de tres cepas de *S. thermophilum* en tres medios de cultivo a 45°C y 135 rpm. Media de tres repeticiones.

Cepa	MA (gL ⁻¹ d ⁻¹)	PDL (gL ⁻¹ d ⁻¹)	IP (gL ⁻¹ d ⁻¹)
ECS-0601	6.06 A*a**	4.44 B*a**	3.64 C*a**
ECS-0602	4.73 A*b**	3.79 A*b**	3.37 B*b**
ECS-0603	2.6 A*c**	2.1 A*B*c**	1.55 B*c**

*Las letras mayúsculas (para tabla 3 y 4) iguales en una misma fila indican que no hay diferencia estadística entre medios, según la prueba de LSD con corrección de Bonferroni ($\alpha=0.016$).

**Las letras minúsculas (para tabla 3 y 4) iguales en una misma columna indican que no hay diferencias estadísticas entre cepas, según la prueba de LSD con Corrección de Bonferroni ($\alpha=0.016$), excepto en el caso de consumo de glucosa en la comparación de tres cepas en IP se usó la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

Tabla 4. Consumo de glucosa de tres cepas de *S. thermophilum* en tres medios de cultivo a 45°C y 135 rpm. Media de tres repeticiones.

Cepa	MA (gL ⁻¹ d ⁻¹)	PDL (gL ⁻¹ d ⁻¹)	IP (gL ⁻¹ d ⁻¹)
ECS-0601	3.01 A*a**	4.48 B*a**	3.71 B*a**
ECS-0602	1.56 A*b**	5.68 B*b**	5.32 B*b**
ECS-0603	3.04 A*a**	3.23 A*c**	2.91A*c**

En la figura 12 se muestra la interacción de cepas, medio y tiempo en cuanto a actividad fenol oxidasa. Se distingue que las cepas 0601 y 0602 presentaron en el día cuatro la mayor actividad enzimática, no así la 0603 que fue en el día cinco. Así mismo en dicha figura se observa que el medio de IP presentó la mayor actividad enzimática con respecto a los otros dos medios durante los cinco días de la cinética. En cuanto a cepas la mayor actividad enzimática tanto en MA, PDL como IP fue producida por la cepa ECS-0602. Cabe mencionar que tanto entre cepas como entre

medios hubo diferencias significativas ($P=0.000$) excepto entre el medio de PDL y MA ($P= 0.2880$), siendo la cepa 0602 la que presentó una mayor actividad enzimática en medio de IP en día cuatro de 33 mU/ml, seguido por la misma cepa en medio de MA (22 mU/ml) y en medio PDL (21 mU/ml).

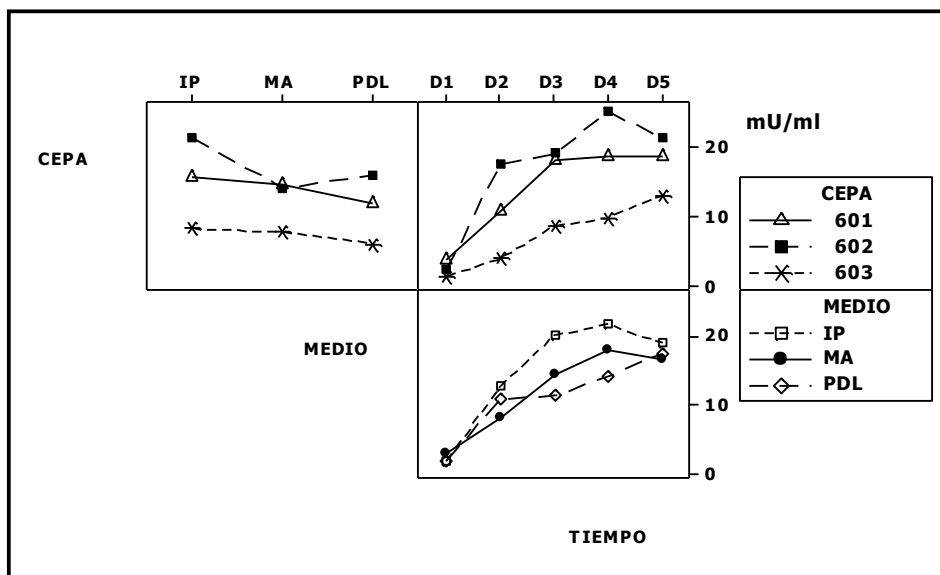
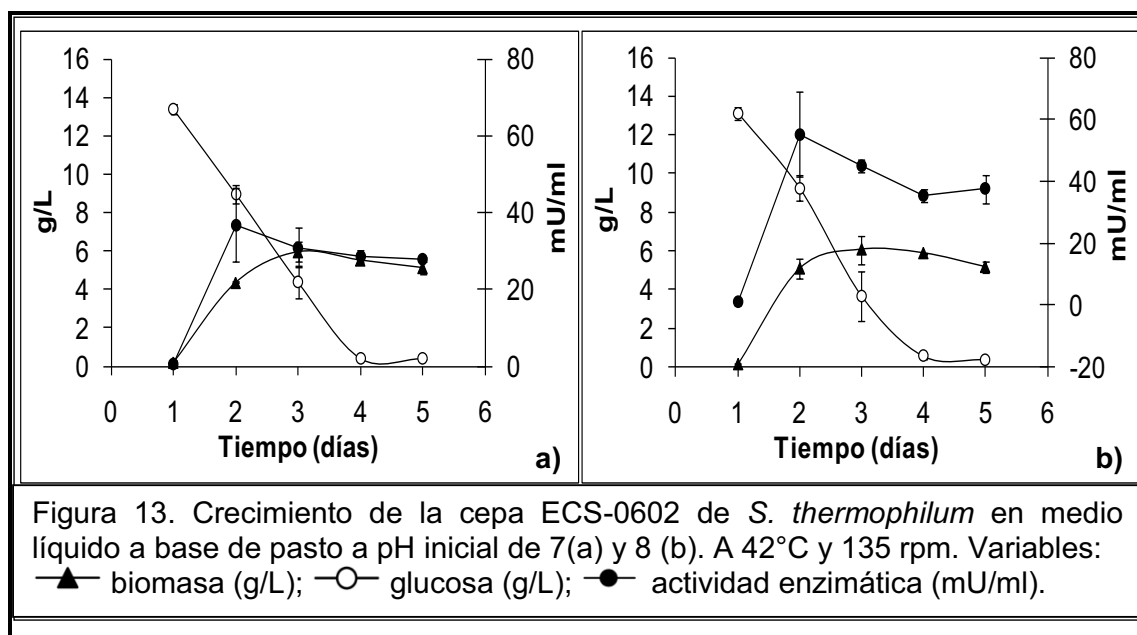


Fig. 12 Interacción de cepas, medio y tiempo en base a la actividad enzimática obtenida en el extracto de dichos medios durante la cinética de crecimiento a 45°C.

6.2 Efecto de pH y temperatura sobre producción de fenol oxidasa

De los resultados de cepa y medio en los que se presentó mayor actividad que fue la cepa 0602 en medio de infusión de pasto, fueron usados para evaluar el efecto del pH inicial (6, 7 y 8, figura 13) y de la temperatura (42, 45 y 48°C, figura 14), sobre el crecimiento y la actividad fenol oxidasa. A pH 6 no hubo crecimiento por lo que no se presentan los datos. La tasa de crecimiento fue de 4.19 gL⁻¹d⁻¹ y 4.95 gL⁻¹d⁻¹ y consumo de glucosa de 4.36 gL⁻¹d⁻¹ y 4.32 gL⁻¹d⁻¹ para pH 7 y 8, respectivamente. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas en cuanto a crecimiento ($P= 0.26$) y consumo de glucosa ($P= 0.686$); sin embargo, en

cuanto a actividad fenol oxidasa el análisis estadístico demostró que hay diferencias significativas ($P= 0.000$), teniendo mayor actividad a pH 8 (55 mU/ml).



Al variar la temperatura, la tasa de crecimiento de la cepa 0602 fue de 5.42 $\text{gL}^{-1}\text{d}^{-1}$, 5.39 $\text{gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ y 5.26 $\text{gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ y consumo de glucosa de 4.48 $\text{gL}^{-1}\text{d}^{-1}$, 5.48 $\text{gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ y 5.17 $\text{gL}^{-1}\text{d}^{-1}$, para 42, 45 y 48°C, respectivamente. La tasa de crecimiento de dicha cepa no mostró diferencia significativa a 48°C con respecto de 42 y 45°C ($P=0.076$ y $P= 0.083$, respectivamente), aunque el crecimiento a 42°C con respecto a 45°C si mostró diferencia significativa ($P= 0.005$). En referencia al consumo de glucosa las diferencias resultaron de la misma forma que el crecimiento: a 48°C con respecto a 42 y 45°C ($P= 0.102$ y $P= 0.394$, respectivamente) no hubo diferencia significativa aunque si la hubo a 42°C con respecto a 45°C ($P= 0.001$). Respecto a actividad enzimática el análisis detectó diferencias significativas entre los tratamientos de 48°C con respecto a 42 y 45°C ($P=0.0087$ y $P=0.000$, respectivamente) y 42°C con respecto a 45°C ($P= 0.000$) a su vez dando una mayor actividad a 45°C (115 mU/ml) al día dos y la menor a 42°C (81 mU/ml) al día tres.

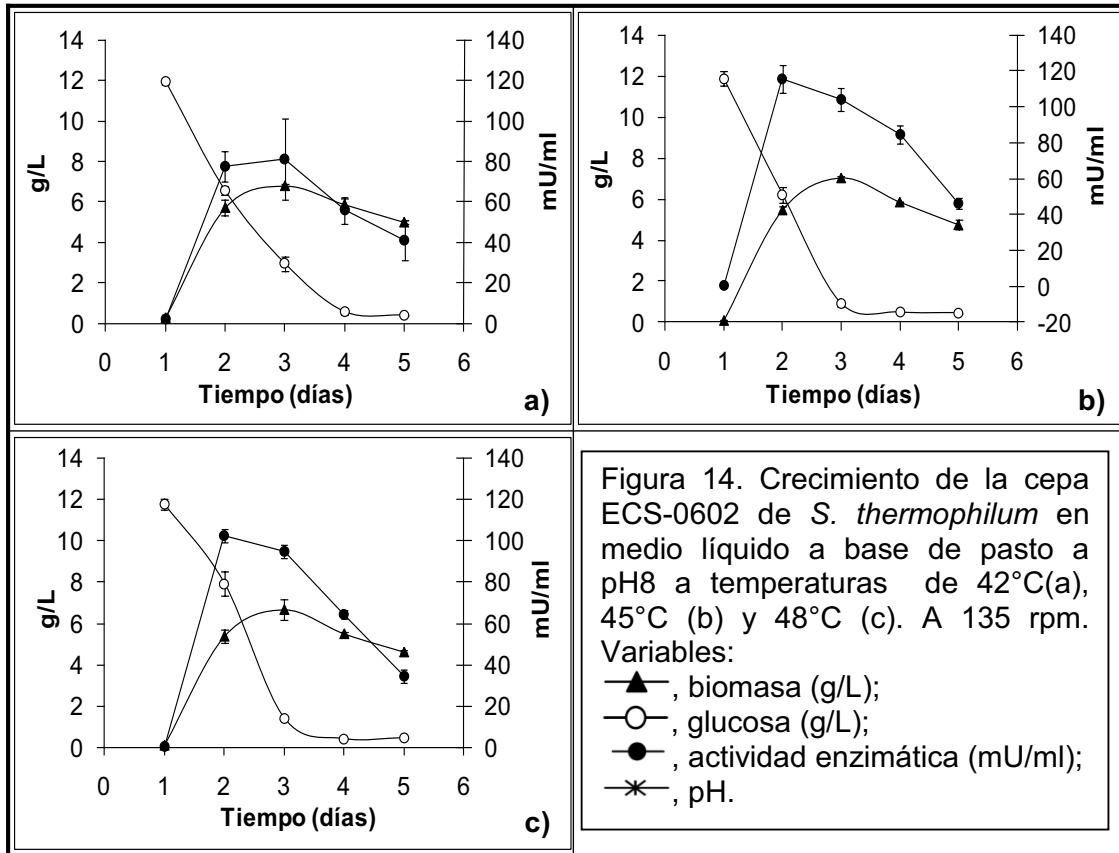


Figura 14. Crecimiento de la cepa ECS-0602 de *S. thermophilum* en medio líquido a base de pasto a pH8 a temperaturas de 42°C(a), 45°C (b) y 48°C (c). A 135 rpm. Variables:
 ▲, biomasa (g/L);
 ○, glucosa (g/L);
 ●, actividad enzimática (mU/ml);
 *, pH.

6.3 Purificación de la fenol oxidasa de *S. thermophilum*

Las fracciones obtenidas de la cromatografía de intercambio iónico que contenían la enzima de interés fueron de la 3 a la 8, (figura 15). Después de la purificación por cromatografía de intercambio iónico se obtuvo enzima pura (153.37 U totales en 7 ml), con un rendimiento de 56.17% de U totales iniciales.

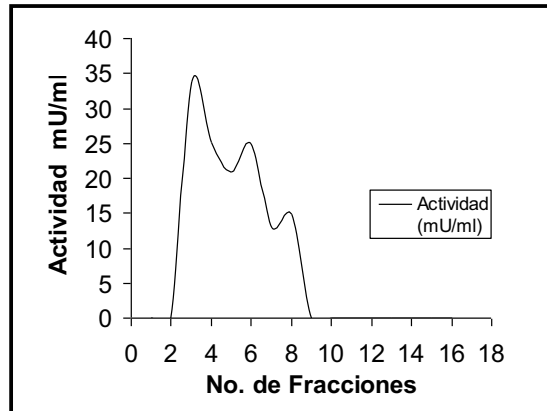


Fig. 15. Perfil de purificación de la enzima en columna de cromatografía de intercambio iónico. Datos obtenidos en ensayos enzimáticos con catecol como sustrato usando el método de Ögel *et al.* (2006).

Como se puede observar en el gel de acrilamida (fig. 16), se logró obtener la proteína con un alto nivel de pureza, siendo la banda bastante marcada y de acuerdo al marcador del peso molecular, el peso de la proteína es de aproximadamente 87 KDa.

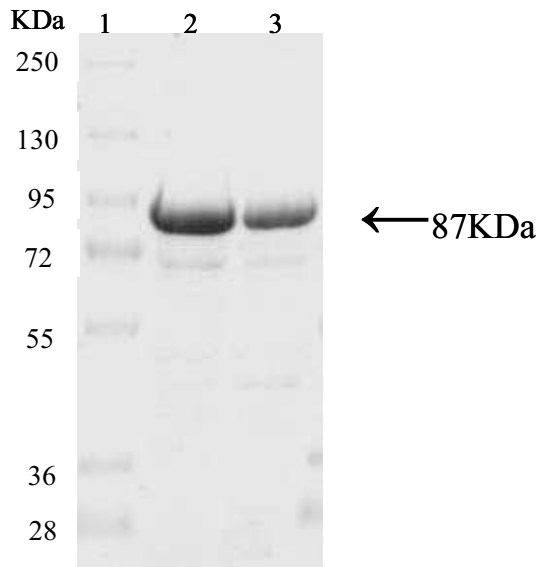


Fig. 16. Gel de electroforésis en el que se cargó el concentrado final de enzima de 6.869 U/mg de proteína. Línea 1, marcadores de peso molecular conocido; línea 2, 39.75 µg de proteína y línea 3, 13.25 µg de proteína.

6.4 Caracterización de la fenol oxidasa de *S. thermophilum*

6.4.1 Efecto de pH y temperatura sobre la actividad de fenol oxidasa

Como se observa en la fig. 17, la enzima no mostró actividad a pH 4, y a pH 11 tenía aún una actividad de 10.6 U/mg de proteína. El pH óptimo fue de 7, con una actividad de 22.9 U/mg de proteína. La temperatura afectó en menor grado la actividad enzimática, observándose actividad entre 30 y 80°C, con un óptimo de reacción de 55°C (22.89 U/mg de proteína).

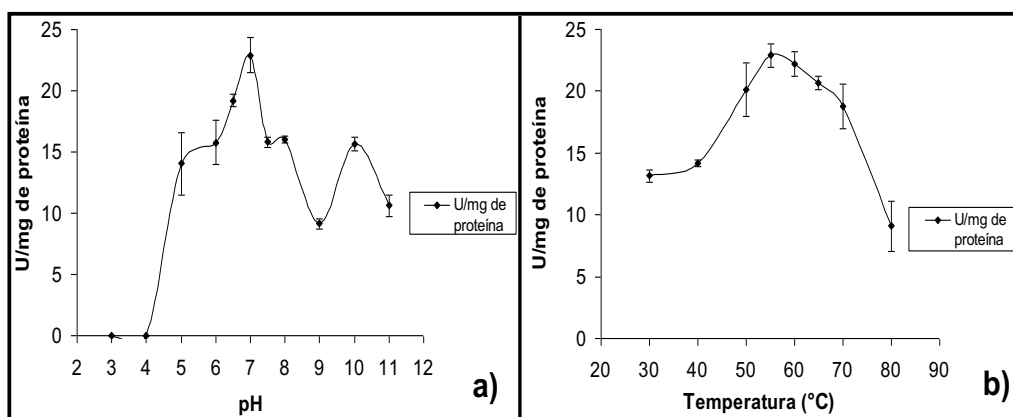


Fig. 17. Efecto de pH y temperatura sobre la actividad de la fenol oxidasa (1.59µg de proteína/ml). a) Actividad en función de pH (3 a 11) a 60°C. b) Actividad en función de temperatura (30 a 80°C) a pH7.

En base al modelo de catálisis enzimática de Michaelis-Menten (1913) con la curva de $V = f(S)$ (fig. 18) se obtuvo la capacidad catalítica (k_{cat} ó V_{max}) de 80.7 $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$ y la constante de afinidad catalítica (K_M) de 302.8 mM.

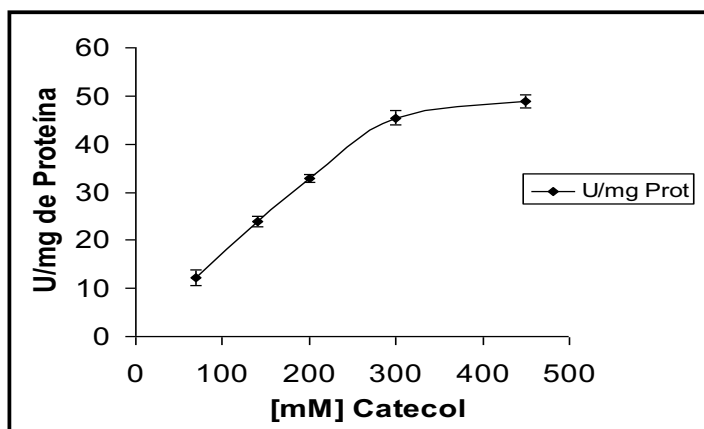


Fig. 18. Cinética de Michaelis-Menten de la fenol oxidasa (0.795 μ g de proteína) a pH 7 y 55°C.

6.4.2 Actividad catalasa

La enzima mostró actividad catalasa a distintos valores de pH a temperatura ambiente. Como se observa en la figura 19 la actividad catalasa va en decremento a partir del pH 6 a 8 con 10,636.6 U/mg de proteína a 7,401.4 U/mg de proteína, respectivamente.

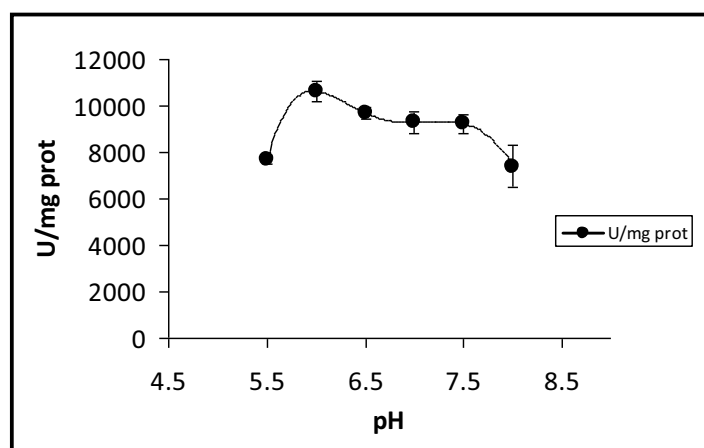


Fig. 19. Efecto de pH sobre la actividad catalasa a temperatura ambiente.

6.4.3 Glicosilación y espectro UV-Vis de la enzima

El gel teñido con el reactivo de Coomassie en donde está el marcador y bandas de 87 KDa, usada como referencia y comparado con el gel con tinción para glicoproteínas (fig. 20), señaló que la enzima purificada es una glicoproteína. Se confirmó con la determinación de azúcares por antrona, que dió una concentración 10.83 mg de azúcares/mg de proteína. Finalmente el espectro UV-VIS del grupo hemo de fenol oxidasa extraído con 2-butanona mostró la máxima absorción del espectro de la enzima a 380 nm, 490 nm y 600 nm. El pico mas alto a 380 nm (banda Soret), indica el contenido del grupo hemo (fig.21).

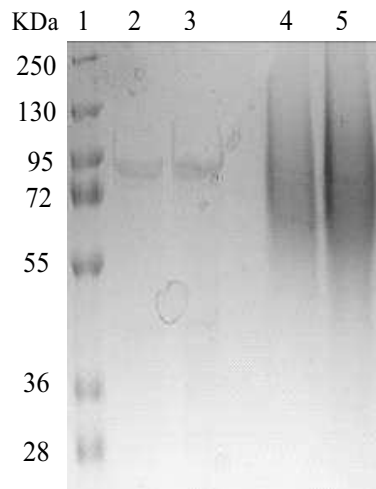


Fig. 20. Gel de tinción de Coomassie (líneas 2 y 3) y de tinción de glicoproteínas, (líneas 4 y 5). Línea 1, marcadores de peso molecular conocido; línea 2, 3.19 µg de proteína; línea 3, 6.38 µg de proteína; línea 4, 3.19 µg de proteína y línea 5, 6.38 µg de proteína.

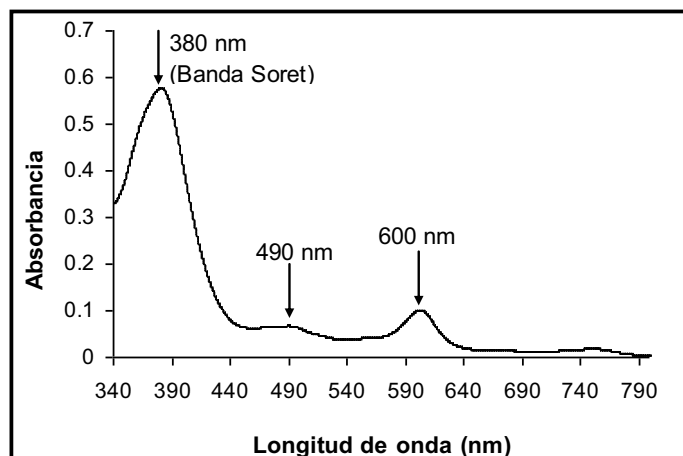


Fig. 21. Espectro UV-VIS del grupo hemo de fenol oxidasa de *Scytalidium thermophilum* en 2-butanona.

6.4.4 Contenido de metales

El resultado del análisis de metales por espectrometría de absorción atómica de hierro demostró que efectivamente la enzima contiene 0.7 moles de Fe por mol de proteína.

7. DISCUSIÓN

En este trabajo se determinaron las condiciones de producción (medio de cultivo, temperatura y pH) de la enzima fenol oxidasa de tres cepas de *S. thermophilum*. Así mismo, se procedió a la purificación y la caracterización de dicha enzima en la cepa más sobresaliente.

La actividad fenol oxidasa fue detectada durante el crecimiento en los tres medios de cultivo a 45°C y en la infusión de pasto se presentó la mayor producción con la cepa 0602. La máxima producción de fenol oxidasa fue de 115 mU/ml al segundo día de incubación obtenida en IP a pH 8 y 45°C. Esta actividad enzimática es mayor a la obtenida por Ögel *et al.* (2006) de 75 mU/ml, aunque hay que considerar que estos autores no optimizaron la producción de fenol oxidasa estudiada. A pesar de haber diferencias en la producción de fenol oxidasa, la producción de biomasa de *S. thermophilum* fue muy parecida en ambos estudios y se situó entre 5 y 6 g/L. Si bien no son comparables ya que se trata de otras enzimas y otros organismos, es de hacer notar que la actividad fenol oxidasa aquí reportada con otras enzimas es muy baja; como por ejemplo: lacasa (13 U/ml) de *Corioloopsis gallica* y manganeso peroxidasa (1.1 U/ml) de *Bjerkandera adusta* (Pickard *et al.* 1999) lo que representa una actividad más de 10 veces superior.

El pH en el medio de crecimiento de las cepas 0601 y 0602 fue alrededor de 8 y 9, para el día en que se presentó la mayor producción de enzima, dicho valor de pH fue similar al observado para la fenol oxidasa (alrededor de 9) de *Thermoascus aurantiacus* en medio líquido a base de aserrín de *Eucalyptus grandis* por Machuca y Duran (1993). Este dato sin embargo contrasta con lo observado para la cepa 0603 que presentó la mayor producción enzimática entre pH 6.5 y 7.5 con una actividad más baja que el resto de las cepas.

Con respecto al efecto del pH inicial del caldo de cultivo se observó que la cepa ECS-0602 no presentó crecimiento a pH 6, pero sí a 7 y 8. Esto difiere parcialmente de lo reportado por Sánchez *et al.* (2008) para un cultivo en medio sólido en caja de Petri, ya que ellos mencionan para el caso de la cepa *S. thermophilum* ECS-0601 los valores más altos de crecimiento a pH de 7 – 8, y un crecimiento de 0.3 mm/h a pH 6; sin embargo, esta diferencia puede estar fundamentada en las características de cada una de las cepas utilizadas.

La mayor producción de enzima fue observada en el medio IP probablemente por la presencia de oligómeros de lignina en la infusión; sin embargo, no se presentó el mayor consumo de glucosa ni el mayor crecimiento en este medio. Esto concuerda con lo expresado por Ögel *et al.* (2006), quienes indicaron que la presencia de compuestos fenólicos induce la expresión de la enzima. Por otra parte, es comprensible que los azúcares simples presentes hayan facilitado el crecimiento en detrimento de la producción de fenol oxidasa en los otros medios.

Se observó que cada cepa presentó ciertas particularidades en cuanto al día de máxima producción y cantidad de enzima producida, lo que concuerda con Lyons y Sharma (1998) quienes reportaron diferencias de comportamiento en función de la cepa de *S. thermophilum* estudiada. En efecto, la cepa 0603 no presentó variaciones en la producción de enzima en los tres medios de cultivo utilizados, mientras que la cepa 0602 fue más influenciada por el medio de cultivo empleado. Así también la cepa 0603 mostró la menor tasa de crecimiento con su máxima producción de fenol oxidasa en el día cinco, lo que difirió de las otras dos cepas que la presentaron en el día cuatro.

El pH y la temperatura óptima de reacción de la enzima purificada fue de 7 y 55°C ligeramente diferentes al reportado por Ögel *et al.* (2006) de una fenol oxidasa de *S. thermophilum* con catecol como sustrato (óptimo pH 7.5 y 65°C), éstos autores mencionan que la actividad enzimática a altos valores de pH y temperatura son una excepción entre las fenol oxidasas provenientes de hongos termófilos puesto que el óptimo de pH para *Chaetomium thermophile* es de 6.0 (Ishigami *et al.* 1988) y para *Thermoascus aurantiacus* el óptimo de pH para la oxidación de *o*-dianisidina es 2.8 (Machuca *et al.* 1998), así también entre los hongos estudiados por Bollag y Leonowicz (1984) se encontró la fenol oxidasa de *Rhizoctonia praticola* con pH neutro (7.2), mientras que para el resto de las fenol oxidasas extracelulares el óptimo de pH era significativamente bajo (3.0 – 5.7). Entre otra de las pocas excepciones se encuentra la lacasa de *Acremonium murorum*, la cual tiene un óptimo de actividad a pH 9 para la oxidación de syringaldazina (Gouka *et al.* 2001).

En cuanto a temperatura, la enzima mostró tener 82% de su actividad a 70°C y 39.6% a 80°C, cabe aclarar que en éste trabajo no se realizaron ensayos para termoestabilidad ni para pH. Dicha actividad a altas temperaturas podría atribuirse al hecho de que la enzima está altamente glicosilada, como mencionan Wasserman y Hultin (1981). Estos autores demostraron que la alta termoestabilidad para la catalasa de *Aspergillus niger* se debía a sus fracciones de azúcares, puesto que como señalan Wang *et al.* (1996) el efecto de glicosilación parece ser dependiente del contenido de carbohidratos. Esos resultados señalan que la función general de la glicosilación de las proteínas es el de ayudar en el plegamiento de la cadena polipeptídica naciente y en la estabilidad de la conformación de la glicoproteína madura; sin embargo, mencionan que no está completamente claro, de cómo contribuye la glicosilación a la estructura y función. Por otro lado, Jafari-Aghdam *et*

al. (2005) además de confirmar lo dicho anteriormente, sugieren que la propiedad de estabilización de una glicoproteína no puede ser generalizada y cada observación deberá ser analizada en términos de propiedad estructural específica a la función exhibida por la molécula proteica.

Hasta el momento se han reportado concentraciones de azúcares bajos en comparación con la que aquí se reporta (10.83 mg de azúcares/mg de proteína). La glucoamilasa de *Aspergillus niveus* contiene 11% de carbohidratos y se menciona que la glucoamilasa de diversos hongos filamentosos contienen típicamente en el rango de 10 a 20% (Da Silva *et al.* 2009). Entre las enzimas con mayor cantidad de carbohidratos se encuentran las fosfatasas alcalinas de *S. thermophilum* extracelulares e intracelulares con alrededor de 54 y 63% respectivamente de contenido de azúcares (Guimaraes *et al.* 2001), donde la alta concentración de carbohidratos resulta ser característico para dichas enzimas (Vasileva-Tonkova *et al.* 1993). Puesto que aquí se reporta una concentración 10.83 mg de azúcares por mg de proteína para la fenol oxidasa de *S. thermophilum*, la glicosilación resulta interesante para su estudio ya que no se ha reportado concentraciones similares en el caso de esta enzima. Por otro lado, el hecho que la enzima sea activa a valores altos de temperatura y de pH (10-11) pudiera resultar de interés, sin embargo parece no ser competitiva para la degradación de compuestos recalcitrantes puesto que otras enzimas tienen mayor actividad como por ejemplo las lacasas de *Trametes hispidata* (Rodriguez *et al.* 1999) y las lignino peroxidasas de *Phanerochaete chrysosporium* (Cripps *et al.* 1990) en la decoloración de algunos colorantes.

El peso molecular obtenido (87 KDa), es muy parecido a la proteína estudiada por Ögel *et al.* (2006) y Sutay Kocabas *et al.* (2008) con 83 y 80 KDa, respectivamente; sin embargo cabe aclarar que el peso molecular aquí determinado

fue obtenido por un gel desnaturalizante a diferencia de Sutay Kocabas *et al.* (2008) quienes determinaron el peso molecular tanto por gel desnaturalizante en SDS-PAGE y en gel nativo donde obtuvieron un peso molecular de 320 KDa de la denominada catalasa-fenol oxidasa, lo que da pie a pensar en la posibilidad de que la enzima estudiada pueda ser tetramérica o con un alto grado de glicosilación y el peso molecular aquí obtenido sea el de una subunidad. Por lo tanto las constantes cinéticas de velocidad máxima ($V_{max} = 80.7 \mu\text{m}/\text{mg prot min}$) y la constante de afinidad catalítica ($K_m = 302.7 \text{ mM}$) fueron determinadas empleando dichas unidades.

La enzima purificada mostró actividad catalasa en el rango de pH de 5.5 a 8. A pH 8 mostró el 70% de su actividad fenol oxidasa y 69.6% de su actividad catalasa. Es de observar que esta última actividad enzimática tiene un rango mas amplio ya que la mayor actividad se presenta a pH 6 (10,636.6 U/mg de proteína) a diferencia de la actividad fenol oxidasa que se presenta a pH 7 (22.9 U/mg de proteína). Cabe aclarar que la actividad catalasa presentada fue observada a 25°C mientras que para la fenol oxidasa se probaron varias temperaturas y se encontró su mayor actividad a 55°C. En el caso de la catalasa no se midió su actividad a altas temperaturas. Sutay Kocabas *et al.* (2008) mencionan que la actividad catalasa fue mayor a temperatura ambiente e igual a temperaturas altas con respecto a la actividad fenol oxidasa.

La anterior actividad catalasa y fenol oxidasa señalan que la enzima purificada es capaz de oxidar fenoles en ausencia y presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), teniendo con éste ultimo una mas alta actividad enzimática a temperatura ambiente.

Finalmente, al determinarse la presencia de un grupo hemo como centro activo, ubica a esta enzima como una hemoproteína típica, que contiene 0.7 moles de Fe/mol de proteína. El espectro del grupo hemo de ésta enzima no reflejó similitud con respecto a la enzima denominada catalasa-fenol oxidasa de *S. thermophilum* estudiada por Sutay Kocabas *et al.* (2008), aunque dichas diferencias podrían deberse a que el barrido UV-visible de la enzima estudiada fue aplicado al grupo hemo extraído con 2-butanona. Dado que la enzima presentó a temperatura ambiente, mayor actividad catalasa que fenol oxidasa, podría decirse que se trata de una enzima bifuncional, es decir de una catalasa-fenol oxidasa.

8. CONCLUSIONES

- La actividad fenol oxidasa fue detectada durante el crecimiento de las tres cepas de *S. thermophilum* estudiadas en los tres medios de cultivo probados a 45°C.
- La mayor producción de fenol oxidasa (115 mU/ml) fue observada con la cepa ECS-0602, en medio infusión de pasto a pH 8 y 45°C.
- Las condiciones óptimas de reacción de la fenol oxidasa purificada fueron: pH 7 y 55°C.
- La enzima presentó un peso molecular de 87 KDa, V_{max} de 80.7 μmoles min/mg de proteína y K_M de 302.8 mM.
- La enzima fenol oxidasa está altamente glicosilada, con una concentración de 10.83 mg de azúcares/mg de proteína y es una hemoproteína típica que contiene 0.7 moles de Fe/mol de proteína.
- La enzima es además, bifuncional, ya que posee una actividad catalasa de 10,636.6 U/mg de proteína a pH 6 y 25°C.

• 9. REFERENCIAS

- Aggelis G, Ehaliotis C, Nerud F, Stoychev I, Lyberatos G, Zervakis GI. 2002. Evaluation of white-rot fungi for detoxification and decolorization of effluents from green olive debittering process. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59(2-3): 353-360.
- Aleshin A, Golubev A, Firsov LM, Honzatko RB. 1992. Crystal structure of glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. X100 to 2.2-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 267(27): 19291-19298.
- Barr BK, Hsieh YL, Ganem B, Wilson DB. 1996. Identification of two functionally different classes of exocellulases. *Biochemistry*, 35(2): 586-592.
- Blanchette RA. 1995. Degradation of the lignocellulose complex in wood. *Canadian Journal of Botany*, 73(S1): 999-1010.
- Bollag JM, Leonowicz A. 1984. Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(4): 849–854.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Burton SG. 2003. Oxidizing enzymes as biocatalysts. *TRENDS in Biotechnology*, 21(12): 543–549.
- Calabria GMM, Goncalves AR. 2006. Obtainment of chelating agents through the enzymatic oxidation of lignins by phenol oxidase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 129-132: 320-325.
- Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW. 2001. *The fungi*. 2a edición, Academic Press: London. Pp. 588.

- Collins PJ, Kotterman MJJ, Field JA, Dobson ADW. 1996 Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. Applied and Environmental Microbiology, 62 (12):4563 – 4567.
- Conover WJ, Ronald LI. 1981. Rank transformations as a bridge between parametric and nonparametric statistics. The American Statistician, 35(3): 124–129. 48
- Cooney DG, Emerson R. 1964. Thermophilic fungi -an account of their biology, activities and classification. WH. Freeman and Co., San Francisco.
- Cripps C, Bumpus JA, Aust SD. 1990. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology, 56:1114–1118.
- Da Silva TM, Maller A, De Lima AR, Michelin M, Ward RJ, Hirata IY, Jorge JA, Terenzi HF, De Polizeli MLTM. 2009. Properties of a purified thermostable glucoamylase from *Aspergillus niveus*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 36: 1439–1446.
- Dalfard AB, Khajeh K, Soudi MR, Naderi-Manesh H, Ranjbar B, Sajedi RH. 2006. Isolation and Biochemical Characterization of Laccase and Tyrosinase Activities in a novel melanogenic soil bacterium. Enzyme Microbial Technology, 39(7): 1409-1416.
- Darbyshire B. 1974. The function of the carbohydrate units of three fungal enzymes in their resistance to dehydration. Plant Physiology, 54: 717-721.
- De Vries OMH, Kooistra WHCF, Wessels JGH. 1986. Formation of an extracellular lactase by a *Schizophyllum commune* dikaryon. Journal of General Microbiology, 132: 2817-2826.

- Eylar EH. 1965. On the biological role of glycoproteins. *Journal of theoretical Biology*, 10: 89-113.
- Fukushima Y, Kirk TK. 1995. Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispora* lignin-degrading system. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (3): 872–876.
- Gersten DM. 1996. Gel Electrophoresis proteins: Essential Techniques Series. 1a edición. Ed. Wiley, USA, Pp. 113–114.
- Gouka RJ, van der Heiden M, Swarthoff T, Verrips CT. 2001. Cloning of a phenol oxidase gene from *Acremonium murorum* and its expression in *Aspergillus awamori*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (6): 2610 – 2616.
- Guimaraes LHS, Terenzi HF, Jorge JA, Polizeli MLTM. 2001. Thermostable conidial and mycelial alkaline phosphatases from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 27: 265-270.
- Guiraud JP, Galzy P. 1980. L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Les Editions de L'usine. Paris. Pp. 230.
- Harborne JB, Simmonds NW. 1964. Biochemistry of phenolic compounds. Academic Press, London. Pp 101.
- Index fungorum. 2008. www.indexfungorum.org/Names/. (Consulta 20 de agosto del 2010).
- Ishigami T, Hirose Y, Yamada Y. 1988. Characterization of polyphenol oxidase from *Chaetomium thermophile*, a thermophilic fungus. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 34: 401–407.

- Jafari-Aghdam J, Khajeh K, Ranjbar B, Nemat-Gorgani M. 2005. Deglycosylation of glucoamylase from *Aspergillus niger*: effects on the structure, activity and stability. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1750: 61–68.
- Joselau JP, Ruel K. 1994. Wood polysaccharides and their degradation by fungi. En: Petrini O, Oullette GB (Eds), *Host Wall Alterations by Parasitic Fungi*. Minnesota St. Paul: APS Press.
- Kemp GCR. 1996. Scale Equivariance and the box-cox transformation. *Economics Letters*, 51: 1–6.
- Kang H, Lee SH, Lee SM, Jung S. 2009. Positive relationships between phenol oxidase activity and extractable phenolics in estuarine soils. *Chem Ecol* 25(2): 99 – 106.
- Khan MTH. 2007. Heterocyclic Compounds against the enzyme tyrosinase essential for melanin production: biochemical features of inhibition. *Topics in Heterocyclic Chemistry*, 9: 119-138.
- Kornfeld R, Kornfeld S. 1976. Comparative aspects of glycoprotein structure. *Annual Review of Biochemistry*, 45: 217-238.
- Leatham GF, Stahmann MA. 1981. Studies on the lacasa of *Lentinus edodes*: specific, localization and association with the development of fruiting bodies. *Journal of General Microbiology*, 125: 147–157.
- Lill JT, Marquis RJ. 2001. The effects of leaf quality on herbivore performance and attack from natural enemies. *Oecologia*, 126: 418-428.
- Lyons GA, Sharma HSS. 1998. Differentiation of *Scytalidium thermophilum* isolates by thermogravimetric analyses of their biomass. *Mycological Research*, 102(7): 843-849.

- Machuca A, Durán N. 1993. Phenol oxidases production and wood degradation by a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 43: 37–44.
- Machuca A, Aoyama H, Durán N. 1998. Production and characterization of thermostable phenoloxidase of the ascomycete *Thermoascus aurantiacus*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 27: 217–223.
- Mannheim B. 1975. *Biochemical Information*. Biochemical W. Germany. Pp 45 - 47
- Maines MD. 1988. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms and clinical applications. *The FASEB Journal*, 2: 2557-2568.
- Maheshwari R, Kamalam PT, Balasubramanyam DV. 1987. The biogeography of thermophilic fungi. *Current Science*, 56(4): 151-154.
- Mason HS. 1955. *Comparative Biochemistry of the Phenolase*. *Complex Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry*, 16: 105-184.
- Miller GH. 1959. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3): 426 – 428.
- Montgomery DC. 2006. *Diseño y análisis de experimentos*. 2a edición. Editorial Limusa Wiley, México. pp. 1-686.
- Moore D. 1998. *Fungal Morphogenesis*. New York. United States of America: Cambridge University Press.
- Narain R, Srivastava RB, Mehrotra BS. 1983. A new thermophilic species of *Scytalidium* from India. *Zentralblatt für mikrobiologie*, 138: 569-572.
- Ögel ZB, Yüzügüllü Y, Mete S, Bakir U, Kaptan Y, Sutay D, Demir AS. 2006. Production, properties and application to biocatalysis of a novel extracellular alkaline phenol oxidase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71: 853 – 862.

- Papinutti L. 2003. Enzimas ligninolíticas en *Fomes sclerodermeus*. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires- Buenos Aires Argentina.
- Pickard MA, Vandertol H, Roman R, Vazquez-Duhalt R. 1999. High production of ligninolytic enzymes from White rot fungi in cereal bran liquid medium. *Canadian Journal of Microbiology*, 45: 627–631.
- Ribéreau-Gayon P. 1972. *Plant Phenolics*, Oliver y Boyd, Edinburgh. Pp. 254.
- Rispail N, Morris P, Webb KJ. 2005. Capítulo 7.5: Phenolic Compounds: Extraction and Analysis. Pp. 349–354. En: Márquez JA. (ed.), *Lotus japonicus Handbook*, Springer Netherlands.
- Rodriguez E, Pickard M, Vazquez-Duhalt R. 1999. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Current Microbiology*, 38: 27–32.
- Ross RC, Harris PJ. 1983. The significance of thermophilic fungi in mushroom compost preparation. *Scientia Horticulturae*, 20: 61–70.
- Rouviainen J, Bergfors T, Teer T. 1990. Three Dimensional Structure of Cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science*, 249: 380-386.
- Salar RJ, Aneja KR. 2007. Thermophilic Fungi: Taxonomy and Biogeography. *Journal of Agricultural Technology*, 3(1): 77-107.
- Sánchez JE, Mejía L, Royse DJ. 2008. Pangola grass colonized with *Scytalidium thermophilum* for production of *Agaricus bisporus*. *Bioresource Technology*, 99: 655-662.
- Satyanarayana T, Johri BN. 1984. Thermophilic fungi of paddy straw compost: their growth, nutrition and temperature relationships. *Journal of the Indian Botanical Society*, 63: 164-170.

- Satyanarayana T, Johri BN, Klein J. 1992. Biotechnological potential of thermophilic fungi. Pp.729-761. En: Arora DK, Elander RP, Mukerji KG (eds). Handbook of applied Mycology, Vol 4. Fungal Biotechnology. Marcel Dekker Inc, New York.
- Score A J, Palfreyman JW, White NA. 1997. Extracellular phenoloxidase and peroxidase enzyme production during interspecific fungal interactions. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 39: 225-233.
- Straatsma G, Gerrits JPG, Gerrits TM, Op den Camp HJM, Van Griensven LJLD. 1991. Growth kinetics of *Agaricus bisporus* mycelium on solid substrate (mushroom compost). *Journal of General Microbiology*, 58:1471–1477.
- Straatsma G, Gerrits JPG, Augustijn MPAM, Op den Camp HJ.M, Vogels GD, Van Griensven LJLD. 1989. Population dynamics of *Scytalidium thermophilum* in mushroom compost and stimulatory effects on growth rate yield of *Agaricus bisporus*. *Journal of General Microbiology*, 135: 751–759.
- Straatsma G. Samson RA. 1993. Taxonomy of *Scytalidium thermophilum*, an important thermophilic fungus in mushroom compost. *Mycological Research*, 97(3): 321-328.
- Subrahmanyam A. 1999. Ecology and Distribution. Pp.13-28. En: Johri BN, Satyanarayana T. y Olsen J. (eds.), *Thermophilic Moulds in Biotechnology*. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Sutay Kocabas D, Bakir U, Phillips SEV, McPherson MJ, Ögel ZB. 2008. Purification, characterization, and identification of a novel bifunctional catalase-phenol oxidase from *Sytalidium thermophilum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79: 407–415.

- Swain T, Bate-Smith EC. 1962. Flavonoid compounds. Pp. 755-809. En: Florkin M, Mason HS (Eds.). Comparative Biochemistry Vol. III. Academic Press, New York, NY,
- Tansey MR, Brock TD. 1972. The upper temperature limit for eukaryotic organisms. Proceedings of National Academy of Sciences, 69(9): 2426-2428.
- Terwilliger NB, Ryan MC. 2006. Functional and Phylogenetic Analyses of Phenoloxidases from Brachyuran (*Cancer magister*) and Brachiopod (*Artemina franciscana*, *Triops longicaudatus*) Crustaceans. The Biological Bulletin, 210: 38–50.
- Vasileva-Tonkova ES, Galabova DN, Balasheva MA, Sotirova AV. 1993. Purification and partial characterization of acid phosphatase from *Candida lipolytica*. Journal of General Microbiology, 139: 479–483.
- Wang Ch, Eufemi M, Turano C, Giartosio A. 1996. Influence of the carbohydrate moiety on the stability of glycoproteins. Biochemistry, 35: 7299–7307.
- Wasserman BP, Hultin H. 1981. Effect of the deglycosylation on the stability of *Aspergillus niger* catalase. Archives Biochemistry and Biophysics, 212: 385–392.
- Waterman PG, Mole S. 1994. Analysis of Phenolic Plant Metabolites. Blackwell Scientific Publications. Methods in Ecology, Oxford.
- Wiegant WM, Wery J, Buitenhuis ET, De Bont JAM. 1992. Growth-promoting effect of thermophilic fungi on the mycelium of the edible mushroom *Agaricus bisporus*. Applied and Environmental Microbiology, 58: 2654–2659.
- Wiegant WM. 1992. Growth characteristics of the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* in relation to production of mushroom compost. Applied and Environmental Microbiology, 58(4): 1301-1307.

Williams S. 1984. Official Methods of Analysis. 14th. Ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington. VA. U.S.A. Pp.152.

Yemm, EW y Willis AJ. 1954. Biochemical Journal, 57: 508-514.

Zucker WV. 1983. Tannins: does structure determine function? An ecological perspective. American Naturalist, 121: 335-365.

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF PHENOL OXIDASE PRODUCED BY *Scytalidium thermophilum*

Yasmin Sanchez-Rosario¹, Jose E. Sanchez-Vazquez¹, Rafael Vazquez-Duhalt², Rene H. Andrade-Gallegos¹

¹Hongos Tropicales, El Colegio de la Frontera Sur, Apdo. postal 36 Tapachula, Chiapas 30700, Mexico. E-mail: yhaz71@hotmail.com, esanchez@ecosur.mx, randrade@ecosur.mx.

²Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Apdo Postal 510-3 Cuernavaca, Morelos 62510, Mexico. E-mail: vazqduh@ibt.unam.mx

Corresponding Author. Present address: Carretera Antigua Aeropuerto km 2.5;

C.P. 30700; Tapachula, Chiapas, México Tel: 962 62 8 98 00 ext. 5460.

E-mail address: esanchez@ecosur.mx, .

Abstract

In this work, the production of phenol oxidase from three strains of *Scytalidium thermophilum* was studied and the enzyme from the best producing strain was characterized. The enzyme production in three different culture media: Starch (SM), Potato Dextrose Yeast (PDY), and Grass Infusion (GI) at different temperatures (42, 45 and 48°C) and different pH (6, 7 and 8) was evaluated. The highest enzymatic activity (0.115U/ml) was observed with the ECS-0602 strain in a Pangola grass infusion at pH 8 and 45°C. Subsequently the purification of the enzyme by ionic exchange chromatography was carried out and the purified enzyme was characterized. The enzyme showed a molecular weight of 87 kDa in 10% SDS-PAGE gel and showed the highest activity at pH 7 and 55°C. The maximal rate (V_{max}) was 80.72 $\mu\text{moles min}^{-1}\cdot\text{mg of protein}^{-1}$ and the catalytic affinity constant (K_M) was 302.79 mM, both determined with catechol as a substrate. The purified enzyme also showed catalase activity from pH 5.5 to 8 and at room temperature, with a maximal catalase activity of 10 640 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ of protein at pH 6. The enzyme is a hemoprotein that contains 0.7 moles of Fe per mol of protein and it is highly glycosylated.

Keywords: Thermophilic fungi, Catalase, Extracellular enzyme, Phenolic compounds, Oxidase.

Introduction

Environmental pollution originated by the accumulation of phenolic compounds from industrial activities represent a public health risk. Phenolic compounds are commonly found in many types of industrial sewage and residues such as those produced by wine distilling, olive oil extraction, bark removal from timber, coffee pulp removal, textile factories, amongst others (Field and Lettinga 1991; Borja et al. 1993; Brand et al. 2000; Lesage-Meessen et al. 2001; Minhalma and De Pinho 2001; Aggelis et al. 2002). These phenolic compounds are considered priority environmental pollutants because their high toxicity. They are compounds that frequently determine the degradation rate of particular organic matter (Kang et al. 2009).

The biological treatment of industrial sewage generally depends on the oxidizing activity of microorganisms (Mendonca et al. 2004). It is well known that phenolic compounds are naturally polymerized during humus

formation and can form other biological products by the activity of phenol oxidases (Brown 1967). These enzymes also play a key role in carbon decomposition processes (Freeman et al. 2001). In addition, they constitute a biocatalyst group able to catalyze the oxidation of aromatic compounds into quinones. Phenol oxidases are classified in two main groups: the first group including polyphenol oxidases, tyrosinases (monophenol monooxygenase; EC 1.10.3.1) and catechol oxidases (o-difenol oxidase; EC 1.10.3.1), and the second group including multicopper oxidases, also known as laccases (Ögel et al. 2006). The phenolic compounds are also oxidized by H₂O₂ dependent peroxidases (EC 1.11.1.7) (Griffith 1994).

Filamentous fungi able to grow in wood, where phenolic structures are present, could be an important source of phenol oxidases (Mendonca et al. 2004). Among these fungi there is *Scytalidium thermophilum*, an innocuous fungus that is important in mushroom cultivation and that has an optimum growth temperature of 45°C (Straatsma et al. 1991, Wiegant 1992). Recently it has been reported *S. thermophilum* as a phenol oxidase producer (Ögel et al. 2006; Sutay et al. 2008), which is of particular interest in the industrial and environmental fields because the potential applications in the degradation of recalcitrant compounds. Unlike mesophilic fungi, these thermophilic fungi are capable of producing functional thermostable enzymes at high temperatures (Machuca and Durán 1993). The enzymes of thermophilic fungi are generally glycosylated (Mason 1957) and active at neutral and alkaline pH (Ögel et al. 2006).

Based on the aforementioned, the aim of this study is to determine the production capacity of phenol oxidase of three strains of *S. thermophilum* and to characterize the enzyme from the best producer strain.

Materials and Methods

Strains, maintenance and culture

Scytalidium thermophilum ECS-0601, ECS-0602 and ECS-0603 were obtained from the Mycological Collection at El Colegio de la Frontera Sur. The strains were cultivated in PD agar (potato extract, 20%; dextrose, 1% and agar, 2%) at 45°C until reaching sporulation and conserved at room temperature. The growth media were: Starch medium (SM), composed of yeast extract (0.4%), dipotassic phosphate (0.1%), magnesium sulphate (0.05%) and soluble starch (1.5%); Potato-Dextrose-Yeast medium (PDY) consisting of potato extract (20%), dextrose (1%) and Bioxón yeast (0.3%), and Grass Infusion medium (GI), with 20g of Pangola grass *Digitaria decumbens*

prepared in 1L of water by boiling for five minutes to which dextrose (1%) and yeast (0.3%) were added. All the media were autoclaved at 121°C for 20 minutes.

Fungal growth

A spores suspension of each strain (strains ECS-0601, ECS-0602 and ECS-0603) in distilled and sterilized water obtained from Petri plate cultures at 45°C for four days. A series of dilutions up to 10^{-3} were made. Spores were counted using a microscope with the aid of a Neubauer camera in order to inoculate 2500 spores in 125 ml conical flasks with 50 ml of growth medium (PDY, SM or GI) (final concentration of 50 spores ml^{-1}). The inoculated conical flasks were incubated for 5 days at 45°C and 135 rpm in a Lab-line Model Orbite 3526 orbital agitator, then three flasks (replicates) were withdraw every 24 hours to determine biomass, sugars, pH and enzymatic activity. Biomass was estimated gravimetrically (Williams 1984) after filtration on a Whatmann # 6 filter paper. Then, the filtrate was centrifuged at 5000 rpm for 10 min, and the supernatant used for determination of pH, sugar content with DNS (Miller 1959) and phenol oxidase activity as described below.

Enzymatic activity

Phenol oxidase activity was measured spectrophotometrically using catechol as a substrate ($\epsilon_{420 \text{ nm}} = 3,450 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The assay medium consisted of 250 μl catechol solution (0.1 M in 0.1M phosphate buffer pH 7) and 500 μl of phosphate buffer and the reaction was started by adding 250 μl of extract (Ögel et al. 2006). One unit of enzyme was defined as the quantity of enzyme required for the formation of 1 μmol of product per minute.

Catalase activity was measured spectrophotometrically at 25°C by absorbance decrease at 240 nm. The reaction mixture (1 ml) contained 10.5 mM H_2O_2 , 50 mM potassium phosphate buffer at different pH values (range of 5 to 8) and enzymatic extract (Mannheim 1975). Extinction coefficient $\epsilon_{240 \text{ nm}} = 0.040 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. One unit of enzyme was defined as the quantity that catalyzes the decomposition of 1 μmol of H_2O_2 per minute.

Effect of pH and temperature on phenol oxidase production

The strain and medium combination which displayed the highest phenol oxidase activity was used to determine the effect of medium pH on the enzyme production at 42°C and 135 rpm. The initial pH was adjusted before inoculation at values of 6, 7 or 8. The effect of culture temperature was determined incubating the fungi at different temperatures.

Purification of phenol oxidase

S. thermophilum was grown in a 10 L fermentor (New Brunswick Scientific Co; Inc, Model MF-114) in a GI medium at pH 8 (previously sterilized at 121°C for 20 min.) for two days at 135 rpm and 45°C. The medium was filtered and centrifuged 21000 rpm at room temperature in a centrifuge (Sharples, model CL-T.1) and then concentrated in a 20 L ultrafiltration device (Amicon, model DC) with a 50000 Da cutoff cartridge. The crude enzymatic extract was still concentrated in a 350 ml ultrafiltration device with a 50000 Da cutoff membrane until reaching a small volume. The concentrated crude extract was centrifuged 14000 rpm at 4°C for 12 min and then chromatographed on a DEAE Sephadex ionic exchange column (20 x 5 cm). The proteins were eluted with a NaCl gradient from 100 to 500 mM in a 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8. The fractions that showed phenol oxidase activity were collected and dialyzed on ultrafiltration cell with a 30000 Da membrane and washed three times with a 10 mM phosphate buffer at pH 8. The purity of the phenol oxidase preparation was tested by electrophoresis in 10% SDS-PAGE and molecular weight was calculated according to its electrophoretic mobility with a known molecular weight markers. Protein concentration was determined by the Bradford (1976) method.

Effect of pH and temperature on phenol oxidase activity

The effect of pH and temperature on phenol oxidase activity was determined for catechol oxidation using the Ögel et al. (2006) method in 1ml assay with a concentration of 0.16 M catechol. The reactions were monitored spectrophotometrically in a spectrophotometer (Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS) at 420nm and an extinction coefficient of 3450 M⁻¹cm⁻¹ was used. The pH activity profile was determined in reaction mixtures ranging from pH 3 to pH 11 at 60°C. For the different pH values, different buffer salts at a concentration of 0.1 M were used (Guiraud and Galzy 1980) in which the respective catechol solutions were prepared.

Regarding temperature profiles, enzymatic activity was determined at pH 7 and at different temperatures between 30 and 80°C.

Determination of kinetic parameters (k_{cat} and K_M).

In order to establish the maximum velocity (k_{cat}) and the affinity constant (K_M) for catechol, the initial activity was determined, based on the oxidation of the substrate at different concentrations at 55°C and pH 7. The

catalytic constants were obtained from the experimental data, based on the Michaelis-Menten model using the Biosoft EnzFitter program (Cambridge, UK).

Enzyme Glycosylation

Sugar content of the protein was determined by anthrone method (Yemm and Willis 1954). The dyeing technique for glycoproteins in a gel of electrophoresis (Gersten 1996) was also performed. A Coomassie blue dyed gel as a reference of the molecular weight was used.

Heme prosthetic group detection in the phenol oxidase from *Scytalidium thermophilum*

A UV-Vis spectrum of the purified enzyme was performed in order to observe the Soret absorption band. In addition, the heme group was removed using 500 μ l of enzyme extract acidified by adding 2 drops of concentrated chlorhydric acid and 800 μ l of 2-butanone,. The mixture was vigorously shaken and then centrifuged at 14000 rpm for 5 min. The spectrum of the organic phase in the 340 to 800 nm range was observed using 2-butanone as blank.

Metal analysis

The purified enzyme (1ml) was digested with 1 ml of ultrapure perchloric acid. A control sample consisted of 1 ml of 10 mM phosphate buffer. All glass material were previously washed with 10% nitric acid and rinsed with double distilled and demineralized water. The samples were analyzed by atomic absorption spectroscopy in the Analytical Unit (USAI) of the Chemistry School at the National University of Mexico.

Statistical analysis

In the enzymatic activity assays, a three factor factorial design (Montgomery 2006) was applied for growth kinetics (culture medium, strain and time) and two factor for the effect of temperature (temperature and time) and pH effect (pH and time). For biomass production and glucose consumption a completely randomized arrangement with three repetitions was used. A covariance analysis was carried out (Montgomery 2006) using Boxcox (Kemp 1996) and Ranges (Conover and Ronald 1981) transformations. A Tukey (P=0.05) test was used for mean separation except when an interaction with time was observed whereby a Bonferroni (P= 0.016) test was applied.

Results

Fungal growth

Three different strains of *Scytalidium thermophilum*, ECS-0601, ECS-0602 and ECS-0603, were grown in three different liquid culture media consisting of starch (SM), potato (PDY) and grass (GI), (Figs. 1-3). The growth of the ECS-0601 strain in the three culture media, showed growth rates of $6.06 \text{ gL}^{-1}\text{D}^{-1}$, $4.44 \text{ gL}^{-1}\text{D}^{-1}$ and $3.64 \text{ gL}^{-1}\text{D}^{-1}$ (Table 1) and glucose consumption of $3.01 \text{ gL}^{-1}\text{D}^{-1}$, $4.48 \text{ gL}^{-1}\text{D}^{-1}$ and $3.71 \text{ gL}^{-1}\text{D}^{-1}$ (Table 1), respectively. Statistical analysis of fungal growth did not show any significant differences when comparing the SM medium with both PDY and GI media ($P=0.018$ and $P= 0.168$, respectively) or PDY and GI media ($P= 0.475$). On the contrary, for the glucose consumption statistical analysis demonstrated that there were significant differences when the SM medium was compared with PDY and GI media ($P= 0.008$ and $P= 0.000$, respectively), however, there was no significant difference between the PDY and SM media ($P= 0.685$). In the three studied media pH tended to increase until reach a value close to 9 after five-day growth. On the other hand, enzymatic activity increased from approximately 3 mU/ml in the first day to a maximal production of 20 mU/ml.

The ECS-0602 strain (Fig. 2) showed growth rates of $4.73 \text{ gL}^{-1}\text{D}^{-1}$, $3.79 \text{ gL}^{-1}\text{D}^{-1}$ and $3.37 \text{ gL}^{-1}\text{D}^{-1}$ for SM, PDY and SM media, respectively. The glucose consumption showed values of $1.56 \text{ gL}^{-1}\text{D}^{-1}$, $5.68 \text{ gL}^{-1}\text{D}^{-1}$ and $5.32 \text{ gL}^{-1}\text{D}^{-1}$, for SM, PDY and SM media, respectively. From statistical analysis, significant differences regarding the GI medium when compared with SM and PDY media ($P=0.000$ for both) were observed, however there was no significant difference ($P= 0.866$) between SM and PDY media. For glucose consumption, statistical analysis revealed that there were significant differences when comparing the SM medium with PDY and GI media ($P=0.001$ and $P= 0.007$) although there was no difference between the PDY and GI media ($P= 0.124$). In the three studied media pH also tended to increase until reaching a value close to 9 after five days growth. Enzymatic activity increased from approximately 2 mU/ml, in the three studied media, to a maximum production of more than 30 mU/ml for GI and more than 20mU/ml for the other media.

Finally, the growth rates of the ECS-0603 strain (Fig. 3) were $2.6 \text{ gL}^{-1}\text{D}^{-1}$, $2.1 \text{ gL}^{-1}\text{D}^{-1}$ and $1.55 \text{ gL}^{-1}\text{D}^{-1}$ and glucose consumption was $3.04 \text{ gL}^{-1}\text{D}^{-1}$, $3.23 \text{ gL}^{-1}\text{D}^{-1}$ and $2.91 \text{ gL}^{-1}\text{D}^{-1}$, in the SM, PDY and GI media, respectively (Table 1). The statistical analysis of these tendencies showed that there was a significant difference between the SM and SM media ($P= 0.000$). There was no significant difference when the PDY medium was

compared with both SM and GI media ($P=0.022$ and $P=0.0320$, respectively). Regarding glucose consumption, statistical analysis demonstrated that there were no significant differences between media, namely SM compared with PDY ($P=0.738$) and GI media ($P= 0.366$) and PDY compared with SM media ($P= 0.727$). The pH was stable, between 8 and 8.6 in the SM medium, 7.2 to 7.6 in the PDY medium and a slight decrease from 7.3 to 6.5 in the GI medium after five days of growth. Enzymatic activity ranged from approximately 1 mU/ml to above 12 mU/ml during maximal production.

The ECS-0601 strain showed higher growth rate than the other *Scytalidium* strains. Significant differences were observed between strains 0601 and 0602 ($P= 0.000$) and between strains 0601 and 0603 ($P=0.000$) for SM medium. The PDY medium (PDY) presented significant differences in growth rates between strains 0601 and 0602 ($P=0.005$), 0601 and 0603 ($P=0.000$) and 0602 and 0603 ($P=0.000$). Finally, in the grass infusion (GI) there were significant differences in growth rates between strains 0601 and 0602 ($P=0.005$), 0601 and 0603 ($P=0.000$) and 0602 and 0603 ($P=0.003$).

Regarding glucose consumption for the three studied strains (Table 1) in the SM medium, significant differences were displayed between strains 0602 and 0601 and strains 0602 and 0603 ($P= 0.004$ y $P=0.000$, respectively). There were no significant differences between strains 0601 and 0603 ($P= 0.962$). In the PDY medium (PDY) statistical analysis showed significant differences when comparing strain 0603 with strains 0601 and 0602 ($P= 0.000$ for both comparisons) and strain 0601 with strain 0602 ($P=0.004$). In the grass infusion (GI) there were significant differences when strain 0603 was compared with strains 0601 and 0602 ($P= 0.000$ for both comparisons) and when strain 0601 was compared with strain 0602 ($P= 0.0005$).

The final aim of these experiments was to obtain a culture medium favorable for the phenol oxidase production. The highest activity in SM, PDY and GI was produced by the ECS-0602 strain (Fig. 4). It is worth mentioning that there were significant differences between both strains and media ($P=0.000$) with the exception of the PDY and SM medium ($P= 0.2880$). Strain 0602 showed the highest enzymatic activity in the GI medium (33 mU/ml) on 4th day followed by the SM medium (22 mU/ml) and the PDY medium (21 mU/ml).

Effect of pH and temperature on phenol oxidase production

Strain ECS-0602 and GI medium were selected, because its highest enzymatic activity, in order to evaluate the effect of initial pH (6, 7 and 8) and culture temperature (42°C 45°C and 48°C) on growth and phenol oxidase activity. At pH 6 there was no growth, while the growth rates were 4.19 gL⁻¹D⁻¹ and 4.95 gL⁻¹D⁻¹ and glucose consumption 3.64 gL⁻¹D⁻¹ and 4.32 gL⁻¹D⁻¹ for pH 7 and 8, respectively. Statistical analysis did not reveal any significant differences with respect to growth (P= 0.26) and glucose consumption (P= 0.6862). However, statistical analysis of phenol oxidase activity demonstrated that there are significant differences (P= 0.000), with a higher activity at pH 8 (55 mU/ml).

The growth rates of strain 0602 at different temperatures were 5.42 gL⁻¹D⁻¹, 5.39 gL⁻¹D⁻¹ and 5.26 gL⁻¹D⁻¹ and glucose consumptions were 4.48 gL⁻¹D⁻¹, 5.48 gL⁻¹D⁻¹ and 5.17 gL⁻¹D⁻¹, at 42°C, 45°C and 48°C, respectively. The growth rate of this strain at 48°C showed no significant differences when compared with growth rates at 42°C and 45°C (P=0.076 and P= 0.083, respectively), however there were significant differences in growth rates between 42°C and 45°C (P= 0.005). Concerning glucose consumption, the differences were the same as those found with growth rates: there were no significant differences in glucose consumption at a temperature of 48°C when compared with temperatures of 42°C and 45°C (P= 0.102 and P= 0.394, respectively), but there were differences between 42°C and 45°C (P= 0.001). Enzymatic activity showed significant differences when comparing treatments at 48°C with those at 42°C and 45°C (P=0.0087 and P=0.000, respectively). Treatments at 42°C when compared with those at 45°C (P= 0.000) also displayed significant differences. The highest activity was found at 45°C (115 mU/ml) after only two-day culture.

Purification and characterization of phenol oxidase

A 10 liter culture was carried out in order to obtain large amounts of enzyme. The enzyme was purified as described in the methods section obtaining 56.17% initial total U of pure enzyme (153.37 total U l). The enzyme purity was determined electrophoretically on a acrylamide gel (Fig. 5), and a protein with high degree of purity was obtained. In accordance with the noticeable band and molecular weight markers, the molecular weight of the protein is 87 KDa.

The purified enzyme did not show any activity at pH 4, and at pH 11 it still had an activity of 10.6 U mg⁻¹ of protein (Fig. 6a). The optimum pH was 7, with a specific activity of 22.9 U mg⁻¹ protein. Temperature affected

enzymatic activity to a lesser degree, observing activity between 30°C and 80°C, with an optimal catalytic reaction at 55°C with a specific activity of 22.89 U mg⁻¹ of protein (Fig. 6b).

The kinetic constants of the purified phenol oxidase were determined. The value of catalytic constant (k_{cat}) obtained was 80.72 $\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ and the Michaleis-Menten constant (K_M) was 302.8 mM. The enzyme displayed also catalase activity. This catalase activity varied at distinct pH values (Fig. 7). The highest catalase activity was obtained at pH 6 with a value of 10 640 U $\cdot\text{mg}^{-1}$ of protein.

The phenol oxidase produced by *Scytalidium thermophilum* is a glycoprotein. The glycosylation was corroborated by a gel dyed for glycoproteins. In addition, the determination of the sugar content by anthrone showed a proportion of 10.89 mg sugars per mg of protein. Finally, the UV-VIS spectrum of the purified phenol oxidase showed a Soret absorption band indicating the presence of a heme prosthetic group. The heme group was extracted with 2-butanone and showed maximal absorption bands in the enzyme spectrum at 380 nm, 490 nm and 600 nm.(Fig. 8). The iron content of the protein, determined by atomic adsorption spectroscopy demonstrated that the enzyme contains 0.7 moles of Fe per mol of protein.

Discussion

In this study the production conditions (growth medium, temperature and pH) of phenol oxidase from three strains of *S. thermophilum* were selected. The purification and characterization of this enzyme was carried out in the most prominent strain. Phenol oxidase activity was detected during growth in all the three culture media assayed at 45°C. Strain ESC-0602 showed the highest enzyme production in the GI infusion medium. The maximal production of phenol oxidase reached 115 mU/ml, on the second day of incubation. This enzymatic activity is greater than these obtained by Ögel et al. (2006) which reported only 75 mU/ml, although it has to be considered that these authors did not optimize the production conditions for the studied phenol oxidase. In spite of the differences in phenol oxidase production, biomass production of *S. thermophilum*, between 5 and 6 g/L, was very similar in both studies.

At the highest enzyme production, the pH in the growth medium of strains ECS-0601 and ECS-0602 was approximately between 8 and 9. This pH value was similar to these observed for the phenol oxidase from *Thermoascus aurantiacus* in a liquid medium consisting of sawdust from *Eucalyptus grandis* (Machuca and

Duran 1993). However, this data contrasts with those observed for the ECS-0603 strain in which the highest enzyme production occurred at pH between 6.5 and 7.5 showing a low extracellular activity.

Strain ECS-0602 was not able to grow at pH 6. This result partially differs from results reported by Sánchez et al. (2008) for a solid medium culture in Petri dishes, whereby the *S. thermophilum* ECS-0601 strain showed the highest growth values at pH 7-8 and a growth rate of 0.3 mm/h at pH 6. However, this difference could be due to the particular characteristics of the culture media and to the strain.

The highest enzyme production was observed in the GI medium, probably due to the presence of lignin oligomers in the grass infusion, even if this medium did not show the highest glucose consumption or growth. This observation is according to Ögel et al. (2006), who indicated that the presence of phenolic compounds induce the enzyme expression. Because the complex composition of the GI medium, it seems probable the presence of other enzyme inducers in the mixture.

It was observed that each strain presented certain particularities in relation to the amount and production kinetics of the enzyme. This concurs with Lyons and Sharma (1998) that reported differences in behavior of the different *S. thermophilum* strains studied. Effectively, while the ECS-0603 strain did not show any variations in enzyme production in the three culture mediums used, the ECS-0602 strain was significantly influenced by the culture medium employed. The ECS-0603 strain displayed the lowest growth rate with its maximal production of phenol oxidase after 5 days of culture, differing from the other two strains which experienced maximal production after 4 days.

The purified phenol oxidase showed a molecular weight of 87 KDa, that is very similar to the phenol oxidases studied by Ögel et al. (2006) and Sutay et al. (2008), in which molecular weights of 83 and 80 KDa were found, respectively. However, it is important to point out that the molecular weight determined in our study was obtained by a denaturalizing gel, while Sutay et al. (2008) determined the molecular weight by non denaturalizing gel obtaining a molecular weight of 320 KDa from a catalase-phenol oxidase. This suggests the possibility that the studied enzyme could be tetrameric or be a protein with a high degree of glycosylation. Our results show a high degree of glycosylation and no equivalent could be found in literature. Among the enzymes that contain the highest quantity of carbohydrates are the extracellular and intracellular alkaline phosphatases from *S.*

thermophilum, which contain around 54 and 63% of sugars, respectively (Guimaraes et al. 2001). A high carbohydrate content is also characteristic of fosfatases (Vasileva-Tonkova et al. 1993). The glucoamylase from *Aspergillus niveus* contains 11% carbohydrates and glucoamylase from diverse filamentous fungi typically contains between 10 and 20% carbohydrates (Da Silva et al. 2009).

On the other hand, the UV-vis spectrum confirms the presence of a heme group as active site, categorizing this enzyme as a typical hemoprotein that contains 0.7 moles of Fe/mol of protein. The spectrum showed in this work was from the extracted heme group and should not be compared with those obtained from the holoenzyme, as in the case of catalase-phenol oxidase enzyme of *S. thermophilum* studied by Sutay et al. (2008).

The purified enzyme showed an optimal pH and temperature of 7 and 55°C, respectively. These optimal values are slightly different from those reported by Ögel et al. (2006) for a *S. thermophilum* phenol oxidase, also using catechol as a substrate (optimal pH 7.5 and 65°C). These authors mentioned that enzymatic activity at high pH and temperature are the exception in phenol oxidases originated from thermophilic fungi. The optimal pH for phenol oxidase from *Chaetomium thermophile* is pH 6.0 (Ishigami et al. 1988), and from *Thermoascus aurantiacu*, using *o*-dianisidine oxidation, the optimal pH is as low as 2.8 (Machuca et al. 1998). Bollag y Leonowicz (1984) found that the phenol oxidase of *Rhizoctonia praticola* had an optimal pH close to neutrality (7.2), while other extracellular phenol oxidases displayed a significantly low optimum pH (3.0 – 5.7). Another example amongst the few exceptions is *Acremonium murorum*, which shows optimal activity at pH 9 during syringaldazine oxidation (Gouka et al. 2001).

Purified phenol oxidase from *Scytalidium thermophilum* ECS-0602 strain showed 82% of its maximal activity at 70°C and 39.6% at 80°C. As mentioned by Wasserman y Hultin (1981) this activity at high temperatures could be attributed to the fact that the enzyme is highly glycosylated. These authors demonstrated that the high thermostability of catalase from *Aspergillus niger* was due to its sugar moiety. Wang et al. (1996) also indicated the importance of the glycosylation degree on the thermostability of enzyme. These results indicate that the general function of protein glycosylation is to protect the folding of the polypeptide chain and the stability of the protein conformation. Nevertheless, the protection mechanism of the glycosylated moiety is not fully elucidated. Jafari-Aghdam et al. (2005) as well as confirming the aforementioned, suggests that the stabilization property of

a glycoprotein cannot be generalized and that each observation should be analyzed in terms of specific structural property of the function exhibited by the enzyme.

The purified enzyme showed also catalase activity within the range of pH 5.5 to 8. At pH 8, it showed 70% of its phenol oxidase activity and 69.6% of its catalase activity. The catalase activity maintains a high activity in a wider pH range (10640 U•mg⁻¹ of protein at pH 6) unlike phenol oxidase activity which has a clear optimal activity at pH 7 (22.9 U•mg⁻¹ of protein). We have observed the catalase activity at 25°C, while phenol oxidase activity was tested at various temperatures showing the highest activity at 55°C. Sutay et al. (2008) mentioned that catalase activity was higher at room temperature, while phenol oxidase activity was higher at high temperatures. From these results, could be convenient to consider the purified enzyme as bifunctional enzyme and call it catalase-phenol oxidase.

Finally, the phenol oxidase from *Scytalidium thermophilum* seems to be interesting for industrial applications. This enzyme is able to perform catalysis at high temperatures and pH's. These properties, doubtless, are important for operational stability in a large scale process.

Acknowledgments

The authors wish to thank to Fondos Mixtos Conacyt-Gobierno del estado de Chiapas, for the funding of this research through the project CHIS-2007-C07-79126. We also thank Lilia Moreno and Rosa Román for their technical support and Javier Valle for his help in the statistical analysis of the data. The first author also thanks Conacyt for the scholarship allowing her to obtain her master degree.

References

Aggelis G, Ehaliotis C, Nerud F, Stoychev I, Lyberatos G, Zervakis GI (2002) Evaluation of white-rot fungi for detoxification and decolorization of effluents from green olive debittering process. *Appl Microbiol Biotechnol* 59(2-3): 353-360.

Bollag JM, Leonowicz A (1984) Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Appl Environ Microbiol* 48: 849–854.

Borja R, Martin A, Maestro R, Luque M, Duran MM (1993) Enhancement of the anaerobic digestion of wine distillery wastewater by the removal of phenolic inhibitors. *Biores Technol* 45(2): 99-104.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

Brand D, Pandey A, Roussos S, Soccol CR (2000) Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. *Enzyme Microb Technol*, 27(1-2): 127-133.

Brown BR (1967) Biochemical aspects of oxidative coupling of phenols, In: Taylor WI, Battersby AR (ed.) *Oxidative coupling of phenols*. M. Dekker, Inc., New York. pp 167-201.

Conover WJ, Ronald LI (1981) Rank Transformations as a bridge between parametric and nonparametric statistics. *Amer Statist* 35(3): 124 – 129.

Da Silva TM, Maller A, De Lima AR, Michelin M, Ward RJ, Hirata IY, Jorge JA, Terenzi HF, De Polizeli MLTM (2009) Properties of a purified thermostable glucoamylase from *Aspergillus niveus*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36: 1439 – 1446.

Field JA, Lettinga G (1991) Treatment and detoxification of aqueous spruce bark extracts by *Aspergillus niger*. *Water Sci Technol* 24(3-4): 127-137.

Freeman C, Ostle N, Kang H (2001) An enzymatic 'latch' on a global carbon store. *Nature*, 409: 149.

Gersten DM (1996). *Gel Electrophoresis proteins: Essential Techniques Series*. 1a edición. Ed. Wiley, USA, pp. 113–114.

Gouka RJ, van der Heiden M, Swarthoff T, Verrips CT (2001) Cloning of a phenol oxidase gene from *Acremonium murorum* and its expression in *Aspergillus awamori*. *Appl Environ Microbiol* 67 (6): 2610 – 2616.

Griffith GW (1994) Phenol oxidases. In Martinelli SD y Kinghorn JR (eds) *Aspergillus nidulans: 50 years on*. Prog Ind Microbiol 29, Elsevier, Amsterdam, pp. 76 –788.

Guimaraes LHS, Terenzi HF, Jorge JA, Polizeli MLTM (2001) Thermostable conidial and mycelial alkaline phosphatases from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. J Ind Microbiol Biotechnol 27: 265 – 270.

Guiraud JP, Galzy P (1980) L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Les Editions de L'usine. Paris. pp. 230.

Ishigami T, Hirose Y, Yamada Y (1988) Characterization of polyphenol oxidase from *Chaetomium thermophile*, a thermophilic fungus. J. Gen. Appl. Microbiol 34: 401–407.

Jafari-Aghdam J, Khajeh K, Ranjbar B, Nemat-Gorgani M (2005) Deglycosylation of glucoamylase from *Aspergillus niger*: effects on the structure, activity and stability. Biochim et Biophys Acta, 1750: 61–68.

Kang H, Lee SH, Lee SM, Jung S (2009) Positive relationships between phenol oxidase activity and extractable phenolics in estuarine soils. Chem Ecol 25(2): 99 – 106.

Kemp GCR (1996). Scale Equivariance and the Box-cox Transformation. Economics Letters 51: 1–6.

Lesage-Meessen I, Navarro D, Maunier S, Sigoillot JC, Lorquin J, Delattre M, Simon JL, Asther M, Labat M (2001) Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. Food Chem 75(4): 501 – 507.

Lyons GA, Sharma HSS (1998) Differentiation of *Scytalidium thermophilum* isolates by thermogravimetric analyses of their biomass. Mycol Res 102 (7): 843–849.

Machuca A, Aoyama H, Durán N (1998) Production and characterization of thermostable phenoloxidase of the ascomycete *Thermoascus aurantiacus*. Biotechnol. Appl. Biochem. 27: 217 – 223.

Machuca A, Durán N (1993) Phenol oxidases production and wood degradation by a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*, Appl Biochem Biotechnol 43: 37–44.

Mannheim B. (1975) Biochemical Information. Biochemical w. Germany. pp 45-47

Mason HS (1957) Mechanism of oxygen metabolism. Adv Enzymol 19: 79-233.

Mendonca E, Martins A, Anselmo AM (2004) Biodegradation of natural phenolic compounds as single and mixed substrates by *Fusarium flocciferum*. Electron J Biotechnol 7(1): 30 – 37.

Miller GH. (1959) Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem 31(3): 426–428.

Minhalma M, De Pinho MN (2001) Tannic-membrane interactions on ultrafiltration of cork processing wastewaters. Sep Purif Tehnol 22-23 (1): 479-488.

Montgomery DC (2006) Diseño y análisis de experimentos. 2da ed. México: Limusa Wiley pp. 1-686.

Ögel ZB, Yüzügüllü Y, Mete S, Bakir U, Kaptan Y, Sutay D, Demir AS (2006) Production, Properties and application to biocatalysis of a novel extracellular alkaline phenol oxidase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*, Appl. Microbio. Biotechnol, 71: 853–862.

Sánchez JE, Mejía L, Royse DJ (2008) Pangola grass colonized with *Scytalidium thermophilum* for production of *Agaricus bisporus*. Bioresour Technol 99: 655-662.

Straatsma G, Gerrits JPG, Gerrits TM, Op den Camp HJM, Van Griensven LJLD (1991) Growth kinetics of *Agaricus bisporus* mycelium on solid substrate (mushroom compost). J Gen Microbiol 58:1471–1477.

Sutay D, Bakir U, Phillips VSE, McPherson MJ, Ögel ZB (2008) Purification, characterization, and identification of a novel bifunctional catalase-phenol oxidase from *Syrialidium thermophilum*, Appl Microbiol Biotechnol 79: 407–415.

Vasileva-Tonkova ES, Galabova DN, Balasheva MA, Sotirova AV (1993) Purification and partial characterization of acid phosphatase from *Candida lipolytica*. J Gen Microbiol 139: 479–483.

Wang Ch, Eufemi M, Turano C, Giartosio A (1996) Influence of the carbohydrate moiety on the stability of glycoproteins. Biochemistry 35: 7299–7307.

Wasserman BP, Hultin H (1981) Effect of the deglycosylation on the stability of *Aspergillus niger* catalase. Arch. Biochem Biophys 212: 385–392.

Wiegant WM, Wery J, Buitenhuis ET, De Bont JAM (1992) Growth-promoting effect of thermophilic fungi on the mycelium of the edible mushroom *Agaricus bisporus*. Appl Environ Microbiol 58: 2654–2659.

Williams S (1984) Official Methods of Analysis. 14th. Ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington. VA. U.S.A. pp.152.

Yemm EW, Willis AJ (1954) Biochemistry. J. 57, 508.

Fig. 1 Mycelial growth of *S. thermophilum* ECS-0601 on three different liquid media. a) SM (starch), b) PDY (potato) and c) GI (grass). At 45°C and 135 rpm. Variables:

—▲—, biomass
—○—, glucose
—●—, enzymatic activity
—*—, pH

Fig. 2 Mycelial growth of *S. thermophilum* ECS-0602 on three different liquid media. a) SM (starch), b) PDY (potato) and c) GI (grass). At 45°C and 135 rpm. Variables:

—▲—, biomass
—○—, glucose
—●—, enzymatic activity
—*—, pH

Fig. 3 Mycelial growth of *S. thermophilum* ECS-0603 on three different liquid media. a) SM (starch), b) PDY (potato) and c) GI (grass). At 45°C and 135 rpm. Variables:

—▲—, biomass
—○—, glucose
—●—, enzymatic activity
—*—, pH

Fig. 4 Interaction effect of strain, medium and time on production of phenol oxidase of *S. thermophilum* during growth at 45°C

Fig. 5 phenol oxidase electrophoretic gel from *S. thermophilum* loaded at a concentration of 6.869 U/mg. Lane 1 protein molecular weight marker; lane 2, 39.75 µg protein, lane 3, 13.25 µg protein of purified phenol oxidase

Fig. 6 Effect of pH and temperature on phenol oxidase activity (1.59 µg protein ml⁻¹). a) pH (3 to 11) at 60°C. b) temperature (30 to 80°C) at pH 7

Fig. 7 Effect of pH on catalase activity at 25°C

Fig. 8 UV-Vis spectra of the heme group extracted with butanone from phenol oxidase of *S. thermophilum* ECS.0602

Table 1 Growth rate, glucose consumption of three strains from *S. thermophilum* on three different culture media at 45°C and 135 rpm. Mean of three repetitions

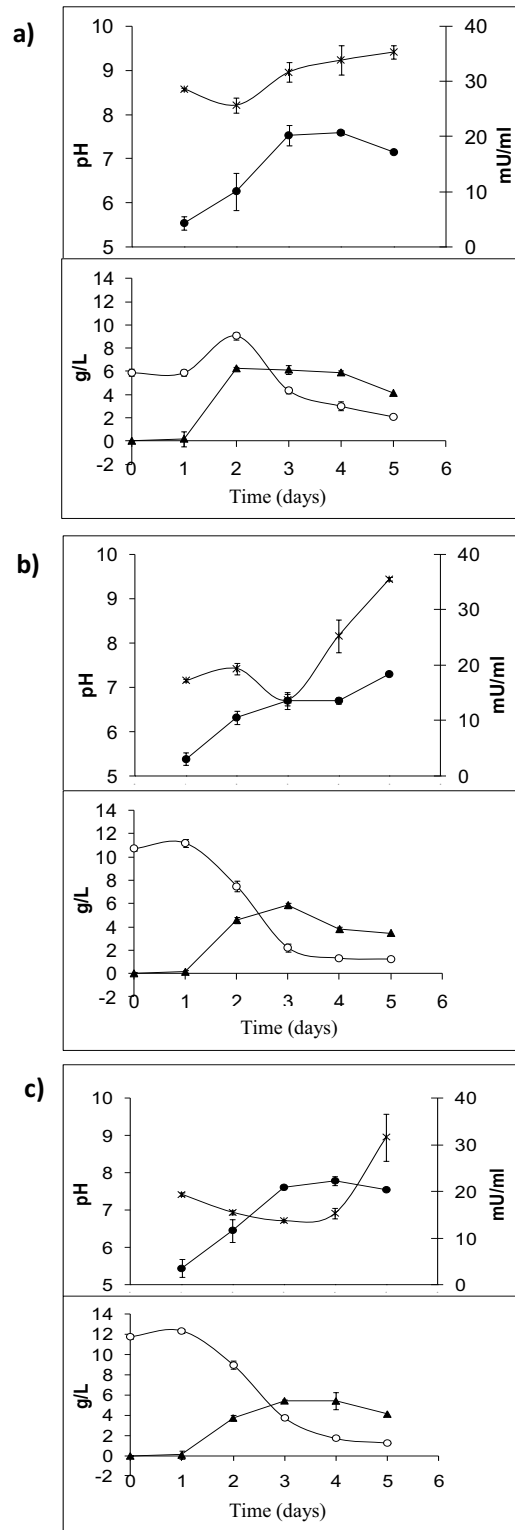


Fig. 1

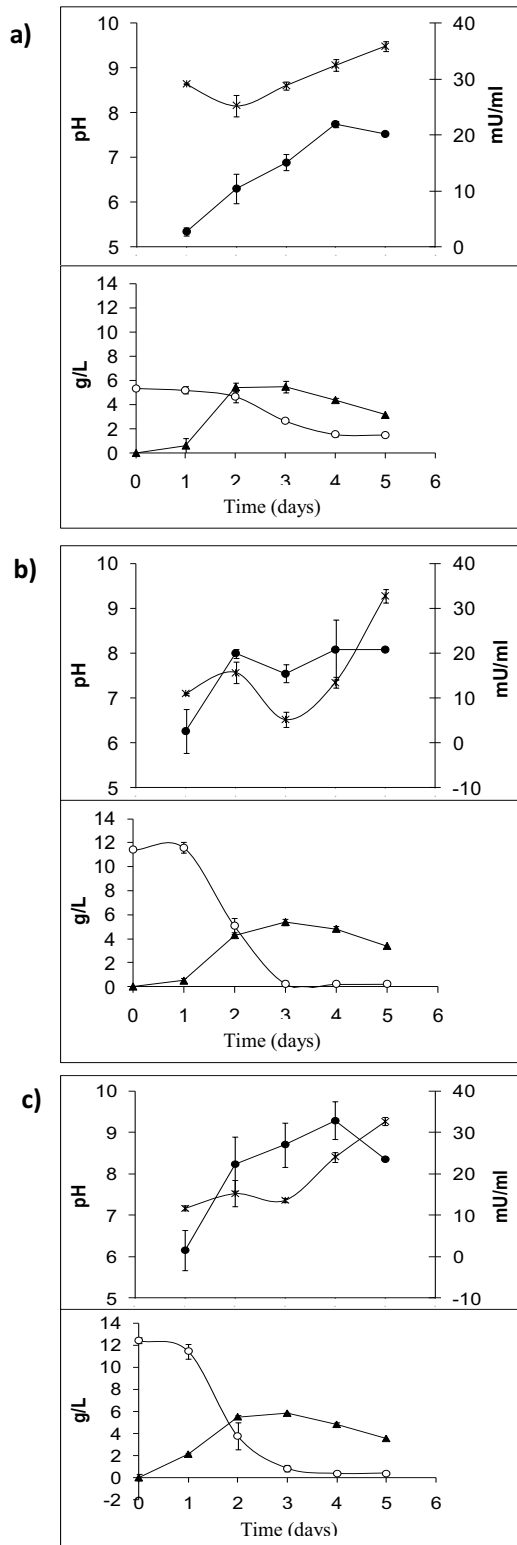


Fig. 2

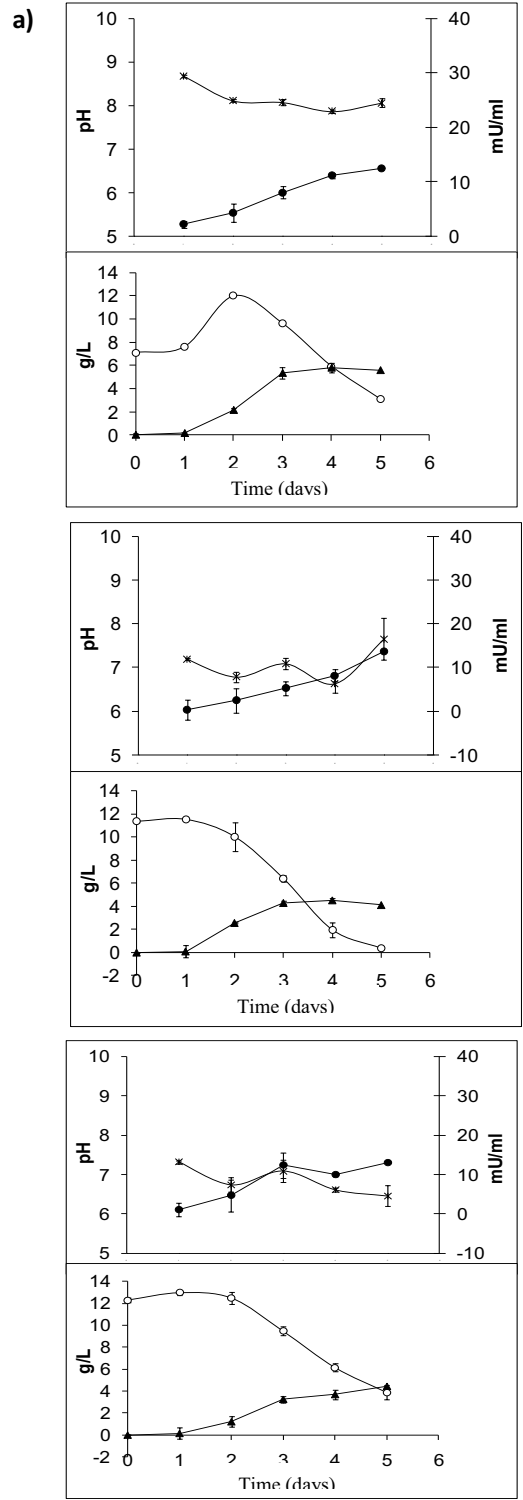


Fig. 3

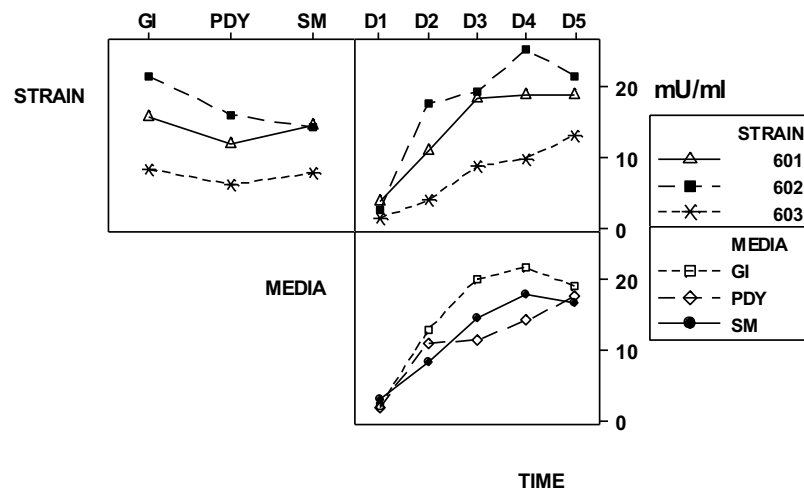


Fig. 4

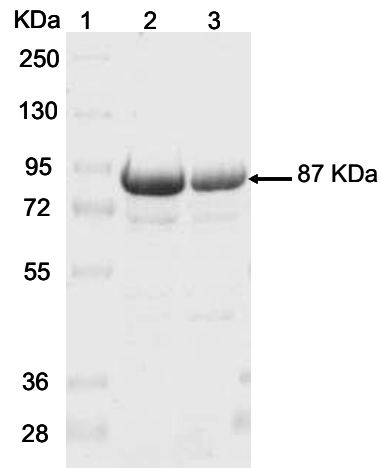
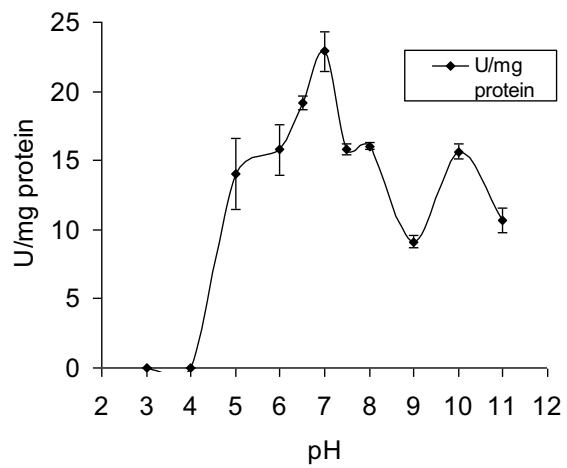


Fig. 5

a)



b)

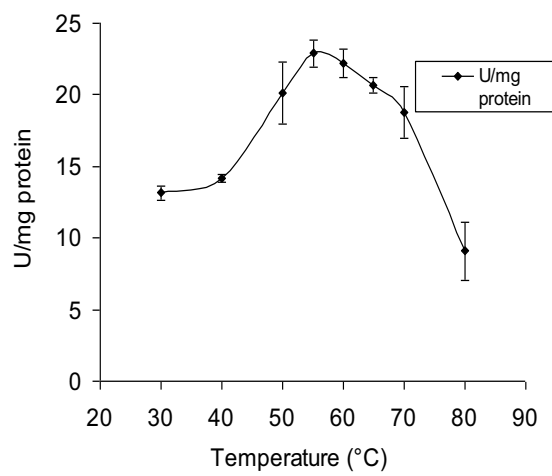


Fig. 6

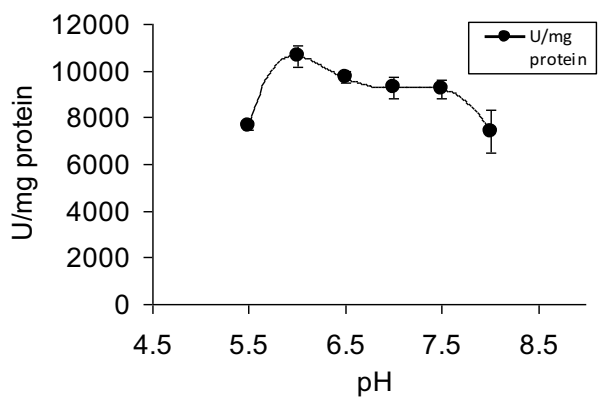


Fig. 7

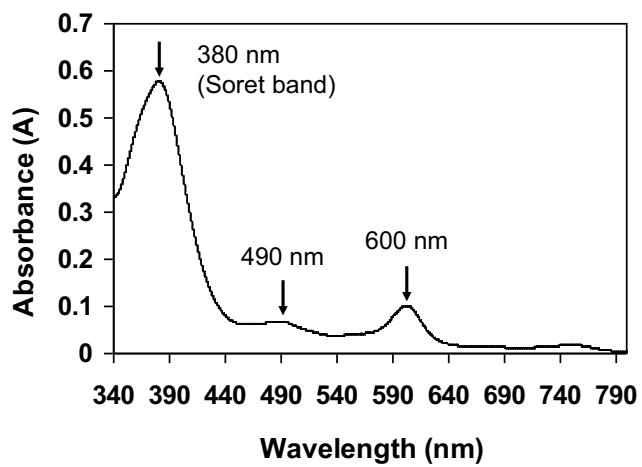


Fig. 8

Table 1

Strain	Culture media		
	SM	PDY	GI
	Fungal growth ($\text{gL}^{-1}\text{D}^{-1}$)		
0601	6.06 A*a**	4.44 B*a**	3.64 C*a**
0602	4.73 A*b**	3.79 A*b**	3.37 B*b**
0603	2.6 A*c**	2.1 A*B*c**	1.55 B*c**
	Glucose consumption ($\text{gL}^{-1}\text{D}^{-1}$)		
0601	3.01 A*a**	4.48 B*a**	3.71 B*a**
0602	1.56 A*b**	5.68 B*b**	5.32 B*b**
0603	3.04 A*a**	3.23 A*c**	2.91A*c**

*Same uppercase letters on the same row indicate no statistical difference between media, according to LSD test with Bonferroni correction ($\alpha=0.016$).

**Same lowercase letters on the same row indicate no statistical difference between strains, according to LSD test with Bonferroni correction ($\alpha=0.016$), except for glucose consumption comparison on GI where Tukey test ($\alpha=0.05$) was used.