

---

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**



**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**“Identificación de la enzima responsable de la  
degradación de pentaclorofenol (PCF) en  
*Amylomyces rouxii* y optimización del mecanismo  
de degradación mediante la expresión heteróloga  
de peroxidasas”**

TESIS  
Que para obtener el grado de  
Doctor en Biotecnología  
PRESENTA

**M. en B. Alba Mónica Montiel González**

**DIRECTOR: Dra. Araceli Tomasini Campocosio  
CO DIRECTOR: Dr. Francisco José Fernández Perrino**

**Febrero 2005**

Iztapalapa, D.F. febrero de 2005

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la  
tesis

**“Identificación de la enzima responsable de la degradación de pentaclorofenol  
(PCF) en *Amylomyces rouxii* y optimización del mecanismo de degradación  
mediante la expresión heteróloga de peroxidasas”**

que presentó

Alba Mónica Montiel González

Directora: Dra. Araceli Tomasini Campocosio

Co director: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Asesor: Dr. Javier Barrios González

Asesor: Dr. Jorge Soriano Santos



Jurado:

Presidente: Dr. Javier Barrios González

Secretario: Dr. Octavio Loera Corral

Vocal: Dra. Refugio Rodríguez Vázquez

Vocal: Dr. Jorge Soriano Santos

**EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE INGENIERIA GENETICA Y METABOLITOS SECUNDARIOS DEL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA, PERTENECIENTE A LA DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD, EN LA UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA - UNIDAD IZTAPALAPA.**

**“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa está incluido en el Padrón Nacional de Posgrado (PIFOP) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y además cuenta con apoyo del mismo Consejo.**

**Este trabajo fue financiado por el CONACyT, a través de la beca de Doctorado No. 127832 y del proyecto "Degradación de pentaclorofenol por *Rhizopus nigricans*" (ref. 31572-B).**

Iztapalapa, D.F. febrero de 2005

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la  
tesis

**“Identificación de la enzima responsable de la degradación de pentaclorofenol  
(PCF) en *Amylomyces rouxii* y optimización del mecanismo de degradación  
mediante la expresión heteróloga de peroxidasas”**

que presentó

Alba Mónica Montiel González

Directora: Dra. Araceli Tomasini Campocosio

Co director: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Asesor: Dr. Javier Barrios González

Asesor: Dr. Jorge Soriano Santos

Jurado:

Presidente: Dr. Javier Barrios González

Secretario: Dr. Octavio Loera Corral

Vocal: Dra. Refugio Rodríguez Vázquez

Vocal: Dr. Jorge Soriano Santos

## RESUMEN

Debido a la creciente presencia de compuestos tóxicos, xenobióticos y recalcitrantes, muchos grupos de investigación se han interesado por conocer alguna forma de degradarlos. Hasta el momento existen tratamientos físicos y químicos capaces de hacerlo, aunque presentan el inconveniente de un alto costo y formación de otros productos indeseables. También existen procesos biotecnológicos que utilizan microorganismos, algunos de los cuales cuentan con complejos enzimáticos capaces de degradar este tipo de tóxicos. Entre los xenobióticos más comunes se encuentra el pentaclorofenol (PCF), que se forma durante el proceso de manufactura del papel. Se ha encontrado que hongos pertenecientes al grupo de los basidiomicetos poseen enzimas ligninolíticas (MnP, LiP y lacasa) que oxidan compuestos fenólicos. A pesar de los beneficios que nos ofrecen estas enzimas, los microorganismos que las producen son de lento crecimiento. Podría especularse, por lo tanto, con la posibilidad de utilizar microorganismos propios de dichos efluentes, que además crezcan más rápido y posean la capacidad de degradación de PCF, con la opción de ser optimizados mediante la expresión heteróloga de enzimas peroxidasas de otras especies.

Por tales razones, en este trabajo se usó una cepa de *Amylomyces rouxii*, aislada de un efluente de la industria del papel y que tiene la capacidad de tolerar y degradar el PCF (52% en 168 h). Pruebas iniciales muestran que este hongo no posee enzimas peroxidasas (MnP y LiP), aunque en pruebas de tipo cualitativo se observa actividad de fenoloxidasas. Por medio de ensayos de fermentación con adición de tirosina, un substrato específico para una fenoloxidasa (tirosinasa), se logró incrementar en un 30% la capacidad de degradación del PCF (81% en 168 h), lo que nos da pauta a considerar que es una tirosinasa la principal enzima responsable de la degradación del PCF en este hongo.

Tras la purificación parcial del extracto de fermentación se pudo obtener una enzima con actividad monofenolasa (reacción que solo se apreció con tirosinasa comercial y no con lacasa o peroxidasa). Dicha enzima posee, aproximadamente, el mismo peso molecular que una tirosinasa comercial (40 KDa).

La tirosinasa comercial por sí sola, fue capaz de degradar el PCF. Todos estos datos llevan a concluir que es una tirosinasa la enzima responsable de la degradación del PCF.

Por otro lado fue posible optimizar el mecanismo de degradación del hongo por co-transformación con los plásmidos pVEM y pCGM y pVEL y pCGL que contienen los genes de Manganese peroxidasa y Lignina peroxidasa de *Phanerochaete chrysosporium*, respectivamente y los plásmidos pULC43 y pAN7-1 que poseen genes de resistencia a fleomicina e higromicina, respectivamente (utilizados como marcadores en la primera selección de transformantes). Una segunda selección se realizó analizando la capacidad de las colonias para decolorar el polímero Poly R-478, reportado como uno de los colorantes que las peroxidases son capaces de decolorar. Se lograron obtener 3 cepas transformantes que fueron capaces de degradar el PCF en su totalidad en 144 h de fermentación líquida.

Por último y como dato adicional, no se consiguió amplificación con PCR utilizando cebadores para lacasa, mientras que sí se obtuvo con cebadores para tirosinasa.

## ABSTRACT

Toxic, recalcitrant and xenobiotic compounds are highly increased in the environment, reason there are many studies about degradation processes of these compounds. One of such xenobiotic important as a model, is pentachlorophenol (PCP), produced during manufactured process of paper. There are physical and chemical methods to degrade the toxic, but these processes have some disadvantages, as high cost and not desirables by-products. Biodegradation is an alternative process, in which method microorganisms able to degrade the toxic are used, these microorganism normally produce ligninolytic enzymes (Mn-peroxidase, Li-peroxidase and lacase). These enzymes oxidizes phenolic compounds, but the producer microorganisms shows a very slow growth. We are interested in to look for an use microorganisms able to degrade toxic through different enzymatic systems, showing a better growth and that could be improved by heterologous expression of peroxidase enzymes from ligninolytic fungi.

*Amylomyces rouxii* was isolated from paper industry effluent. *A. rouxii* tolerate and degrade PCP (52% in 168 h). Initial studies showed that this fungus did not produce peroxidases (LiP and MnP), although phenoxidases were found by qualitative assays. Tyrosine, a specific substrate for tyrosinase, was added to fermentation medium and PCP degradation capacity was increased in 30% (81% in 168h). This strongly supported that a tyrosinase will be the enzyme responsible for PCP degradation by this fungus.

In this work, the enzyme responsible for PCP degradation by *A. rouxii* was determined and degradation capacity was improved by heterologous expression. First we made a partial purification of fermentation extract. The enzyme from this extract presented monophenolase activity and a molecular weight, 40 KDa, similar to a commercial tyrosinase used as standard.

*A. rouxii* was co-transformed with pVEM and pCGM and pVEL and pCGL plasmids containing manganese and lignin peroxidase genes from *Phanerochaete chrysosporium* respectively and with pULC43 and pAN7-1 plasmid containing resistance to phleomycin and hygromycin genes (used as marker for the first selection of transformants).

The second selection was made by decoloration capacity of Poly R-478, this pigment is decolorated by peroxidases but not by phenoloxidases. It was obtained three transformant strains degrading 100% of PCP in 144 h of fermentation.

# ÍNDICE

CAPÍTULO	PÁGINA
1.- INTRODUCCIÓN	
1.1 COMPUESTOS TÓXICOS	1
1.2 BIODEGRADACIÓN DE COMPUESTOS TÓXICOS	2
1.3 IMPACTO AMBIENTAL DEL PENTACLOROFENOL (PCF)	3
1.3.1 Características físico-químicas del PCF	5
1.4 MICROORGANISMOS USADOS EN LA DEGRADACIÓN DE PCF	6
1.4.1 Estudios de degradación de PCF por hongos	6
1.5 DEGRADACION DE PCF POR <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (mecanismo propuesto y sistema enzimatico)	8
1.5.1 Reacciones propuestas en la degradación de PCF	8
1.6 ENZIMAS QUE INTERVIENEN EN LA DEGRADACION DEL PCF	9
1.7 MEJORAMIENTO DE CEPAS POR EXPRESION HETERÓLOGA DE PEROXIDASAS	11
1.8 NUEVAS CEPAS USADAS EN LA DEGRADACIÓN DE PCF	13
1.9 MEJORA GENÉTICA DE CEPAS DEL GENERO <i>Rhizopus</i>	14
2.- ANTECEDENTES	16
2.1 JUSTIFICACION	18
3.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
3.1 HIPOTESIS	20
3.2 OBJETIVOS	20
3.2.1 OBJETIVO GENERAL	20
3.2.2 OBJETIVOS PARTICULARES	20
4.- MATERIALES Y MÉTODOS	
4.1 MICROORGANISMOS UTILIZADOS	
4.1.1 Cepas fúngicas	21
4.1.2 Cepas bacterianas	21
4.2 VECTORES	
4.2.1 Vectores plasmídicos	22

4.3 EQUIPO Y REACTIVOS	
4.3.1 Reactivos para las fermentaciones	26
4.3.2 Reactivos para biología molecular	26
4.3.2.1 Ácidos nucleicos	26
4.3.2.2 Antibióticos	27
4.3.2.3 Enzimas	27
4.3.2.4 Isótopos radiactivos	28
4.3.2.5 Sistemas comerciales para la manipulación de ADN	28
4.3.3 Equipo	28
4.4 MEDIOS DE CULTIVO	
4.4.1 Medios de cultivo para bacterias	30
4.4.2 Medios de cultivo para hongos	30
4.5 CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS	
4.5.1 Crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	33
4.5.2 Crecimiento de <i>Amylomyces rouxii</i>	34
4.5.2.1 Condiciones de propagación	34
4.5.2.2 Diseño experimental	34
4.5.2.3 Condiciones de fermentación líquida para la degradación de PCF	35
4.5.2.3.1 Suspensión de esporas	35
4.5.3 Determinaciones analíticas	
4.5.3.1 Determinación de biomasa	36
4.5.3.2 Determinación de PCF por HPLC	37
4.5.3.3 Determinación de la actividad monofenolásica	38
4.5.3.3.1 Preparación de muestras mediante cromatografía de filtración en gel para determinación de la actividad monofenolásica.	39
4.5.3.3.2 Determinación de la actividad de tirosinasa	42
4.5.3.4 Determinación de proteína total	42
4.5.3.5 Presencia de cobre	44
4.5.3.6 Pruebas de confirmación de la actividad tirosinasa extracelular	44
4.6 OBTENCIÓN DE ADN DE <i>Amylomyces rouxii</i>	45
4.7 ELECTROFORESIS DE ADN	48
4.8 AMPLIFICACIÓN DE LOS PLASMIDOS pBluescript KS, pULC43, pAN7-1, pVEM, pCGM, pVEL y pCGL.	50
4.9 AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO DE <i>E. coli</i>	51
4.10 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS (CEBADORES)	52
4.11 REACCIÓN EN CADENA DE LA ADN POLIMERASA (PCR)	52
4.12 CLONACIÓN DEL FRAGMENTO DE PCR EN EL PLÁSMIDO pBluescript KS+	55
4.13 DETERMINACIÓN Y REDUCCIÓN DEL NUMERO DE NÚCLEOS EN ESPORAS DE <i>Amylomyces rouxii</i> .	58

4.14 DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD BASAL DE <i>Amylomyces rouxii</i> A FLEOMICINA E HIGROMICINA.	58
4.15 COTRANFORMACIÓN DE <i>Amylomyces rouxii</i> CON LOS PLÁSMIDOS pULC43, pAN7-1, pVEM, pCGM, pVEL y pCGL.	60
4.16 SELECCIÓN DE TRANSFORMANTES DE <i>Amylomyces rouxii</i> CON pVEM, pCGM, pVEL y pCGL.	63
4.17 CONDICIONES DE FERMENTACIÓN LIQUIDA PARA LA DEGRADACIÓN DE PCF POR LAS CEPAS TRANSFORMANTES.	68
4.18 EXTRACCIÓN DE ADN DE LAS CEPAS TRANSFORMANTES.	68
4.19 DIGESTIÓN DE ADN TOTAL DE <i>Amylomyces rouxii</i> Y DE LAS CEPAS TRANSFORMANTES	69
4.20 TRANSFERENCIA DE SOUTHERN DE ADN DE LAS CEPAS TRANSFORMANTES.	70
4.21 HIBRIDACIÓN DE LA Sonda pVEM CON EL ADN DIGERIDO DE LAS CEPAS TRANSFORMANTES.	72
5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
5.1 DETERMINACIÓN DE PCF POR HPLC	75
5.2 PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO PARA MEDIR ACTIVIDAD TIROSINASA	76
5.3 PRESENCIA DE COBRE	77
5.4 CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL Y DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LA ENZIMA	78
5.4.1 Determinación del peso molecular de las fracciones obtenidas	80
5.5 FERMENTACIÓN EN ESTADO LÍQUIDO DE LAS CEPAS ORIGINALES	81
5.5.1 Comprobación del papel inductor de la tirosina	81
5.5.2 Comprobación del carácter extracelular de la proteína	83
5.5.3 Producción de biomasa	84
5.5.4 Cinéticas de proteína total	87
5.5.5 Degradación de PCF	87
5.5.6 Determinación de la actividad enzimática (tirosinasa)	90
5.5.6.1 Actividad Volumétrica	90
5.5.6.2 Actividad Específica	91
5.5.7 Relación de la degradación de PCF con actividad específica monofenolasa	92
5.6 MEJORA GENÉTICA	
5.6.1 Obtención del ADN de <i>Amylomyces rouxii</i> .	93
5.6.2 Diseño de cebadores (primers)	94
5.6.3 Análisis de la secuencia de nucleótidos del fragmento obtenido por PCR	98
5.7 REDUCCION DE NUCLEOS EN ESPORAS DE <i>Amylomyces rouxii</i> .	98
5.8 SENSIBILIDAD DE ESPORAS DE <i>Amylomyces rouxii</i> A FLEOMICINA E HIGROMICINA.	100
5.9 TRANSFROMACION DE <i>Amylomyces rouxii</i> .	102
5.10 DEGRADACION DEL PCF EN FERMENTACION EN ESTADO LIQUIDO POR LAS TRANSFORMANTES SELECCIONADAS	105

5.10.1 Producción de biomasa	105
5.10.2 Cinéticas de degradación de PCF	108
5.11 SOUTHERN BLOT E HIBRIDACION	110
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
6.1 OBSERVACIONES	113
6.2 CONCLUSIÓN	116
6.3 RECOMENDACIONES	116
7.- LITERATURA CITADA	118
7.1 LITERATURA GENERAL	125

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
TABLA 1.- Porcentaje y eficiencia de degradación de PCF de <i>A. rouxii</i> en medio con y sin tirosina.	82
TABLA 2.- Porcentaje de degradación de PCF en medio Melín-Norkrans con enzimas comerciales.	82
TABLA 3.- Porcentaje de degradación de PCF en extractos de fermentación de <i>A. rouxii</i> .	83
TABLA 4.- Reducción en el número de núcleos en las esporas mediante procesos de congelación-descongelación.	99
TABLA 5.- Resultados del estudio de sensibilidad de <i>A. rouxii</i> a fleomicina	101
TABLA 6.- Resultados del estudio de sensibilidad de <i>A. rouxii</i> a higromicina.	101
TABLA 7.- Colonias obtenidas de las cepas transformantes	102
TABLA 8.- Actividad peroxidasa mostrada por la cepa parental y las cepas transformantes.	104

## ÍNDICE DE GRAFICOS

GRÁFICO	PÁGINA
GRÁFICO 1.- Perfil correspondiente al espacio vacío (azul de dextrano)	79
GRÁFICO 2.- Perfil correspondiente a los marcadores de peso molecular, de menor a mayor.	79
GRÁFICO 3.- Perfil de filtración en gel de la tirosinasa comercial	79
GRÁFICO 4.- Perfil de filtración en gel de las proteínas presentes en la muestra de 48 h	79
GRÁFICO 5.- Gráfica del log PM vs $V_e/V_o$ de los estándares	80
GRÁFICO 6.- Cinética de producción de biomasa de <i>A. rouxii</i> en medio Melin-Norkrans con y sin tirosina.	84
GRÁFICO 7.- Cinética de producción de biomasa de <i>A. rouxii</i> en medio Melin-Norkrans con y sin leucina.	86
GRÁFICO 8.- Cinética de proteína total de <i>A. rouxii</i> en medio Melin-Norkrans con y sin tirosina.	87
GRÁFICO 9.- Cinética de degradación de PCF por <i>A. rouxii</i> en medio Melin-Norkrans con y sin tirosina.	88
GRÁFICO 10.- Cinética de degradación de PCF por <i>A. rouxii</i> en medio Melin-Norkrans con y sin leucina.	89
GRÁFICO 11.- Cinética de actividad volumétrica monofenolasa reproducida por <i>A. rouxii</i> en medio Melin-Norkrans con y sin tirosina.	90
GRÁFICO 12.- Cinética de la actividad específica monofenolasa producida por <i>A. rouxii</i> en medio Melin-Norkrans con y sin tirosina.	91
GRÁFICO 13.- Actividad específica monofenolasa y degradación de PCF (%) por <i>A. rouxii</i> en medio Melin-Norkrans con y sin tirosina, en función del tiempo.	92
GRÁFICO 14.- Perfil de producción de biomasa en MM-M 5% para las transformantes y la cepa original de <i>A. rouxii</i> .	106
GRÁFICO 15.- Perfil de producción de biomasa en MN-M 5% por las transformantes y la cepa original de <i>A. rouxii</i> .	107
GRÁFICO 16.- Perfil de degradación de PCF en MM-M 5% por las transformantes y la cepa original de <i>A. rouxii</i>	108
GRÁFICO 17.- Perfil de degradación de PCF en MN-M 5% por las transformantes y la cepa original de <i>A. rouxii</i>	109

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
FIGURA 1.- Vía propuesta para la degradación de pentaclorofenol por <i>P. chrysosporium</i>	8
FIGURA 2.- ADN total de <i>Amylomyces rouxii</i> .	94
FIGURA 3.- Parte del alineamiento de secuencias de aminoácidos de tirosinasa.	95
FIGURA 4.- Banda amplificada por PCR a partir del ADN cromosómico de <i>A. rouxii</i> con cebadores diseñados para el gen de la tirosinasa.	97
FIGURA 5.- Decoloración de Poly R-478 por <i>P. chrysosporium</i> , <i>A. rouxii</i> y una cepa transformante de esta última con los plásmidos pAN7-1 + pVEM	103
FIGURA 6.- ADN digerido de las transformantes de <i>A. rouxii</i> transferido por Southern blot.	111
FIGURA 7.- Hibridación del ADN digerido de pULC43 + pVEM5, <i>A. rouxii</i> y pAN7-1 + pVEM1 con el plásmido pVEM, usado como sonda.	112

## 1.- INTRODUCCIÒN

### 1.1 COMPUESTOS TÒXICOS

En nuestros días, los seres humanos y su entorno estamos sufriendo las consecuencias de la introducción de algunos compuestos tóxicos (naturales y xenobióticos, es decir creados por el hombre) a las actividades productivas. Este es el caso de herbicidas, pesticidas, insecticidas y conservadores utilizados para evitar el ataque microbiano y preservar los materiales. Existen varios procesos industriales que generan, en sus aguas residuales, compuestos tóxicos para los seres vivos. Algunos de estos tipos de compuestos son clorofenoles, bifenilos policlorados, hidrocarburos aromáticos clorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos y colorantes tipo azo (Sutherland, 1992; Bumpus *et al*, 1993; Redy, 1995; Esposito, *et al.* 1998; Szewczyk, *et al.* 2003). Algunos de estos compuestos se originan por reacciones químicas durante ciertos procesos de manufactura de artículos de utilidad para el hombre. En concreto, en el caso de la industria papelera se forman compuestos tóxicos como los clorofenoles (y entre ellos el pentaclorofenol - PCF -), que es el objeto de estudio en el presente trabajo.

El conocimiento de la toxicidad de estos compuestos y de su difícil degradación en la naturaleza ha conducido a una gran cantidad de investigadores a buscar organismos capaces de degradarlos, obteniéndose hasta ahora valiosos resultados que, mediante el apoyo de conocimientos aportados por disciplinas afines, permitirán aplicarlos en casos reales.

En este trabajo nos enfocamos a estudiar la degradación de PCF por *Amylomyces rouxii*, un hongo del orden de los Mucorales, aislado a partir de efluentes de la industria papelera (Tomasini *et al.*, 1996). El PCF en esta industria se usa como conservador de la madera y es un compuesto considerado dentro de los principales contaminantes por la Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos de Norteamérica -*US Environmental Protection Agency (EPA)*- (Keither y Teilard, 1979; Moos *et al.*, 1983).

## 1.2 BIODEGRADACIÒN DE COMPUESTOS TÒXICOS

Desde hace tiempo se han realizado trabajos de investigación dirigidos a la eliminación de los compuestos tóxicos que generan contaminación en el medio ambiente. La eliminación de dichos compuestos puede realizarse por procesos fisicoquímicos o biológicos.

Dentro de los procesos biológicos, se han estudiado bacterias y hongos capaces de degradar dichos compuestos. Por ejemplo, la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* VUN 10,010 y el hongo *Penicillium janthinellum* VUO 10,201, juntos en un consorcio, son capaces de degradar y mineralizar pireno, benzopireno y benzoantraceno (Boonchan *et al.*, 2000).

También se ha estudiado la biodegradación del herbicida Diuron, utilizando actinomicetos autóctonos del suelo: Esposito *et al.* (1998) reportaron la presencia de manganeso peroxidasa producida por una cepa de actinomicetos, sugiriendo su relación con la capacidad de degradación que presentaba esta cepa.

Con respecto al uso de los hongos para la degradación de tóxicos, los más estudiados son los basidiomicetos, especialmente los denominados de pudrición blanca. *Phanerochaete chrysosporium*, un hongo de pudrición blanca, es capaz de degradar compuestos xenobióticos como el PCF, el benzopireno y el trifenilmetano, gracias a un sistema enzimático constituido por peroxidasas extracelulares (Tien y Kirk, 1988; Higson, 1991; Reddy y Gold, 2000). Otros basidiomicetos como *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor* presentan también capacidad para degradar una gran variedad de compuestos tóxicos, como los hidrocarburos y los compuestos aromáticos halogenados (Okeke *et al.*, 1997; Fahr *et al.*, 1999).

En 1996, Vroumsia *et al.* reportaron la biodegradación de tres herbicidas en el suelo (clortoluron, diuron e isoproturon) por hongos, encontrando que *Rhizoctonia solanii* fue capaz de crecer en presencia de estos compuestos.

También se han realizado estudios para identificar hongos de otros géneros, como *Fusarium*, *Cunninghamella* o *Rhizopus*, capaces de degradar este tipo de compuestos tóxicos (Alleman *et al.*, 1992; Guiraund *et al.*, 1992 y 1995; Seigle-Murandi *et al.*, 1993; Tomasini *et al.*, 2001).

### 1.3 IMPACTO AMBIENTAL DEL PENTAFLOROFENOL

El pentaclorofenol (PCF) (conocido también como PCP, penclorol, penta, pentaclorol, etc) se ha utilizado ampliamente como modelo en estudios de degradación, debido a que en su estatus regulatorio es considerado como un compuesto tóxico moderado (clase II de toxicidad de la EPA) y, sin embargo, posee una estructura química muy parecida a la de otros compuestos con altos niveles de toxicidad. El PCF es también un pesticida restringido en su uso, y en algunos casos como en Estados Unidos de Norteamérica y en Europa está prohibido su uso general para otros propósitos y muy restringido su uso para conservar la madera.

El compuesto se usa principalmente para proteger la madera de la degradación por hongos presentes en las raíces, o de insectos que la incluyan en su dieta, pero también puede usarse como un deshojante precosecha en cultivos de algodón, como un herbicida pre-emergente general y como un biocida en sistemas de agua industrial. Está disponible en forma de bloques, escamas, gránulos, concentrados líquidos y soluciones de petróleo listas para usarse. El PCF en grado técnico tiene un 86% de pureza y contiene dioxinas (tetra, hexa y octoclorodibenzo-p-dioxina) y hexaclorobenceno. El PCF es también un producto principal del metabolismo del hexaclorobenceno en los mamíferos.

Este compuesto es moderadamente tóxico por vía oral, con una dosis letal  $DL_{50}$  de 27 a 211 mg/kg en ratas. También es moderadamente tóxico vía inhalación, con una  $DL_{50}$  de 0.2 a 2.1 mg/L en ratas. Causa irritación de las membranas mucosas, piel y ojos. La penetración por la piel puede ser la forma de exposición más dañina: se conocen alrededor de 50 casos de envenenamiento con PCF, 30 de los cuales fueron mortales. La inmersión de una mano humana en una solución al 0.4% de PCF durante 10 minutos causa dolor e inflamación.

La elevada exposición a este compuesto puede causar elevación de la temperatura, abundante sudoración, deshidratación, pérdida de apetito, descenso del peso corporal, náuseas y efectos neurológicos varios (como temblores, movimientos descoordinados, dolor en piernas, contracciones musculares e incluso coma), degeneración del hígado y niveles de enzimas y química sanguínea irregulares. A muy altos niveles causa la obstrucción del sistema circulatorio en el pulmón y fallas cardíacas. Los sobrevivientes a exposiciones al tóxico pueden sufrir daños visuales y en el sistema nervioso central permanentes.

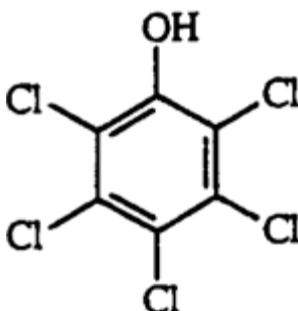
Hay que destacar, no obstante, que algunos síntomas pueden ser debidos a las impurezas de la formulación más que al propio PCF. Hasta el momento no se han encontrado efectos sobre la reproducción, aunque sí tiene efectos teratogénicos. No es mutagénico en bacterias, es débilmente mutagénico en ratas y es mutagénico en levaduras. Se han observado efectos mutagénicos débiles en linfocitos humanos cultivados y expuestos a PCF. La evidencia disponible que se tiene con respecto a sus efectos carcinogénicos no es suficiente, sin embargo, como para asegurar que el PCF sea carcinogénico en humanos. Los principales órganos dañados por el PCF son el hígado, riñones y sistema nervioso central.

En cuanto a sus efectos ecológicos, prácticamente no tiene efectos tóxicos en aves. En peces su toxicidad es de alta a muy alta. Varias especies de peces, invertebrados y algas han demostrado tener niveles internos de PCF significativamente más altos que la concentración del compuesto en las aguas circundantes.

Sin embargo, una vez absorbido por los peces, el PCF puro es rápidamente excretado, con una vida media biológica de tan sólo 10 horas. Se sabe que el compuesto es moderadamente persistente en el suelo, con una vida media de 45 días. El PCF puede ser incorporado por las plantas (la lechuga, por ejemplo, crece sobre suelos contaminados con PCF), siendo el compuesto muy tóxico para las plantas.

### 1.3.1 Características físico-químicas del PCF

El PCF es un hidrocarburo clorado, con la siguiente estructura química:



#### PROPIEDADES FÍSICAS:

Apariencia: A temperatura ambiente, el PCF es cristalino, incoloro, sólido, con un olor fenólico. El color puede variar de blanco a café oscuro, dependiendo de la pureza del compuesto.

Nombre químico: Pentaclorofenol

Número CAS: 87-86-5

Peso Molecular: 266.34

Solubilidad en agua: 80 mg/L

Solubilidad en otros solventes: acetona, alcoholes, éter y benceno. También en éter de petróleo, tetracloruro de carbono y parafinas.

Punto de Fusión: 191°C

Presión de vapor: 16,000 mPa a 20°C

Coefficiente de partición. 5.2

Coefficiente de absorción: 30 a pH 7. (EXTOXNET, Oregon State University, 1996)

## 1.4 MICROORGANISMOS USADOS EN LA DEGRADACIÓN DEL PCF

En la degradación del PCF participan principalmente bacterias y hongos. Algunas bacterias descritas para la degradación de PCF son *Sphingomonas sp.* G30, *Pseudomonas sp.* Bu34, y *Desulfitobacterium frappieri* (Lee *et al.*, 1998; Juteau *et al.*, 1995; Cassidy *et al.*, 1999; Tartakovsky *et al.*, 1999).

Los hongos filamentosos más estudiados para degradar PCF se encuentran dentro del grupo de los basidiomicetos, incluyéndose varias especies de *Phanerochaete* (*P. chrysosporium*, *P. sordida* y *P. magnoliae*), *Lentinus edodes*, *Trametes* (*T. versicolor*, *T. hirsuta* y *T. gibosa*), *Pleurotus ostreatus*, etc. El más estudiado de todos ellos es *P. chrysosporium*, que ha demostrado gran eficiencia para degradar este tipo de compuestos.

### 1.4.1 Estudios de degradación del PCF por hongos.

Se ha observado que el sistema enzimático de los hongos ligninolíticos, formado principalmente por peroxidasas, es capaz de degradar tanto la lignina como otros compuestos tóxicos (Hatakka, 1994). Por tal razón, se ha estudiado extensamente la capacidad de estos microorganismos para modificar o degradar compuestos xenobióticos, compuestos de difícil degradación o compuestos recalcitrantes que se acumulan en el ambiente (Lamar, 1992).

En 1996, Aitken y Logan, estudiaron la degradación del PCF por *Phanerochaete chrysosporium*, observando una degradación del 72 al 75% del compuesto. Los autores propusieron que la deshalogenación del PCF era mediada por la actividad extracelular de la enzima lignina peroxidasa (LiP). Por otro lado, Fahr *et al.* (1999), estudiaron la degradación del 2,4-diclorofenol y del PCF por hongos de pudrición café (*Gloeophyllum striatum* y *G. trabeum*). En estos cultivos no detectaron actividad lacasa ni otra peroxidasa normalmente involucrada (la manganeso peroxidasa); sin embargo, la degradación de ambos clorofenoles se llevó a cabo.

Law *et al.* (2003) reportaron un 89% de degradación del PCF por una cepa de *Pleurotus pulmonarius*, aunque esta cepa presentaba el inconveniente de que tardaba mucho tiempo en propagarse para su uso (10 días). Walter *et al.* (2004) reportaron dos hongos, *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor*, aislados a partir de desechos ligninolíticos con capacidad de degradar el PCF, en este trabajo también se reportó la actividad de peroxidasas extracelulares.

También se han realizado estudios de degradación del PCF empleando otros hongos diferentes a los basidiomicetes, buscando la ventaja de un crecimiento más rápido y de presentar diferentes sistemas enzimáticos. Por ejemplo, Seigle-Murandi *et al.*, (1993) reportaron la capacidad de diversos hongos, como zigomicetos y ascomicetos, para degradar este compuesto. También se ha reportado la decoloración de efluentes de la industria del papel por *Rhizopus orizae* (Nagarathnamma y Bajpai, 1999) y una cepa de *Amylomyces rouxii* capaz de degradar PCF (Tomasini *et al.*, 2001). Más recientemente, Szewczyk *et al.* (2003) publicaron un estudio realizado con 15 cepas de hongos, aisladas de áreas contaminadas con compuestos xenobióticos provenientes de desechos de aceite, efluentes de curtidurías y petróleo crudo. Estas cepas se incubaron en medios que contenían fenantreno, antraceno y PCF, para determinar su capacidad de degradación. En este trabajo lograron identificar algunas cepas capaces de degradar PCF, determinando que se trataba de *Mucor ramosissimus*, aunque no identificaron ninguna actividad enzimática.

En los trabajos mencionados se puede observar que las especies de hongos que poseen la capacidad de degradar el PCF refieren esta capacidad a la expresión de enzimas con actividad oxidasa (peroxidasa y fenoloxidasa).

### 1.5 DEGRADACION DEL PCF POR *Phanerochaete chrysosporium* (mecanismo propuesto y sistema enzimático)

El hongo estudiado por excelencia para la degradación del PCF ha sido, como se comentó anteriormente, *Phanerochaete chrysosporium*. En los trabajos reportados por Reddy *et al.* (2000) podemos encontrar estudios de la degradación de PCF mediada por la actividad de peroxidadasas de *P. chrysosporium*, así como los intermediarios generados y las reacciones involucradas. Las reacciones propuestas en la degradación del PCF se muestran a continuación, así como los intermediarios formados.

#### 1.5.1 Reacciones propuestas en la degradación del PCF

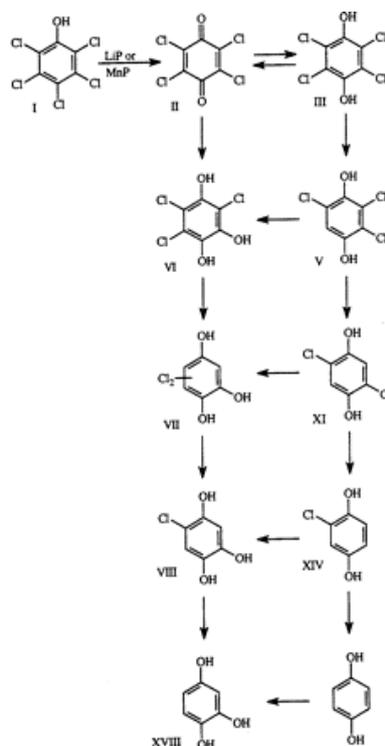


Figura 1.- Vía propuesta para la degradación de pentaclorofenol por *P. chrysosporium*. (I) PCF. (II) Tetraclorobenzoquinona, (III) Tetraclorodihidroxibenceno. (V) Triclorodihidroxibenceno, (VI) Triclorotrihidroxibenceno, (VII) Diclorotrihidroxibenceno, (VIII) Clorotrihidroxibenceno, (XI) 2,5-diclorodihidroxibenceno, (XIV) 2-cloro-1,4-dihidroxibenceno, (XVIII) Trihidroxibenceno.

Esta vía de degradación se dedujo a partir de la caracterización de los metabolitos del hongo y de los productos de oxidación generados por la lignina peroxidasa (LiP) y la manganeso peroxidasa (MnP) purificadas. La vía es iniciada con la dechloración oxidativa, catalizada por estas enzimas.

## 1.6 ENZIMAS QUE INTERVIENEN EN LA DEGRADACIÓN DEL PCF

Como se mencionó anteriormente, entre las enzimas más comunes que intervienen en la degradación del PCF están las peroxidases, principalmente la manganeso (MnP) y la lignina peroxidasa (LiP). Estas enzimas realizan, en presencia de  $H_2O_2$ , la oxidación de la lignina (Buswell y Odier, 1987; Kirk y Farrell, 1987; Gold *et al.*, 1989; Higuchi, 1990).

Las manganeso peroxidases son proteínas con grupo hemo que catalizan la oxidación del  $Mn^{2+}$ . La MnP (EC 1.11.1.13) es oxidada por 2 electrones del  $H_2O_2$  para generar un intermediario conocido como compuesto I. El compuesto I puede oxidar  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{3+}$  o puede oxidar substratos fenólicos a sus correspondientes radicales, siendo la enzima reducida al intermediario oxidado con un electrón, conocido como compuesto II. Este compuesto II tiene un absoluto requerimiento de  $Mn^{2+}$  como reductor, y por la oxidación de  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{3+}$  la enzima pasa a su estado reducido (Kuan *et al.*, 1993; Wariishi. *et al.*, 1988 y 1989). El  $Mn^{3+}$ , quelado por un ácido orgánico, es un oxidante capaz de oxidar una gran variedad de substratos fenólicos (Kishi *et al.*, 1994).

Por otro lado, la lignina peroxidasa (LiP) (EC 1.11.1.14) es una glicoproteína, inespecífica y extracelular, dependiente de  $H_2O_2$ . Contiene un mol de protohemo IX por mol de enzima y se encuentra como una serie de isoenzimas (pI 3.2-4.0) (Wariishi y Gold, 1990). Esta enzima actúa por extracción de electrones sencillos de anillos aromáticos de lignina, llegando a la generación de un radical catiónico y al subsecuente rompimiento de los anillos (Bonnarme y Jeffries, 1990). La enzima interviene también en reacciones de degradación de varios compuestos aromáticos.

Otro tipo de enzimas, específicamente las fenoloxidasas (lacasas y tirosinasas), tienen la capacidad de oxidar también los compuestos fenólicos.

Las lacasas (EC 1.10.3.2) pertenecen al grupo de las oxidasas azules de cobre. Son enzimas de tipo fenoloxidasa cúprica que contienen cuatro átomos de cobre, los cuales tienen un papel importante en los mecanismos catalíticos de la enzima. Los átomos de cobre se distribuyen en diferentes sitios de la molécula. Las lacasas se han clasificado en tres tipos: lacasa tipo 1 ó azul, tipo 2 ó normal y tipo 3 ó cobre binuclear. En la reacción típica de una lacasa fúngica, el sustrato está sujeto a la oxidación de un electrón para dar un radical oxianil: por ejemplo, el fenol se oxida para formar el radical fenoxilo, acompañado de la reducción del oxígeno molecular a agua. Las lacasas catalizan la oxidación de tanto compuestos fenólicos como no fenólicos (Bourbonnais y Paice, 1990) y son capaces de mineralizar un amplio rango de colorantes sintéticos (Swamy y Ramsay, 1999; Abadulla *et al.*, 2000).

La enzima tirosinasa o polifenoloxidasa (PPO, monofenol, o-difenol:oxígeno reductasa, EC.1.14.18.1), también presenta cobre en su molécula. Los sitios activos de la tirosinasa contienen dos átomos de cobre, aunque su estructura espacial completa es aún desconocida. Esta enzima se ha estudiado principalmente en humanos, debido a su gran importancia en la pigmentación por melanina. También el oscurecimiento enzimático de las frutas y los vegetales es causado por la actividad de la tirosinasa en los tejidos de las plantas, por lo que esta enzima juega un papel importante en el procesamiento de frutas y verduras durante el almacenamiento de alimentos procesados. La enzima cataliza la hidroxilación de monofenoles (actividad monofenolasa) y la oxidación de o-difenoles a o-quinonas (actividad difenolasa). Los zigomicetos de las especies *Rhizopus* y *Mucor* presentan actividad fenoloxidasa (Thompson and Cannon., 1984).

Utilizando los conocimientos adquiridos sobre estas enzimas que participan en la degradación de los clorofenoles, se han descrito métodos basados únicamente en las enzimas (y no en los microorganismos completos) para eliminar compuestos fenólicos de aguas de desecho industriales.

Estos métodos usan la enzima polifenoloxidasas, que oxida los fenoles a las correspondientes o-quinonas. Esta enzima se ha encontrado en casi todas las soluciones desfenolizadas, en un intervalo de concentración de 0.01 a 1.0 g/L. (Atlow *et al.*, 1984).

También se han realizado estudios acerca de la oxidación de fenol catalizada por la enzima tirosinasa, encontrándose que el fenol primero se oxida produciendo catecol, que luego se oxida para formar otros productos de mayor peso molecular. De este modo, se llegó a concluir que el fenol, en solución acuosa, puede descomponerse eficientemente por medio de la enzima tirosinasa, lográndose conversiones hasta del 100%. (Leyva *et al.*, 1996). Sin embargo aún no se ha propuesto ninguna ruta de degradación posible del PCF por acción de la tirosinasa.

### **1.7 MEJORAMIENTO DE CEPAS POR EXPRESION HETEROLOGA DE PEROXIDASAS**

Gracias al conocimiento de la participación de las peroxidasas en el proceso de degradación de compuestos fenólicos, como el PCF, se han realizado trabajos en los que se han expresado genes que codifican para dichas enzimas en otros microorganismos que presentan ventajas en cuanto a su crecimiento y manipulación. Un ejemplo de estos trabajos es el reportado por Ruíz-Dueñas *et al.* en 1999, donde se realiza la expresión heteróloga de peroxidasas de *Pleurotus eryngii* en *Aspergillus nidulans*, encontrándose que éste último hongo es capaz, después de la transformación, de oxidar  $Mn^{2+}$  y otros substratos aromáticos, casi con la misma eficiencia que las enzimas nativas.

También se han realizado trabajos acerca de la sobreexpresión de genes para la Mn-peroxidasa, como el reportado por Mayfield *et al.* en 1994, en el que se estudió la expresión homóloga de la Mn-peroxidasa recombinante en *P. chrysosporium*.

Los autores encontraron que la Mn-P recombinante no se veía influenciada por el nivel de Mn en el medio, como ocurría en el tipo silvestre, y que la cantidad de Mn-P expresada y secretada en este sistema es comparable a la cantidad de enzima expresada por la cepa de tipo silvestre en condiciones ligninolíticas.

Yasushi *et al.* (2000) obtuvieron la expresión heteróloga eficiente de una peroxidasa con capacidad de decoloración de colorantes de *Geotrichum candidum* Dec1 en *Aspergillus orizae*, usando el promotor del gen para la  $\alpha$  amilasa de *A. orizae*. En este caso, la actividad de la peroxidasa recombinante fue 42 veces mayor a la actividad presentada por la enzima nativa.

Asimismo, Stewart *et al.* en 1996 reportaron la expresión heteróloga de un gen para la manganeso peroxidasa (*mnp1*) de *P. chrysosporium* en *Aspergillus orizae*. En este caso, la expresión se consiguió fusionando el ADNc del gen *mnp1* con un promotor de la taka-amilasa y una señal de secreción, obteniendo la secreción de la enzima en forma activa con propiedades físicas y cinéticas similares a las de la proteína nativa.

En 2001, Larrondo *et al.* reportaron la multiplicidad de isoenzimas y la caracterización de una manganeso peroxidasa recombinante de *Ceriporiopsis subvermispota* y de *P. chrysosporium*. En este trabajo expresaron en *Aspergillus nidulans* los ADNc que codifican para las MnPs de los basidiomicetos *C. subvermispota* (MnP1) y *P. chrysosporium* (H4) bajo el control de un promotor para la  $\alpha$  amilasa de *Aspergillus orizae*. Encontraron que las MnPs recombinantes obtenidas tienen masas moleculares y se expresan de manera similar a las enzimas obtenidas de las cepas parentales.

Recientemente se reportó la expresión heteróloga de la Li-P de *P. chrysosporium* en la levadura *Pichia methanolica*, obteniéndose niveles de expresión de 100 mg Li-P H8/L (Wang *et al.*, 2004).

### **1.8 NUEVAS CEPAS USADAS EN LA DEGRADACIÓN DEL PCF**

La mayor desventaja de los hongos de pudrición blanca es el ser especies de crecimiento muy lento. Adicionalmente, se ha observado también que la actividad enzimática disminuye drásticamente después de llegar a su máximo. Son éstas las razones que explican nuestro interés por estudiar otros hongos filamentosos, que no presenten tales inconvenientes y puedan ser utilizados en los procesos de degradación de los compuestos antes mencionados.

Los estudios de degradación de compuestos tóxicos por hongos diferentes a los de pudrición blanca se han basado en la tolerancia de estos hongos a los tóxicos, así como en su capacidad para degradarlos. Kadhim *et al.* (1999), observaron la desaparición de compuestos fenólicos en agua (tri y di clorofenoles y fenol) mediada por *Coriolus versicolor*. En este estudio, la eliminación fue debida a la presencia de lacasa, detectándose también la presencia de Mn-peroxidasa.

Por otro lado, Seigle-Murandi *et al.* (1991) estudiaron el potencial de biodegradación del pentaclorofenol por 100 cepas fúngicas. Seleccionaron 50 cepas y obtuvieron un 25% global de degradación de PCF por zigomicetos, un 3% por levaduras y del 10 al 15% por deuteromicetos.

En estudios realizados acerca de la degradación del pentaclorofenol por hongos de diferentes grupos taxonómicos, se ha encontrado que este compuesto fue degradado en un 80% por 91 cepas ensayadas, de las cuales los zigomicetos resultaron ser los más eficientes (Seigle-Murandi *et al.*, 1993). Los zigomicetos son hongos filamentosos cuyo nombre común es moho del pan; poseen hifas cenocíticas (es decir, cada célula contiene más de un núcleo), forman zigosporas y su hábitat es el suelo o material vegetal en descomposición.

Son responsables del deterioro de los alimentos, y raramente están implicados en enfermedades de tipo parasitario. Los géneros característicos son *Mucor* y *Rhizopus* (Madigan *et al.*, 1999).

Lamentablemente, el uso de hongos como *P. chrysosporium* aporta la ventaja del conocimiento de las enzimas, las rutas de degradación implicadas y los metabolitos intermediarios formados, bases que no se conocen en las propuestas de microorganismos alternativos a utilizar. Es por ello que el estudio de dichos mecanismos en zigomicetos degradadores de PCF se vuelve tan interesante.

### **1.9 MEJORA GENÉTICA DE CEPAS DEL GENERO *Rhizopus*.**

Además de encontrar especies alternativas de hongos con mejores cualidades para degradar compuestos aromáticos tóxicos y de entender sus mecanismos de acción, el mejoramiento genético de las cepas puede llevarse a cabo desde múltiples puntos de vista y es aplicable tanto en etapas iniciales (sin muchos conocimientos de dichos mecanismos, como es nuestro caso) como en etapas avanzadas (el conocimiento de la ruta y de los precursores formados permitiría una acción mucho más específica). Algunas de las estrategias que se han probado hasta la fecha tratan de incrementar el número de copias de algún gen en especial. La sobreexpresión de los genes es un mecanismo apropiado para conseguir aumentos en los rendimientos de producto esperado; el aumento en el número de copias de los genes de interés suele traducirse en un aumento en los niveles de la actividad catalítica por ellos codificada (Giardina *et al.*, 1995).

Este tipo de tecnología no ha sido muy utilizado anteriormente en zigomicetos, aunque sí hay trabajos que implican clonaje, descripción de marcadores de selección y expresión heteróloga (en *E. coli*) En este sentido, Takaya *et al.* (1994) describieron la clonación y caracterización de dos genes de 3-fosfoglicerato kinasa de *Rhizopus niveus* y los expresaron de forma heteróloga en *E. coli*, observando que la expresión se llevaba a cabo bajo el control del propio promotor de *R. niveus*.

Otro trabajo, realizado por Takaya *et al.* en 1996, reportó la clonación y caracterización del gen *leu1* y su uso para realizar una transformación homóloga, encontrando alta frecuencia de transformación y alta estabilidad mitótica. En el trabajo de Horiuchi *et al.* (1995) se describe la clonación del gen *pyr4* de *Rhizopus niveus*, que codifica para una orotidina 5-monofosfato descarboxilasa. Dicho gen se usó para la transformación de *Rhizopus delegar*, observándose alta estabilidad mitótica durante varios procesos de esporulación.

Estos trabajos, aunque no precisamente del microorganismo utilizado en este estudio, aportan una buena base para pensar en expresar peroxididasas de forma heteróloga en *A. rouxii* (perteneciente al género *Rhizopus*), siendo una especie factible de ser transformada y teniendo antecedentes de buena expresión de peroxididasas en sistemas heterólogos.

## 2.- ANTECEDENTES

En el laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolismo Secundario de la Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa se aisló, a partir de un efluente de la industria del papel, una cepa de *Rhizopus sp* que se había identificado como *Rhizopus nigricans* por métodos microbiológicos clásicos (Cortés *et al.* 2001). Recientemente, por técnicas moleculares se encontró que la secuencia de ADN para el ARNr 18S presentaba una muy alta similitud (99.5-99.8% de identidad) con el correspondiente a cepas de *Amylomyces rouxii* (Montiel *et al.*, 2004), previamente conocido como *Rhizopus arrhizus var. Rouxii* (Index Forum, 2003). Estudios realizados con esta cepa mostraron que *A. rouxii* tolera, en cultivo superficial, concentraciones de hasta 100 mg PCF/L, mientras que *P. chrysosporium* solamente crece en concentraciones de hasta 25 mg/L de PCF (Tomasini *et al.*, 2001).

También se realizaron estudios para determinar la capacidad de *A. rouxii* para degradar PCF. Resultados preliminares mostraron que el hongo puede degradar, en cultivo sumergido, un 55% del PCF adicionado a las 24 h en una concentración inicial de 25 mg/L (Tomasini *et al.*, 2001). Este hongo presenta diferentes niveles de tolerancia al tóxico en función del tipo de cultivo: en cultivo sumergido resultó ser menos tolerante que en cultivo superficial.

Ya se han determinado también las condiciones de cultivo (pH, relación C/N y agitación óptimas) en las que se obtiene mejor degradación de PCF por parte de esta cepa y se ha estudiado la relación entre el efecto de la edad del micelio del hongo y el momento en el que se adiciona el PCF, obteniéndose una degradación máxima cuando se agrega a las 48 h. Por otro lado, en estudios preliminares, se determinó que la adición de tirosina al medio de cultivo incrementa la eficiencia de degradación de PCF, lo que sugiere la posible presencia de una tirosinasa como la presunta responsable de dicha degradación (Cortés *et al.*, 2001; Tomasini *et al.*, 2001).

Se hicieron pruebas enzimáticas cualitativas para tratar de identificar las actividades Mn-peroxidasa y polifenoloxidasas (tirosinasa y lacasa) y se midió la actividad enzimática de

Li-peroxidasa. No se encontró actividad Li-peroxidasa ni Mn-peroxidasa significativa, pero se observó una importante actividad polifenoloxidasa, utilizando como sustrato el p-cresol (Tomasini *et al.*, 2001). En algunos otros trabajos se ha comprobado que las polifenoloxidasas pueden degradar compuestos fenólicos.

## 2.1 JUSTIFICACIÓN

### POTENCIAL DE APLICACIÓN DEL PROYECTO

El hecho de que los hongos filamentosos han mostrado tener capacidad para degradar compuestos tóxicos, aunado a sus características naturales de crecer en el suelo en condiciones estresantes y poder usar como fuente de carbono substratos baratos o incluso desechos (bagacillo de caña, paja, salvado de trigo, por ejemplo), hace de su empleo una vía prometedora para ayudar a resolver problemas de contaminación. Los hongos filamentosos pueden aplicarse en procesos tanto para biodegradar sustancias tóxicas provenientes de efluentes industriales como en biorremediación de suelos.

Por estas razones, es importante la búsqueda de microorganismos tolerantes a este tipo de compuestos que además puedan degradarlos en las condiciones naturales del proceso. Este es el caso de *Amylomyces rouxii*, que es un hongo que ha mostrado tener una buena eficiencia en la degradación del compuesto tóxico PCF (utilizado como modelo, debido a que los microorganismos capaces de degradarlo pueden degradar también otros tóxicos similares).

En estos estudios es, sin embargo, primordial conocer cuál o cuáles son las enzimas que participan en la degradación del PCF, para tener un mejor conocimiento de la posible vía metabólica utilizada y de los presumibles compuestos intermediarios formados. El conocimiento de estas enzimas, por otro lado, nos permitiría la posibilidad de utilizar los genes que las codifican para el mejoramiento genético de las cepas. El uso de otros genes que codifican para enzimas, ya conocidas, que participan eficientemente en este proceso, sería otra estrategia de mejoramiento. De esta forma, mediante la expresión heteróloga de estos genes, se buscaría incrementar la capacidad innata de degradación de PCF por parte de *Amylomyces rouxii*.

Nuestros estudios persiguen, pues, una caracterización más profunda de los procesos de degradación de PCF (y otros compuestos tóxicos, como los aromáticos clorados) en un microorganismo de uso potencial en biorremediación y la utilización de la biotecnología, en este caso en el área genética, para producir cepas mejoradas con ventajas prometedoras en los procesos mencionados.

### 3.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 3.1 HIPÓTESIS

Una fenoloxidasa, posiblemente una tirosinasa, es la enzima responsable de la degradación de PCF en *Amylomyces rouxii*. La expresión heteróloga de peroxidasas exógenas en dicho hongo puede mejorar el mecanismo de degradación del tóxico.

#### 3.2 OBJETIVOS

##### 3.2.1 Objetivo General

- ∅ Identificar la enzima responsable de la degradación de PCF en *Amylomyces rouxii* y determinar si la expresión heteróloga de Mn y Li peroxidasas incrementa la capacidad de degradación de dicho compuesto.

##### 3.2.2 Objetivos Particulares

- ∅ Establecer si es una polifenoloxidasa la enzima responsable de la degradación de PCF.
- ∅ Expresar los genes que codifican para las enzimas Mn y Li peroxidasas en *Amylomyces rouxii* y determinar si se incrementa la capacidad de degradación de PCF.

## 4.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 MICROORGANISMOS UTILIZADOS

#### 4.1.1 Cepas fúngicas.

##### *Amylomyces rouxii*:

Es un hongo filamentoso con el que se realizó la mayor parte del trabajo de Doctorado. Es una cepa aislada en el laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, a partir de un efluente de la industria del papel y capaz de tolerar la presencia del compuesto tóxico pentaclorofenol (PCF). A partir de la cepa original se aislaron, por gradiente de concentración del tóxico en placa, colonias resistentes al PCF en concentraciones de hasta 100 mg/L. Posteriormente se comprobó que dichas colonias, además de tolerar el compuesto también eran capaces de degradarlo en medio líquido.

Las características de tolerancia al PCF y degradación del mismo por parte de la cepa de *A. rouxii* parecían originalmente asociadas con la detección cualitativa de actividad fenoloxidasa en placa (Tomasini *et al.*, 2001), aunque la cepa carecía de las actividades Mn-P y Li-P, tradicionalmente reportadas en otros estudios (y otros hongos) como responsables de la degradación de este tipo de compuestos.

#### 4.1.2 Cepas bacterianas.

##### *Escherichia coli DH5 $\alpha$* (Hanahan, 1983):

Cepa utilizada en los experimentos de transformación bacteriana realizados. Posee una alta eficiencia (hasta  $5 \times 10^8$  transformantes por microgramo de ADN).

Entre sus características más útiles está la de poseer una delección en el gen Z del operón *lac*, que permite que se puedan seleccionar fácilmente con ella los transformantes que posean un plásmido capaz de originar la  $\alpha$ -complementación de dicha mutación.

GENOTIPO: *deoR*, *endA1*, *gyrA96*, *recA1*, *hsdR17* ( $r_k^-$ ,  $m_k^+$ ), *relA1*, *supE44*, *thi-1*,  $\Delta(lacZYA-argFV169)$  f80 $\delta lacZ\Delta M15F\lambda^-$ .

## 4.2 VECTORES

### 4.2.1 Vectores plasmídicos

#### **pBLUESCRIPT® (KS+):**

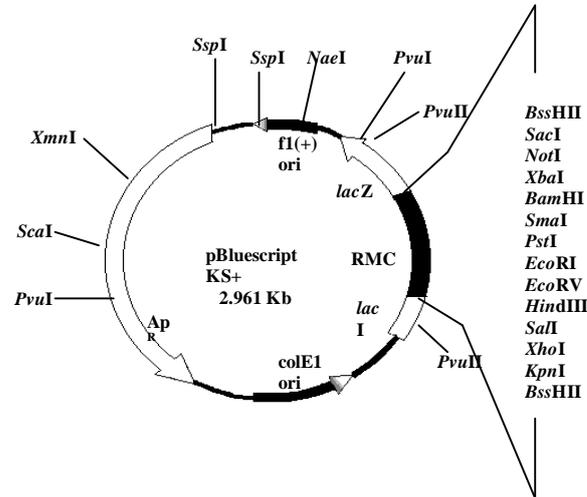
Plásmido derivado del pUC19, tiene un tamaño de 3 kpb, contiene un fragmento del gen *lacZ* (subunidad  $\alpha$ ) que complementa la mutación de la  $\beta$ -galactosidasa presente en algunas cepas de *E. coli*, permitiendo la selección de las transformantes en las que se ha integrado el plásmido mediante la aparición de color azul en presencia de IPTG (inductor del gen *lacZ*) y de X-gal (responsable de la coloración, al ser sustrato de la  $\beta$ -galactosidasa codificada por el mencionado gen *lacZ*). La inserción de un fragmento de ADN en la región múltiple de clonación del vector provoca la disrupción de la subunidad  $\alpha$  y la desaparición del color azul.

KS: indica un sitio múltiple de clonación orientado 5'-*KpnI*.....*SacI*-3' con respecto al extremo 5' del gen *lacZ*.

(+): indica que la cadena rescatada al obtener ADN de cadena sencilla es la codificante para el fragmento del gen *lacZ*.

Posee el origen de replicación *colE1* para *E. coli* del plásmido pBR322.

Posee un gen para resistencia a ampicilina como marcador de selección

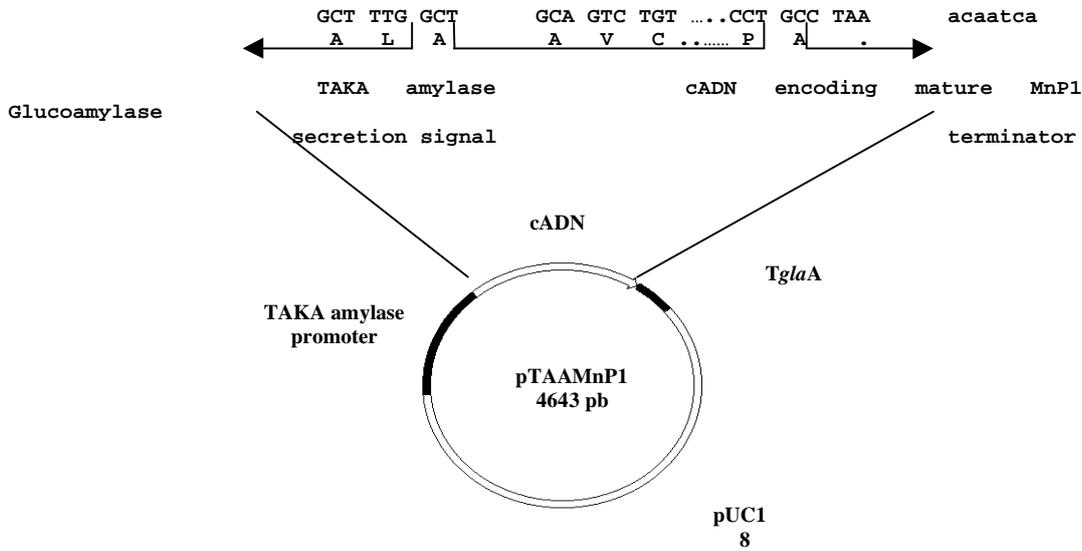


#### **p VE LipA (vector de expresión pVEL y clón genómico pCGL):**

-Plásmido derivado del pUC18, con una construcción que contiene el gen para la lignina peroxidasa de *Phanerochaete chrysosporium*, un promotor para la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y un terminador de *Aspergillus awamori*. Obtenido del Dr. Cullen, Universidad de Wisconsin, E.E.U.U.

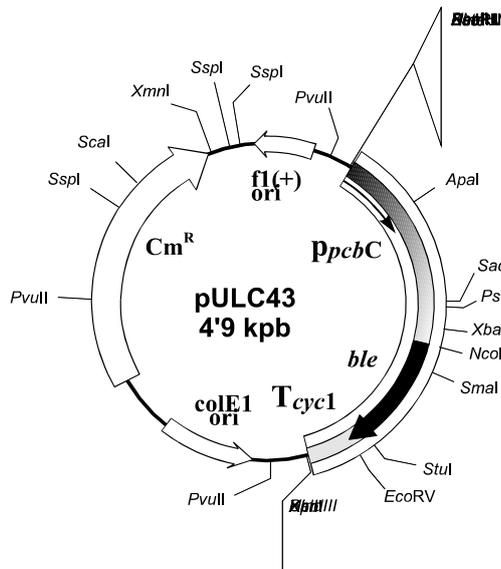
#### **pTAAMnP1 (vector de expresión pVEM y clón genómico pCGM):**

Vector de expresión derivado del pUC18. Contiene una construcción con el ADNc del gen para la manganeso peroxidasa (gen *mnp1*) de *P. chrysosporium*, un promotor para la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y un terminador de *Aspergillus awamori*. Obtenido del Dr. Cullen, Universidad de Wisconsin, E.E.U.U.



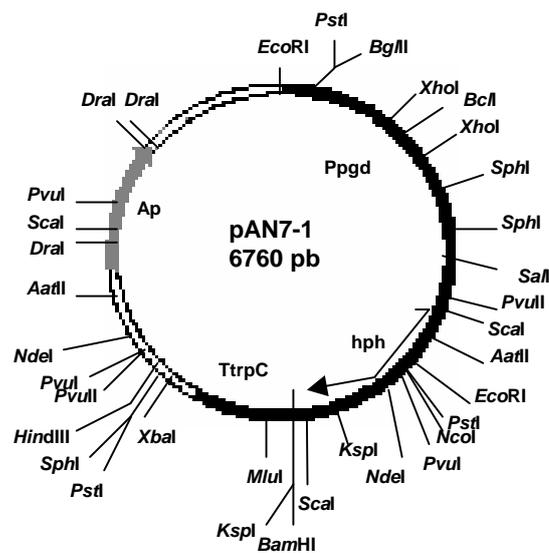
**pULC43:**

Plásmido de 4.9 kpb, contiene el gen para resistencia a fleomicina de *Streptoalloteichus hindustanus* expresado bajo control de las regiones promotoras del gen *pcbC* de *P. chrysogenum*. Contiene, asimismo, la región de terminación de la transcripción del gen *cyc1* de *Saccharomyces cerevisiae* y un gen para resistencia a cloranfenicol, como marcador de selección en procariontes.



**pAN7-1:**

Plásmido de 6.76 kpb que contiene el gen para resistencia a higromicina como marcador de selección para hongos y el gen para resistencia a ampicilina como marcador de selección en bacterias.



## 4.3 EQUIPO Y REACTIVOS

### 4.3.1 Reactivos para las fermentaciones

Los recursos económicos y materiales, así como los equipos necesarios para la realización del presente trabajo, fueron proporcionados por el Laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Los materiales utilizados fueron los comunes de laboratorio (material de vidrio y plástico, por ejemplo) y los reactivos los usados habitualmente para la realización de fermentaciones y técnicas analíticas: ácidos orgánicos, sales, colorantes, solventes y enzimas control (lacasa, tirosinasa, peroxidasa y enzimas hidrolíticas, por ejemplo). Los reactivos de Biología Molecular se describen por separado.

### 4.3.2 Reactivos para Biología Molecular

#### 4.3.2.1 Ácidos nucleicos

Se utilizó el ADN del bacteriófago  $\lambda$  (Invitrogene), como marcador del tamaño molecular para la electroforesis en geles de agarosa. Dicho ADN fue digerido con diferentes enzimas de restricción, como *EcoRI*, *PstI* ó *HindIII*, dependiendo del patrón de tamaños que se deseara.

En la técnica de hibridación se utilizó ADN de esperma de salmón (Invitrogene) desnaturalizado.

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizaron diferentes pares de oligonucleótidos como cebadores (*primers*) (MWG-Biotech):

Para tirosinasa

1.- 5'-ATA **GAA TTC** TTY CCI ACI TGG CAY AGI CCI TAY - 3'

2.- 5'-GCA **GAA TTC** RTG RTG IAR CCA RAA RAT DGG ATC - 3'

Para lacasa

1.- 5'-CGG **GAA TTC** CCH TAY TKB GAT TGG GCT TCH-3'

2.- 5'-CGC **GAA TTC** RTG RTG RAA CCA RAA RAG DGG-3'

Donde: R: A ó G, D: A ó G ó T, H: A ó C ó T, Y: C ó T, B: A ó C y K: A ó C ó G ó T.

#### 4.3.2.2 Antibióticos

Se utilizaron ampicilina y cloranfenicol para la amplificación de los plásmidos en *E. coli*. También se utilizaron higromicina (Sigma) y fleomicina (Cayla) para la transformación del hongo.

#### 4.3.2.3 Enzimas

En este trabajo las enzimas de restricción que se utilizaron fueron ***EcoRI***, ***HindIII***, ***PstI***, ***BamHI*** y ***SalI*** (Invitrogen).

Otras enzimas utilizadas fueron **ARNasa**, **ADN ligasa del fago T4** y, en la reacción de PCR, **Taq polimerasa** (Invitrogen).

#### **4.3.2.4 Isótopos radiactivos**

Se utilizó [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dCTP (100  $\mu\text{Ci}$  , NEN) para el marcaje de la sonda empleada en la técnica hibridación con el ADN del hongo.

#### **4.3.2.5 Sistemas comerciales para manipulación de ADN**

En su oportunidad, se utilizaron sistemas comerciales para realizar algunas de las reacciones, como:

Purificación de las bandas de ADN a partir de geles: QIAEX II Gel Extraction System (Qiagen)

Realización de minipreparaciones con una elevada concentración final de ADN puro: Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)

Purificación directa de fragmentos de ADN amplificados por PCR: Wizard<sup>®</sup> PCR Preps DNA Purification System (Promega)

#### **4.3.3 Equipo**

El equipo de laboratorio utilizado durante el presente trabajo se enlista a continuación:

- Autoclave
- Balanza analítica (Ohaus Corporation, Explorer)
- Baños con temperatura controlada (LAB-LINE AQUABATH)
- Bomba de vacío (Waters, Millipore)
- Cámaras de electroforesis (E-C Apparatus Corporation)
- Campana de seguridad química

- Campanas de flujo laminar (VECO, S.A de C.V.)
- Centrífugas refrigeradas (Beckman Avanti™ 30 y Eppendorf 5415R)
- Colector de fracciones (BIO-RAD)
- Congeladores de -20° y -80°C (REVCO y Forma scientific)
- Equipo de Electroforesis Capilar (Waters Quanta 4000)
- Analizador Capilar de Iones v 3.1
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) (Waters™)
- Equipo de filtración al vacío (Waters, Millipore)
- Espectrofotómetro (Shimadzu UV1201)
- Fuentes de poder PowerPac 300 (Bio-Rad)
- Horno de hibridación (Hybaid)
- Incubadoras (20°-40°C), con y sin agitación (LAB-LINE Instrument, INC)
- Liofilizadora (LABCONCO, FREEZE DRY SYSTEM LYPH.LOCK<sup>R</sup> 4.5)
- Microcentrífugas (Eppendorf 5415C)
- Microondas (Sanyo)
- Micropipetas (Gilson)
- Microscopio óptico (Olympus CH30)
- Parrillas con agitación magnética (Cimarec 2, Termoline)
- Potenciómetro (ORION 525<sup>a</sup>)
- Sistema de fotodocumentación GelDoc 2000 (Bio-Rad)
- Sistemas de purificación de agua Milli-Ro y Milli-Q (Millipore)
- Sonicador (Branson, 1210, Ultrasonics)
- Termociclador (Eppendorf Mastercycler Personal)
- Termo mezclador (Eppendorf modelo 5436)
- Transiluminador (UVP)
- Vórtex (Thermolyne Maxi Mix II 37600)

## 4.4 MEDIOS DE CULTIVO

### 4.4.1 Medios de cultivo para bacterias

**Medio Luria-Bertani (LB).**- Se utilizó para el crecimiento de *E. coli*

Bactotripton	10 g/L
NaCl	10g/L
Extracto de levadura	5g/L
pH	7.5

Cuando se necesitó usarlo en consistencia sólida (LA) se le adicionó agar bacteriológico al 2 % (p/v). Se esteriliza en autoclave.

En algunos experimentos, este medio fue adicionado con antibióticos como ampicilina y cloranfenicol a una concentración de 30 µg/mL

### 4.4.2 Medios de cultivo para hongos

#### **Agar de papa y dextrosa (PDA):**

Este es un medio comercial y fue utilizado para la propagación, esporulación y conservación de la cepa de *Amylomyces rouxii*, actividades necesarias para obtener el inóculo para las fermentaciones. La preparación del medio se realizó de acuerdo a lo especificado por el proveedor (Bioxon).

Se esterilizó en autoclave.

**Medio Melín-Norkrans (MN) modificado (Ainsworth, 1995; Villareal, 1996):**

Fue el medio utilizado para realizar las fermentaciones con el hongo.

Glucosa	10 g/L
Extracto de levadura	1 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.15 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g/L

Este medio se preparó en un litro de líquido, compuesto por un 50 % de agua destilada y un 50 % de amortiguador de citratos pH 5.5.

Se realizaron fermentaciones comparativas, adicionando tirosina y leucina al medio con una concentración de 0.1 g/L, para comparar los porcentajes de degradación.

Para la fermentación con las cepas de hongo transformadas se adicionó maltosa al 5% a la composición de este medio.

**Amortiguador de Citratos**

Ácido cítrico monohidratado 0.1 M	137 mL
Citrato de sodio 0.1 M	363 mL

Se lleva a 1 litro con agua destilada.

Se esterilizó en autoclave.

**Medio Mínimo (Antier *et al.* 1993) con Maltosa (MM-M):**

Este medio fue utilizado para inducir la expresión de los genes de peroxidasas (manganeso y lignina peroxidasas), en las transformantes de *Amylomyces rouxii*.

Maltosa	5 % (p/v)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.3 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1.13 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.75 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.30 g/L
Urea	0.25 g/L
CaCl <sub>2</sub>	0.30 g/L

Se esterilizó en autoclave.

**Medio PMY:**

Se usó para el crecimiento de micelio de los hongos, requerido para la extracción de ADN

Glucosa	40 g/L
NaNO <sub>3</sub>	3 g/L
Extracto de levadura	2 g/L
KCl	0.5 g/L
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.5 g/L
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.01 g/L
pH	6.0

Se esterilizó en autoclave.

**Medio Czapek:**

Se utilizó en las pruebas de sensibilidad basal a los antibióticos y en el crecimiento de las transformantes fúngicas.

Sacarosa	30 g/L
NaNO <sub>3</sub>	2 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g/L
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5 g/L
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01 g/L

Cuando se tuvo que utilizar en estado sólido se le adicionó agar bacteriológico al 2.5% (p/v). En caso de usarse para la regeneración de protoplastos de *A. rouxii* después de la transformación, se le adicionó sorbitol a una concentración 1 M como estabilizador osmótico.

Se esterilizó en autoclave.

**4.5 CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS****4.5.1 Crecimiento de *Escherichia coli***

Para el crecimiento de la bacteria *E. coli* se utilizaron los medios LA y LB dependiendo de si se requería sólido o líquido, con la adición o no de los antibióticos ampicilina y cloranfenicol (cuando se trataba de incubar colonias transformadas con algún plásmido que confiriera resistencia a alguno de esos dos antibióticos)

## **4.5.2 Crecimiento de *Amylomyces rouxii*.**

### **4.5.2.1 Condiciones de propagación**

Para la obtención de las esporas del hongo, se realizó la siguiente metodología:

El hongo se propagó en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio PDA por colocación de círculos de agar del mismo medio con micelio del hongo, conservados en glicerol al 40 %. Después de que los matraces fueron inoculados se incubaron durante 4 días a 30°C para obtener esporulación completa en los matraces. Se obtuvo una solución de esporas cosechando las esporas de los matraces con una solución de Tween 80 al 0.2% y un agitador magnético filtrando la solución resultante a través de gasa estéril. Esta solución se conservó en viales con glicerol al 40 %, a -20°C. Para obtener la concentración correcta de glicerol se colocaron en los viales 50% de la solución de esporas con Tween y 50% de glicerol al 80% (v/v).

A partir de esta solución de esporas se obtuvo el inóculo del hongo utilizado en las fermentaciones.

### **4.5.2.2 Diseño experimental**

Las unidades experimentales consistieron en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con 50 mL de medio de cultivo líquido Melin-Norkrans modificado (M-N), con y sin tirosina.

Inicialmente se usaron tres tipos de cultivo:

- 1.- Fermentación únicamente con medio de cultivo M-N
- 2.- Fermentación con medio de cultivo + PCF 12.5 mg/L
- 3.- Fermentación con medio de cultivo + tirosina (0.1 % p/v) + PCF (12.5 mg/L)

Se utilizaron 12 matraces para cada tipo de medio de cultivo, por duplicado. La fermentación se realizó durante 168 h en todos los casos y se tomaron muestras cada 24 h, a partir de las 48 h (que es el tiempo en que se agrega el PCF al medio, pues si se adiciona desde el principio no germinan las esporas) (Tomasini *et al.*, 2001).

La fermentación 1 se usó como control, para observar el efecto del medio de cultivo sobre la producción de tirosinasa. En la fermentación 2 pudo observarse la degradación del PCF y la inducción de la enzima por este compuesto y, finalmente, en la número 3, por comparación con la segunda se determinó el incremento en la degradación de PCF debido a la presencia de tirosina en el medio.

#### **4.5.2.3 Condiciones de fermentación líquida para la degradación de PCF.**

##### **4.5.2.3.1 Suspensión de esporas**

A partir de la suspensión de esporas obtenida en la primera propagación se inocularon 5 matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio PDA y se incubaron a 30°C durante 4 días para su esporulación total. Con una solución de Tween 80 al 0.2 % (v/v) y un agitador magnético estéril se recogieron las esporas de los matraces, haciendo girar el agitador sobre una parrilla de agitación. La solución concentrada de esporas se filtró a través de gasa estéril para separar restos de micelio y se pasó a un matraz limpio y estéril, donde se mantuvieron en agitación para asegurar la homogeneidad. La concentración de esporas se cuantificó por recuento en una cámara de Neubauer

Para determinar la degradación de PCF por *Amylomyces rouxii*, se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL estériles con 50 mL de los medios de cultivo mencionados en el apartado anterior (en el caso del medio adicionado con tirosina, ésta se agregó después de la esterilización, cuando el medio estuvo a una temperatura adecuada, 40°C aproximadamente). Se inocularon los medios con  $1 \times 10^6$  esporas del hongo por mL de medio, obtenidas en la forma anteriormente mencionada.

Los matraces se incubaron en una incubadora con agitación a 30°C y 125 rpm durante 48 h. Cumplido este tiempo se les adicionó, en una campana de flujo laminar, la cantidad adecuada de PCF para alcanzar una concentración de 12.5 mg/L del tóxico en cada matraz.

Se obtuvo una muestra a las 49 h, justo después de la adición del PCF y a continuación cada 24 h, hasta las 168 h. A cada matraz se le determinó la cantidad de biomasa, proteína total, concentración de PCF, actividad enzimática monofenolásica y presencia de cobre (prueba cualitativa).

También se hizo una fermentación con un aminoácido distinto de la tirosina, para determinar que la mayor actividad de degradación observada en los medios suplementados con tirosina no era debida al suplemento del medio con un aminoácido. El aminoácido usado con este fin fue la leucina, que estructuralmente es diferente a la tirosina ya que no tiene grupos fenólicos. Las fermentaciones se llevaron a cabo de la misma manera descrita anteriormente, sustituyendo la tirosina por leucina. En este caso solo se determinaron las cinéticas de producción de biomasa y de degradación del PCF.

### **4.5.3. Determinaciones analíticas**

#### **4.5.3.1 Determinación de biomasa**

En este proceso se usaron círculos de papel de filtro (Watman No. 1) numerados, llevados previamente a peso constante en una estufa a 65°C durante 24 h. Pasado este tiempo, se colocaron en un desecador donde se mantuvieron durante 15 minutos y posteriormente se registró su peso como el peso inicial.

La muestra obtenida de cada matraz (50 mL) fue filtrada a través del círculo de papel correspondiente, usando un embudo Buchner y un matraz Kitasato con ayuda de una bomba de vacío. Después, la biomasa obtenida en el embudo se coloca en tubos de ensayo con un amortiguador para extraer todo el PCF que se pudiera encontrar adherido al micelio.

Se vuelve a filtrar en el mismo papel, se lava perfectamente con agua destilada y se coloca en la estufa de 65°C, en las mismas condiciones utilizadas anteriormente. De esta forma se obtuvo un peso constante que se consideró como el peso final. La cantidad de biomasa obtenida en cada punto de la fermentación se calculó restando el peso inicial al peso final y multiplicándolo por 20 para tener la biomasa en unidades de gramos/ L.

#### **4.5.3.2 Determinación de PCF por HPLC**

Para esta determinación se utilizó un equipo de cromatografía líquida de alta presión (HPLC, Waters 600) con una columna de fase reversa C18 como fase estacionaria y una mezcla de acetonitrilo-ácido acético al 1 % (v/v) y agua-ácido acético al 1 % (v/v) como fase móvil. La fase móvil se filtró con vacío a través de membranas de 0.45 µm de tamaño de poro. Se utilizaron estándares de PCF con concentraciones de 1.25, 2.5, 5, 10, 12.5 y 25 mg/L, preparados con agua de calidad MilliQ 18Ω (Millipore).

Para la determinación, en primer lugar se recuperó el PCF presente en el extracto de fermentación de los matraces de cada muestra mediante filtración en papel de filtro (el usado en la determinación de biomasa, conservándose en esta ocasión el filtrado) y el retenido en las paredes fúngicas. Este último ensayo se realizó colocando la biomasa obtenida en tubos de ensayo con 25 mL de amortiguador de carbonatos pH 10.6, tratándose con ultrasonidos a continuación durante 25 minutos.

#### **Amortiguador de carbonatos**

Carbonato de sodio 0.1 M	42.5 mL
Bicarbonato de sodio 0.1 M	7.5 mL

Se lleva a 200 mL con agua destilada.

Después del tratamiento con ultrasonidos, la biomasa fue nuevamente filtrada en el papel de filtro y los extractos recuperados en este paso (junto con los recuperados en la primera extracción) fueron almacenados en tubos de ensayo con tapón de rosca, en refrigeración, hasta el momento del análisis. Antes de ser inyectados al HPLC, se colocaron 1.5 mL de cada una de las muestras en tubos Eppendorf de 2 mL de capacidad y se centrifugaron a 4°C durante 15 minutos a 12,000 rpm. Se filtraron los sobrenadantes a través de membranas de 0.45 µm de tamaño de poro y se inyectaron volúmenes de 20 µL al equipo de HPLC.

El tiempo de retención al cual se observó el pico correspondiente al PCF fue de 3.04 minutos aproximadamente. y la cuantificación del compuesto se realizó con ayuda del software Millennium 32 (Millipore).

#### **4.5.3.3 Determinación de la actividad monofenolásica**

Para tratar de determinar la actividad de la tirosinasa, se obtuvieron los extractos de las muestras de fermentación y se probó el método de Rodríguez-López *et al* (1994), usando un amortiguador de fosfatos pH 6.2, 3-metil-2-benzotiazolona hidrazona hidroclicorada (MBTH) como agente cromóforo, tirosina y PCF como sustratos, tirosinasa comercial (Sigma) como control positivo y peroxidasa de rábano y lacasa comerciales (Sigma) como controles negativos.

Con este método se obtuvo reacción enzimática favorable en el control positivo y no hubo reacción en los controles negativos, pero la reacción en las muestras fue muy lenta y no se pudo cuantificar. Por ello se decidió concentrar la muestra para obtener una reacción más rápida y buscar un nuevo método de cuantificación.

Después de obtener la muestra concentrada se midió la actividad tirosinasa en las muestras mediante el método de hidrazona de Besthorn (Mazzocco and Pefferri, 1976).

Éste es un método espectrofotométrico, en el que se usa una curva estándar con yodo en distintas concentraciones ( $1-8 \times 10^{-4}$  M) para oxidar el sustrato, que en este caso es el catecol 0.5 M. Como agente cromóforo se usa MBTH y la reacción se lleva a cabo en presencia de un amortiguador de fosfato-ácido cítrico 0.4 M, pH 4.2. La reacción se detiene con la adición de ácido sulfúrico concentrado y acetona, midiéndose la absorbancia en un espectrofotómetro a 495 nm. El volumen de reacción fue de 3 ml y el volumen total fue de 6 mL.

Las cantidades usadas para preparar la curva fueron:

Reactivo	Blanco (mL)	Muestra (mL)
Catecol	0.5	0.5
Amortiguador	1.5	1.0
MBTH	0.5	0.5
I <sub>2</sub> ( $1-8 \times 10^{-4}$ )	-	0.5
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5	0.5
Acetona	3	3

Para poder medir la actividad de las muestras y de los controles, se optimizó el método sustituyéndose el sustrato por otro más pertinente. Las nuevas condiciones alcanzadas se describen en el apartado de Resultados.

#### **4.5.3.3.1 Preparación de muestras mediante cromatografía de filtración en gel para la determinación de la actividad monofenolásica.**

Para poder determinar con mayor precisión la actividad enzimática presente en el extracto de las muestras de fermentación, se decidió utilizar una purificación parcial de las proteínas mediante el método de cromatografía de filtración en gel.

Este método puede darnos información adicional acerca del tamaño molecular de la proteína de interés por comparación con estándares de proteínas de tamaño conocido.

**Marcadores de tamaño molecular:**

Seroalbúmina bovina	66,000 Da
Anhidrasa carbónica	29,000 Da
Citocromo C	12,600 Da
Aprotinina	5,600 Da

Espacio vacío: se determinó con ayuda del azul de dextrano, que tiene un tamaño molecular de 2,000,000 Da.

La columna para realizar este método se preparó de la siguiente manera:

Las dimensiones de la columna fueron 2.5 x 70 cm, utilizando como soporte Sepharosa 6B. Para empacar la columna se calentó el gel a 40°C, mientras tanto se hizo una cama de lana de vidrio en el fondo de la columna y se desgasificó con agua destilada. Posteriormente se llenó la columna con un amortiguador que tiene la siguiente composición:

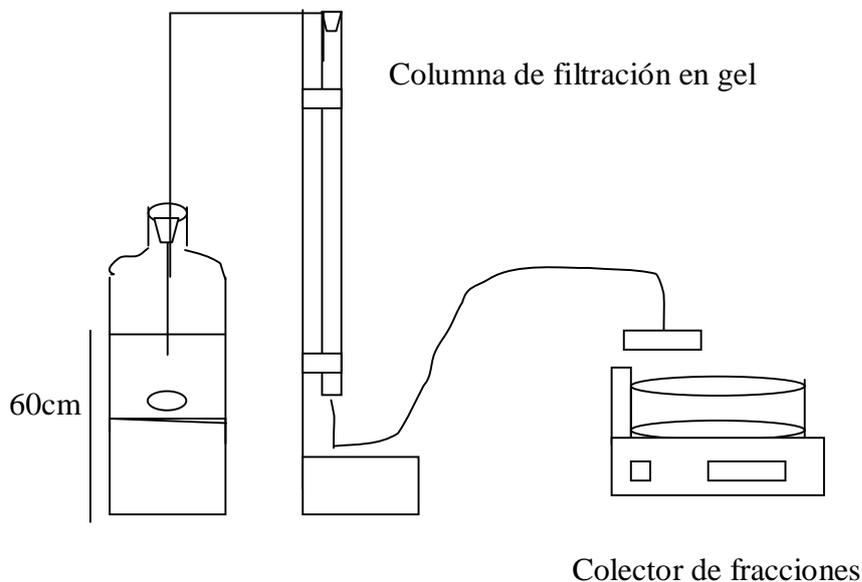
Compuesto	Concentración
NaCl	0.4 M
2-Mercapto Etanol	20 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.6 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	32.5 mM
Azida sódica	0.02 % (p/v)

Este amortiguador tiene un pH de 7.5 y una fuerza iónica ( $\mu$ ) de 0.5. Al llenar la columna con amortiguador se eliminaron las burbujas de aire, iniciándose a continuación el llenado con el gel. Se dejó pasar el amortiguador a través de la columna durante 2 días para estabilizar la matriz de cromatografía.

El recipiente que contiene el amortiguador fue colocado 60 cm por encima de la columna, para favorecer el flujo. El azul de dextrano, usado como el estándar de mayor tamaño molecular, se volvió denso con sacarosa a saturación y la aprotinina, el citocromo C, la anhidrasa carbónica y la seroalbúmina bovina se volvieron densos con glicerol al 5 % (v/v).

Los estándares y las muestras se colocaron en una proporción de 5 % del volumen total de la columna. Las muestras se agregaron eliminando el amortiguador de la parte superior y agregándose nuevamente amortiguador, de manera que quedaran dos fases.

Se colectaron fracciones de 6 mL a un flujo de 24 mL/h, fracciones que fueron analizadas en un espectrofotómetro con una longitud de onda de 280 nm.



#### **4.5.3.3.2 Determinación de la Actividad de tirosinasa**

El extracto obtenido de cada una de las muestras de fermentación líquida (como se indicó anteriormente) se adicionó con el inhibidor de proteasas Fluoruro de fenilsulfonil metano (PMSF, 10 mM) e inmediatamente se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se liofilizó. El extracto liofilizado (polvo) se resuspendió en 15 mL de amortiguador de citratos pH 5.5 y las proteínas se precipitaron con sulfato de amonio al 80 % (p/v) de saturación, a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ .

Posteriormente se centrifugó a  $4^{\circ}\text{C}$  y 5,000 rpm durante 20 minutos, se desechó el sobrenadante y las proteínas precipitadas se volvieron a resuspender en 15 mL del mismo amortiguador. Se colocó en una membrana de diálisis de 30,000 Da de tamaño de poro y se dializó durante 24 h a  $4^{\circ}\text{C}$  frente a agua destilada, cambiando el agua destilada tres veces durante la diálisis.

Después de dializar la muestra, se densificó con sacarosa y se introdujo a la columna de filtración en gel. Se obtuvieron fracciones de 6 mL y se leyeron en un espectrofotómetro, como ya se indicó en la descripción del método. Las fracciones que mostraron absorbancia a 280 nm se seleccionaron y se les determinó la actividad de tirosinasa (monofenolasa) por el método de Hidrazona de Besthorn (Mazzocco *et al.* 1976), en la forma descrita con anterioridad.

#### **4.5.3.4 Determinación de proteína total**

La concentración de proteína extracelular total de las muestras se determinó siguiendo el método de microensayo (colorante ligado a la proteína) de Bradford (Bradford, M., 1976). Es un método espectrofotométrico y se utilizó una curva estándar realizada con diluciones de una solución de seroalbúmina bovina con  $100\ \mu\text{g/mL}$ .

Curva patrón para la determinación de proteína por el método del colorante ligado a la proteína de Bradford.

Solución de seroalbúmina bovina (μl)	Agua destilada (μl)	Volumen del análisis (μl)	Concentración final de proteína por tubo. (μg/ml)
0	800	800	0
20	780	800	2
40	760	800	4
60	740	800	6
80	720	800	8
100	700	800	10
120	680	800	12

Cada dilución se realizó por triplicado. A cada tubo de la dilución correspondiente se le adicionaron 200 μl del reactivo de Bradford, se homogenizaron en un vórtex y se dejaron estabilizar durante 5 minutos, después de este tiempo se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro a 595 nm.

Se realizó la curva estándar para obtener los parámetros de la pendiente y la ordenada en el origen y se utilizó la ecuación de la recta

$$y = mx + b$$

Donde:

y = Absorbancia

x = Concentración de proteína

b = Ordenada en el origen

m = Pendiente de la recta

Sustituyendo los valores obtenidos en la ecuación tenemos:

$$y = 0.1772x + 0.1294$$

Con una  $r^2$  de 0.99

Con estos datos, al despejar  $x$  pudimos obtener la concentración de proteína de las muestras.

Para la determinación de la proteína total en las muestras, se agregaron 800  $\mu\text{L}$  del extracto de cada muestra en tubos de ensayo de 10 mL de capacidad, por triplicado, adicionándose a cada tubo 200  $\mu\text{L}$  del reactivo de Bradford. Posteriormente, se agitaron los tubos en un vórtex y después de 5 minutos se midió su absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

#### **4.5.3.5 Presencia de cobre**

La presencia de cobre en las muestras se determinó en un equipo de electroforesis capilar Waters Quanta 4000 con el Analizador Capilar de Iones v 3.1. Se usaron como electrolitos 4-metilbenzilamina 5 mM y ácido  $\alpha$ -hidroxiisobutírico (HIBA) 10 mM, un pH de 4.0 y un voltaje de 17.5 kV. El tiempo de retención del cobre fue de 10 minutos y se determinó a una longitud de onda de 214 nm.

#### **4.5.3.6 Pruebas de confirmación de la actividad de tirosinasa extracelular**

En estos experimentos se utilizaron enzimas comerciales como tirosinasa y lacasa (607 y 120 U/mL, respectivamente). Estas enzimas se adicionaron en solución al medio de cultivo con PCF para verificar la reacción de oxidación del compuesto y determinar la degradación mediante análisis en HPLC.

También se realizaron cultivos donde se filtró la biomasa del medio después de 48 h y el medio libre de biomasa fue adicionado con PCF. Después de 1 h, las muestras se procesaron para inyectarlas al HPLC y observar la degradación.

#### 4.6 OBTENCIÓN DE ADN DE *Amylomyces rouxii*.

En este punto se explica el procedimiento seguido para la extracción del ADN cromosómico de *Amylomyces rouxii*, iniciando desde el cultivo para la obtención del micelio del hongo.

Se inocularon en 100 mL del medio PMY  $1 \times 10^8$  esporas del hongo por mL de medio, y se incubaron durante 48 h a 30°C y 125 rpm. Después de este tiempo, se filtró el micelio a través de tela Nytal estéril y se lavó con 100 mL de solución fisiológica (NaCl estéril al 0.9 % (p/v)) y posteriormente con 100 mL de tampón A, que tiene la siguiente composición:

##### **Tampón A**

EDTA	100 mM pH 8.0
NaCl	150 mM
Tris-HCl	50 mM pH 8.0

Posteriormente al lavado, se eliminó la humedad con papel de filtro estéril, presionando sobre él la tela que contiene el micelio. Una vez retirado el exceso de líquido, el micelio se colocó en una caja de Petri desechable estéril, se congeló a -80°C durante 3-4 h o hasta conseguir la congelación total.

Cuando el micelio estaba congelado, se liofilizó hasta que estuvo lo suficientemente seco para obtener un polvo. Este polvo se consiguió pulverizando el micelio liofilizado en un mortero estéril. Con este polvo se llenaron tubos Eppendorf de 2 mL hasta aproximadamente una capacidad de 0.5 mL, conservándose a continuación a -20 °C hasta su uso.

La extracción del ADN se realiza a partir del polvo de micelio de los tubos, añadiendo en primer lugar 500 µL de tampón de ruptura.

**Tampón de ruptura**

EDTA	100 mM pH 8.0
SDS	1 % (p/v)
Tris-HCl	0.2 M pH 8.

Al agregar el tampón se mezcló con el polvo y se agregaron a continuación 500  $\mu$ L de fenol neutro y 500  $\mu$ L de una mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico (CIA). Se mezcló bien, de forma suavemente, y se incubó a 50°C durante 20 minutos, mezclando nuevamente pasados 10 minutos.

**Fenol Neutro**

Fenol ácido	4 volúmenes
Tris-HCl 1 M pH 8.0	1 volumen

Se mezclan los volúmenes mencionados por agitación y se mantiene la mezcla en reposo hasta que se separa la fase acuosa (superior) de la fenólica (inferior). Este fenol se conservó a 4°C en recipientes protegidos de la luz.

**CIA**

Cloroformo	24 volúmenes
Alcohol isoamílico	1 volumen

Después de la incubación se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos, a temperatura ambiente, y el contenido del tubo se separó en dos fases. Se extrajo la fase superior (acuosa) y se pasó a un tubo nuevo estéril, agregándosele nuevamente fenol y CIA en las mismas cantidades. Se mezcló y centrifugó en las mismas condiciones, repitiéndose este paso hasta obtener una interfase limpia.

A continuación se agregó CIA al mismo volumen de la fase superior, se mezcló y centrifugó y se extrajo la fase superior, que se colocó en otro tubo nuevo y estéril. Se le agregaron 0.7 volúmenes de isopropanol y se incubó a 4°C durante 2 días. Después de este tiempo se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se tiró el sobrenadante y al precipitado se le agregaron 700 µL de etanol al 70 % (v/v) para lavarlo. Finalmente se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos, se tiró el sobrenadante y al precipitado resultante se le eliminó el líquido, resuspendiéndose con 20 µL de agua destilada estéril a 4°C.

El ADN obtenido en este paso se encuentra aún mezclado con ARN, para eliminarlo se trató con ARNasa (100 µg/mL), incubándose a 37°C durante 90 minutos.

**ARNasa**

ARNasa	10 mg
Solución NaCl 15 mM y	
Tris-HCl 10 mM pH 7.5.	1 mL

Se mezclan los dos componentes y se hierve durante 15 minutos. Se deja enfriar a temperatura ambiente, se reparte en alícuotas y se conserva a -20°C.

Tras la incubación con ARNasa se agregó al tubo un volumen de fenol neutro, mezclándose y centrifugándose a temperatura ambiente y 14,000 rpm durante 5 minutos. Se extrajo la fase acuosa y se homogenizó con un volumen de fenol-CIA, se centrifugó en las mismas condiciones y se repitió este paso hasta obtener una interfase limpia.

Posteriormente se agregó un volumen de CIA, se mezcló y centrifugó, se extrajo la fase superior y se precipitó con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío a -20°C. Finalmente se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 minutos, se tiró el sobrenadante y se agregaron al precipitado 700 µL de etanol al 70 % (v/v), se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos, se tiró el sobrenadante, se eliminó el líquido residual en el precipitado y se resuspendió en 20 µL de agua destilada estéril a 4°C durante 24 h.

Este ADN se corrió en un gel de agarosa al 0.7 % (p/v) a 80 V, junto con un marcador de tamaño  $\lambda$ HindIII.

#### 4.7 ELECTROFORESIS DE ADN

Este método se realizó como lo reporta Sambrook *et al.*, (2001). En la electroforesis se utiliza la característica de que el ADN posee carga negativa neta por la presencia de grupos fosfato, pudiendo migrar a través de un gel hacia el polo positivo cuando se establece una corriente eléctrica. Se emplearon geles con concentraciones de agarosa (Promega) entre el 0.7 y el 1.5 % (p/v), disuelta en tampón TAE 1× por calentamiento en microondas y vertida para su gelificación en las cámaras del tamaño correspondiente.

La concentración de agarosa en los geles dependió del tamaño de las bandas de ADN que se deseaban separar.

#### TAE 50×

Ácido acético glacial	57.1 mL
EDTA 0.5 M pH 8.0	100 mL
Tris base	242 g
H <sub>2</sub> O destilada	hasta completar 1 L

Tamaño del fragmento de ADN	Concentración de agarosa (p/v)
900 pb	1.5 %
2 – 7 kpb	0.7 %

Las muestras de ADN se mezclaron con agua destilada estéril (para ajustar al volumen final) y un décimo de volumen final de tampón de carga concentrado.

A continuación se calentaron durante 5 minutos, enfriándose inmediatamente en un baño de hielo y agua durante 3 minutos.

La muestra fue cargada en los pocillos del gel y la electroforesis se llevó a cabo en tampón TAE, con la aplicación de una diferencia de potencial de 5 voltios/cm. La visualización del ADN se realizó tras teñir el gel con una solución de bromuro de etidio (BrEt) a una concentración de 0.5 µg/mL.

Este compuesto se intercala entre las cadenas de ADN y emite fluorescencia al ser irradiado con luz UV, lo que se llevó a cabo en un equipo de fotodocumentación Gel Doc II (Bio-Rad).

Los marcadores de tamaño usados fueron:

**1.- ADN del fago  $\lambda$  digerido con la enzima *HindIII*.**

Posee fragmentos con tamaños de 23,130, 9,416, 6,557, 4,361, 2,322, 2,027, 564 y 125 pb

**2.- ADN del fago  $\lambda$  digerido con la enzima *PstI*.**

Posee fragmentos con tamaños de 11,509, 5,080, 4,649, 4,505, 2,840, 2,577, 2,454, 2,443, 2,140, 1,980, 1,700, 805, 516, 467, 448, 339, 265, 247 y 210 pb.

**3.- ADN del fago  $\lambda$  digerido con la enzima *EcoRI*.**

Posee fragmentos con tamaños de 21,226, 7,421, 5,804, 5,643, 4,878 y 3,530.

#### **4.8 AMPLIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS pBluescript KS, pULC43, pAN7-1, pVEM, pCGM, pVEL y pCGL.**

El ADN de los plásmidos que se van a necesitar, se amplificó después de introducirlos por transformación en células competentes de la bacteria *E. coli* DH5 $\alpha$ . El procedimiento fue el siguiente:

Las células competentes de *E. coli*, que se conservan a -80°C, se descongelaron durante 5 minutos en un baño de agua con hielo. Posteriormente, en tubos Eppendorf nuevos y estériles se adicionaron 3  $\mu$ L del plásmido a amplificar y se mezclaron perfectamente con 100  $\mu$ L de la suspensión de células competentes. Se mantuvieron en el baño a 4°C durante 20 minutos, y después se introdujeron los tubos en un baño de agua a 42°C durante 45 segundos para favorecer la apertura de los poros de la membrana por choque térmico y realizar la introducción del plásmido al interior de las células. Se mantuvo nuevamente en el baño con hielo y agua durante 5 minutos más y posteriormente se le adicionaron 700  $\mu$ L de medio LB.

Se mezcló bien y los tubos se incubaron a 37°C y 250 rpm durante 45 minutos, para ayudar a las células a expresar el gen de resistencia al antibiótico contenido en los plásmidos antes de realizar la selección con el mismo. Simultáneamente, se prepararon cajas de Petri desechables y estériles con medio LA, al que se incorporó el antibiótico adecuado para el plásmido a amplificar.

Después de la incubación, una alícuota de la suspensión de células transformadas se inoculó en cada una de las cajas con LA-antibiótico y se esparció en toda la superficie con ayuda de una varilla de vidrio estéril. Las cajas con las células se dejaron secar dentro de la campana de flujo laminar y se cerraron y sellaron con Parafilm para incubarse a 37°C durante 12–16 h. Las cajas que presentaron crecimiento de colonias son las que poseen colonias transformantes con el plásmido deseado. Para comprobar la presencia del plásmido en las colonias de *E. coli* se seleccionaron y se sometieron a un tratamiento para aislar el ADN plasmídico de la bacteria.

#### 4.9 AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO DE *E. coli*

El método de las minipreparaciones se utiliza para obtener ADN plasmídico a pequeña escala y es una modificación del descrito por Holmes y Quigley (1981).

Se inició picando con un palillo estéril una de las colonias seleccionadas de *E. coli* y se inoculó en un tubo Eppendorf estéril con 1 mL de medio LB que contenía el antibiótico adecuado para mantener el plásmido dentro de la bacteria. Se incubó a 37°C y 250 rpm durante 12 h para permitir el crecimiento bacteriano. Pasado este tiempo los tubos se centrifugaron a 5,000 rpm durante 3 minutos para recoger las células, el precipitado obtenido, sin sobrenadante, se resuspendió en 350 µL de solución STET y se añadieron 10 µL de una solución de lisozima a una concentración de 10 mg/mL en agua.

#### STET

EDTA	50 mM pH 8.0
Sacarosa	8 % (p/v)
Tris-HCl	10 mM pH 8.0
Tritón X-100	0.5 % (v/v)

Esta solución se mezcla con el precipitado durante 30 segundos y los tubos se sumergen en agua en ebullición durante 45 segundos. Las proteínas, restos celulares y ADN cromosómico bacteriano se precipitan por centrifugación a 14,000 rpm durante 10 minutos y se retiran de los tubos con ayuda de palillos estériles. El ADN plasmídico queda en el sobrenadante y se precipita con 40 µL de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 600 µL de isopropanol (tras mezclar y mantenerse a temperatura ambiente durante 15 minutos). Después de este tiempo el ADN fue centrifugado a 14,000 rpm durante 5 minutos y el precipitado se lavó con etanol al 70 % (v/v).

El precipitado se secó y resuspendió en 30  $\mu$ L de agua destilada estéril. Se usaron 2  $\mu$ L del ADN de cada tubo para electroforesis en un gel de agarosa al 0.7 % (p/v), de forma que pudiera comprobarse la presencia de los plásmidos en las bacterias. Las colonias correspondientes a las muestras positivas se conservaron en glicerol al 20 % (v/v), a una temperatura de -20°C, para su disponibilidad posterior.

#### **4.10 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS (CEBADORES)**

En esta parte se buscaron las secuencias de nucleótidos correspondiente a genes de polifenoloxidasas (tirosinasas y lacasas) de otros microorganismos, tratando de que fueran lo más cercanos posible, desde el punto de vista evolutivo, al hongo que se utilizó en este trabajo.

Las secuencias de aminoácidos (codificadas por las secuencias de nucleótidos obtenidas anteriormente) se alinearon mediante el programa CLUSTAL (integrado en el paquete informático DNASTAR) para tratar de encontrar zonas o regiones conservadas que sirvieran para diseñar los oligonucleótidos que funcionaran como cebadores. El paso de la secuencia de aminoácidos seleccionada a ADN (la elección de los tripletes que correspondían a cada aminoácido) se realizó con el uso de codones específicos para *Rhizopus* (un basidiomiceto estrechamente emparentado con *Amylomyces* y del que hay mucha información en las bases de datos).

Los cebadores fueron utilizados para tratar de amplificar por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) un fragmento del gen para la enzima deseada de *Amylomyces*.

#### **4.11 REACCIÓN EN CADENA DE LA ADN POLIMERASA (PCR)**

Este es un método de amplificación de ADN (Saiki *et al.*, 1985; Mullis y Faloona, 1987). Se basa en el proceso de replicación normal del ADN, obteniéndose en cada ciclo el doble de las moléculas preexistentes.

Para realizar la amplificación de una secuencia específica se necesita una cadena de ADN a copiar, llamada “molde” o “diana”, y se utilizan oligonucleótidos cebadores diseñados con este fin, a partir de los que se da la amplificación.

El método se basa en la repetición de tres pasos consecutivos, bajo determinadas condiciones de temperatura.

El primer paso es la desnaturalización de las dos cadenas de “ADN molde”, mediante la incubación a temperaturas elevadas, en este caso 94°C durante 1 minuto.

El segundo paso consiste en la hibridación de los cebadores. Se usaron dos oligonucleótidos específicos para lacasa y dos para tirosinasa, que al unirse a secuencias de ADN delimitan la región que se desea amplificar.

La hibridación del ADN molde y los cebadores se favorece sobre la rehibridación de las dos cadenas del ADN molde por la alta concentración de los cebadores en la mezcla (notablemente mayor a la del ADN molde) (Fernández Perrino F. J. 1997). Las temperaturas usadas en este trabajo durante este paso fueron 45°C para lacasa y 58°C para tirosinasa.

Finalmente se realizó el paso de elongación de la secuencia, delimitada como ya se mencionó por los cebadores, lo que se llevó a cabo por medio de la enzima *Taq* ADN polimerasa, a una temperatura de 72°C (la temperatura óptima de esta enzima).

El conjunto de los tres pasos constituye un ciclo y, para tener cantidad adecuada de la secuencia amplificada, este ciclo se repitió 30 veces en ambos casos.

---

**La mezcla de reacción para los cebadores diseñados para el gen que codifica a la lacasa fue:**

H <sub>2</sub> O estéril	27 µl
Amortiguador 10× para Taq polimerasa comercial	5 µl
MgCl <sub>2</sub> [50 mM]	1.5 µl
Mezcla de nucleótidos dATP, dGTP, dCTP, dTTP [10 mM] cada uno.	2 µl
Cebador L1 20 µM	2 µl
Cebador L2 20 µM	2 µl
ADN molde [100 ng]	10 µl
Taq polimerasa (5 U/µL)	0.5 µl

**La mezcla de reacción para los cebadores diseñados para el gen que codifica a la tirosinasa fue:**

Volumen total de reacción 50 µL

H <sub>2</sub> O estéril	25.5 µl
Amortiguador 10× para Taq polimerasa comercial	5 µl
MgCl <sub>2</sub> [50 mM]	3 µl
Mezcla de nucleótidos dATP, dGTP, dCTP, dTTP [10 mM] de cada uno.	2 µl
Cebador TY1 20 µM	2 µl
Cebador TY2 20 µM	2 µl
ADN molde [100 ng]	10 µl
Taq polimerasa (5 U/µL)	0.5 µl

Las mezclas de reacción se llevaron a cabo en un baño de agua con hielo, se mezclaron con un vórtex, se centrifugaron y se introdujeron en un termociclador Eppendorf Mastercycler Personal, incubándose a 94°C durante 10 minutos. A partir de este tiempo se aplicaron los 30 ciclos en las condiciones de temperatura antes descritas.

El resultado de la reacción fue separado en un gel de agarosa al 1.5 % (p/v) para verificar la presencia del fragmento de ADN amplificado. La banda observada fue purificada de la mezcla de reacción por medio de un sistema (QIAEX II Gel Extraction System, Qiagen, E.U.A.)

#### **4.12 CLONACIÓN DEL FRAGMENTO DE PCR EN EL PLÁSMIDO**

##### **pBluescript KS+**

Para tener suficiente cantidad del fragmento obtenido por PCR, éste fue clonado en el plásmido pBluescript KS+. El fragmento posee en los extremos regiones de corte para la enzima de restricción *EcoRI*, que dejan extremos cohesivos compatibles con los extremos generados por la misma enzima en la región múltiple de clonaje del plásmido. Este hecho nos facilitó la ligación del producto de PCR con el plásmido.

En primer lugar se explicará cómo se realizaron las digestiones tanto del fragmento como del plásmido.

La enzima de restricción fue usada bajo las recomendaciones del proveedor, en las condiciones óptimas que éste marca. Por regla general, la enzima se utilizó en un décimo de volumen del volumen final de la mezcla de reacción, debido a la elevada concentración de glicerol con que se almacenan estas enzimas (lo que podría inhibir parcial o totalmente o alterar la especificidad de la reacción).

En dos tubos Eppendorf nuevos y estériles de 1.5 mL se mezclaron, por separado:

ADN del fragmento (100 µg disuelto en 50 µL)	15 µL
Amortiguador para <i>EcoRI</i> 10×	2 µL
H <sub>2</sub> Od	1 µL
ADN de pBluescript KS (500 µg disuelto en 80 µL)	10 µL
Amortiguador para <i>EcoRI</i> 10×	5 µL
H <sub>2</sub> Od	3 µL
<i>EcoRI</i> (10 U/µL)	2 µL

En ambos casos, el volumen final de reacción fue de 20 µL.

Realizada la mezcla se incubó a 37°C durante 3 h. Pasado este tiempo se verifica la digestión en un gel de agarosa al 1.5 y 0.7 % (v/v), respectivamente. Posteriormente se realizó el ensamblaje del fragmento con el plásmido, usando la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4.

La mezcla de reacción fue la siguiente:

ADN del plásmido	1 µL
ADN del fragmento	5 µL
Amortiguador para ADN ligasa T4 10×	1 µL
H <sub>2</sub> Od	2 µL
ADN ligasa T4 (5U/µL)	1 µL

Volumen final de reacción 10 µL

Esta mezcla se incubó a 15°C durante 12 h y la ligación se verificó en un gel de agarosa al 0.7 % (p/v).

El resultado se purificó del gel por medio del sistema comercial QIAEX II Gel Extraction System (Qiagen, E.U.A.), siguiendo las recomendaciones del proveedor y con el ADN recuperado se transformaron células competentes de *E. coli*, de la manera anteriormente descrita.

Posteriormente se procedió a la selección de colonias de bacteria con coloración blanca en cajas de Petri con LA y ampicilina (a la concentración ya indicada), IPTG (500 µg/mL) y X-gal (80 µg/mL). Al insertarse un fragmento de ADN extraño en el plásmido se inactiva el fenómeno de la  $\alpha$ -complementación de la  $\beta$ -galactosidasa de la bacteria. De esta forma, las bacterias que contienen un plásmido con inserto no poseen coloración azul en presencia de los compuestos mencionados.

Al igual que se explicó en el apartado anterior, se seleccionaron las transformantes obtenidas y se realizaron minipreparaciones para recuperar el ADN plasmídico, analizándose éste en un gel de agarosa para verificar que estuviera incluido en las colonias seleccionadas y que cumpliera con los requisitos de tamaño esperado.

Las colonias que resultaron transformantes fueron incubadas para amplificar el plásmido ligado con el fragmento de interés, en medio LB con ampicilina y se realizó el protocolo de aislamiento con el sistema de purificación Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), como lo indica el proveedor. La concentración del plásmido con el fragmento ligado obtenido fue de 500 µg/µL. Con este material se procedió al análisis de la secuencia de ADN del fragmento insertado, trabajo que fue llevado a cabo en el Instituto de Fisiología de la UNAM con un secuenciador automático (ABI-Prism)

#### **4.13 DETERMINACIÓN Y REDUCCIÓN DEL NÚMERO DE NÚCLEOS EN ESPORAS DE *Amylomyces rouxii*.**

*Amylomyces rouxii* es un hongo de tipo basidiomiceto, hongos caracterizados por su carácter cenocítico (sin una auténtica división entre sus células, lo que implica la existencia de un gran número de núcleos en las mismas). Las esporas de dichos hongos son también plurinucleadas, por lo que cualquier experimento de transformación de los mismos conlleva un alto riesgo de inestabilidad de las características adquiridas en las cepas transformantes y de eventual pérdida de las mismas a lo largo de las posteriores generaciones.

Por ello, fue necesario determinar el número de núcleos presentes en las esporas de la cepa a transformar y, en caso de ser posible, reducir el número de dichos núcleos sin afectar a la viabilidad de las esporas.

Esta determinación fue realizada por microscopía óptica, utilizando el colorante safranina para la tinción de los núcleos. Las preparaciones y tinción fueron realizadas en el laboratorio de histología de la Universidad Autónoma Chapingo, con la ayuda del Técnico Mario Venegas Peralta. Las esporas resultaron ser plurinucleadas, por lo que se llevó a cabo el método reportado por Necas and Gabriel, (1980) para la reducción de núcleos en esporas del hongo *Amylomyces rouxii*. Este método consiste en realizar pasos de congelación y descongelación, al final de cada uno de los cuales se realiza un muestreo de esporas que son fijadas en un portaobjetos y teñidas con safranina para ser observadas al microscopio y realizar el conteo de los núcleos.

#### **4.14 DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD BASAL DE *Amylomyces rouxii* A FLEOMICINA E HIGROMICINA.**

Es importante, cuando se quiere llevar a cabo una transformación, que se cuente con marcadores de selección efectivos para identificar las transformantes obtenidas.

Generalmente, estos marcadores se encuentran incluidos en los vectores o vehículos que se usarán en la transformación, junto con los genes que se desean conferir al microorganismo a transformar.

En este trabajo, los plásmidos que contienen los genes que se desean introducir en *A. rouxii* no poseen marcadores de selección para hongos, por tanto se realizó una cotransformación utilizando otros plásmidos que incluyeran dichos marcadores para seleccionar hongos transformados. Estos marcadores son genes de resistencia a dos antibióticos: higromicina y fleomicina, incluidos en los plásmidos pAN7-1 y pULC43, respectivamente.

Para poder utilizar estos plásmidos como marcadores de selección en primer lugar se determinó la sensibilidad basal de *A. rouxii* a cada uno de los antibióticos mencionados.

Se usaron concentraciones de 0, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 60, 100 y 200 µg/mL de cada antibiótico y se mezclaron con medio Czapek y las esporas del hongo hasta tener una homogenización total. Se vertieron sobre cajas de Petri desechables, se dejaron gelificar y se incubaron a 4°C durante una noche. Pasado este tiempo se incubaron a tres diferentes temperaturas 20, 25 y 30°C durante 5 días, tiempo en el que esporula completamente el control positivo (la cepa inoculada en medio sin antibiótico). Cada concentración de antibiótico fue probada por triplicado. El uso de distintas temperaturas se debe a la existencia de reportes previos acerca de la influencia de la temperatura sobre la sensibilidad de los hongos al marcador de selección (Austin *et al.*, 1990; Chevadhanarak *et al.*, 1991; Durand *et al.*, 1991).

#### 4.15 COTRANSFORMACIÓN DE *Amylomyces rouxii* CON LOS PLÁSMIDOS pULC43, pAN7-1 y pVEM, pCGM, pVEL, pCGL.

En este paso se realizó la transformación de *Amylomyces rouxii* con los vectores pVEM y pVEL, que contienen respectivamente los genes para la manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa de *Phanerochaete chrysosporium*, un promotor TAKA amilasa, una señal de secreción que se obtuvo del ADN genómico de *Aspergillus oryzae* y un terminador del gen glucoamilasa de *Aspergillus awamori* y con los plásmidos pCGM y pCGL que contienen, respectivamente, las secuencias genómicas de manganeso y lignina peroxidasa.

*Amylomyces rouxii* fue transformado utilizando protoplastos obtenidos a partir de las esporas del hongo, siguiendo el método descrito por Cantoral *et al.*, (1987) y Diez *et al.*, (1987), con alguna modificación (Fernández Perrino F.J. 1997)

El procedimiento fue el siguiente:

Se inocularon 100 mL de medio PMY con esporas de *A. rouxii* propagadas en matraces con PDA, incubándose durante 5 h a 30°C con una agitación de 200 rpm.

Las esporas fueron recuperadas por centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos y se lavaron con NaCl al 0.9 % (p/v), recuperándose por centrifugación en cada lavado.

El precipitado obtenido se resuspendió en 10 mL de tampón TPP y se mezcló en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con otros 10 mL de tampón TPP con 60 mg de enzimas líticas disueltas. La suspensión se incubó a 25°C durante dos horas a 100 rpm y se controló la liberación de protoplastos en el microscopio.

**Tampón TPP:**

KCl	0.7 M
Tampón de fosfato potásico	50 mM pH 5.8

Después de 3 h, los protoplastos fueron centrifugados durante 3 minutos a 2,500 rpm, el precipitado se lavó tres veces con 10 mL de tampón KCM, en cada lavado se recuperó el precipitado por centrifugación en las mismas condiciones.

**Tampón KCM:**

CaCl <sub>2</sub>	50 mM
KCl	0.7 M
MES	10 mM pH 5.8

Después del último lavado, los protoplastos se resuspendieron en 500 µL de KCM y se añadió 1/10 del volumen total de tampón PCM. Esta suspensión se mantuvo en un baño de agua con hielo hasta el momento de realizar la transformación.

**Tampón PCM:**

CaCl <sub>2</sub>	50 mM
MES	10 mM pH 5.8
PEG 8000	50 % (p/v)

Para realizar la transformación, en un tubo Eppendorf de 1.5 mL estéril se colocaron:

Suspensión de protoplastos	100 µL
ADN del plásmido pULC43 ó pAN7-1	10 µL
ADN del plásmido pVEM ó pCGM ó pVEL ó pCGL	20 µL

Se mezclaron con la pipeta y se mantuvo la mezcla en un baño con hielo durante 20 minutos. Posteriormente se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de tampón PCM, se mezcló perfectamente y se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 minutos. Por último se adicionaron 600  $\mu\text{L}$  de tampón KCM, se mezcló bien y se mantuvo a temperatura ambiente hasta el momento en que se extendió en las placas.

Simultáneamente se prepararon cajas de Petri desechables estériles con una base de 5 mL de medio Czapek/sorbitol adicionados con el antibiótico correspondiente para la combinación de plásmidos utilizados a una concentración de 200  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Ya solidificado el medio en las cajas se extendió sobre él la transformación en forma de cobertera, con la siguiente composición.

Mezcla de transformación	300 $\mu\text{L}$
Antibiótico (10 mg/mL)	100 $\mu\text{L}$
Medio Czapek/sorbitol a 45°C	5 mL

Se dejó solidificar la cobertera y las cajas fueron incubadas a 4°C durante 12 h y después durante 2 días a 20°C. En este experimento se incluyeron controles negativos y de regeneración de los protoplastos.

Los controles negativos consistieron en cajas de Petri con medio Czapek/sorbitol más el antibiótico correspondiente, inoculadas con los protoplastos del hongo sin transformar. Los controles de regeneración consistieron en cajas de Petri con medio Czapek/sorbitol sin antibiótico inoculadas con los protoplastos del hongo sin transformar.

Las colonias del hongo que aparecen en las cajas con medio Czapek /sorbitol con el antibiótico son consideradas transformantes con los plásmidos pULC43 y pAN7-1 (en teoría, si la cotransformación hubiera sido efectiva, deberían poseer también los plásmidos pVEM, pCGM ó pVEL, pCGL).

Para confirmar este extremo, se diseñó una segunda prueba de selección para las colonias transformadas que contuvieran los plásmidos pVEM, pCGM ó pVEL, pCGL

#### **4.16 SELECCIÓN DE TRANSFORMANTES DE *Amylomyces rouxii* CON pVEM, pCGM O pVEL, pCGL.**

La selección de transformantes con los plásmidos que contienen los genes de manganeso y lignina peroxidasa se llevó a cabo aprovechando la capacidad que han mostrado estas enzimas para decolorar el colorante polimérico Poly R-478 en un medio de reacción líquido reportado por Moredo *et al.*, (2003). En el presente trabajo se realizó la prueba de decoloración con las posibles transformantes usando el medio de reacción con el colorante modificado y con la adición de agar bacteriológico al 1 % para hacer una prueba cualitativa rápida.

Para realizar esta selección se inocularon esporas de las colonias previamente seleccionadas en cilindros de agar con medio mínimo con maltosa al 5 % durante 2 días a 30°C.

Los cilindros de agar con el micelio crecido se inocularon en cajas de Petri desechables estériles de 5.5 cm de diámetro, con un medio de reacción que contiene el colorante; la composición fue la siguiente:

##### **Para transformantes de pVEM ó pCGM**

Poly R-478 0.06 % (p/v)	50 µL
MnSO <sub>4</sub> 2 mM	125 µL
Tartrato de sodio 100 mM pH 4.5	1,000 µL
Agar bacteriológico al 2 % (p/v)	1,750 µL
H <sub>2</sub> O	2,075 µL

El volumen final de reacción fue de 5 mL.

**Para transformantes de pVEL ó pCGL.**

Poly R-478 0.06 % (p/v)	50 µL
Alcohol veratrílico 4 mM	125 µL
Tartrato de sodio 100 mM pH 3.0	1,000 µL
Agar bacteriológico al 2 % (p/v)	1,750 µL
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	2,075 µL

El volumen final de reacción fue de 5 mL.

Antes de colocar los cilindros con el micelio sobre las cajas ya solidificadas, se agregaron 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.4 % (v/v) para iniciar la reacción, extendiéndolo sobre la superficie de la caja y retirando el excedente. Inmediatamente después se colocaron los cilindros de agar con micelio, se cerraron las cajas y se envolvieron con papel de aluminio para incubarlas en condiciones de oscuridad durante 2 días a 30°C.

Para validar esta técnica se utilizaron como control positivo cilindros de agar con micelio de *Phanerochaete chrysosporium*, conocido productor de estas enzimas, y como control negativo se utilizaron cilindros de agar con micelio de la cepa parental de *Amylomyces rouxii*.

A las colonias correspondientes a los micelios de los cilindros que mostraron halos de decoloración en las cajas se les midió la decoloración en el medio de reacción líquido para estimar su actividad peroxidasa, usando como estándar la enzima comercial peroxidasa de rábano (Sigma).

---

---

**Mezcla de reacción para elaborar la curva de actividad-decoloración con MnSO<sub>4</sub> como sustrato para la Mn peroxidasa:**

Poly R-478 0.03 % (p/v)	100 µL
MnSO <sub>4</sub> 2 mM	50 µL
Tartrato de sodio 100 mM pH 4.5	100 µL
H <sub>2</sub> O d	750, 749, 748, 746, 744, 742, 740 µL
Solución de enzima (2 U) 1 mg/mL	0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 µL

El volumen final de reacción fue de 1 mL.

**Mezcla de reacción para elaborar la curva de actividad-decoloración con alcohol veratrílico como sustrato para Li-peroxidasa:**

Poly R-478 0.03 % (p/v)	100 µL
Alcohol veratrílico 4 mM	50 µL
Tartrato de sodio 100 mM pH 3.0	100 µL
H <sub>2</sub> O d	750, 749, 748, 746, 744, 742, 740 µL
Solución de enzima (2 U) 1 mg/mL	0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 µL

El volumen final de reacción fue de 1 mL.

Al momento de iniciar la estimación de la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 520 nm se adicionaron 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.4 % (v/v), se mezcló con la pipeta y se tomó la lectura inicial y la final al cabo de 5 minutos.

El porcentaje de decoloración se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\% D = 100 (Abs_{ini} - Abs_{fin}) / Abs_{ini}$$

En las siguientes tablas se muestra la relación entre decoloración y unidades de enzima, para estimar la actividad enzimática.

### Para Mn-peroxidasa

Volumen de enzima ( $\mu$ l)	U/mL de enzima	% de decoloración
0	0	0
1	0.2	1.166
2	0.4	1.657
4	0.8	2.194
6	1.2	2.540
8	1.6	2.631
10	2	2.857

La ecuación para interpolar el porcentaje de decoloración y relacionarlo con las unidades de actividad es:

$$U \text{ de act. de Mn peroxidasa} = (\%D - 0.7874) / 1.215$$

Con una  $r^2 = 0.897$

**Para Li-peroxidasa**

Volumen de enzima ( $\mu$ l)	U/mL de enzima	% de decoloración
0	0	0
1	0.2	1.006
2	0.4	1.042
4	0.8	1.415
6	1.2	1.755
8	1.6	2.013
10	2	2.326

La ecuación para interpolar el porcentaje de decoloración y relacionarlo con las unidades de actividad es:

$$U \text{ de act. de Li peroxidasa} = (\%D - 0.50193) / 0.97475$$

Con una  $r^2 = 0.9408$

Después de obtener las curvas se probaron las colonias transformantes que dieron halos de decoloración más grandes en la prueba anterior. Para estimar su actividad estas colonias se incubaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 25 mL de medio mínimo con maltosa al 5%, inoculados con  $1 \times 10^6$  esp/ml, se incubaron a 30°C y 125 rpm durante 48 h. Estas pruebas se realizaron por duplicado.

Después de estos dos días se filtraron a través de círculos de papel filtro Whatman no. 1 y el extracto fue centrifugado a 4°C en tubos Eppendorf de 1.5 mL.

El sobrenadante obtenido se probó con las mezclas de reacción anteriores dependiendo de si era una colonia transformada con el plásmido pVEM o pVEL, usando como volumen final de la reacción 2 mL y realizando la corrección en los cálculos de la curva, realizados para 1 mL. La enzima se conservó a -20°C.

Las colonias que dieron actividad en esta prueba se probaron en fermentación líquida para determinar su capacidad de degradación del PCF.

#### **4.17 CONDICIONES DE FERMENTACIÓN LÍQUIDA PARA LA DEGRADACIÓN DE PCF POR LAS CEPAS TRANSFORMANTES**

Estas fermentaciones se realizaron utilizando los dos medios de cultivo descritos al inicio de este capítulo, medio Melín-Norkrans modificado y medio mínimo, ambos adicionados con maltosa al 5 % para inducir la expresión de los genes de peroxidasa incluidos en las cepas transformantes de *A. rouxii* a partir de los promotores de TAKA amilasa.

La fermentación se realizó de la misma manera en que se describe previamente para la cepa original, tomando muestras por duplicado hasta las 144 h y adicionando el PCF a las 48 h de incubación de las esporas de las cepas.

Las pruebas analíticas realizadas en estas fermentaciones sólo fueron las cinéticas de biomasa y de degradación de PCF.

#### **4.18 EXTRACCIÓN DE ADN DE LAS CEPAS TRANSFORMANTES**

La extracción de ADN de las cepas transformantes se realizó de igual manera que se hizo la extracción para la cepa original.

Este ADN se utilizó para realizar una transferencia de Southern y una posterior hibridación con el plásmido pVEM como sonda para corroborar la integración del ADN en las cepas.

#### **4.19 DIGESTIÓN DE ADN TOTAL DE *Amylomyces rouxii* Y DE LAS CEPAS TRANSFORMANTES**

Para realizar la transferencia de Southern con el ADN del hongo parental y el ADN de las cepas transformantes, se realizaron digestiones de los ADN totales de dichas cepas con la enzima de restricción *EcoRI*.

Las digestiones se realizaron como se describió anteriormente, las mezclas de reacción fueron:

En un tubo Eppendorf de 1.5 mL se mezclaron:

ADN total	5 $\mu$ L
Amortiguador para <i>EcoRI</i>	3 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	20 $\mu$ L
<i>EcoRI</i>	2 $\mu$ L

El volumen final de la mezcla de reacción fue de 30  $\mu$ l

Estas mezclas se incubaron a 37°C, ya que es la temperatura que marcan los proveedores para esta enzima, durante 3 h. Pasado este tiempo se comprobaron las digestiones por electroforesis en un gel de agarosa al 0.7 % (p/v).

Las digestiones totales del ADN extraído de dos cepas transformantes, y de la cepa original, usada como control negativo, con la enzima de restricción *EcoRI*, se sometieron a electroforesis junto con el plásmido pVEM linearizado con la misma enzima y un marcador de tamaño  $\lambda$  *EcoRI*.

#### **4.20 TRANSFERENCIA DE SOUTHERN DEL ADN DE LAS CEPAS TRANSFORMANTES**

Este método consiste básicamente en la transferencia de fragmentos de ADN, obtenidos por digestión con enzimas de restricción y sometidos a migración por electroforesis en un gel de agarosa, a un soporte sólido (que en este caso fue una membrana de nylon). El procedimiento fue el siguiente:

Se realizó la electroforesis de las digestiones de ADN total de *A. rouxii*, el gel se tiñó y se fotografió como se hace rutinariamente. Posteriormente el gel se trató con una solución de HCl 0.25 N durante 15 minutos, con agitación moderada y a continuación se lavó repetidas veces con agua destilada estéril.

A continuación se sumergió en una solución desnaturalizante durante 30 minutos, con agitación moderada, se lavó nuevamente con agua en las mismas condiciones anteriores y en un paso posterior se sumergió en una solución neutralizante durante otros 30 minutos. Por último se lava otra vez, para eliminar los residuos de la última solución.

##### **Solución desnaturalizante:**

NaCl	1.5 M
NaOH	0.5 M

**Solución neutralizante:**

NaCl	3 M
Tris-HCl	1 M pH 7.5

Simultáneamente a que se realiza el protocolo anterior, se prepara un taco de papeles absorbentes de las mismas dimensiones que el gel y de unos 5 cm de grosor sobre un recipiente limpio y sobre él se colocan dos láminas de papel de filtro Whatman 3 MM (también del mismo tamaño que el gel), previamente humedecidas en el tampón de transferencia.

**Tampón de transferencia:****SSC 10×**

Citrato trisódico	0.15 M
NaCl	1.5 M
pH 7.0, ajustado con NaOH	

Se coloca el gel ya tratado sobre las láminas del papel de filtro y sobre él se pone la membrana de nylon (de un centímetro mayor en anchura que el gel) previamente humedecida en agua destilada estéril y en el tampón de transferencia. Deben eliminarse con una varilla de vidrio limpia las posibles burbujas que pudieran formarse entre los papeles porque interferirían en la transferencia. Sobre la membrana se colocaron otras dos láminas de papel Whatman humedecidas en el tampón de transferencia (del mismo tamaño que el gel) y sobre ellas se coloca otro taco de papel absorbente de unos 7 cm de grosor. Sobre todo este sistema se colocó un cuadro de vidrio y sobre él un objeto de 500 g de peso, aproximadamente. Se añadió el tampón de transferencia al recipiente hasta casi alcanzar el límite superior del taco de papel inferior y se mantuvo en reposo durante 12 -14 h.

Transcurrido este tiempo se marcó la posición de los pocillos del gel en la membrana y ésta se lavó cuidadosamente en una solución de SSC 5×. Se dejó secar la membrana sobre un filtro de papel y se fijó covalentemente el ADN mediante irradiación con luz ultravioleta durante 4.5 minutos.

#### **4.21 HIBRIDACIÓN DE LA SONDA pVEM CON EL ADN DIGERIDO DE LAS CEPAS TRANSFORMANTES Y AUTORRADIOGRAFÍA**

En este paso del trabajo se utilizó el plásmido pVEM como sonda para hibridarlo con el ADN del hongo nativo y el de dos cepas transformantes, fijado en la membrana de nylon. Primero se realizó una prehibridación para bloquear los sitios activos del filtro donde no se había unido ADN en la transferencia (y que podrían unir de forma inespecífica los fragmentos de ADN utilizados como sonda) al mismo tiempo que sirve para equilibrar la membrana con el tampón de hibridación. Se introdujo la membrana en un tubo de hibridación y se añadió el tampón de hibridación junto con el ADN de esperma de salmón desnaturalizado a una concentración final de 150 µg/mL. Se usaron 100 µL de tampón de hibridación por cm<sup>2</sup> de membrana. El tubo se incubó a 42°C durante 12 h.

##### **ADN de esperma de salmón:**

ADN de esperma de salmón tipo III	1 g
NaOH 0.3N	50 mL

Se mezcla durante 2-3 h a temperatura ambiente. Se calienta a 80°C durante 2 h y se añaden

Tris-HCl 1 M pH 8.0	0.5 mL
EDTA 0.5 M pH 8.0	1 mL
TE	50 mL

Se ajustó el pH a 7.0 con HCl concentrado. Se trató con fenol neutro y se precipitó con etanol a -20°C. Se centrifugó y resuspendió el precipitado en el volumen de TE necesario para tener una concentración de 10 mg/mL.

**Tampón de hibridación:**

Denhardt`s	1×
Formamida	40 % (v/v)
Glicina	1 % (p/v)
SSC	5×
Tampón de fosfato sódico	50 mM pH 6.5.

**Denhardt´s 100×**

BSA	2 % (p/v)
Ficoll	2 % (p/v)
Polivinilpirrolidona	2 % (p/v)

Se disuelve en agua destilada estéril sin calentar. Se conserva a -20°C.

Para la hibridación se desechó el tampón de prehibridación contenido en el tubo donde se tenía la membrana y se adicionó nuevo tampón, también con ADN de esperma de salmón pero a una concentración de 30 µg/mL. En este nuevo tampón se añadió la sonda, marcada radiactivamente por el método de “desplazamiento de mella” (Nick-Translation System, Invitrogen), purificada y desnaturalizada. Se tapó el tubo y se incubó a 42°C durante 24 h.

Tras la hibridación se procedió al lavado de la membrana (de forma que se eliminara la hibridación inespecífica). El primer lavado se realizó con el tampón de lavado I, durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Se desechó el líquido en un recipiente especial para desechos radiactivos y se lavó a continuación con el tampón de lavado II durante 15 minutos a 42°C. Fue necesario realizar dos lavados más con este tampón, monitoreándose la radiactividad presente sobre la membrana por medio de un contador Geiger-Muller. Finalmente se expuso la membrana a un film en un estuche con pantallas intensificadoras, a -20°C durante 7 días.

## 5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en los experimentos realizados a lo largo del trabajo de Doctorado, iniciando con las técnicas de cuantificación y puesta a punto de los métodos necesarios para realizar nuestro estudio y con los resultados cinéticos comparativos de las cepas fúngicas evaluadas.

### 5.1 DETERMINACIÓN DE PCF POR HPLC

Para determinar el PCF por HPLC se necesitó encontrar la proporción de la fase móvil a la cual el tiempo de retención fuera óptimo (evaluado en función de la mejor resolución posible del pico de interés). Para encontrar esta proporción, se hizo un barrido desde 50:50 hasta 80:20 (acetonitrilo-ácido acético al 1%: agua-ácido acético al 1%), pasando por mezclas 55:45, 60:40, 65:35, 70:30 y 75:25. En esta prueba se encontró que la proporción más apropiada era **75:25**, debido a que con ella se obtuvo la mayor definición del pico de PCF. El tiempo de retención al cual se detectó el pico del compuesto fue de 3.04 minutos.

También se determinó que para una mejor cuantificación del PCF las muestras deberían inyectarse a un pH igual al de los estándares, ya que al inyectarse las muestras directamente de la fermentación (con el pH original) se apreciaron variaciones significativas en la concentración del compuesto cuantificada.

El valor de pH al que se inyectaron las muestras fue de **7**, teniendo cuidado de ser muy precisos al ajustarlo y evitar agregar demasiado HCl ó NaOH, ya que en estos extremos también se apreció variación en el tamaño del pico y, consecuentemente, una mala cuantificación. Además, el uso de un valor de pH adecuado ayuda a conservar en buenas condiciones la columna durante más tiempo (la columna que se usó tiene un pH óptimo de 3.5-7.5).

---

## 5.2 PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO PARA MEDIR ACTIVIDAD TIROSINASA.

Se hicieron fermentaciones líquidas para obtener muestra y poder probar un método de determinación de la actividad tirosinasa,. Se obtuvo el extracto de las muestras y se probó el método de Rodríguez-López *et al.* (1994), usando un amortiguador de fosfatos pH 6.2, 3-metil-2-benzotiazolona hidrazona hidroclicorada (MBTH) como agente cromóforo, tirosina y PCF como sustratos, tirosinasa comercial como control positivo y peroxidasa de rábano y lacasa comerciales como controles negativos.

Con este método se obtuvo reacción enzimática en el control positivo y no hubo reacción en los controles negativos, pero la reacción enzimática de las muestras fue muy lenta y no se pudo cuantificar. Por ello se decidió concentrar la muestra para obtener una reacción más rápida y buscar un nuevo método de cuantificación más sencillo.

Después de obtener la muestra concentrada, se midió la actividad tirosinasa de las muestras mediante el método de la hidrazona de Besthorn (Mazzocco and Pefferi, 1976). Éste es un método espectrofotométrico, en el que se usa una curva estándar con yodo, en distintas concentraciones ( $1-8 \times 10^{-4}$  M), para oxidar el sustrato, que en este caso es el catecol 0.5 M, usando como agente cromóforo la MBTH. La reacción se lleva a cabo en presencia de un amortiguador de fosfato cítrico 0.4 M, pH 4.2 y se detiene con ácido sulfúrico concentrado y acetona. Una vez parada la reacción se mide la absorbancia en un espectrofotómetro a 495 nm de longitud de onda.

Las cantidades usadas para preparar la curva se describen en la sección de materiales y métodos. El volumen de reacción fue de 6 mL. Para medir la actividad de las muestras y de los controles se sustituyó el sustrato catecol por fenol 0.5 M y el I<sub>2</sub> por el extracto enzimático o la enzima comercial, según el caso. En todos los casos, tanto para la elaboración de la curva como para las muestras la reacción se dejó durante 1 minuto, después del cual se agregaron primeramente el ácido y a continuación la acetona.

Al igual que en el método anteriormente descrito, se usaron una tirosinasa comercial como control positivo y una lacasa y una peroxidasa de rábano comerciales como controles negativos.

Con este método se pudo cuantificar la actividad de las muestras, obteniéndose mayor intensidad de color con el control positivo y ausencia de color con los controles negativos. De la curva estándar se obtuvo la ecuación:

$$Y = 0.754 X - 0.0099$$

**Donde Y = Absorbancia a 495 nm**

**X = Concentración de la enzima**

Si consideramos que la absorbancia a 495 nm para 1  $\mu\text{mol}$  de enzima es 0.754 en 1 minuto, se puede saber la concentración de las muestras en un minuto haciendo la siguiente relación:

$$0.754 - 1 \mu\text{mol}$$

$$Y - X$$

El resultado se multiplica por dos para obtener las unidades de actividad por mililitro. Se definió **unidad de actividad** como la cantidad de enzima capaz de producir 1  $\mu\text{mol}$  de quinona por minuto.

### **5.3 PRESENCIA DE COBRE**

Para confirmar en mayor medida los datos previos, en esta parte del trabajo se determinó la presencia de cobre en las fracciones obtenidas a partir de una cromatografía de filtración en gel, más concretamente, a las fracciones en las que se determinó la presencia de proteína (por lectura en espectrofotómetro a 280 nm) y actividad monofenolasa.

La determinación de la presencia de cobre en estas fracciones fue cualitativa, realizándose en un sistema de electroforesis capilar. La presencia de cobre en la fracción donde se obtuvo actividad monofenolasa nos arroja evidencia adicional de que la enzima analizada es una fenoloxidasa (lacasa o tirosinasa), ya que las peroxidasas no presentan cobre en su molécula.

#### **5.4 CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL Y DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LA ENZIMA.**

En este apartado se muestran los resultados obtenidos en la cromatografía de filtración en gel. Se utilizó tirosinasa comercial como control positivo, encontrándose que su peso molecular fue de 40 kDa.

Se muestran a continuación los gráficos obtenidos tanto para los estándares como para la enzima comercial y las muestras.

Los estándares usados fueron los siguientes:

Seroalbúmina bovina	66,000 Da
Anhidrasa carbónica	29,000 Da
Citocromo C	12,600 Da
Aprotinina	5,600 Da

El espacio vacío se determinó con azul de dextrano, que tiene un peso molecular de 2,000,000 Da.

Los estándares se inyectaron a la columna (100  $\mu$ L) con un flujo de 24 mL/h y se recuperaron 1.5 mL por fracción, obteniéndose los siguientes patrones:

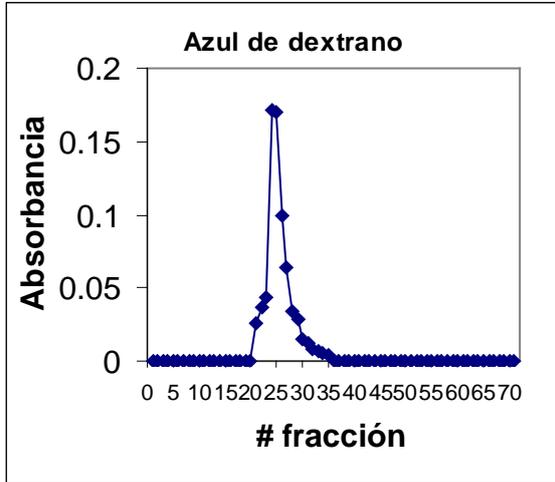


Gráfico 1.- Perfil correspondiente al espacio vacío (azul de dextrano)

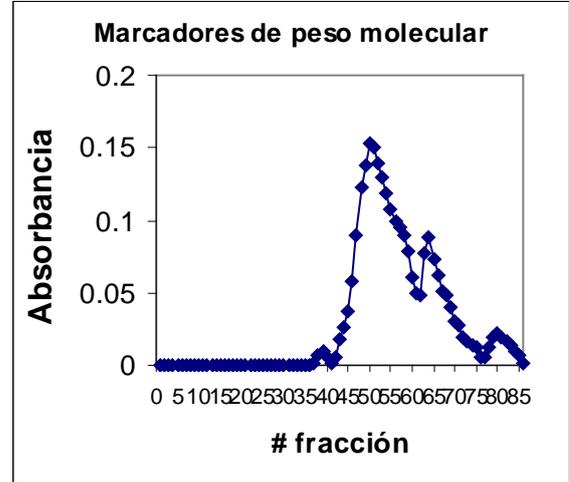


Gráfico 2.- Perfil correspondiente a los marcadores de peso molecular.

En estos gráficos se muestran los perfiles obtenidos a partir de los valores de absorbancia de las fracciones correspondientes al espacio vacío y a los marcadores de peso molecular. En este último caso los picos aparecen de manera ascendente en el número de fracción, de acuerdo al peso molecular ascendente de los estándares.

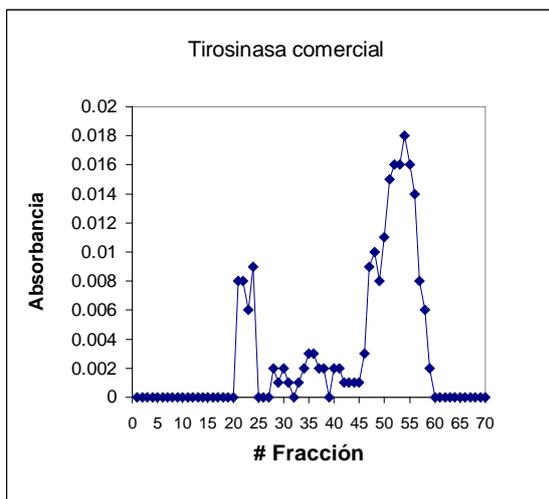


Gráfico 3.- Perfil de filtración en gel de la tirosinasa comercial

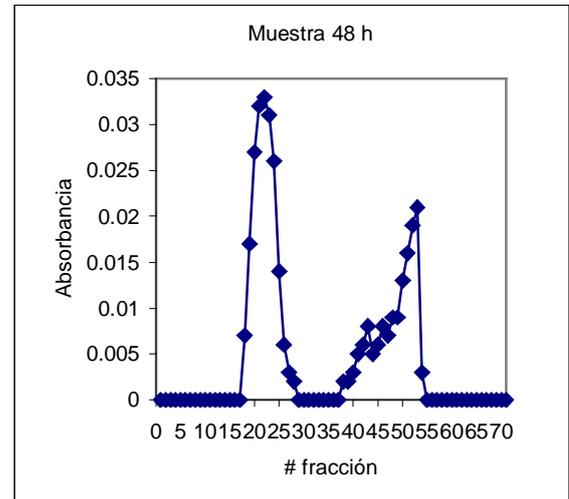
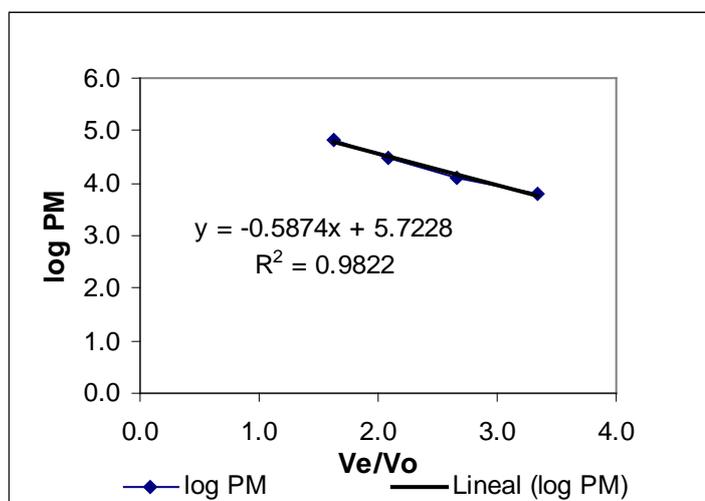


Gráfico 4.- Perfil de filtración en gel de las proteínas presentes en la muestra de 48 h.

En los gráficos correspondientes al control (tirosinasa comercial) y a la muestra se aprecia que el mayor pico presente en el gráfico del control aparece en el mismo número de fracción en el que aparece también el mayor pico de absorbancia en la muestra (fracción 55). A estas fracciones se les determinó la actividad monofenolasa y ambas, el control y la muestra, dieron resultado positivo, por lo que se determinó que el peso molecular de la proteína de interés es muy similar al de nuestro control, pudiendo tratarse de la misma enzima.

#### 5.4.1 Determinación del peso molecular de las fracciones obtenidas.

Para determinar el peso molecular de la enzima se realizó la siguiente gráfica, que relaciona el logaritmo del PM de los estándares con el cociente del volumen de elución en que aparece el pico de la proteína estándar entre el volumen en que aparece el pico del azul de dextrano (espacio vacío).



Gráfica 5.- Gráfica del log PM vs  $V_e/V_o$  de los estándares.

$$Y = -0.5874X + 5.7228$$

Con la ecuación obtenida se interpolan los valores de  $V_e/V_o$  para determinar el peso molecular de la fracción deseada.

Los cálculos muestran que la tirosinasa comercial tiene un PM aparente de 39692 Da, obteniéndose en las muestras un pico en una fracción muy similar a la fracción en que se encuentra la tirosinasa comercial. El PM correspondiente a este pico fue también de aproximadamente 39692 Da.

Con los resultados obtenidos hasta este punto se tienen evidencias suficientes para decir que es una fenoloxidasa, específicamente tirosinasa, la que en este hongo participa como enzima principal en el mecanismo de degradación del PCF, al presentar cobre en su molécula y tener un peso molecular calculado similar al de la tirosinasa comercial (Sigma) utilizada como estándar (40 KDa).

## **5.5 FERMENTACIÓN EN ESTADO LÍQUIDO DE LAS CEPAS ORIGINALES**

Para evaluar el perfil metabólico de la fermentación se determinó la producción de biomasa, la actividad enzimática, las proteínas totales y la degradación del PCF en cada cultivo con y sin tirosina. En esta sección se presentan los resultados obtenidos de las cinéticas de fermentación usando como inóculo esporas de la cepa original de *Amylomyces rouxii*, para posteriormente poder compararlas con las cepas transformantes obtenidas.

### **5.5.1 Comprobación del papel inductor de la tirosina**

Inicialmente se realizaron fermentaciones con medio Melin-Norkrans con y sin tirosina y en presencia de PCF para corroborar el perfil de degradación del PCF en estas condiciones. De esta prueba se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 1.- Porcentaje y eficiencia de degradación de *Amylomyces rouxii* en medios con y sin tirosina.

Fermentación	Porcentaje de degradación		Eficiencia de degradación (mgPCF/gXh)	
	144 h	168 h	144 h	168 h
Sin tirosina	33.44	66.73	0.025	0.019
Con tirosina	48.32	78.16	0.027	0.037

Se puede apreciar que en la fermentación con tirosina, tanto el porcentaje como la eficiencia de degradación del PCF por el hongo fueron mayores a las 144 y 168 h. Estos resultados corroboran los trabajos previos que se realizaron al respecto, y que dieron la pauta a pensar que una tirosinasa era la responsable o estaba implicada en la degradación del PCF (ya que ésta es una enzima inducible y la tirosina es su sustrato específico).

Se realizaron asimismo pruebas con enzimas comerciales, utilizando tirosinasa, lacasa y peroxidasa de rábano, para determinar si oxidaban el PCF en una concentración de 12.5 mg/L, usando el medio de cultivo Melin-Norkrans como medio de reacción. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 2.- Porcentaje de degradación de PCF en medio Melin-Norkrans con enzimas comerciales.

Enzimas ( 200 U/mL)	Concentración de PCF inicial (mg/L)	Concentración de PCF final (mg/L)
TIROSINASA	12.3	7.6
	24.41	10.81
LACASA	10.9	10.7

En este experimento se pudo observar que la tirosinasa, por sí sola, es capaz de degradar el PCF, mientras que la lacasa no fue capaz de degradar el compuesto.

La reacción teórica de la lacasa podría hacer pensar en un hipotético papel en la degradación del PCF; sin embargo, al no reaccionar con la tirosina (el sustrato que potencia la degradación del PCF), sugiere un papel preponderante de una tirosinasa en dicho proceso (sin descartar la presencia de la lacasa ni un posible mecanismo relacionado).

### 5.5.2 Comprobación del carácter extracelular de la proteína estudiada

Se realizaron también pruebas para determinar si la enzima buscada era intracelular o extracelular. En ellas se realizó la fermentación del hongo durante 48 h, por duplicado, con tres diferentes tratamientos:

- 1.- Sin inóculo
- 2.- Sin tirosina
- 3.- Con tirosina

Después de las 48 h se retiró la biomasa producida y al extracto se le adicionó el PCF necesario para tener una concentración de 12.5 mg/L, incubándose a 30°C durante 1 h para evaluar la degradación del PCF. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente gráfica:

Tabla 3.- Porcentaje de degradación de PCF en extractos de fermentación de *A. rouxii*.

Tratamiento	Concentración de PCF inicial (mg/L)	Concentración de PCF final (mg/L)
Sin inóculo	13.2	13.2
Sin tirosina	13.0	9.7
Con tirosina	13.0	5.6

En la tabla se puede observar que la mayor tasa de degradación de PCF se presentó en el medio que contenía tirosina, obteniéndose un 55% de degradación, mientras que en el medio sin tirosina la degradación observada fue sólo de un 25%. En el control sin inóculo, en el que ningún mecanismo metabólico está llevándose a cabo, no se ve cambio en la concentración de PCF en el medio. Este dato sirve para demostrar que no hay una degradación externa o ambiental del PCF, ajena por lo tanto a la actividad biológica.

Los resultados, por otro lado, permiten afirmar que la degradación se lleva a cabo gracias a una enzima que no se encuentra asociada con la biomasa, es decir una enzima extracelular. A continuación se realizaron fermentaciones para intentar correlacionar la actividad enzimática en los extractos de las muestras y los perfiles metabólicos de la fermentación, experimentos que se describen en los siguientes apartados.

### 5.5.3 Producción de biomasa

En el gráfico 6 se muestra el perfil de crecimiento de la cepa de *Amylomyces rouxii* en medio con y sin tirosina.

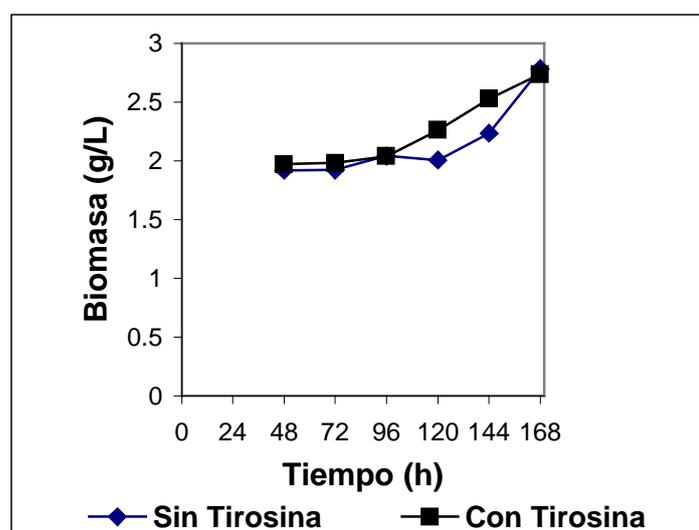


Gráfico 6.- Cinética de producción de biomasa de *A. rouxii* en medio Melin-Norkrans con y sin tirosina.

Se puede observar que la cantidad de biomasa que se produce es baja. Sin embargo, no se encuentra diferencia estadísticamente significativa entre la fermentación con tirosina y sin tirosina. Teniendo en cuenta que la cuantificación de la biomasa se inicia a las 49 h, aproximadamente una hora después de adicionar el PCF al medio, la biomasa “inicial” en ambas fermentaciones es de aproximadamente 1.9 g/L, comenzando la fase exponencial de crecimiento a las 96 h en el medio con tirosina y a las 120 h en el medio sin tirosina y llegándose en los dos casos a 2.8 g/L de biomasa final a las 168 h.

La adición del aminoácido, por lo tanto, no se debe a que se dé un aporte nutrimental extra para el hongo, que promoviera la producción de una mayor cantidad de biomasa y, por consiguiente, una mejor degradación del PCF (más que a la inducción por dicho aminoácido de un sistema enzimático específico, como la tirosinasa). Para corroborar este hecho se realizó una prueba adicional en la que se sustituyó el aminoácido tirosina por otro aminoácido distinto, con el objeto de ver su efecto en cuanto a la producción de biomasa y descartar esta variable como la responsable de la mayor degradación en los medios suplementados con el aminoácido.

El aminoácido elegido fue la leucina, estructuralmente diferente a la tirosina ya que no tiene grupos fenólicos, y las fermentaciones se llevaron a cabo de la misma manera descrita anteriormente para la tirosina. Los resultados obtenidos se muestran en el gráfico 7.

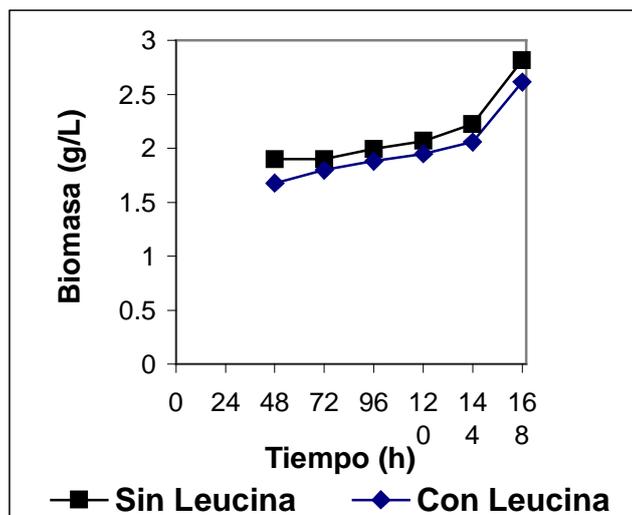


Gráfico 7.- Cinética de producción de biomasa de *A. rouxii* en medio Melin-Norkrans con y sin leucina.

En la gráfica se puede observar una diferencia en la cantidad de biomasa obtenida, diferencia no significativa desde el punto de vista estadístico. Iniciando la cuantificación de la biomasa al mismo tiempo que en las fermentaciones anteriores se observa como concentración de biomasa inicial 1.7 y 1.9 g/L en los medios sin leucina y con leucina, respectivamente.

En ambos medios, la fase de crecimiento exponencial comienza aproximadamente a las 120 h, lo que nos indica que es más larga la fase de latencia con este aminoácido. A las 168 h, finalmente, se obtienen 2.6 y 2.8 g/L (sin y con leucina, respectivamente), aproximadamente la misma cantidad que se obtuvo en este tiempo para las fermentaciones con tirosina.

En el apartado 5.5.5 se correlacionarán estos resultados con datos de degradación de PCF en dichas condiciones, de forma que se pueda sacar una conclusión conjunta.

#### 5.5.4 Cinéticas de proteína total

En el gráfico 8 se muestra la proteína total en las fermentaciones con y sin tirosina en el medio.

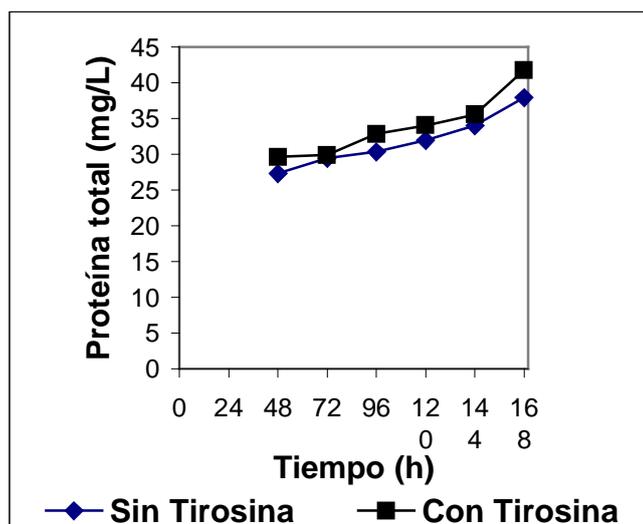


Gráfico 8.- Cinética de proteína total de *A. rouxii* en medio Melín-Norkrans con y sin tirosina.

Al igual que en la gráfica del perfil de biomasa (Gráfico 7) se puede observar que la cantidad de proteína total en las muestras es muy parecida en ambas fermentaciones, lo que indica que no hay diferencias significativas en el crecimiento. La principal razón de realizar esta determinación fue el poder obtener posteriormente valores de actividad monofenolasa específica obteniendo unidades de actividad por mg de proteína.

#### 5.5.5 Degradación de PCF

En el gráfico 9 se muestra el perfil de degradación de PCF por *Amylomyces rouxii* inoculado en medio Melín-Norkrans con y sin tirosina.

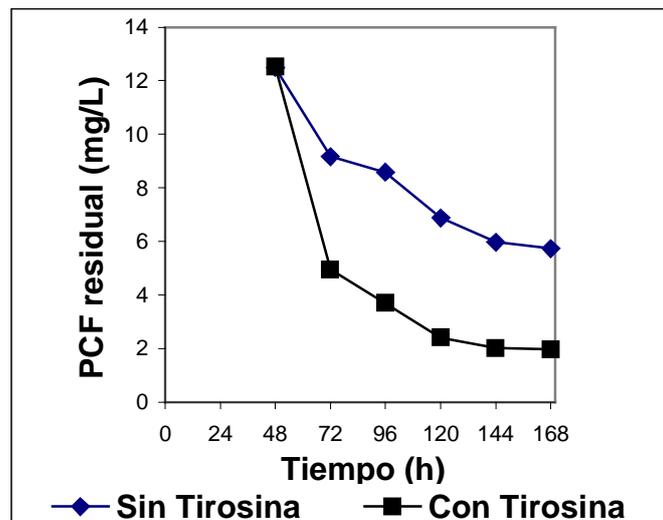


Gráfico 9.- Cinética de degradación de PCF por *A. rouxii* en medio Melin-Norkrans con y sin tirosina.

La concentración inicial del tóxico fue de 12.5 mg/L, adicionado a las 48 h después de la inoculación del medio. La cuantificación del primer punto se realizó a este tiempo. En el gráfico se observa que en el medio sin tirosina la degradación es menor que en el medio con tirosina. En ambas gráficas, sin embargo, se ve el mayor descenso de la concentración de PCF durante las primeras 48 h después de la adición del tóxico.

La máxima degradación del PCF mostrada por el hongo en el medio sin tirosina fue del 55%, aproximadamente, mientras que en el medio con tirosina la máxima degradación fue aproximadamente del 84%. Se puede apreciar claramente la influencia positiva de este aminoácido sobre la degradación de PCF, complementando la información presentada anteriormente en la Tabla 1.

Como se comentó en el apartado anterior, se realizó un experimento de evaluación del perfil de degradación de PCF cuando en el medio de fermentación se sustituyó la tirosina por leucina. Los resultados se muestran en el gráfico 10.

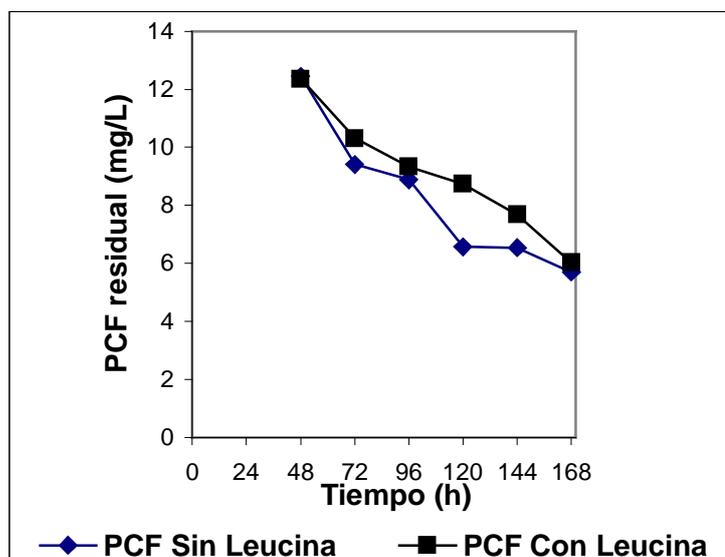


Gráfico 10.- Cinética de degradación de PCF por *A. rouxii* en medio Melín-Norkrans con y sin leucina.

En este gráfico se puede ver que la degradación del PCF es muy parecida en ambas fermentaciones en los primeros tiempos, modificándose a partir de las 96 h. Al final de la fermentación, sin embargo, con los dos medios de cultivo se alcanzó un porcentaje de degradación aproximado del 55%. La obtención de aproximadamente el mismo porcentaje de degradación para los dos medios permite demostrar que la leucina, a diferencia de la tirosina, no tiene influencia (ni positiva ni negativa) sobre los mecanismos de degradación del PCF.

Se puede deducir, por lo tanto, que la mayor actividad mostrada en los cultivos adicionados con tirosina no es producto de la existencia de una mayor cantidad de biomasa (y enzima, por lo tanto), sino que la tirosina tiene influencia, específica y estimuladora, sobre los mecanismos de degradación del PCF.

A partir de este experimento, todos los experimentos se realizaron sólo con los medios con y sin tirosina.

### 5.5.6 Determinación de la actividad enzimática (tirosinasa)

En esta sección se presentan los resultados de cuantificación de la actividad monofenolasa en la cepa original, en ambos medios (con y sin tirosina adicionada).

#### 5.5.6.1 Actividad volumétrica

En el gráfico 11 se muestra la cinética de actividad volumétrica de la tirosinasa producida por *A. rouxii* en medio Melín-Norkrans con y sin tirosina.

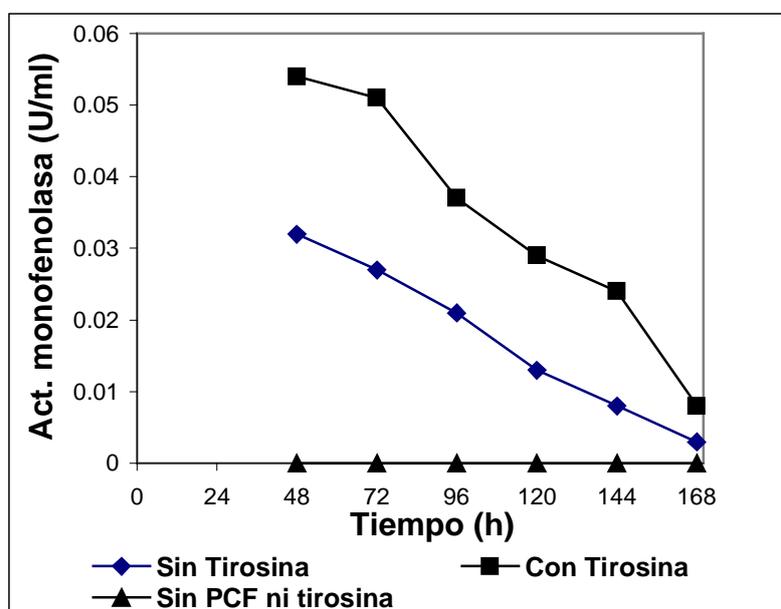


Gráfico 11.- Cinética de actividad volumétrica monofenolasa producida por *A. rouxii* en medio Melín-Norkrans con y sin tirosina.

En el gráfico se puede observar que con ambos medios la mayor actividad se encuentra en los primeros tiempos de la fermentación, cuando el PCF ha sido adicionado. En el medio adicionado con tirosina se aprecia una mayor actividad monofenolasa (0.054 U/mL), mientras que cuando no está presente la tirosina la actividad es menor (0.032 U/mL).

Se puede observar también que la actividad no se pierde completamente durante los días que duró la fermentación, lo que sugiere un cierto grado de estabilidad de la actividad, principalmente en los primeros tiempos. La línea que engloba los triángulos en el gráfico es el resultado de evaluar la actividad monofenolasa presente en el cultivo en ausencia de tirosinasa y PCF (que como ya se ha mencionado, son los sustratos que inducen/estimulan la actividad de la tirosinasa). Como se observa, no se detectó actividad en estas condiciones, lo que de nuevo sugiere que la tirosina es la enzima responsable de la degradación, al ser detectada en mayor cantidad en los momentos y condiciones (presencia de PCF y tirosina en el medio) en los que esta degradación es mayor.

### 5.5.6.2 Cinéticas de Actividad Específica

Para conocer cuánta es la cantidad de proteína soluble que tiene actividad monofenolasa se relacionó la actividad volumétrica con la cantidad total de proteína obtenida (actividad específica) y esta relación se expresó en función del tiempo. En el gráfico 12 se muestra la actividad específica monofenolasa producida por *A. rouxii*, en medios con y sin tirosina.

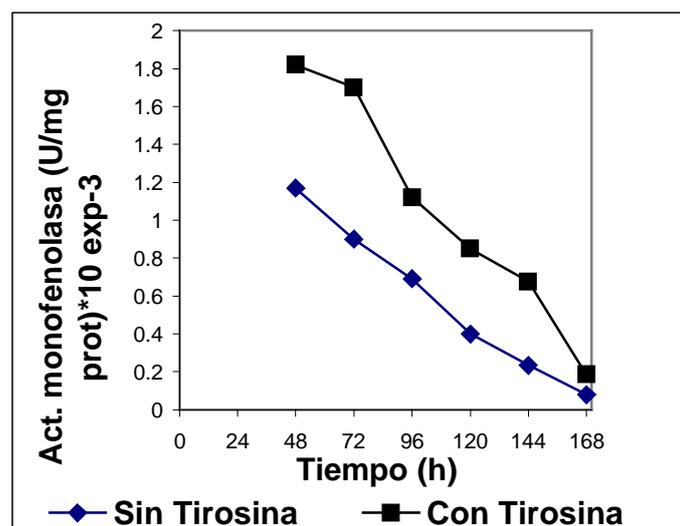


Gráfico 12.- Cinética de la actividad específica monofenolasa producida por *A. rouxii* en medio Melín-Norkrans con y sin tirosina.

En el gráfico 12 se puede observar un perfil similar al mostrado en el gráfico de la actividad volumétrica de la enzima. En el medio adicionado con tirosina se encuentra la mayor actividad ( $1.8 \times 10^{-3}$  U/mg de proteína) en los primeros tiempos de la fermentación, después de agregar el PCF. Este mismo comportamiento se observa en el medio sin tirosina, aunque la mayor actividad encontrada fue de  $1.2 \times 10^{-3}$  U/mg de proteína, aproximadamente.

### 5.5.7 Relación de la degradación de PCF con la actividad específica monofenolasa

En este apartado se relaciona el porcentaje de degradación de PCF por *A. rouxii* en los medios con y sin tirosina con la actividad específica monofenolasa determinada en ambos medios, de tal forma que se pueda inferir alguna correlación entre los dos aspectos. Los resultados se muestran en el gráfico 13.

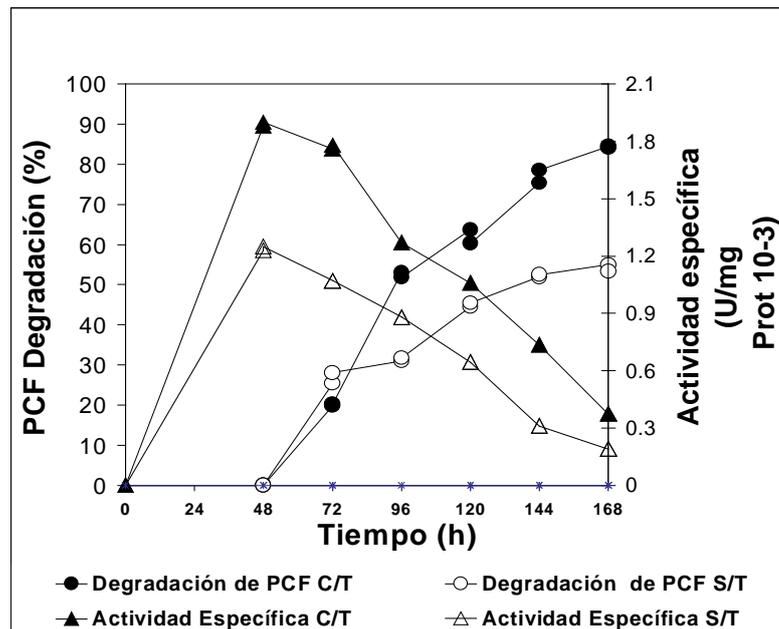


Gráfico 13.- Actividad específica monofenolasa y degradación de PCF (%) por *A. rouxii* en medio Melin-Norkrans con y sin tirosina, en función del tiempo.

En este gráfico se observa que en el medio sin tirosina el porcentaje de degradación es menor que en el medio con tirosina y el mismo efecto se presenta cuando se evalúa la actividad enzimática. Se puede ver también que en las primeras 24 h de fermentación después de adicionado el PCF se presenta la mayor actividad específica ( $1.8$  y  $1.2 \times 10^{-3}$  U/mg proteína), en los medios con y sin tirosina, respectivamente.

La degradación de PCF es similar en ambos medios a las 24 h después de adicionado el tóxico (19 y 20%); sin embargo, la degradación en los cultivos con tirosina se incrementa con mayor rapidez que en los cultivos sin tirosina (llegando a alcanzarse una degradación final del 85% en los cultivos con tirosina, frente al 50% de degradación alcanzada en los cultivos sin tirosina, ambos valores a las 168 h de cultivo).

La actividad tirosinasa durante toda la fermentación es mayor en los cultivos con tirosina que en los cultivos sin este aminoácido, resultados que muestran una relación directa de la actividad tirosinasa con la degradación del PCF.

## **5.6 MEJORA GENÉTICA**

Posteriormente al estudio enzimático se emprendió el estudio molecular del hongo, con el objetivo de mejorar genéticamente la cepa utilizada de *Amylomyces rouxii* e incrementar su capacidad de degradación del compuesto tóxico PCF.

### **5.6.1 Obtención del ADN de *Amylomyces rouxii*.**

El primer paso de este estudio consistió en la extracción del ADN, realizado como se indicó en la sección de Materiales y Métodos. En la siguiente figura se muestra una imagen del gel que contiene el ADN total de *Amylomyces rouxii*, junto con un marcador de tamaño molecular.



Figura 2.- ADN total de *Amylomyces rouxii*. (1) Marcador de peso molecular  $\lambda$ EcoRI y (2) ADN de *A. rouxii*.

Después de obtenido el ADN total del hongo, se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$ , disuelto en  $\text{H}_2\text{O}$ .

### 5.6.2 Diseño de cebadores (primers)

Para iniciar con la localización del gen que codifica para la tirosinasa se realizó la técnica de la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), para lo que se necesitó diseñar cebadores (primers) para la amplificación específica de la región de interés. Lo mismo se hizo para el gen que codifica para la lacasa, ya que como se explicó anteriormente, no estaría en principio descartada su presencia.

Para tal efecto se realizó un alineamiento de secuencias de aminoácidos correspondientes a tirosinasas y lacasas de algunas especies de microorganismos. Se tomaron en cuenta secuencias pertenecientes a especies lo más cercanas posibles, desde el punto de vista filogenético, al hongo utilizado en la fase previa del trabajo doctoral, aunque no se encontró información de este tipo en la base de datos para ningún zigomiceto (tipo de hongos a los que pertenece, como ya se mencionó anteriormente, *Amylomyces rouxii*).

En la figura siguiente se muestra parte del alineamiento de las secuencias de aminoácidos de tirosinasa y las especies consideradas como ejemplo: *Agaricus bisporus*, *Aspergillus orizae*, *Lentinula edodes* y *Neurospora crassa*.

	ILFPTWHRPYLALXEQALQAAAQDVAXXFPVX---RAXYVXAAXDLRQPY	Majority
	<hr/>	
	110 120 130 140 150	
84	VLFPTWHRTYLSVLEQILQGAIEVAXXFTSN---QTDWVQAAQDLRQPY	ABTYR.PRO
87	ILFPTWHRAYLMAVEXALRXACPDVS-----LPY	AOTYR.PRO
93	VLFPTFHRPYVLLIEQAIQAAAVDIAATYIVD---RARYQDAALNLRQPY	LETYR.PRO
100	ILFITWHRPYLALYEQALYASVQAVAQXFPVEGGLRAXYVAAAXDFRAPH	NCTYR.PRO
98	ILFLTWHRPYLALFEQALYNSIQXIANQFP-QGPLRTXYVEAAXTFRMPY	PATYR.PRO
	HMSSEVAADFPLFWLHHTNVDRLLSLWQDLNPDVFXTPGPAPDGTFXIX	Majority
	<hr/>	
	210 220 230 240 250	
265	HMDHPFFAAFDPIFWLHHTNVADRLLSLWXAINPDVWVTSGRNRDGTMGIA	ABTYR.PRO
242	CLLTEEYTVFS-----NTSACQR---WND-----EQFHPLESG	AOTYR.PRO
273	QMSDPSVAGFDPIFFMHHAQVADRLLSLWSALNPRVWITDGPSTGDTWTIP	LETYR.PRO
290	HMSSEVSAFDPLFWLHHVNVVDRLWSIWQDLNPNSEMTPRPAPYSTFVAQ	NCTYR.PRO
287	HMSSELDVSSFDPLFWFHHTNVIDRLWSIWQDLNPDNFLTTPRPAPYSTFNST	PATYR.PRO

Figura 3.- Parte del alineamiento de secuencias de aminoácidos de tirosinasa.

En este alineamiento se localizaron regiones muy conservadas para las dos enzimas (secuencias sombreadas), algunas de las cuales corresponden al sitio activo de las enzimas o a los dominios de unión de cobre. Estas secuencias son, pues, susceptibles de ser utilizadas en el diseño de cebadores específicos. Ya elegida la secuencia a utilizarse como cebador se diseñaron los oligonucleótidos, cambiando la secuencia de aminoácidos existente por su secuencia probable de nucleótidos.

Para ello se utilizaron codones (los triplete más comúnmente utilizados para cada aminoácido) de *A. rouxii* y se añadieron una secuencia de corte para una enzima de restricción (*EcoRI*) y cuatro nucleótidos adicionales en los extremos 5' (las bases adicionales garantizan una buena reacción de corte por parte de la enzima de restricción, que posteriormente se utilizará para poder recuperar el fragmento amplificado con cortes cohesivos y facilitar su clonación).

Los cebadores diseñados para cada enzima fueron.

**Lacasa:**

1: 5' -CGCGAATTCACHTTYTGGTAYCAYWSNCAY-3'

2: 5' -TATGAATTCACCADGCRTCRATRTGRCARTG-3'

**Tirosinasa:**

1: 5' -CGGGAATTCCHTAYTKBGATTGGGCTTCH-3'

2: 5' -CGCGAATTCRTGRTGRAACCARAARAGDGG-3'

Donde R: A ó G, D: A ó G ó T, H: A ó C ó T, Y: C ó T B: A ó C y K: A ó C ó G ó T

La existencia de varias posibilidades de codificación para cada aminoácido (en función de la degeneración del código genético) hace necesario diseñar oligonucleótidos degenerados, con los que se pueda abarcar las combinaciones más probables.

Con estos cebadores se realizó la reacción de PCR, obteniéndose solo amplificación en la reacción realizada con los cebadores diseñados a partir de la secuencia de la tirosinasa. En el caso de los cebadores diseñados a partir de la lacasa se probaron diferentes condiciones en la reacción, sin obtener amplificación en ningún caso.

La banda obtenida con los cebadores para la tirosinasa fue de aproximadamente 900 pb y se muestra en la siguiente figura, donde se aprecia también un marcador de peso molecular (ADN del bacteriófago  $\lambda$  digerido con *Pst*I) que tiene bandas con tamaños cercanos al esperado:

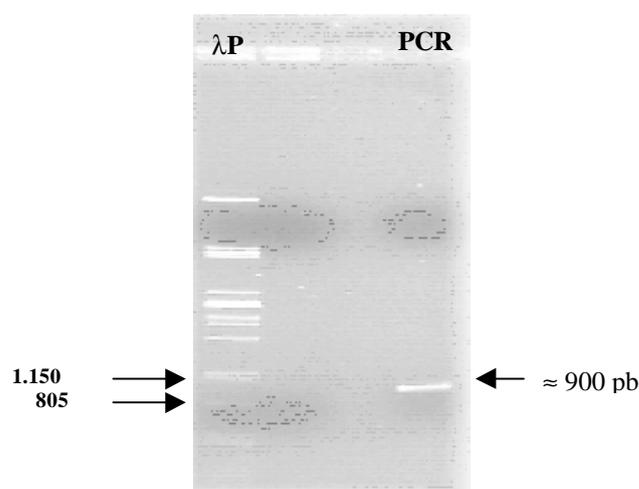


Figura 4.- Banda amplificada por PCR a partir del ADN cromosómico de *A. rouxii* con cebadores diseñados para el gen de la tirosinasa.

Los resultados mostrados indican que posiblemente la banda amplificada en el caso de la tirosinasa corresponda con esta enzima. En el caso de la lacasa, a pesar de no haber obtenido amplificación con los cebadores diseñados a tal efecto, no podemos descartar contundentemente su presencia en el genoma del hongo.

La banda amplificada para el gen que codifica para la tirosinasa se purificó y digirió con la enzima de restricción *EcoRI*. Asimismo, el plásmido pBluescript KS se digirió también con la misma enzima, sometiéndose la mezcla a una reacción de ligado, que fue comprobada por electroforesis en un gel de agarosa.

La construcción del plásmido con el fragmento de interés insertado se clonó en células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  (con las características mostradas en Materiales y Métodos) incubadas en LA con ampicilina, X-gal e IPTG y seleccionadas por la pérdida del color azul característico de las células de la bacteria en el medio utilizado.

La cepa con el plásmido se conservó en glicerol al 20% a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta su uso para poder obtener la cantidad necesaria de la construcción para proceder al análisis de la secuencia de nucleótidos del inserto.

### **5.6.3 Análisis de la secuencia de nucleótidos del fragmento obtenido por PCR**

La secuencia se llevó a cabo sobre la construcción de pBluescript KS con el inserto, utilizándose cebadores universales T1 y T3.

Los resultados muestran una similitud con el gen de tirosinasa de apenas el 50%, misma similitud encontrada con el citocromo P450. En la búsqueda de elementos que refieran que se trata de esta enzima se encontró una región que codifica para dopamina, sin embargo hace falta más trabajo de investigación que lleve a confirmar sin ningún género de dudas que el fragmento clonado pertenece a la tirosinasa (la escasa similitud no es prueba suficiente, si tenemos en cuenta los datos obtenidos de las bases de secuencias, pudiendo no estar estrechamente relacionadas secuencia y función).

En vista de los datos poco definitivos acerca del clonaje del presunto gen para la tirosinasa y debido a las exigencias en tiempos, se procedió a mejorar la cepa degradadora de PCF por una estrategia distinta: en lugar de aumentar la dosis del gen que codifica para la tirosinasa responsable del proceso (como se ha ido delimitando a lo largo del presente trabajo) se optó por complementar las capacidades de degradación del hongo con enzimas, no existentes en el mismo, y con probada importancia en la biorremediación de compuestos de similares características por otros hongos filamentosos. En este sentido, los genes que codifican para lignina peroxidasas y/o manganeso peroxidasas son buenos candidatos para conseguir cepas mejoradas.

## **5.7 REDUCCION DE NUCLEOS EN ESPORAS DE *Amylomyces rouxii***

Después de encontrar los resultados descritos en el punto anterior, se inició el estudio de las características del hongo más importantes para su transformación con un ADN extraño.

Esta fue una etapa capital para poder abordar el mejoramiento de la cepa degradadora de PCF; por tal motivo fue necesario eliminar (o cuando menos disminuir) los problemas de heterogeneidad que podrían ocasionarnos las esporas del hongo utilizado (posee esporas plurinucleadas). Con base en el método utilizado para reducir el número de núcleos en las esporas, reportado por Necas y Gabriel, (1980) se realizaron ligeras modificaciones, aumentándose hasta tres los pasos de congelación y descongelación de la suspensión de esporas en glicerol al 40%. Los resultados se comentan a continuación.

Tabla 4.- Reducción en el número de núcleos en las esporas mediante procesos de congelación-descongelación.

Paso de congelación-descongelación	Número de núcleos observados
0	Alrededor de 6 a 7 núcleos por espora
1	Se observan esporas con 4 y 3 núcleos
2	Predomina la población de esporas con 3 núcleos y aparecen esporas con 2 núcleos
3	Las esporas predominantes poseen un solo núcleo

La utilización de esporas procedentes de tres pasos de congelación-descongelación nos permite conseguir una mayor eficacia en la predicción de los resultados que se podrían obtener tras la transformación del hongo y una mayor garantía de homogeneidad para la transformación y las generaciones siguientes.

## 5.8 SENSIBILIDAD DE ESPORAS DE *Amylomyces rouxii* A FLEOMICINA E HIGROMICINA

Previamente a un experimento de transformación se debe contar con los marcadores de selección adecuados que nos permitan determinar cuáles son las colonias transformantes (de forma especial en casos, como el presente, en los que se va a realizar una transformación doble). Para este trabajo se contó con dos plásmidos de expresión en hongos: el pULC43 y el pAN7-1, que contienen respectivamente los genes de resistencia a fleomicina e higromicina.

El uso de estos plásmidos constituyó el primer paso para la selección de los transformantes en el experimento, por lo que realizar ensayos de sensibilidad del hongo a los dos antibióticos fue imprescindible. Inicialmente se probaron concentraciones de cada antibiótico de 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75 y 100 µg/mL, tomando como referencia las concentraciones de estos mismos antibióticos que han sido utilizadas para otros microorganismos (y tratando de abarcar sobradamente los intervalos reportados en anteriores estudios). El antibiótico fue mezclado con medio Czapek en cajas de Petri y se incubaron a 30°C (temperatura óptima de crecimiento de *A. rouxii*) con el hongo.

En estas condiciones, el hongo creció en todas las cajas, aunque sí se observó disminución en el número de colonias a medida que aumentaba la concentración. Se decidió, de esta forma, aumentar la concentración hasta 200 µg/mL y se incubó en las mismas condiciones. Se siguió observando crecimiento, aunque muy escaso.

Gracias a la información reportada por Durand *et al.* (1991), Chevadhanarak *et al.* (1991) y Austin *et al.* (1990), que indicaron que la sensibilidad del microorganismo al antibiótico puede aumentar si se trata una noche a 4°C previamente a la incubación a la temperatura óptima, se pudo diseñar un experimento en el que se tomó en cuenta un tratamiento de temperatura previo a la incubación y se probaron tres diferentes temperaturas de incubación:

Antibiótico: fleomicina e higromicina

Concentraciones: 0, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 60, 100 y 200 µg/mL

Temperatura de incubación: 20, 25 y 30° C.

Tratamiento de temperatura previo: 4°C durante 12 h

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos para la fleomicina:

Tabla 5.- Resultados del estudio de sensibilidad de *A. rouxii* a fleomicina.

<b>FLEOMICINA</b>		
<b>Concentraciones: 0, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 60, 100 y 200 µg/mL</b>		
<b>30°C</b>	<b>25°C</b>	<b>20°C</b>
<b>el control crece a las 12 h</b>	<b>el control crece a las 18 h</b>	<b>el control crece a las 42 h</b>
<b>hay crecimiento a las 18 h a partir de 7.5 µg/mL</b>	<b>en todas las concentraciones crece a las 18 h</b>	<b>20 y 60 µg/mL crece a las 72 h</b> <b>100 y 200 µg/mL NO CRECE</b>

Los resultados obtenidos para la higromicina se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 6.- Resultados del estudio de sensibilidad de *A. rouxii* a higromicina.

<b>HIGROMICINA</b>		
<b>Concentraciones: 0, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 60, 100 y 200 µg/mL</b>		
<b>30°C</b>	<b>25°C</b>	<b>20°C</b>
<b>el control crece a las 12 h</b>	<b>el control crece a las 18 h</b>	<b>el control crece a las 42 h</b>
<b>15 µg/mL crece a las 48 h</b> <b>20 µg/mL crece a las 72 h</b> <b>60 &gt;µg/mL NO CRECE</b>	<b>20 µg/mL crece a las 72 h</b> <b>60 &gt;µg/mL NO CRECE</b>	<b>60 µg/mL crece a las 72 h</b> <b>100 &gt;µg/mL NO CRECE</b>

Con base en estos resultados, las pruebas de selección de transformantes se realizaron con una concentración de los dos antibióticos de 200 µg/mL, que garantiza que no crezca la cepa original sin transformar.

### 5.9 TRANSFORMACION DE *Amylomyces rouxii*

La transformación del hongo se realizó utilizando protoplastos obtenidos de las esporas tratadas en la forma descrita previamente.

Utilizando los antibióticos mencionados, como primer marcador de selección, y una concentración de ADN plasmídico de 200 µg/µL de cada uno de los plásmidos descritos en la siguiente tabla, se pudieron obtener colonias transformantes:

Tabla 7.- Colonias obtenidas de las cepas transformantes.

Plásmido	No. de colonias obtenidas
pULC43	1
pULC43 + pVEL	10
pULC43 + pCGL	1
pULC43 + pVEM	27
pULC43 + pCGM	26
pAN7-1 + pVEM	2
pAN7-1 + pVEL	2

pULC43 es el plásmido con el gen de resistencia a fleomicina, pAN7-1 el plásmido con el gen de resistencia a higromicina, pVEL el vector de expresión de LipA, pCGL el clon genómico de LipA, pVEM el vector de expresión de manganeso peroxidasa y pCGM el clon genómico de manganeso peroxidasa. Los clones genómicos poseen intrones, a sus propios promotores, mientras que en el caso de los vectores de expresión los intrones no aparecen, al utilizarse el ADN complementario y la expresión se dá a partir del promotor del gen de la TAKA amilasa.

El primer marcador de selección, fleomicina o higromicina, sólo permite garantizar la presencia de uno de los dos plásmidos incluidos en la cotransformación. Por ese motivo, se probó un método secundario de detección, enfocado en la confirmación de la presencia de los plásmidos con los genes de peroxidadas.

El método se basó en la decoloración del colorante Poly R-478, usando el alcohol veratrílico como cofactor en el caso de la lignina peroxidasa y el sulfato de manganeso para identificar la expresión de la manganeso peroxidasa.

Esta prueba se realizó con cilindros de agar de medio mínimo con maltosa (debido a que el vector de expresión para las peroxidases contiene un promotor inducible por maltosa). Cada cilindro se inoculó con micelio de cada transformante, de 2 días de edad (ya que se reporta que en este tiempo hay mayor expresión de las enzimas en *P. chrysosporium*, cepa utilizada como control positivo en la prueba y de la que proceden los genes de las peroxidases).

La técnica, una vez puesta a punto, se aplicó a los transformantes obtenidos en el paso anterior de *A. rouxii*, usando como control negativo la cepa original de *A. rouxii*. Los resultados permitieron seleccionar cinco transformantes con los plásmidos pULC43 y pVEL, seis transformantes con los plásmidos pULC43 y pCGM, tres transformantes con los plásmidos pULC43 y pVEM y un transformante con los plásmidos pAN7-1 y pVEM. En la siguiente figura se muestran cajas de Petri con micelio de *P. chrysosporium* (control positivo), de la transformante pAN7-1 + pVEM y de la cepa *A. rouxii* sin transformar (control negativo) en el medio de decoloración y los halos formados debido a la actividad de las peroxidases.

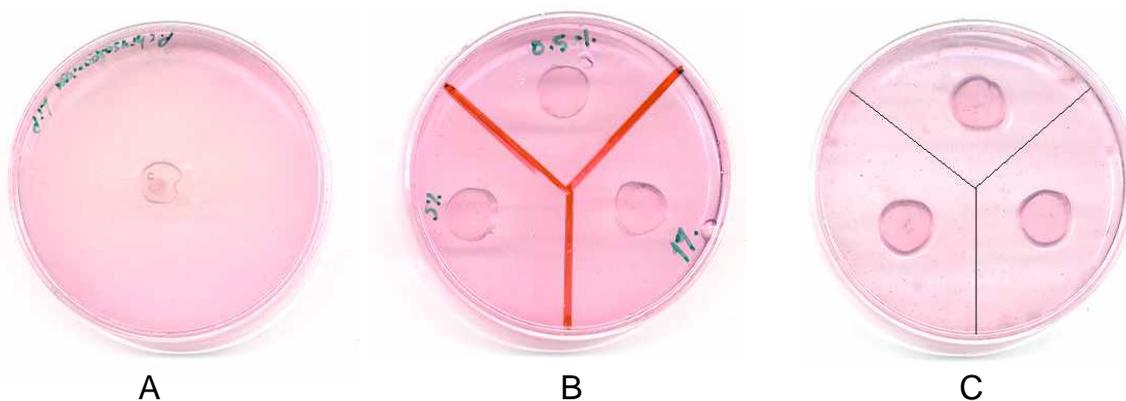


Figura 5.-Decoloración de Poly R-478 por (A) *P. chrysosporium*, (B) *A. rouxii* y (C) una cepa transformante de esta última con los plásmidos pAN7-1 + Pvem.

La decoloración por estas transformantes fue diferente en intensidad (en algunos casos incluso el resultado no fue muy claro), por lo que se determinó la actividad peroxidasa también en medio líquido. Para tal prueba se incubaron las cepas en medio mínimo con maltosa (en una concentración del 5%), realizándose la fermentación durante 48 h. Tras obtener el extracto enzimático de cada muestra, se llevó a cabo la reacción descrita en el apartado de Materiales y Métodos.

Como resultado se apreció que no todas las cepas presentaron actividad: algunas si dan un cambio de absorbancia, cambio que sin embargo no es suficiente para poder incluirlas en la ecuación mediante la cual se calcula la actividad peroxidasa (de acuerdo a una curva patrón realizada con una peroxidasa de rábano comercial).

Tabla 8.- Actividad peroxidasa mostrada por la cepa parental y las cepas transformantes.

Cepa	Actividad MnP (U/L)	Actividad LiP (U/L)
<i>Amylomyces rouxii</i>	0	0
pULC43 + pVEL4	0	<b>72.14</b>
pULC43 + pVEM4	73.0	0
pULC43 + pCGM 4	46.0	0
pAN7-1 + pVEM1	<b>107.0</b>	0
pULC43 + pVEL3	0	16.5
pULC43 + pVEM5	<b>130.0</b>	0

Con estos resultados se seleccionaron para la fermentación de degradación de PCF las transformantes pULC43 + pVEL4 (tirosinasa original + lignina peroxidasa) y las transformantes pAN7-1 + pVEM1 y pULC43 + pVEM5 (tirosinasa original + manganeso peroxidasa).

Cabe mencionar que las cepas que presentaron tanto decoloración en caja como actividad peroxidasa en líquido presentan una morfología distinta a la morfología de la cepa original, creciendo en forma más compacta, como grandes esferas con micelio aéreo blanco.

### **5.10 DEGRADACION DEL PCF EN FERMENTACIÓN EN ESTADO LÍQUIDO POR LAS TRANSFORMANTES SELECCIONADAS**

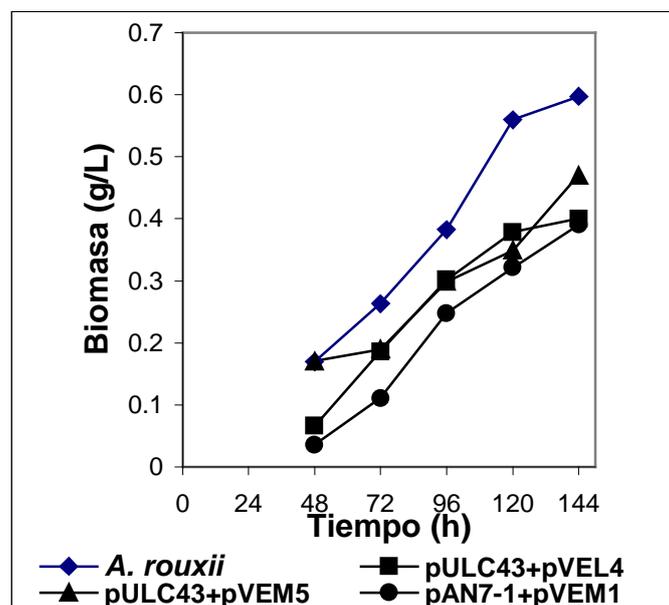
Para la fermentación en estado líquido se probaron dos medios de cultivo distintos, pues también era necesario caracterizar los perfiles de degradación y crecimiento de las cepas en el medio con el que se realizaron los estudios del hongo original con la adición de maltosa (inductor de la expresión de los genes de las peroxidases, como ya se mencionó anteriormente).

Los medios probados fueron, por lo tanto, medio Melin-Norkrans con 5% de maltosa y medio mínimo con maltosa, en la misma concentración.

A continuación se muestran las gráficas obtenidas con las 4 cepas para los perfiles de producción de biomasa y degradación de PCF.

#### **5.10.1 Producción de biomasa**

En el gráfico 14 se muestra la producción de biomasa por las 3 transformantes seleccionadas y la cepa original de *A. rouxii* en medio mínimo con maltosa al 5% (MN-M5%).



Gráfica 14.- Perfil de producción de biomasa en MM-M 5% para las transformantes y la cepa original de *A. rouxii*.

En esta gráfica se puede observar que la producción de biomasa de las 4 cepas en este medio, es menor en todas las cepas comparada con la producción obtenida en las fermentaciones iniciales donde se alcanzaban hasta 2.8 g/L en las últimas horas de la fermentación. Esto puede deberse a la pobreza nutricional del medio, ya que sus principales componentes son sales.

La maltosa, que fue la fuente de carbono utilizada, se asimila seguramente con menor eficiencia que la glucosa (el azúcar asimilable por excelencia), que fue la fuente de carbono utilizada en el medio de cultivo anterior.

La cuantificación inicial de la biomasa en las 4 cepas parece ser muy diferente, sin embargo esto se debe a la escala tan baja que se utilizó en la gráfica. La mayor producción de biomasa se observa en la cepa original, donde se alcanzaron aproximadamente 0.6 g/L a las 144 h de fermentación.

En el caso de las transformantes, se puede apreciar que la producción de biomasa no presenta diferencia significativa alcanzándose, a las 144 h de fermentación, 0.45, 0.4 y 0.4 g/L en las cepas pULC43 + pVEM5, pULC43 + pVEL4 y pAN7-1 + pVEM1, respectivamente.

En el gráfico 15 se muestra el perfil de producción de biomasa para las cepas transformantes y la original en medio Melín-Norkran (MN-M 5%) que fue el medio usado en las fermentaciones iniciales (suplementado con maltosa al 5%, por las razones ya mencionadas).

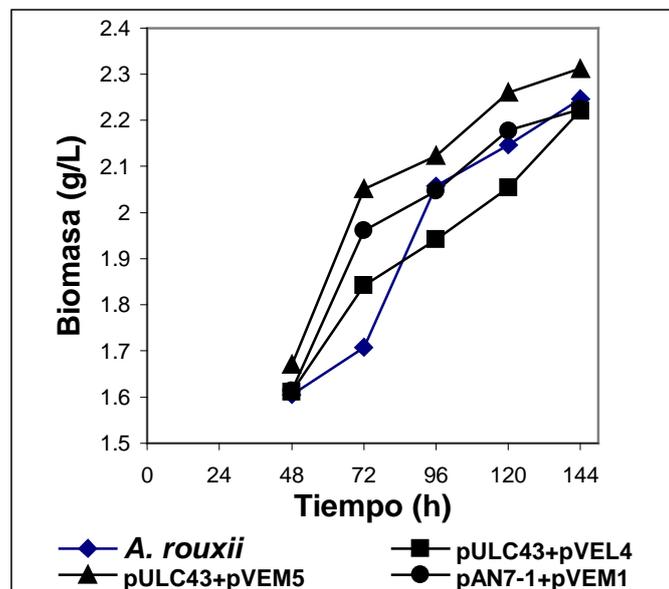


Gráfico 15.- Perfil de producción de biomasa en MN-M 5% por las transformantes y la cepa original de *A. rouxii*.

En la figura 15 se puede apreciar que la cantidad de biomasa producida por las 4 cepas a las 144 h no presenta diferencia significativa y se alcanza aproximadamente la misma cantidad de biomasa que se alcanzaba en las fermentaciones iniciales a las 144 h con este medio y por parte de la cepa original (2.23 g/L en el medio MN sin maltosa y 2.25 g/L en el medio MN-M 5%).

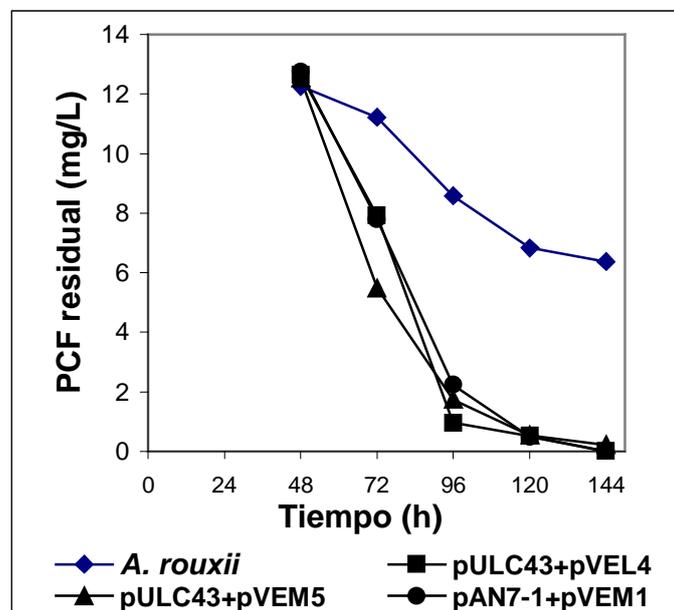
Los incrementos que se pueden observar con respecto a la cepa original son del 5%, aproximadamente, y se presentan sólo en la cepa transformante pULC43 + pVEM5, que a las 144 h de fermentación alcanza valores de 2.35 g/L de biomasa.

De estos resultados puede deducirse que la cantidad de biomasa producida no es un factor que pueda influir en los resultados de degradación de PCF que se muestran a continuación.

### 5.10.2 Cinéticas de degradación de PCF

En este punto se muestran los resultados obtenidos para la degradación del PCF en fermentaciones realizadas con los medios MM-M 5% y MN-M 5%, por parte de las 3 cepas transformantes y de la cepa parental de *A. rouxii*.

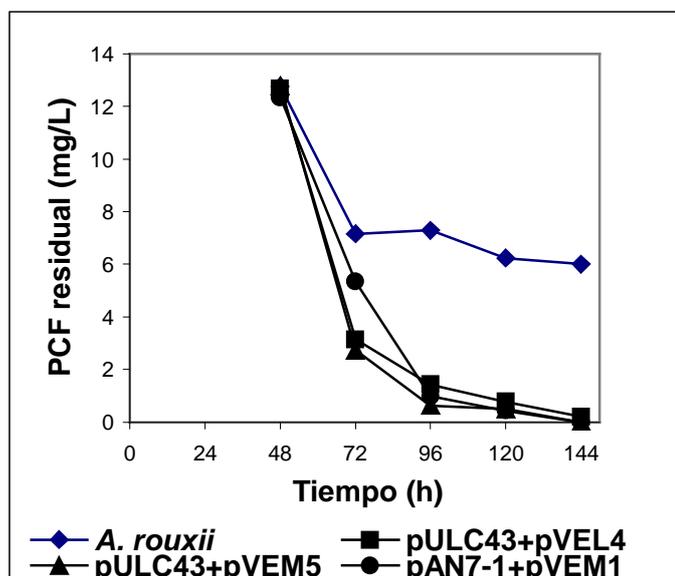
En el gráfico 16 se presentan los perfiles de degradación de PCF para las 4 cepas en MM-M 5%.



Gráfica 16.- Perfil de degradación de PCF en MM-M 5% por las transformantes y la cepa original de *A. rouxii*

Inicialmente, se puede apreciar que el perfil de degradación de PCF por la cepa original es distinto al que se presentaba en el medio MN, en los experimentos iniciales: al parecer la fase más rápida de degradación ya no se da durante las primeras 48 h, sino después de 24 h de adicionado el PCF. El hongo muestra un porcentaje de degradación de apenas el 48% a las 144 h, a diferencia del que presentaba anteriormente (52% en el mismo tiempo). Estos resultados pueden indicarnos que la composición del medio afecta de manera negativa a los mecanismos de degradación del PCF en la cepa original del hongo.

Por el contrario, para las 3 cepas transformantes se observa una degradación completa del PCF a las 144 h de fermentación, mostrando perfiles de degradación de PCF muy similares. En este caso, a pesar de las deficiencias nutricionales que pueda representar el medio y a pesar de la baja cantidad de biomasa que se produce en las cepas incubadas en este medio, se logró degradar el total de PCF, mostrándose así la mejora de las cepas en cuanto a su capacidad de degradación del tóxico. En el gráfico 17 se muestra el perfil de degradación de PCF por las 4 cepas en medio MN-M 5%, para determinar la influencia de la maltosa en la degradación del PCF cuando se adiciona a este medio y así compararlo con el obtenido en un principio para la cepa original.



Gráfica 17.- Perfil de degradación de PCF en MN-M 5% por las transformantes y la cepa original de *A. rouxii*

Se puede apreciar que en el caso de la cepa original otra vez la mayor degradación del PCF se lleva a cabo en las primeras 24 h de la fermentación después de adicionar el PCF al medio, dando un porcentaje de degradación del 52% aproximadamente a las 144 h (que es casi el mismo que se obtuvo en la fermentación inicial con el medio sin maltosa).

En este caso no se observa influencia de la maltosa adicionada al medio en el perfil de degradación de PCF por la cepa original. En el caso de las tres cepas transformantes, se observa que en las primeras 24 h de fermentación después de adicionado el PCF se realiza la mayor degradación del tóxico, siendo mayor sin embargo en las cepas pULC43 + pVEM5 y pULC43 + pVEL4. Al final de las 144 h de fermentación las 3 cepas transformantes llegan a una degradación total del PCF.

Con estos resultados se puede afirmar que la mejora de las cepas transformantes, en cuanto a la degradación de PCF, no se ve influenciada de manera negativa por el medio utilizado y se comprueba que con estas cepas se llega en menor tiempo a una concentración final de PCF de aproximadamente cero en el tiempo de fermentación manejado.

Finalmente, para comprobar la integración de los plásmidos en el genoma fúngico por métodos moleculares, se realizó una transferencia de Southern del ADN de las cepas transformantes digerido con la endonucleasa *EcoRI*, para hibridarlo con el plásmido con el que fueron transformadas.

### **5.11 SOUTHERN BLOT E HIBRIDACIÓN**

Todo el proceso que involucra el realizar una transferencia de Southern, desde la obtención de ADN de las transformantes, la digestión del ADN, la electroforesis y la transferencia se realizó de la misma manera en que se hizo el procedimiento con la cepa original.

En la figura 6 se muestra el gel con el ADN que fue transferido a la membrana.

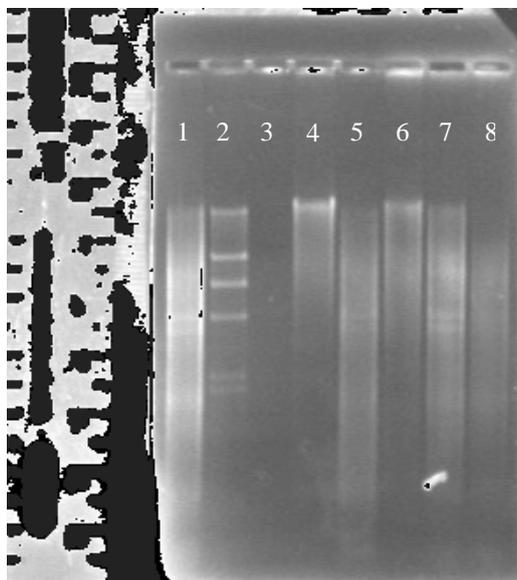


Figura 6.- ADN digerido de las transformantes de *A. rouxii* (4)pULC43 + pVEM5, (6)pAN7-1 + pVEM1, (7) pULC43 + pVEM3 y (8)pULC43 + pVEM 9, con el plásmido (3) pVEM, transferido por Southern blot. Los carriles (1) y (5) son de ADN de *A. rouxii* parental y el carril (2) corresponde al marcador de peso molecular  $\lambda$ EcoRI.

En este trabajo sólo se comprobó la hibridación con el plásmido pVEM como sonda. Por razones de tiempo no se realizó la hibridación con la transformante obtenida del plásmido pVEL, aunque morfológicamente es una cepa que también presenta diferencias con la original y cumple con las pruebas de selección y fermentación a las que se sometieron todas las colonias transformantes obtenidas.

En la figura 7 se muestran las bandas de hibridación de la sonda pVEM con el ADN de las transformantes pULC43 + pVEM5 y pAN7-1 + pVEM1, separadas por el ADN de la cepa de *A. rouxii* original, usado como control negativo.

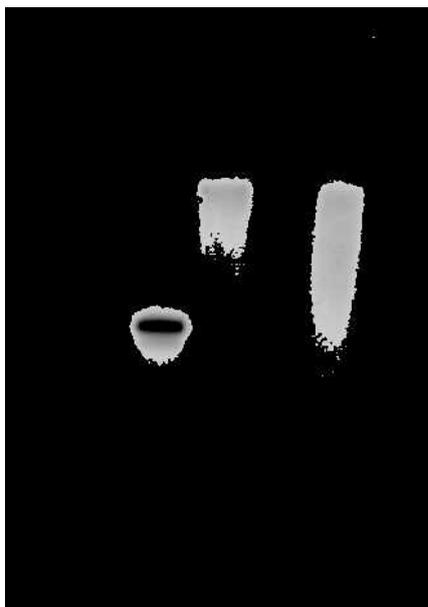


Figura 7.- Hibridación del ADN digerido de (2)pULC43 + pVEM5, (3)*A. rouxii* y (4)pAN7-1 + pVEM1 con el plásmido (1) pVEM, usado como sonda.

Con estos estudios se da por terminado el trabajo de Doctorado, en apartados siguientes se exponen las conclusiones y recomendaciones para estudios adicionales a este trabajo.

## 6.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En este capítulo puntualizamos las observaciones más importantes encontradas en el transcurso de esta tesis, así como la conclusión obtenida y algunas recomendaciones que pueden servir como principio de trabajos posteriores que enriquecerían la investigación presente.

### 6.1 OBSERVACIONES

- ✓ Se pudieron establecer las condiciones óptimas para la cuantificación del pentaclorofenol en un equipo de cromatografía líquida de alta presión (HPLC).
- ✓ Se determinó el incremento en la degradación de PCF por *A. rouxii* en fermentaciones líquidas con la adición de tirosina al medio en una concentración de 0.1 g/L.
- ✓ Se determinó que la enzima que degrada el PCF en el medio de cultivo de *A. rouxii* es una fenoloxidasa extracelular.
- ✓ Se determinó que la tirosinasa (comercial) por sí sola puede oxidar el PCF.
- ✓ Se logró poner a punto el método para la determinación de la actividad monofenolasa (tirosinasa), así como la metodología para concentrar la enzima mencionada.
- ✓ Por las determinaciones de actividad monofenolasa obtenidas en las muestras existe evidencia de que efectivamente es una tirosinasa la responsable de la degradación del PCF en este microorganismo.
- ✓ Se observó que la mayor actividad de esta enzima se presenta en las primeras horas después de adicionar el PCF en el medio y mantiene una actividad decreciente, aunque estable durante el tiempo de fermentación.

- ✓ Se observó una relación directa entre actividad monofenolasa y degradación de PCF: mayor actividad de la enzima se acompaña de mayor degradación del tóxico.
  
- ✓ Se pudo amplificar un fragmento de ADN por la técnica de PCR con cebadores diseñados para seleccionar parte de un gen que codifica para una tirosinasa y no se encontró amplificación con cebadores diseñados para obtener un fragmento correspondiente a un gen para una lacasa, lo cual no descarta contundentemente que no se encuentre presente en el genoma del hongo. Es necesario obtener evidencia contundente para poder determinar que el fragmento obtenido corresponde a la tirosinasa de esta especie de hongo.
  
- ✓ Se logró la reducción de núcleos de las esporas del hongo *Amylomyces rouxii* con 3 ciclos del proceso de congelación- descongelación, obteniéndose una población con un 90% de esporas con un solo núcleo.
  
- ✓ Se pudo observar que este hongo posee una alta resistencia a los antibióticos utilizados (a las temperaturas óptimas de crecimiento resiste hasta 250 µg/mL de fleomicina y 200 µg/mL de higromicina), por lo que se implementó un tratamiento basado en una pre-incubación a baja temperatura (4°C durante 12 h) para poder utilizar dichos antibióticos como marcadores de selección en la transformación.
  
- ✓ La transformación de *A. rouxii* por obtención de protoplastos fue buena para nuestros fines ya que sólo se buscaba obtener transformantes, sin embargo la eficiencia de transformación fue baja con la metodología utilizada.
  
- ✓ Se logró establecer un método cualitativo relativamente rápido para la selección, en placas con un 1% de agar bacteriológico, de transformantes con genes de manganeso y lignina peroxidasa, por decoloración del colorante polimérico Poly R-476 (reportado por Moredo *et al.* 2003, como reactivo decolorado por la actividad peroxidasa en medio líquido).

- ✓ Se pudieron seleccionar tres cepas transformantes, que se probaron en fermentación líquida con PCF (12.5 mg/L) en 2 medios de cultivo (medio mínimo con maltosa al 5% y medio Melin-Norkrans con maltosa al 5%), obteniéndose en los dos medios una degradación del 100% del tóxico a las 144 h de fermentación. No se observaron diferencias reseñables en los perfiles de degradación de las cepas debidas a los medios de cultivo empleados.
  
- ✓ En el caso de la cepa original, probada como control para la comparación con los perfiles de las cepas transformantes, sí se encontró un efecto negativo del medio mínimo con maltosa al 5% sobre la degradación del PCF, ya que se obtuvo como mayor porcentaje de degradación el 48%, encontrándose que con el medio Melin-Norkrans con y sin maltosa al 5% se mantiene el porcentaje de degradación de PCF en 52%.
  
- ✓ Finalmente se pudo corroborar la presencia del plásmido pVEM en el ADN genómico de las transformantes pULC43 + pVEM5 y pAN7-1 + pVEM1, al hibridarse con el propio plásmido usado como sonda.

## 6.2 CONCLUSIONES

- 1.- **Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede concluir que es una tirosinasa la enzima responsable de la degradación del pentaclorofenol (PCF) en *Amylomyces rouxii*.**
  
- 2.- **Fue posible mejorar la cepa, obteniéndose tres cepas transformantes con mecanismos de degradación del tóxico optimizados. Las tres cepas transformantes logran degradar el 100% de PCF inicial en un tiempo de 144 h en fermentación líquida, con una concentración inicial de PCF de 12.5 mg/L, mientras que la cepa original degrada sólo el 52% del PCF bajo las mismas condiciones.**

## 6.3 RECOMENDACIONES

- ✓ Un estudio que se debe completar es el estudio del fragmento amplificado por PCR, con el objeto de poder conseguir el gen para la tirosinasa de este hongo y poder optimizar la degradación por incremento en la dosis de dicho gen.
  
- ✓ Sería interesante tratar de poner a punto el método de transformación del hongo por electroporación, así como optimizar el método de transformación de protoplastos (como ya se mencionó la eficiencia de transformación obtenida en el presente trabajo fue baja).
  
- ✓ Se pueden hacer estudios adicionales probando las transformantes obtenidas en fermentación con medio líquido y PCF, adicionando nuevamente tirosina al medio para determinar si la degradación se puede realizar en menos tiempo y si se sigue incrementando en esas condiciones la actividad monofenolasa en las nuevas cepas.

- ✓ Es necesario hacer pruebas de resiembra con las cepas transformantes para comprobar su estabilidad, es decir, verificar que sigan manteniendo su capacidad de degradación del PCF.
  
- ✓ Sería de gran interés que las cepas obtenidas fueran probadas en sistemas sólidos, utilizando como soporte algún residuo agroindustrial para determinar si la capacidad de degradación del PCF es similar o se potencia.
  
- ✓ Para que estos trabajos adquieran mayor interés sería necesario diseñar algún modelo para la utilización del hongo en la degradación del tóxico usado en la presente tesis, trabajando con efluentes contaminados a escala de planta piloto.

---

**7.- LITERATURA CITADA**

1. Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K. H., Cavaco-Paulo, A. and Gübitz, G. M. (2000). Decoloration and detoxification of textile dyes whit a laccase from *Trametes hirsuta*. *Applied ans Environmental Microbiology*. **66**:3357-3362.
2. Ainsworth, A. M. (1995). Technical information sheet No. 11: Isolation techniques for basidiomycetes. *World J. of Microbiol and Biotechnol*. **11**:364-366.
3. Aitken, B. S. and Logan, B. E. (1996). Degradation of pentachlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown in ammonium lignosulphonate media. *Biodegradation*. **7**: 175-182.
4. Alleman, B. C., Logan, B. E. and Gilbertson, R. I. (1992). Toxicity of pentachlorophenol to six species of white rot fungi as a function of chemical dose. *Applied and environmental Microbiology*. **58**:4048-4050
5. Austin, B., Hall, R. M. and Tyler, B. M. (1990). Optimized vectors and selecction for transformation of *Neurospora crassa* and *Aspergillus nidulans* to bleomycin and phleomicyn resistance. *Gene*. **93**:157-162
6. Antier, P., Minjares, A., Roussos, S., Raimbault, and Viniegra-González, G. (1993). Pectinase hiperprodicing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid-state fermentation of coffe pulp. *Enzyme MicrobialTtechnology*. **15**: 254-260.
7. Atlow, S. C., Banadonna-Aparo, L., and Klibanov A. M. (1984). Dephenolization of industrial wastewaters catalized by phenol oxidase. *Biotechnology and Bioengineering*. **XXVI** :599-603.
8. Bonnarme, P. and Jeffries, W. (1990). Mn (II) regulation of lignin peroxidase ans manganeso-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi. *Applied ans Environmental Microbiology*. **56**:210-217.
9. Bourbonnais, R. and Paice, M. G. (1990). Oxidation of non-phenolic substrates and expanded role of laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters*. **267**:99-102.
10. Bradford, M. (1976). A quick a sensitive method for the cuantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. **72**: 248-254.

11. Boonchan, S., Brito, M. L. and Stanley, G. A. (2000). Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Applied and environmental Microbiology*. **66** (3): 1007-1019.
12. Bumpus, J. A., Kakar, S. N. and Coleman, R. D. (1993). Fungal degradation of organophosphorus insecticides. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **39/40**:715-725.
13. Buswell, S. A. and Odier, E. (1987). Lignin degradation. *Crit. Rev. Biotechnol.* **6**:1-60.
14. Cantoral, J. M., Diez, B., Barredo, J. L., Alvarez, E. and Martín, J. F. (1987). High frequency transformation of *Penicillium chrysogenum*. *Bio/Technology*. **5**: 494-497.
15. Cassidy, M. B., Lee, H., Trevors, J. T. and Zablutowicz R. B. (1999). Chlorophenol and nitrophenol metabolism by *Sphingomonas* sp. UG30. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **23**:232-241.
16. Cortés, D. V., Bernal, R. y Tomasini, A. (2001). Efecto de las condiciones de cultivo sumergido en la degradación de pentaclorofenol. *Información technol.* **12**:75-80.
17. Chevadhanarak, S., Saunders, G., Renno, D.V., Flegel, T.W. and Holt, G. (1991). Transformation of *Aspergillus oryzae* with a dominant selectable marker. *J. Biotechnol.* **19** : 117-122
18. Diez, B., Alvarez, E., Cantoral, J. M., Barredo, J. L. and Martín, J. F. (1987). Selection and characterization of *pyrG* mutants of *Penicillium chrysogenum* lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase and complementation by the *pyr 4* gene of *Neurospora crassa*. *Curr. Genet.* **12**: 277-282.
19. Durand, N., Reymond, P. and Fevre, M. (1991). Transformation of *Penicillium roqueforti* to phleomycin- and to hygromycin B- resistance. *Curr. Genet.* **19**(2): 149-153
20. Esposito, E., Paulillo, S. M. and Manfio, G. P. (1998). Biodegradation of the herbicide Diuron in soil by the indigenous actinomycetes. *Chemosphere*. **37** (3): 541-548.
21. Fahr, K., Wetzstein, H-G., Grey, R. and Schlosser, D. (1999). Degradation of 2-4-dichlorophenol and pentachlorophenol by two brown rot fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* **175**: 127-132.
22. Fernández Perrino, F. J. (1997). Caracterización de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de penicilina: Reacción enzimática catalizada por el producto del último gen (*pen DE*) de la ruta de biosíntesis de penicilina. *Tesis doctoral*.

- 
- 
23. Gold, M. H., Wariishi, H. and Valli, K. (1989). Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *ACS. Symp. Ser.* **389**:127-140.
  24. Guiardina, P., Cannio, R., Martirani, L., Marzullo, L., Palmieri, G., and Sannia, G. (1995). Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2408-2413.
  25. Guiraud P., Seigle-Murandi F., Steiman R. and Benoit-Guyod J. L. (1992). Extracellular phenoloxidase activity of micromycetes from various taxonomic groups. *Microbiologica.* **4**: 367-390.
  26. Guiraud, P., Steiman, R., Seigle-Murand, F. and Benoit-Guyod, J. L. (1995). Comparison of the toxicity of various lignin-related phenolic compounds toward selected fungi perfecti and fungi imperfecti. *Ecotox. Environ. Safety.* **32**. 29-33.
  27. Hatakka, A. (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**:125-135.
  28. Higson, F. K. (1991). Degradation of xenobiotics by white rot fungi. *Environ. Contam. Toxicol.* **122**: 111-152.
  29. Higuchi, T. (1990). Lignin biochemistry; biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* **24**:23-63.
  30. Holmes, D. S. and Quigley, m. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacteria plasmids. *Anal. Biochem.* **1/4** : 193-197.
  31. Horiuchi, H., Takaya, N, Yanai, K., Nakamura, M., Ohta, A. and Takagi, M. (1995). Cloning of the *Rhizopus niveus* pyr 4 gene and its use for the transformation of *Rhizopus delemar*. *Curr. Genet.* **27** (5):472-478.
  32. Juteau, P., Beaudet, R., McSween, G., Lepine, F. and Bisailon, J. G. (1995). Study of the reductive dechlorination of pentachlorophenol by a methanogenic consortium. *Can. J. Microbiol.* **41** (10):862-868.
  33. Kadhim, H., Graham, C., Barratt, P., Evans, C. S. and Rastall, R. A. (1999). Removal of phenolic compounds in water using *Coriolus versicolor* grown on wheat bran. *Enz. Microb. Technol.* **24**: 303-307.
- 
-

- 
- 
34. Keither, L. H. and Teilard, W. A. (1979). Priority pollutants. I. A. prospective view. *Environ. Sci. Technol.* **13**:416-423.
  35. Kishi, K., Wariishi, H., Marquez, L., Dunford, H. B. and Gold, M. H. (1994). Mechanism of manganese peroxidase compound II reduction. Effect of organic chelators and pH. *Biochemistry.* **33**:8694-8701.
  36. Kirk, T. K. and Farrell, R. L. (1987). Enzymatic "combustion"; the microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* **117**: 277-285.
  37. Kuan, I.C., Johnson, K.A. and Tien, M. (1993). Kinetic analysis of manganese peroxidase. The reaction with manganese complexes. *J Biol Chem.* **268**(27):20064-20070.
  38. Lamar, R. T. (1992). The role of fungal lignin-degrading enzymes in xenobiotic degradation. *Curr. Op. Biotechnol.* **3** : 261-266.
  39. Larrondo, L. F., Lobo, S., Stewart, P., Cullen, D. and Vicuna, R. (2001). Isoenzyme multiplicity and characterization of recombinant manganese peroxidases from *Ceriporiopsis subvermispora* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental microbiology.* **67**(5): 2070-2075.
  40. Law, W. M., Lau, W. N., Lo, K. L., Wai, L. M. and Chiu, S. W. (2003). Removal of biocide pentachlorophenol in water system by the spent mushroom compost of *Pleurotus pulmonarius*. *Chemosphere.* **52** (9):1531-1537.
  41. Lee, S. G., Yoon, B. D., Park, Y. H. and Oh, H. M. (1998). Isolation of a novel pentachlorophenol-degrading bacterium, *Pseudomonas sp* Bu 34. *J. Appl. Microbiol.* **85** (1):1-8.
  42. Leyva Ramos R., Serrato Villegas L. E., Guerrero Coronado R. M., y Mendoza Barrón J. (1996). Descomposición enzimática del fenol en solución acuosa usando tirosinasa. *Avances en Ingeniería Química.* **6/1**: 41-45.
  43. Madigan, M. T., Martínko, J. M. and Parker J. (1999). Brock, Microbiología de los Microorganismos. 8ª edición. *Prentice Hall*. España.
  44. Mayfield, M. B., Kishi, K., Alic, M. and Gold, M. H. (1994). Homologous expression of recombinant manganese peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and environmental Microbiology.* **60** (12): 4303-4309.
- 
-

- 
- 
45. Mazzocco, F. and Pefferi, P. G. (1976). An improvement of the spectrophotometric method for the determination of tyrosinase catecholase activity by besthor's hydrazone. *Anal. Biochem.* **72**: 643-647.
  46. Moos, L. P., Kirsch, E. J., Wukasz, R. F. and Grady C. P. L. (1983). Pentachlorophenol biodegradation. *Water Res.* **17**:1575-1584.
  47. Moredo, N., Lorenzo, M., Domínguez, A., Moldes, D., Cameselle, C. and Sanroman, A. (2003). Enhanced ligninolytic enzyme production and degrading capability of *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* **19**:665-669.
  48. Montiel, A. M., Fernández, F. J., Marcial, J., Soriano, J., Barrios-González, J. and Tomasini, A. (2004). An fungal phenoloxidase (tyrosinase) involved in pentachlorophenol degradation. *Biotechnology Letters.* **26**:1353-1357.
  49. Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalized chain reaction. *Methods in enzymology.* **155**: 335-350. R. Wu. ed. Academic Press, San Diego, E. U. A.
  50. Nagarathnamma, R. and Bajpai, P. (1999). Decolorization and detoxification of extraction-stage effluent from chlorine bleaching of kraft pulp by *Rhizopus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology.* **65**: 1078-1082.
  51. Necas, O. and Gabriel, M. (1980). Ultrastructure of spores of *Rhizopus nigricans* after repeated freezing and thawing shocks. *Folia Microbiol.* **25** (3):228-232.
  52. Okeke, B. C., Paterson, A., Smith, J. E. and Watson-Craik, I. A. (1997). Comparative biotransformation of pentachlorophenol in soils by solid substrate cultures of *Lentinula edodes*. *Applied Microbiology Biotechnology.* **48**: 563-569.
  53. Redy, C. A. (1995). The potencial for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Curr. Op. Biotechnol.* **6**:320-328.
  54. Reddy, B., Vijay, G. and Gold, M. H. (2000). Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: intermediates and reactions involved. *Microbiology.* **146**: 405-413.
- 
-

- 
- 
55. Rodríguez López, J. N., Escribano, S. and García-Cánovas, F. (1994). A continuous spectrophotometric method for the determination of monophenolase activity of tyrosinase using 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone. *Anal. Biochem.* **216** (1):205-212.
56. Ruiz Dueñas, F. J., Martínez, M. J. and Martínez, A. T. (1999). Heterologous expression of *Pleurotus eryngii* peroxidase confirms its ability to oxidize Mn (2<sup>+</sup>) and different aromatic substrates. *Applied and Environmental Microbiology.* **65** (10): 4705-4707.
57. Saiki, R. K., Scharf, S. J., Faloona, F., Mullis, K. B., Hurn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* **230**: 1350-1354.
58. Seigle-Murandi, F., Guiraud, P., Steiman, R. and Benoit-Guyod, J. L. (1992). Phenoloxidase production and vanillic acid metabolism by zygomycetes. *Microbiologica.* **15**: 157-165.
59. Seigle-Murandi, F., Steiman, R., Benoit-Guyod, J. L. and Guiraud, P. (1993). Fungal degradation of pentachlorophenol by micromycetes. *J. Biotechnol.* **30**: 27-35.
60. Seigle-Murandi F., Steiman R. and Benoit-Guyod J. L. (1991) . Biodegradation potential of some micromycetes for pentachlorophenol. *Ecotox. Environ. Safety.* **21**: 290-300.
61. Stewart, P., Whitwam, R. E., Kersten, P. J., Cullen, D. and Tien, M. (1996). Efficient expression of a *Phanerochaete chrysosporium* manganese peroxidase gene in *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology.* **62** (3): 860-864.
62. Sutherland, J. B. (1992). Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. *Journal ind. Microbiol.* **9**: 53-62.
63. Swamy, J. and Ramsay, J. A. (1999). Effects of Mn<sup>2+</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentrations of laccase and manganese peroxidase production and amaranth decoloration by *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology.* **51**:391-396.
64. Szewczyk, R., Bernat, P., Milczarek, K. and Długonski, J. (2003). Application of microscopi fungi isolated from polluted industrial areas for polycyclic aromatic hydrocarbons and pentachlorophenol reduction. *Biodegradation.* **14** (1):1-8.
65. Takaya, N., Yanai, K., Horiuchi, H., Ohta, A. and Takagi, M. (1994). Cloning and characterization of two 3-phosphoglycerate kinase genes of *Rhizopus niveus* and heterologous gene expression using their promoters. *Curr. Genet.* **25** (6):524-530.
- 
-

- 
- 
66. Takaya, N., Yanai, K., Horiuchi, H., Ohta, A. and Takagi, M. (1996). Cloning and characterization of the *Rhizopus niveus leu1* gene and its use for homologous transformation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60** (3): 448-452.
67. Tartakovsky, B., Lévesque, M.-J., Dumortier, R., Beaudet, R. and Guiot, S. R. (1999). Biodegradation of pentachlorophenol in a continuous anaerobic reactor augmented with *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4357-4362.
68. Thompson, D. P. and Cannon, C. (1984). Extracellular phenoloxidase activity in *Rhizopus* and *Mucor* species. *Mycologia.* **76/3** : 567-568.
69. Tien, M. and Kirk, T. K. (1988). Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzymology.* **161**:238-249.
70. Tomasini, C. A., Villarreal, A. H. y Barrios-González, J. (1996). Resistencia de una cepa de *Rhizopus sp.* al crecer en medios conteniendo pentaclorofenol. *Av. Ing. Quím.* **6**:36-40.
71. Tomasini, A., Flores, V. D. C. and Barrios-González, J. (2001). An isolate of *Rhizopus nigricans* capable of tolerating and removing pentachlorophenol. *World J. Microbiol.* **17**:201-205.
72. Villarreal, H. R. (1990). Aislamiento y selección de hongos filamentosos capaces de degradar clorofenoles. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Tamaulipas
73. Vroumsia, T., Steiman, R., Seigle-Murandi, F., Benoit-Guyod, J. L. and Khadrani, A. (1996). Biodegradation of three substituted phenylurea herbicides (chlortoluron, diuron and isoproturon) by soil fungi. A comparative study. *Chemosphere.* **33** (10): 2045-2056.
74. Walter, M., Boul, L., Chong, R. and Ford, C. (2004). Growth substrate selection and biodegradation of PCP by New Zealand white-rot fungi. *J. Environ. Manage.* **71** (4):361-369.
75. Wang, H., Lu, F., Sun, Y. and Du, L. (2004). Heterologous expression of lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* in *Pichia methanolica*. *Biotechnol. Letters.* **26** (20): 1569-1573.
76. Wariishi, H., Akileswaran, L. and Gold, M. H. (1988). Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*; spectral characterization of the oxidized states and the catalytic cycle. *Biochemistry.* **27**:5365-5370.
- 
-

- 
- 
77. Wariishi, H., Dunford, H. B., MacDonald, I. D. and Gold, M. H. (1989). Manganese peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *phanerochaete chrysosporium*: transient-state kinetics and reactions mechanism. *J. Biol. Chem.* **264**:23688-23695.
78. Wariishi, H. and Gold, M. H. (1990). Lignin peroxidase compound III. Mechanism of formation and decomposition. *J. Biol. Chem.* **265** (4): 2070-2077.
79. Yasushi Sugano, Ryosuke Nakano, Katsuya Sasaki and Makoto Shoda. (2000). Efficient heterologous expression in *Aspergillus oryzae* of a unique dye-decolorizing peroxidase, Dyp, of *Geotrichum candidum* Dec 1. *Applied and Environmental Microbiology.* **66** (4):1754-1758.

### 7.1 LITERATURA GENERAL

80. Aitken, M. D., Massey, L. J., Chen T. and Heck P. E. (1994). Characterization of reaction products from the enzyme catalyzed oxidation of phenolic pollutants. *Water Res.* **28/9**: 1879-1889.
81. Boyer, Paul D. (1972). The enzymes. 3<sup>a</sup> edición. Vol. VII. Edit. Academic Preess. New York.
82. Burton, S. G., Duncan, J. R., Kaye, P. T. and Rose, P. D. (1993). Activity of mushroom polyphenol oxidase in organic medium. *Biotechnol. Bioengin.* **42**: 938-944.
83. Espin, J. C., Morales, M., García-Ruíz, P. A., Tudela, J. and García-Cánovas, F. (1997). Improvement of a continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of mushroom polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **45**: 1084-1090.
84. Espin, J. C., Varón, R., G. Fenoll L, Gilabert, M. A., García-Ruíz, P. A., Tudela, J. and García-Cánovas, F. (2000). Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanisms of mushroom tyrosinase. *Eur. J. Biochem.* **267**: 1270-1279.
85. Goodenough, P. W., Kessell, S., Lea, A. G. H. and Loeffter, T. (1983). Mono- and diphenolase activity from fruit of *Malus pumila*. *Phytochemistry.* **22/2**: 359-363.
86. Harking, J. M. and Obst, J. R. (1973). Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi. *Experientia.* **29/4**: 381-508.

- 
- 
87. Madigan, M. T., Martínko, J. M. and Parker, J. (1998). Brock, Biología de los microorganismos. 8ª edición. *Prentice Hall*. España.
  88. Marr C. D., Grund D. W. and Harrison K.A. (1986). The taxonomic potential of laccase and tyrosinase spot test. *Mycologia*. **78/2**: 169-184.
  89. Rescigno, A., Sanjust, E., Soddu, G., Rinaldi, A. C., Sollai, F., Currely, N. and Rinaldi, A. (1998). Effect of 3-hydroxyanthranilic acid on mushroom tyrosinase activity. *Biochim. Biophys. Acta*. **1384**: 268-276.
  90. Rüttimann-Johnson, C. and Lamar, R. T. (1996). Polymerization of pentachlorophenol and ferulic acid by fungal extracellular lignin-degrading enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3890-3893.
  91. Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory
  92. Solomon, E. I., Sumdaram, U. M., and Machonkin, T. E. (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* **96**: 2563-2605.
  93. Ullih, M. A., Bedford, C. T. and Evans, C. S. (2000). Reactions of pentachlorophenol with laccase from *Coriolus versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 230-234.
  94. Voet and Voet G. J. (1995). Biochemistry. 2ª edición. Edit. Wiley, U. S. A.