

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

“Estudio de las enzimas fenoloxidasas, proteasas y peroxidasas presentes en *Rhizopus oryzae* ENHE”

TESIS

Que para obtener el grado de:

Maestro en Biotecnología

P R E S E N T A

I.B.Q. Arianna Ruiz Badillo

DIRECTOR: Dra. Araceli Tomasini Campocosio

Asesores: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Dra. Alba Mónica Montiel González

Julio, 2013

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de **Ingeniería Genética y Metabolismo Secundario** del Departamento de Biotecnología, perteneciente a la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Este trabajo fue financiado por el **CONACyT**, a través de la beca de maestría N° 265786

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, con la referencia 001465.

México D.F., a 17 de Julio del 2013

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

**“Estudio de las enzimas fenoloxidasas, proteasas y peroxidasas presentes en
Rhizopus oryzae ENHE”**

que presentó

Arianna Ruiz Badillo

Comité Tutorial:

Director: Dra. Araceli TomasiniCampocosio

Asesor: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Asesor: Alba Mónica Montiel González

Jurado:

Presidente: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Secretario: Dr. Francisco Fierro Fierro

Vocal: Dra. Alba Mónica Montiel González

Vocal: M. en Biot. Héctor Hugo León Santiesteban

AGRADECIMIENTOS

El trabajo realizado en el campo de la biotecnología podría resultar incomprendido, de difícil asimilación o hasta aburrido para aquellas personas que prestan su interés a otras áreas, sin embargo son esas personas las que me enseñan a desglosar al máximo mi conocimiento, son ellas las que me retroalimentan en otras áreas y son ellas las que me hacen olvidar solo por un momento todas esas responsabilidades que están presentes en mi cabeza día tras día. Gracias mamá, papá, hermano, por darme el amor, cariño y comprensión que se necesita. A Fili, por compartir ratos tan agradables y siempre hacerme escapar de mi realidad. A mis tíos, primos y abuelos, quienes fueron fundamentales en el forje de mi personalidad. .

Gracias compañeros y amigos de la universidad, escalada y espeleo, (Lili, Luis, Mario, Miguel, Rafa y Vivi; Mary, Tanis, Valientito y Xavo) por esas convivencias tan amenas y emocionantes que me hacen ver la vida desde un punto de vista mucho más relajado.

El trabajo en equipo es algo fundamental para llegar a un final exitoso, es por eso que le estoy muy agradecida a todos mis compañeros de laboratorio (Angie, Axel, Core, Cris, Fac, Hugo, Jessy, Lalo, Mary, Rox, Tere, Uli, Wyl), no solo por su gran ayuda sobre dudas técnicas y teóricas que siempre surgían, sino también por siempre sacarme una sonrisa mientras trabajaba. A mis amigas de generación Oli e Isa con las cuales me divertía mucho mientras realizábamos las tareas.

A pesar del sinnúmero de conocimientos adquiridos con el paso del tiempo, siempre se necesita el apoyo de un experto...

Gracias a la Dra. Tomasini, por darme toda su confianza para trabajar en uno de sus proyectos. Gracias Paco Pepe, Paco Fierro y nuevamente Hugo, por dedicar parte de su tiempo a la revisión de mi tesis y ser aportadores de extensos conocimientos, además por ser personas tan agradables conmigo, dejándome una sonrisa en la cara cada vez que charlábamos.

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras	I
Índice de gráficas	II
Abreviaturas y acrónimos	III
Resumen	V
Abstract	VI
INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Rhizopus oryzae</i>	1
1.2 Peroxidasas	2
1.2.1 Lignina Peroxidasa	3
1.2.2 Manganeseo Peroxidasa	4
1.3 Fenoloxidasas	6
1.3.1 Lacasa	7
1.3.2 Tirosinasa	9
1.4 Proteasas	11
1.4.1 Exopeptidasas	11
1.4.2 Endopeptidasas	12
1.5 Isoenzimas	13
1.6 Zimogramas	13
2 ANTECEDENTES	16
3 JUSTIFICACIÓN	18
4 HIPÓTESIS	19
5 OBJETIVOS	19
5.1 Objetivos generales	19
5.2 Objetivos específicos	19
6 METODOLOGÍA	20
6.1 Propagación de <i>Rhizopus oryzae</i> ENHE	20
6.2 Obtención de esporas para análisis posteriores	21
6.3 Concentración de esporas	21
6.4 Fermentación sumergida	21
6.5 Obtención de extractos extracelulares	22

6.6	Obtención de extractos intracelulares	22
6.7	Determinación de actividad fenoloxidasa	22
6.7.1	Actividad monofenolasa (tirosinasa)	22
6.7.2	Actividad de la lacasa	23
6.8	DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA	23
6.8.1	Actividad proteasas ácidas	23
6.8.2	Actividad proteasas neutras y alcalinas	24
6.9	DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD PEROXIDASA	24
6.9.1	Actividad Lignina Peroxidasa (LiP)	24
6.9.2	Actividad Manganeso Peroxidasa (MnP)	25
6.10	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE	25
6.11	INDUCCIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	26
6.12	ZIMOGRAMAS	26
6.12.1	Extracción de proteína extracelular	27
6.12.2	Extracción de proteína intracelular	27
6.12.3	Zimogramas	28
6.12.3.1	Zimogramas para proteasas	28
6.12.3.2	Zimogramas para actividad LiP	29
6.12.3.3	Zimogramas para fenoloxidasas	29
6.12.3.4	Zimogramas para actividad monofenolasa	29
6.12.3.5	Zimogramas para actividad difenolasa	30
6.13	Diseño experimental y tratamiento estadístico	30
7	RESULTADOS	31
7.1	Crecimiento de <i>Rhizopus oryzae</i> ENHE	31
7.2	Actividades enzimáticas	32
7.3	Actividades enzimáticas extracelulares	33
7.4	Proteasas	33
7.5	Lignina peroxidasa	34
7.6	Actividades enzimáticas intracelulares	35
7.7	Zimogramas	36
7.7.1	Zimogramas para proteasas	36

7.7.2	Zimogramas para fenoloxidasas	39
7.7.3	Zimograma para LiP	40
8	DISCUSIÓN	42
9	CONCLUSIONES	47
10	PERSPECTIVAS	47
11	BIBLIOGRAFÍA	49

ANEXO 1 MATERIAL Y EQUIPO UTILIZADO

Anexo 1.1	MEDIOS DE CULTIVO, AMORTIGUADORES Y REACTIVOS	62
Anexo 1.2	ESPECIFICACIONES DEL EQUIPO UTILIZADO	63

ANEXO 2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Anexo 2.1	ANÁLISIS ESTADÍSTICO. CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA EN BASE SECA DE <i>R. oryzae</i> ENHE.	63
Anexo 2.2	ANÁLISIS ESTADÍSTICO. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE EXTRACELULAR EN <i>R. oryzae</i> ENHE.	64
Anexo 2.3	ANÁLISIS ESTADÍSTICO. pH DEL MEDIO EXTRACELULAR EN <i>R. oryzae</i> ENHE.	65
Anexo 2.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXTRACELULAR DE PROTEASAS ÁCIDAS, NEUTRAS Y ALCALINAS EN <i>R. oryzae</i> ENHE	66
Anexo 2.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA INTRACELULAR DE PROTEASAS ÁCIDAS, NEUTRAS Y ALCALINAS EN <i>R. oryzae</i> ENHE.	73
Anexo 2.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA LiP EN <i>R. oryzae</i> ENHE	81
Anexo 2.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA LiP CON ALCOHOL VERATRÍLICO EN <i>R. oryzae</i> ENHE.	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Morfología del género <i>Rhizopus</i>	1
Figura 2	Lignina Peroxidasa	3
Figura 3	Ciclo catalítico de la LiP	4
Figura 4	Manganeso Peroxidasa	5
Figura 5	Ciclo catalítico de MnP	6
Figura 6	Lacasa de <i>Trametes versicolor</i>	7
Figura 7	Mecanismo óxido-reducción del centro activo de la Lacasa	8
Figura 8	Actividad monofenolasa de la tirosinasa	9
Figura 9	Actividad difenolasa de la tirosinasa	10
Figura 10	Estructura de la enzima tirosinasa	10
Figura 11	Metodología general que se llevó a cabo para el estudio de las enzimas en <i>R. oryzae</i> ENHE	20
Figura 12	Zimogramas de proteasas extracelulares en <i>R. oryzae</i> ENHE	37
Figura 13	Zimogramas de proteasas intracelulares en <i>R. oryzae</i> ENHE	38
Figura 14	Zimograma realizado con L-DOPA como sustrato	39

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1	Crecimiento de <i>R. oryzae</i> ENHE en cuanto a su biomasa seca obtenida de medio Lee sin inductores y pH del medio extracelular sin inductores	32
Gráfica 2	Actividades enzimáticas proteasas ácidas, neutras y alcalinas a nivel extracelular en <i>R. oryzae</i> ENHE	33
Gráfica 3	. Actividad LiP a nivel extracelular en <i>R. oryzae</i> ENHE crecido con y sin alcohol veratrílico en el medio Lee	34
Gráfica 4	Actividades enzimáticas proteasas ácidas, neutras y alcalinas a nivel intracelular en <i>R. oryzae</i> ENHE	35
Gráfica 5	Decoloración de azul de anilina a través del tiempo por parte de la LiP presente en los extractos extracelulares.	40

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Ai	Absorbancia inicial
Af	Absorbancia final
PDA	Agar papa dextrosa
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
$\Delta A \text{ min}^{-1}$	Cambio de absorbancia por minuto
Cm	Centímetros
E	Coefficiente de extinción molar
Dil	Dilución
DTT	Ditiotreitol
Fe	Hierro
°C	Grados Celsius
G	Gramos
h	Horas
kDa	Kilo Daltons
L-DOPA	3,4-dihidroxi-fenil-L alanina
LiP	Lignina peroxidasa
L	Litros
pH	Logaritmo negativo de la concentración de H ⁺
Mn	Manganeso
MN	Melin-Norkrands (medio de cultivo)
μg	Micro gramos
μL	Micro litro
μm	Micro metros
μM	Micro Molar
MBTH	3-metil-2-benzotiazolona hidrazonahidroclorada
Mg	Mili gramos
mL	Mili litros
mM	Mili Molar
Min	Minutos

M	Molaridad
Nm	Nanómetros
PCF	Pentaclorofenol
PPO	Polifenoloxidasas
(p/v)	Relación peso-volumen
(v/v)	Relación volumen-volumen
rpm	Revoluciones por minuto
N	Tamaño de muestra
t	Tiempo
U	Unidades de actividad enzimática
v	Volumen extracto enzimático
V	Volumen de reacción
%	Porcentaje
U.S. EPA	United States Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norte América)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Gel de electroforesis de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio)

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue estudiar tanto a nivel extra como intracelular, las proteasas (ácidas, neutras y alcalinas), fenoloxidasas (lacasa y tirosinasa) y peroxidasas (manganeso y lignina peroxidasa) presentes en *Rhizopus oryzae* ENHE el cual es un hongo filamentoso que tiene la característica de crecer en ambientes contaminados con xenobióticos como el pentaclorofenol (PCF), por lo cual el estudio de su sistema enzimático es de gran utilidad para desarrollos biotecnológicos posteriores.

R. oryzae ENHE se creció en medio Lee regulado con amortiguador de citratos 0.1M pH 5.8 a 30°C y 150 rpm; bajo tales condiciones, alcanzó su máxima producción de biomasa a partir de las 24 horas, tomándose muestra desde este tiempo hasta las 96 horas. En estos tiempos de estudio se logró cuantificar a nivel intracelular proteasas ácidas, neutras y alcalinas; en el medio extracelular se cuantificó proteasas ácidas, neutras, alcalinas y lignina peroxidasa.

La actividad lignina peroxidasa pudo ser cuantificada hasta las 48 h. Sin embargo, al adicionar 0.1g L⁻¹ alcohol veratrílico al inicio de la fermentación, esta actividad logró ser cuantificada durante toda la cinética. Debido a la actividad metabólica que presenta dicha enzima, no se descarta su participación en la remoción del PCF.

Las proteasas regulan los niveles proteicos de la célula, por lo que, detectar las proteasas que regulan a la o las enzimas de interés mediante inhibidores específicos, podría contribuir a elevar los niveles de remoción del PCF. En este trabajo se logró identificar posibles aspartato, serín y cisteín proteasas tanto en extractos extra como intracelulares.

En los extractos intracelulares que se sometieron a zimografía se detectó actividad fenoloxidasa al visualizarse una banda a 203kDa que reaccionó con L-DOPA, sin embargo, no se puede afirmar que sea producto de actividad tirosinasa, ya que con métodos espectrofotométricos y zimogramas con MBTH y tirosina, el resultado fue negativo.

ABSTRACT

The objective of this project was study the extracellular and intracellular enzymes such asproteases (acid, neutral and basic), phenoloxidases (laccase and tysosinase) and peroxidases (manganese and lignin) in *Rhizopus oryzae* ENHE which is a filamentous fungi that is able to grow in contaminated environments with xenobiotics as pentachlorophenol (PCF), so the study on their enzymatic system is useful for biotechnology developments.

R. oryzae ENHE was cultivated on Lee medium with citrate buffer 0.1M pH 5.8, at 30°C and 150 rpm. In these conditions *R. oryzae* ENHE reached its maximum biomass production from 24 hours. Samples were collected from 24 up to 96 hours of cultivation. With these conditionswe could quantify acid, neutral and alkalyneproteases in the intracellular extract, and acid, neutral and alkalyne proteases, along with lignin peroxidase (LiP), in the extracellular extract.

The LiP could be quantified only until 48 hours of cultivation, although when 0.1 g L⁻¹ was added to the medium at time zero the activity could be quantified during the whole kinetics. Involvement of LiP in PCF removal is probable given the known metabolic activity of this enzyme.

Protease enzymes participate in the turnover of cellular protein, so finding the proteases which regulate other enzymes of interest with specific inhibitors might contribute to enhance PCF removal. In this work we managed to identify some aspartatic, serine and cysteine proteases.

The intracellular extracts were subjected to zymographic studies with L-DOPA as substrate, where a dark band of aproximately 203 kDa could be detected which corresponded to phenoloxidase activity. However, we could not confirm that this activity was tyrosinase, as results turned out negative using spectrophotometric and zymographic techniques with MBTH and tyrosine as substrates.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Rhizopus oryzae*

Rhizopus oryzae es un hongo filamentososo cuya clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino: Fungi (*Myceteae*)

Phylum: *Zygomycota*

Clase: *Zygomycetes*

Orden: *Mucorales*

Familia: *Mucoraceae*

Género: *Rhizopus*

El género *Rhizopus* se caracteriza por su morfología de esporangióforo (figura 1) y se le puede clasificar en base al tamaño del mismo, a su temperatura de crecimiento, ramificación de los rizoides (Schipper y Stalpers, 1984); hibridación DNA-DNA y análisis de isoenzimas (Ellis 1986; Liouet *al.*, 2001).

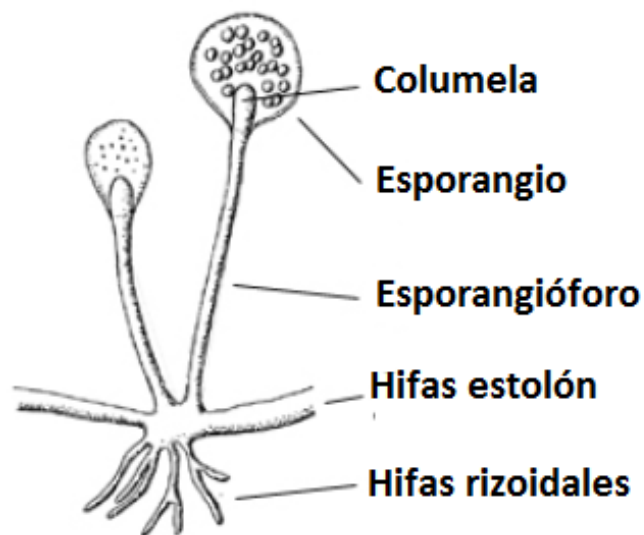


Figura 1. Morfología del género *Rhizopus* (Plantas y hongos, en línea)

Este Zygomycete se puede observar comúnmente desarrollándose en materia orgánica en descomposición; tiene la capacidad de crecer en una amplia variedad de fuentes de carbono, por ejemplo, glicerol, etanol, ácido láctico, glucosa, manosa, fructosa, sacarosa,

xilosa, celobiosa, ácidos grasos y aceites; pero es inhibido por la ciclohexamida. Las colonias de *Rhizopus* crecen muy rápidamente, madura en 4 días y forma hifas blancas aéreas conocidas como estolones, que posteriormente se tornan grisáceas. La formación de estas hifas aéreas puede facilitar la invasión de sustratos que no están en contacto inmediato con los ya colonizados (Carlile *et al.*, 2001)

Su importancia a nivel industrial radica en ser uno de los hongos más utilizados en la fabricación de alimentos fermentados tradicionales de Asia (Nout *et al.*, 1990), además es productor de ácidos orgánicos como el láctico, fumárico (Tsao *et al.*, 1999), málico y cítrico (Longacre *et al.*, 1997), así como etanol (Taherzadeh *et al.*, 2003), proteasas (Kavanagh, 2002) y glucoamilasas (Radford *et al.*, 1996). Es también conocido como un patógeno oportunista en humanos, causando zigomicosis, la cual es una infección subcutánea y profunda.

En cuanto al área ambiental, la clase Zygomycete no ha sido ampliamente estudiada su intervención en ambientes contaminados con xenobióticos sin embargo diversos trabajos han contribuido a dilucidar su papel en el medio ambiente (León-Santesteban *et al.*, 2008; Montiel *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2009) y se ha observado la intervención de enzimas como peroxidadasas y fenoloxidasas.

1.2. Peroxidasas

En la naturaleza, las peroxidadasas intervienen en reacciones de lignificación de la pared celular y en la degradación del ácido indolacético en plantas (Robinson, 1996) y en otros organismos (como los hongos) son útiles en la degradación de la lignina a compuestos de fácil asimilación. Estas enzimas utilizan el peróxido de hidrógeno o un hidroperóxido orgánico como aceptor de electrones, también se caracterizan por tener como grupo prostético a un grupo hemo tipo b (protoporfirina IX), con Fe (III) pentacoordinado. Además, presentan una elevada estabilidad térmica, química y a cambios de pH.

Las peroxidasas son dependientes de peróxidos. En la naturaleza se han estudiado dos oxidasas extracelulares que han sido relacionadas con la producción de peróxido de hidrógeno, glioxal oxidasa (Kersten y Kirk, 1987) y aril-alcohol oxidasa (Bourbonnais y Paice, 1988)

1.2.1. Lignina peroxidasa (LiP)

LiP (EC 1.11.1.14) es una glicoproteína de una masa molecular de alrededor de 41 kDa, con un hierro protoporfirínico IX como grupo prostético que fue descrita por primera vez en *Phanerochaete chrysosporium* (Tien y Kirk, 1983; Glennet *al.*, 1983), además presenta residuos de histidina ligados a este grupo prostético (Steven et al. 1993) (figura 2).

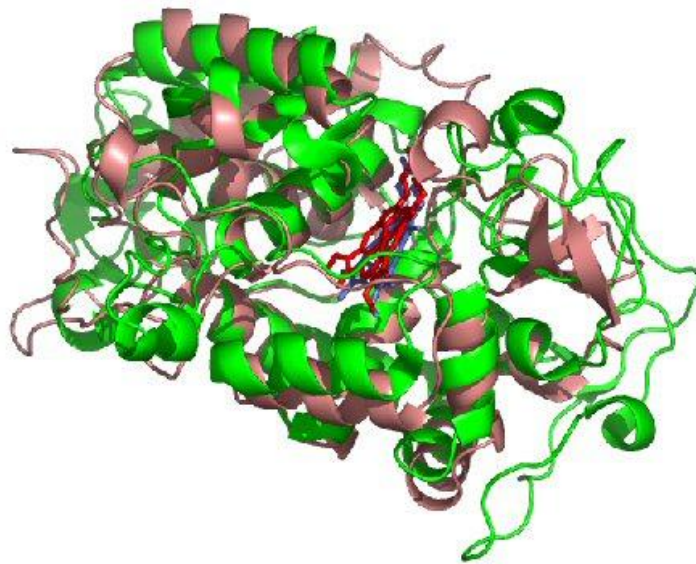


Figura 2. Lignina Peroxidasa (University of Maine, en línea)

La LiP se diferencia de otras peroxidasas por su alto potencial de óxido-reducción, lo que le permite oxidar compuestos aromáticos fenólicos y no fenólicos, y por tanto, la mayor parte de las unidades de la lignina (Tien, 1987). Sin embargo, muchos hongos degradadores de lignina parecen llevar a cabo la degradación de este polímero con una muy baja expresión de la LiP. Con ello se ha puesto énfasis en el rol de oxidantes más débiles tales como fenol oxidasa y Manganese peroxidasa.

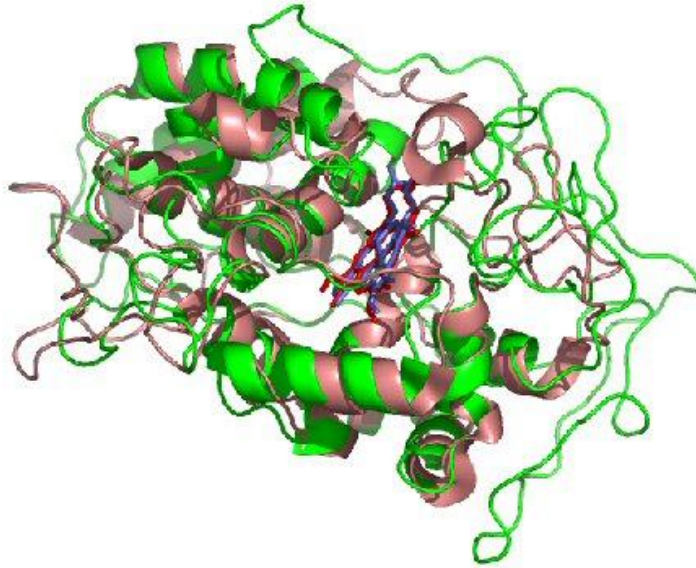


Figura 4. Manganeso Peroxidasa (University of Maine, en línea)

La reacción que lleva a cabo MnP necesita la presencia de ácidos orgánicos secretados por el microorganismo como el glicolato u oxalato, los cuales realizan una acción quelante sobre el Mn^{3+} de tal manera que sea posible la formación de un sistema redox y por lo tanto sean atacadas las estructuras fenólicas de la lignina, dejando como resultado radicales libres que tienden a desintegrarse inmediatamente. La capacidad de despolimerización que presenta dicha enzima, la hace reaccionar con una amplia variedad de compuestos fenólicos (Martinez, 2002; Banciet *al.*, 1998).

El ciclo catalítico inicia por la unión del peróxido de hidrógeno o peróxidos orgánicos al hierro nativo de la enzima y consecuentemente la rotura del enlace O-O del peróxido mediante la transferencia de dos electrones del grupo hemo de la enzima con lo cual se genera el componente I (radical complejo Fe^{4+} -oxo-porfirina). Una reducción siguiente se presenta para formar el complejo Fe^{4+} -oxo-porfirina con la donación de un electrón por parte de un monoquelato Mn^{2+} (compuesto II) quedando como Mn^{3+} ; además del Mn^{2+} puede ser reducido por otros compuestos como los fenólicos y el ferrocianuro. El ciclo es completado por la reducción del compuesto II mediante otro Mn^{2+} dando lugar a la forma original de la enzima (figura 5)

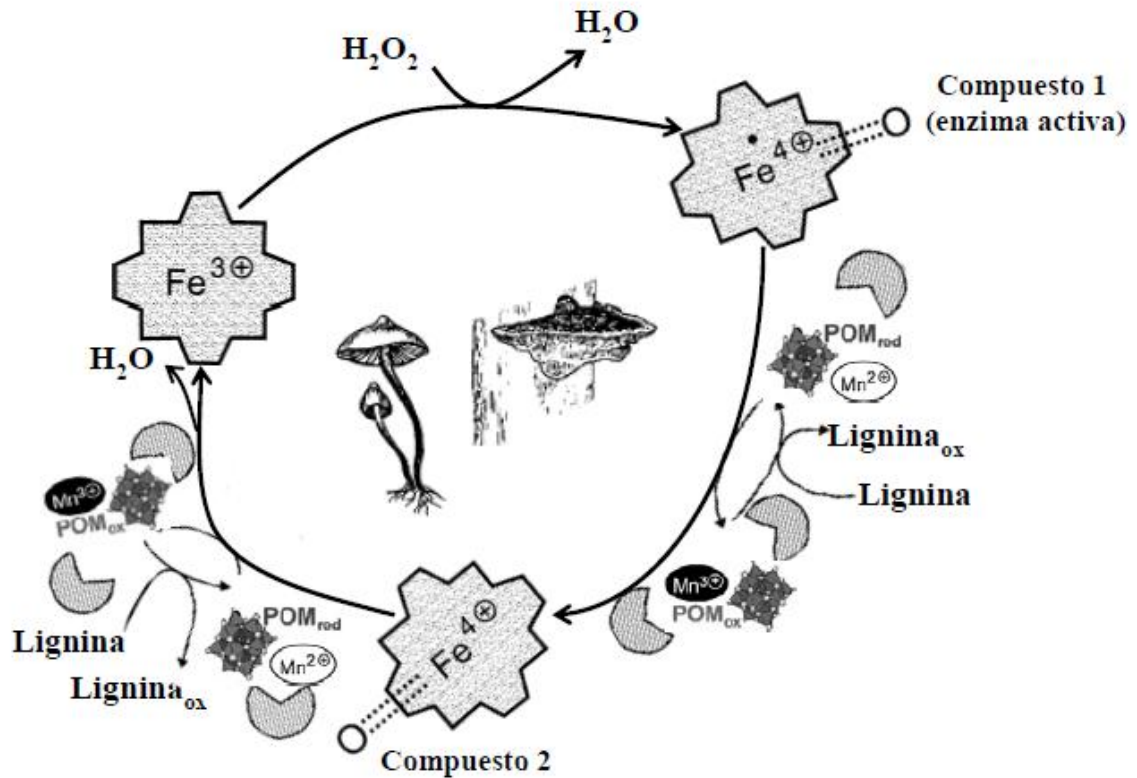


Figura 5. Ciclo catalítico de MnP (Hofrichter. 2002)

MnP generalmente se puede encontrar en hongos basidiomicetos y comúnmente estas enzimas presentan pesos moleculares entre 38 y 62.5 kDa (Hofrichter. 2002).

1.3. Fenoloxidasas

Las fenoloxidasas son oxidoreductasas que catalizan la oxidación de componentes fenólicos reaccionando con oxígeno y sin la necesidad de cofactores; se subdividen en dos subclases, tirosinasas y lacasas (Chevalier *et al.*, 1999).

Las fenoloxidasas están presentes en diversos organismos (animales, plantas, hongos y algunas bacterias); su actividad biológica en animales, se enfoca en la síntesis de melanina, procesos de esclerotización y como defensa contra factores físicos y biológicos. Estas enzimas tienen actividad O-hidroxilación de monofenoles (cresolasa) u oxidación de O-difenoles a quinonas (catecoloxidasas) o ambas (tirosinasa) (Sánchez-Ferreret *et al.*, 1995; Deckeret *et al.*, 2000).

Las actividades enzimáticas que presentan las fenoloxidasas, les permiten ser de gran utilidad en el área de la biorremediación para poder degradar compuestos aromáticos tóxicos.

1.3.1. Lacasa

Las lacasas (p-benzoil: oxígeno oxidoreductasa, EC 1.10.3.2) pertenecen al grupo de proteínas que son conocidas como oxidasas azules multicobre (Durán *et al.*, 2002). Esta enzima es capaz de catalizar la oxidación de varios componentes aromáticos (particularmente fenoles) con la consecuente reducción del oxígeno a agua.

La lacasa presenta 4 átomos de cobre que se han clasificado en tres tipos de acuerdo a su resonancia paramagnética electrónica, los cuales juegan un papel importante en el mecanismo catalítico (figura 6).

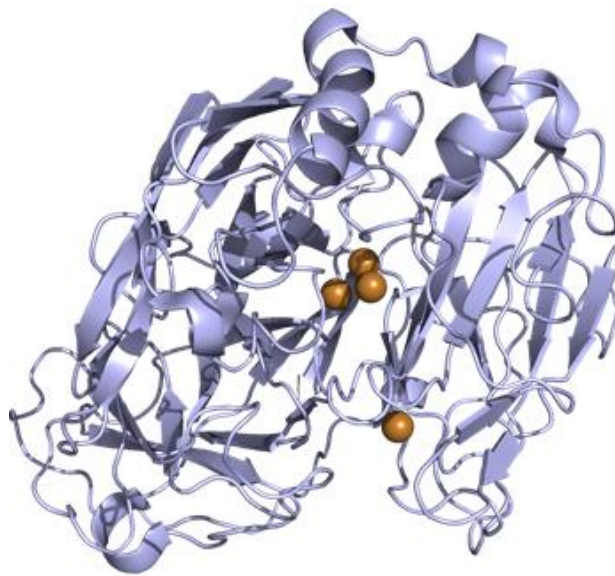


Figura 6. Lacasa de *Trametes versicolor* (The Armstrong Research Group, en línea)

El cobre del centro tipo 1 (T1) es el primer aceptor de electrones del sustrato, después los electrones se transfieren secuencialmente al grupo trinuclear que forman los cobres tipo 2

(T2) y tipo 3 (T3), que tras recibir cuatro electrones, reducen una molécula de oxígeno a agua. Así la oxidación del sustrato va acoplada a la reducción del oxígeno (figura 7).

Esta enzima reacciona con diversos compuestos aromáticos (principalmente de origen fenólico), los cuales son sometidos a una oxidación, dando lugar a un radical que puede convertirse en una quinona. Tanto la quinona como el radical libre se someten a reacciones no enzimáticas que conducen a una polimerización (Higuchi, 1989); en plantas, esta reacción de polimerización tiene la finalidad de originar una cubierta protectora cuando sufre lesiones. En los hongos, la función de la lacasa no está clara, se ha relacionado con la morfogénesis, pigmentación de los conidios, formación de rizomorfos, desarrollo de cuerpos fructificantes (Thurston., 1994), patogénesis (Lewis y Yamamoto., 1990) y en la protección frente a compuestos fenólicos tóxicos liberados durante la degradación de la lignina (Bollaget *al.*, 1988); es la causante de la podredumbre blanca en la degradación de esta última, produciendo ácidos aromáticos (Buswell y Odier., 1987).

La lacasa no presenta una gran especificidad por el sustrato que metaboliza, de hecho puede hacerlo con compuestos no aromáticos, sin embargo, a pesar de esto, no es capaz de oxidar a la tirosina.

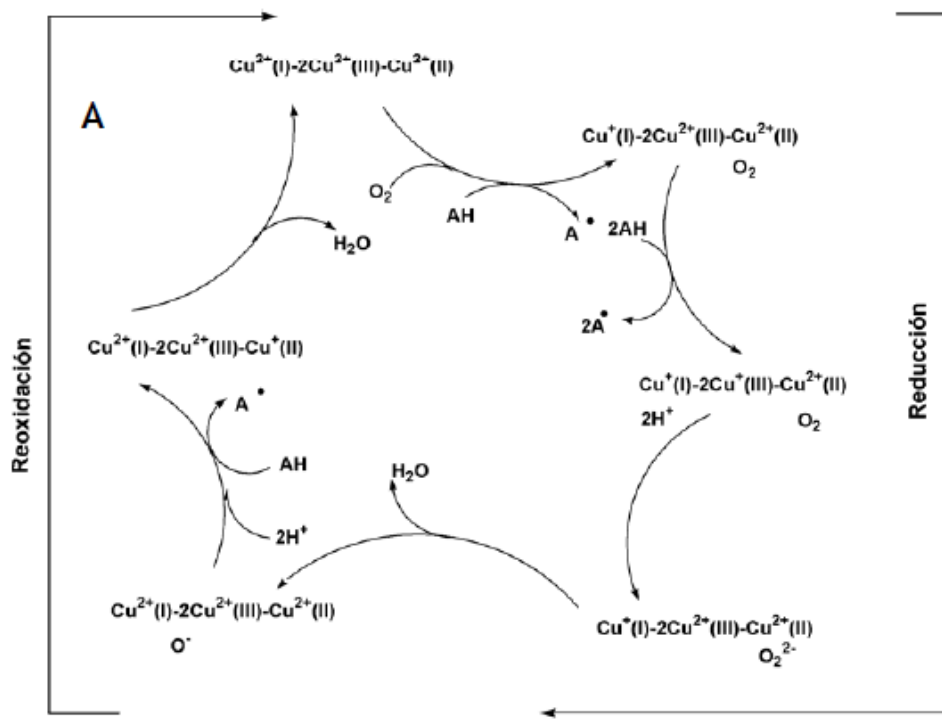


Figura 7. Mecanismo óxido-reducción del centro activo de la Lacasa (Yaropolovet *al.* 1994)

1.3.2. Tirosinasa

La enzima tirosinasa (E.C. 1.14.18) o polifenol oxidasa (PPO) tiene una amplia distribución entre los microorganismos, plantas y animales, debido a su participación en mecanismos de importancia biológica: la pigmentación de la piel en vertebrados y procesos de oscurecimiento en vegetales (Espínet *al.*, 1998) como un mecanismo de defensa a estrés físicos como radiación UV, radicales libres, rayos gamma, deshidratación y temperaturas extremas.

En hongos, la PPO puede encontrarse en el citoplasma, asociada a la pared celular o en el medio extracelular (Rastet *al.*, 2003; Marcial, 2011). El peso molecular de las PPO fúngicas presentan una considerable diversidad; parte de esta diversidad es genética, como es indicado por los agrupamientos en el árbol filogenético de las enzimas (Halalouillet *al.*, 2005).

La PPO es una enzima bifuncional presenta actividad monofenolasa y difenolasa. La actividad monofenolasa inserta oxígeno molecular en la posición orto de un grupo hidroxilo existente en un anillo aromático (cresoles, clorofenoles, fenol, etc.) produciendo sus correspondientes *o*-difenoles (catecol, dopamina, L-DOPA, epinefrina) (figura 8), la reacción continúa con la actividad difenolasa al oxidar el difenol a su correspondiente quinona (figura 9) (Manson., 1956); las quinonas sufren reacciones no enzimáticas con diferentes nucleófilos, produciendo pigmentos de color marrón oscuro.

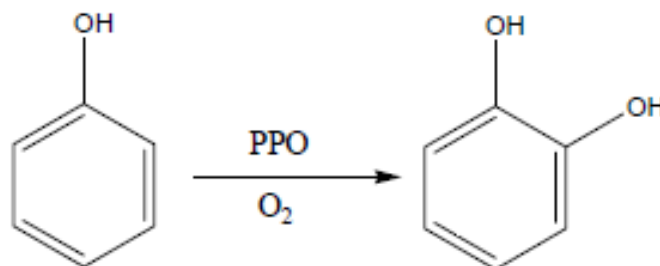


Figura 8. Actividad monofenolasa de la tirosinasa

La actividad monofenolasa de la tirosinasa, la distingue de otras actividades fenoloxidasas, aunque la incapacidad de oxidar la tirosina, pero sí el 3,4-dihidroxi-fenil-L alanina (L-DOPA) podría ser tomado como una prueba de actividad lacasa (Mayer. 1987).

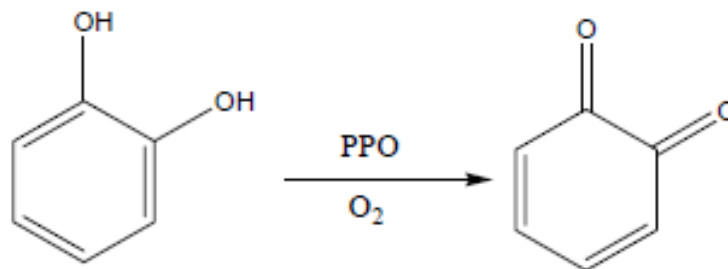


Figura 9. Actividad difenolasa de la tirosinasa

Esta enzima contiene en su centro activo un complejo binuclear de cobre (figura 10), lo cual la hace ser perteneciente al grupo 3 de las proteínas de cobre (Durán *et al.*, 2002).

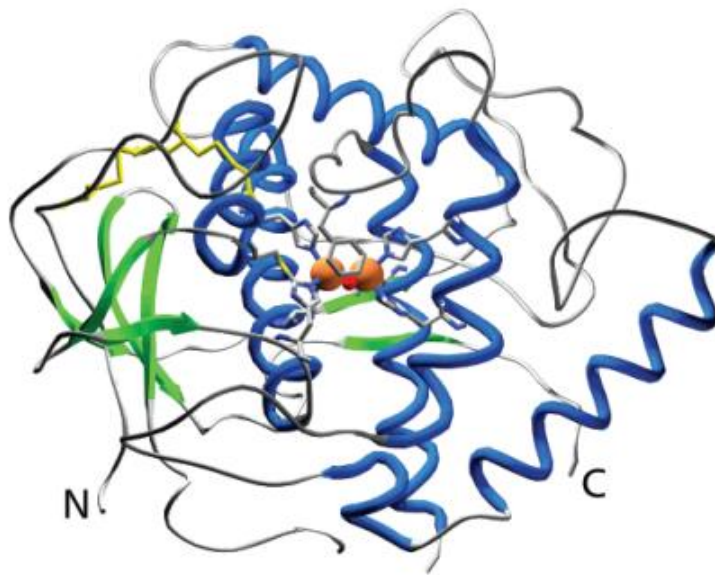


Figura 10. Estructura de la enzima tirosinasa (Gerdemann *et al.* 2001)

1.4. Proteasas

Las proteasas son enzimas proteolíticas que pertenecen al grupo de las hidrolasas, debido a que catalizan la degradación de otras proteínas hidrolizando los enlaces peptídicos con la consecuente eliminación de una molécula de agua.

La importancia que presentan las proteasas en las células, es conservar los niveles proteínicos en equilibrio, regulando las velocidades de síntesis y degradación de las mismas (Schimke y Doley. 1970). Además de facilitar la absorción de sustratos, protección hacia agentes externos y comofactores de virulencia en organismos patógenos (North. 1982).

Las proteasas constituyen uno de los grupos de mayor utilidad en la industria alimenticia (bebidas, panificación, ablandamiento de carne, etc.) y farmacéutica. Las proteasas de origen microbiano son de mayor producción por sobre las de origen vegetal, debido a su gran tasa de producción y fácil cultivo.

Las proteasas fúngicas presentan ciertas ventajas sobre las bacterianas, en cuanto a su ubicación generalmente extracelular, son de fácil recuperación y purificación, los procesos de producción involucrados son habitualmente más sencillos y económicos, además de secretar mayor variedad de proteasas. De acuerdo al sitio donde actúan las proteasas en una cadena proteínica, se clasifican en exopeptidasas y endopeptidasas.

1.4.1. Exopeptidasas

Este tipo de proteasas actúan en los extremos de las cadenas polipeptídicas, ya sea en el extremo amino terminal (aminopeptidasas) o en el carboxilo terminal (carboxipeptidasas).

- Aminopeptidasas (L-aminoácil péptido hidrolasas E.C. 3.4.11): Catalizan la reacción de liberación secuencial de aminoácidos del extremo amino terminal.
- Carboxipeptidasas (Peptidilaminoácido hidrolasa E.C. 3.4.12): Catalizan la reacción de liberación secuencial de aminoácidos del extremo carboxilo terminal.

1.4.2. Endopeptidasas

Catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos situados preferentemente en el interior de la cadena polipeptídica y son capaces de degradar a las proteínas hasta oligopéptidos. Pueden clasificarse en base al rango de pH al cual son activas (ácidas, neutras o alcalinas); en base a su habilidad para hidrolizar proteínas específicas (queratinasas, colagenasas, etc.) o en base a características similares, como por ejemplo, pepsina, tripsina y quimiotripsina. La clasificación más aceptada es la propuesta por Hartley en 1960, la cual está basada en el mecanismo catalítico y cada grupo puede ser distinguido de acuerdo a su sensibilidad a diversos inhibidores.

- Serínproteasas (EC 3.4.21): Poseen un residuo de serina en su sitio activo y son inhibidas principalmente por fluoruro de fenilmetilsulfonilo, diisopropil-fluorofósforo y otros organofosforados (Betancourt. 2009), así como por agentes quelantes como el EDTA. La mayoría de las serín proteasas son activas a pHs alcalinos; usualmente son de bajo peso molecular (alrededor de 25 kDa) y su punto isoeléctrico (pI) ronda pH 4.4 a 6.2 (Ebeling *et al.*, 1974).
- Cistein proteasa (EC 3.4.22): Contiene residuos de cisteína e histidina en el centro activo y son inhibidas por Iodoacetamida, iodoacetato, metales pesados y *N*-ethylmaleimida. Agentes reductores, cisteína y EDTA, funcionan como activadores. Las cisteín proteasas usualmente son activas a pHsligeramente ácidos (Cinoet *al.*, 1973).
- Aspartato proteasas (EC 3.4.23): También son conocidas como proteasas ácidas, debido a la presencia de uno o dos grupos carboxilos que contiene en el centro activo; son inhibidas por pepstatina, acetil pepstatinay epóxidos. La gran mayoría de las enzimas pertenecientes a esta clasificación son activas a valores de pH ácidos. En hongos microoscópicos, la gran mayoría de estas enzimas presenta pI por debajo de pH 5.1 (entre 3.4 y 4.6), excepto de las proteasas de *Sporotrichumdimorphosporum* (pH 7.4) (Tapia *et al.*, 1981).
- Metaloproteasas (EC 3.2.24): Necesitan cationes metálicos divalentes como cofactores. Son inactivadas en presencia de agentes quelantes y por procesos de diálisis (Suárez-Rendules y Wolf, 1988). Generalmente las metaloproteasas son

activas a un pH alrededor de la neutralidad, tienen un peso molecular alrededor de 20 kDa y no es muy común encontrarlas en hongos.

Los cuatro tipos de proteasas mencionadas han sido detectadas en hongos, sin embargo las aspartato y serín proteasas son las más predominantes. Aunque las enzimas del mismo tipo pero de diferentes especies, pueden presentar grandes similitudes, las proteasas fúngicas, en general, tienen una especificidad más amplia que las equivalentes en mamíferos (North, 1982).

1.5. Isoenzimas

El término isoenzima fue propuesto por Markert y Moller. (1959), para describir las enzimas que presentan la misma función catalítica pero difieren entre sí en propiedades químicas, físicas y cinéticas.

La importancia de las isoenzimas radica en ser utilizadas para estudios filogenéticos (Vastaget *al.*, 1998; Saboticet *al.*, 2007). Cada una puede presentar diferente afinidad por los sustratos, así como ser inhibidas diferencialmente por agentes específicos, por lo cual pueden ser estudiadas de manera individual, así como su interacción con los demás sistemas celulares.

Al presentar diferentes características estructurales y cinéticas, la célula puede secretar diferentes tipos de isoenzimas, de acuerdo al pH del medio en el que se encuentre, la temperatura, los diferentes inhibidores a los que esté expuesta y sus requerimientos nutrimentales.

1.6. Zimogramas

En 1957 Hunter publicó un artículo en el cual reportó la separación y visualización de la actividad enzimática de esterasas proveniente de un extracto crudo, utilizando geles de almidón mediante técnicas electroforéticas. A partir de este momento se ha utilizado como

una gran herramienta para la caracterización de las isoenzimas, presentes en un sistema biológico determinado en cuanto a peso molecular, punto isoeléctrico y medición semicuantitativa de las isoenzimas (García-Carreño. 1993).

Los zimogramas se realizan mediante un SDS-PAGE (acrónimo en inglés de sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide gel) bajo condiciones no reductoras, es decir sin usar ditionitrotol (DTT) ni 2-mercaptoetanol. La actividad enzimática se revela con ayuda de un sustrato específico para la misma, ya sea copolimerizado en el gel o disuelto en el amortiguador donde se incubará el mismo.

Ong y Chang (1997) introdujeron al análisis de zimografía convencional la técnica de isoelectroenfoque, con la finalidad de dar mayor resolución a la separación de las isoformas de la enzima en estudio, por lo que se comenzó a utilizar los zimogramas en dos dimensiones (2D-zimogramas). La primera dimensión corresponde a la separación por medio de punto isoeléctrico y la segunda de acuerdo al peso molecular de cada isoforma mediante un SDS-PAGE.

El SDS-PAGE se basa en la migración de las proteínas a través de un gel de acrilamida conteniendo SDS con la finalidad de que este detergente aniónico se una a las proteínas en una proporción estequiométrica de 1 molécula de SDS por cada 2 aminoácidos (Nelson. 1970), con lo cual se logra uniformar la carga de cada una de ellas (carga negativa), de tal manera que al someter el SDS-PAGE a un campo eléctrico, las proteínas solamente se pueden separar debido a su peso molecular.

El SDS, al ser un detergente aniónico fuerte, tiene la capacidad de unirse a los núcleos internos hidrófobos de las proteínas y por lo tanto desnaturalizarlas, lo cual provoca que pierdan su actividad catalítica; por lo tanto este detergente debe ser eliminado de la muestra a analizar.

Después de concluida la electroforesis, el gel se somete a una incubación en una solución de triton X-100, el cual es un detergente no iónico que al unirse a las proteínas no provoca

su inactivación y elimina el SDS de la proteína con la finalidad de renaturalizarlas (Alberts.*et. al.*, 2002).

Como ya se mencionó los zimogramas a diferencia del SDS-PAGE convencional se diferencian en no someter a las muestras a condiciones reductoras, es decir, no se agrega DTT ni 2-mercaptoetanol, los cuales son agentes que rompen enlaces disulfuro en las proteínas y por lo tanto las enzimas pierden su actividad catalítica

2. ANTECEDENTES

Los hongos tienen la capacidad de crecer en casi cualquier ambiente; producen metabolitos de alto valor agregado, secretan enzimas de interés industrial (principalmente proteasas), además son capaces de degradar compuestos complejos (como la lignina). Debido a esta última característica se han utilizado recientemente en el área de la biotecnología ambiental con la finalidad de remover distintos compuestos contaminantes de difícil degradación natural.

Los hongos que más ampliamente han sido investigados por su participación en la degradación de compuestos tóxicos, son los llamados “hongos de la pudrición blanca” (*Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*), sin embargo, recientemente se ha puesto interés en otras especies de hongos debido a su capacidad de crecer en ambientes contaminados con xenobióticos y/o metales pesados.

En el laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolismo Secundario de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa, se lograron aislar dos cepas fúngicas del phylum Zigomycete capaces de crecer en medios contaminados con clorofenoles, las cuales se lograron identificar por técnicas de biología molecular como *Rhizopus oryzae* ENHE aislado del suelo de un aserradero en Puebla (León-Santiesteban *et al.*, 2008) y *Amylomyces rouxii* aislado de un efluente de la industria de la pulpa y el papel (Montiel *et al.*, 2004); ambos microorganismos presentan capacidad para remover pentaclorofenol (PCF), el cual es un xenobiótico utilizado como conservador de madera y es uno de los desechos de la industria papelera. Este xenobiótico presenta un amplio espectro de toxicidad al causar alteraciones en el sistema inmunológico y endócrino, aumenta la susceptibilidad a infecciones, altera las funciones reproductivas y además es un mutágeno (Castillo y Bárcenas. 1998), por lo que se le considera un compuesto tóxico moderado (Clase II de toxicidad de la EPA).

Al caracterizar *A. rouxii*, se comprobó que presenta actividad fenoloxidasas (tirosinasa) y proteasas (ácidas) (Montiel *et al.*, 2004; Pérez de los Santos 2009), además debido a su

capacidad de crecer en ambientes contaminados con PCF, es capaz de remover dicho xenobióticos hasta en un 81% (de una concentración inicial de 12.5 mg PCF L⁻¹) en medio Melin-Norkrands (MN) modificado (Marcial *et al.*, 2006). En el 2011, Marcial identificó una aspartato proteasa extracelular (rhizopuspepsina-2) que afecta de manera negativa la actividad tirosinasa, enzima involucrada en la remoción de PCF.

En cuanto a *R. oryzae* ENHE, León-Santiesteban (2010) al inmovilizar dicha cepa en fibra de nylon saturada con PCF y en medio MN, logró una remoción del 92% de 25 mg PCF L⁻¹ en 72h. En el 2008, León-Santiesteban *et al.* encontraron actividad tirosinasa y LiP en *R. oryzae* ENHE. Además observaron un incremento de la actividad tirosinasa hasta en un 14% en el extracto extracelular y 4.71 veces mayor en el extracto intracelular al agregar 0.1 g L⁻¹ de tirosina.

3. JUSTIFICACIÓN

R. oryzae ENHE es un hongo capaz de crecer en ambientes contaminados con PCF por lo cual probablemente tiene sistemas enzimáticos como peroxidasas y fenoloxidasas que le podrían permitir soportar estos xenobióticos; otro aspecto a considerar es el hecho de que el género *Rhizopus* es un importante productor de proteasas, las cuales podrían afectar de manera negativa la actividad de otras enzimas, como es el caso de la *rhizopupepsina-2* en *A. rouxii*, por lo tanto el estudio de estas enzimas en *R. oryzae* ENHE podrían contribuir a desarrollos biotecnológicos.

4. HIPÓTESIS

De acuerdo a previas investigaciones en torno a la biorremediación de ecosistemas contaminados con desechos xenobióticos se plantean la siguiente hipótesis:

- Tanto fenoloxidasas como proteasas y peroxidasas se han caracterizado en diferentes hongos filamentosos degradadores de compuestos fenólicos, por lo que su presencia en *R. oryzae* ENHE es probable.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar si *R. oryzae* ENHE presenta actividades de proteasas, fenoloxidasas y peroxidasasa nivel extra y/o intracelular.

5.2. Objetivos particulares

- Cuantificar la actividad enzimática extra e intracelular de proteasas, fenoloxidasas y peroxidasas en *R. oryzae* ENHE.
- Determinar el efecto de diferentes inductores sobre las actividades enzimáticas de peroxidasas y fenoloxidasas de *R. oryzae* ENHE.
- Determinar las isoformas de las enzimas encontradas bajo las condiciones de crecimiento de *R. oryzae* ENHE.

6. METODOLOGÍA

La figura 11 describe de manera general la metodología desarrollada.

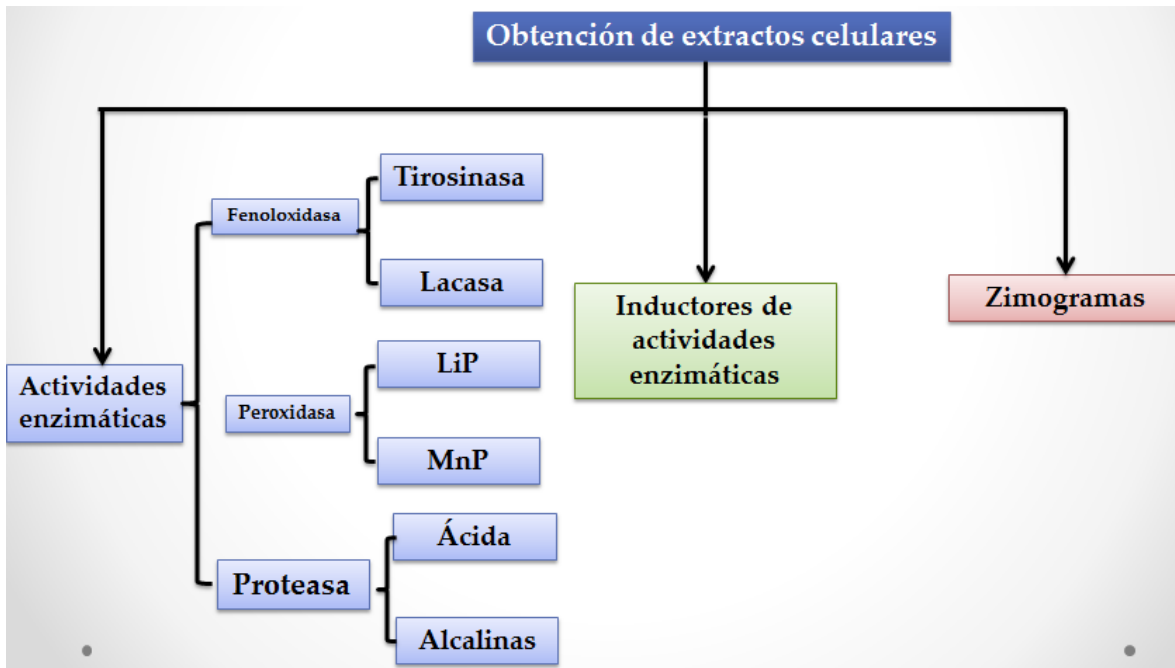


Figura 11. Metodología general que se llevó a cabo para el estudio de las enzimas en *R. oryzae* ENHE

Las especificaciones sobre la formulación de los reactivos y el equipo utilizado se plantean en el anexo 1.

6.1. Propagación de *R. oryzae* ENHE.

La propagación de *R. oryzae* ENHE se llevó a cabo en agar papa y dextrosa (PDA) con 2% (p/v) de agar bacteriológico en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 40 mL de medio de cultivo. El medio de cultivo se inóculo con esporas del zigomiceto y se incubó de 7 a 8 días a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, hasta su esporulación. Las esporas se recolectaron con Tween 80 al 0.1% (v/v) y se conservaron en viales de 2 mL con glicerol al 40% (v/v) a -20°C .

6.2. Obtención de esporas para análisis posteriores.

De la suspensión de esporas que se obtuvo según la metodología descrita anteriormente, se inocularon 100 µL en 40 mL de PDA con 2% de agar bacteriológico en matraces Erlenmeyer de 250mL durante 7 a 8 días a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Las esporas (se observan de un color gris oscuro) que se encontraban presentes después de este periodo de incubación, se cosecharon mediante un agitador magnético en una solución de Tween 80 al 0.1% (v/v).

6.3. Concentración y lavado de esporas

La solución de esporas se filtró a través de tela miracloth con la finalidad de eliminar residuos de micelio y agar, posteriormente el filtrado se colocó en microtubos de 1.5 mL y se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 min a 4°C . El sobrenadante resultante se eliminó y la pastilla de esporas se lavó con 700 µL de agua destilada estéril para centrifugarse nuevamente. Lo anterior se repitió hasta lograr un sobrenadante claro, lo cual nos indicó la eliminación del Tween 80. Por último, la pastilla de esporas se resuspendió en 400 µL de agua destilada estéril y se transfirió a un tubo tipo Falcon de 50 mL. Un volumen de la suspensión de esporas resultante se diluyó 10 veces para poder contar las esporas por medio de la cámara Neubauer.

6.4. Fermentación sumergida

Se colocaron 50 mL de medio Lee en amortiguador de citratos al 0.1 M y pH 5.8 estéril en matraces Erlenmeyer de 250 mL y se inocularon con 1×10^6 esporas mL^{-1} . Los matraces inoculados se mantuvieron en incubación a $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ con una agitación de 150 rpm y se tomó como muestra a analizar tanto el medio líquido como la biomasa cada 24 h hasta las 96 h.

6.5. Obtención de extractos extracelulares

El medio de cultivo se filtró al vacío con papel filtro Whatman #44 (puestos previamente a peso constante) para separar el medio de la biomasa. La biomasa se cuantificó mediante peso seco. El extracto libre de células se guardó a 4°C hasta su posterior análisis (no más de 1 día ya que las actividades enzimáticas variaban con periodos de refrigeración prolongados).

6.6. Obtención de extractos intracelulares

La biomasa recuperada por filtración se transfirió a un mortero enfriado previamente a -70°C y mantenido en hielo. La biomasa se maceró por completo con un pistilo y se colocó en tubos Eppendorf, donde se re-suspendió en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 (1mg biomasa mL⁻¹), posteriormente se mezcló en un vórtex hasta que se alcanzó una disolución homogénea. Finalmente, la suspensión se centrifugó a 14,000 rpm durante 20 min a 4°C; y el sobrenadante obtenido se conservó a 4°C para su posterior análisis (por no más de 1 día de almacenamiento).

6.7. Determinación de actividad fenoloxidasas

6.7.1. Actividad monofenolasa (tirosinasa)

La actividad tirosinasa se cuantificó mediante el método espectrofotométrico descrito por Mazzocco y Pefferri (1976). La reacción se llevó a cabo en presencia de 1 mL amortiguador de fosfato-citrato 0.4 mM, pH 4.2, 500µL de 3-metil-2-benzotiazolona hidrazonahidroclorada (MBTH) 2 mM como agente cromóforo, 500µL de extracto enzimático y 500µL de fenol 0.5M como sustrato. Se utilizó tirosinasa comercial (Sigma T3824) como control positivo y lacasa comercial (Sigma 51639) como control negativo. La prueba se inició con la adición del fenol y se permitió que la reacción se llevara a cabo por 1 min para posteriormente detenerla con 1mL H₂SO₄ concentrado y 2mL de acetona, posteriormente se cuantificó espectrofotométricamente a 495nm; se preparó una curva

patrón con concentraciones molares de I_2 (1×10^{-4} hasta $12 \times 10^{-3} M$), el cual sustituyó la actividad de la enzima tirosinasa.

6.7.2. Actividad de la lacasa

La actividad de la enzima lacasa se cuantificó según lo reportado por Niku-Paavola *et al.* (1990), mediante la oxidación de 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) al 5 mM en amortiguador de acetato de sodio pH 5.4, 200 μL de muestra y agua destilada hasta 1 mL. La reacción se realizó a 30°C durante 1 min y la oxidación del ABTS se siguió por el incremento en la absorbancia a 420nm.

Se utilizó lacasa (Sigma 51639) comercial como control positivo y peroxidasa de rábano (Sigma P8375) como control negativo.

6.8. Determinación de actividad proteolítica

Debido a que no se conoce el tipo de proteasas producidas por *R. oryzae* ENHE se realizaron 3 procedimientos para determinar si estas proteasas son de tipo ácido, neutro o básico. Para el caso de las proteasas ácidas se utilizó como sustrato a la hemoglobina, ya que tiene su máxima solubilidad a pH 3.5. Para proteasas neutras y alcalinas se utilizó la caseína, debido a que su solubilidad es limitada a valores de pH por debajo de 6 (Park *et al.*, 2007).

6.8.1. Actividad proteasas ácidas

La actividad de las proteasas ácidas se realizó de acuerdo a los métodos descritos por Anson (1938) y Asakura *et al.*, (1997), utilizándose hemoglobina al 2% (p/v) disuelta en amortiguador universal 25 mM a pH 3.5.

A 1 mL de hemoglobina se le adicionaron 0.25 mL de extracto enzimático. La reacción se incubó a 37°C durante 20 min y posteriormente se detuvo con 0.25 mL de ácido tricloroacético al 10% (p/v). La mezcla resultante se incubó a 4°C durante 15 min y se

centrifugó a 14,000 rpm durante 15 min más para descartar los precipitados formados y hacer una la lectura correcta de la absorbancia del sobrenadante a 280 nm.

6.8.2. Actividad proteasas neutras y alcalinas

La reacción se llevó a cabo mediante la técnica de Kunitz(1946) reportada por Yamaguchi *et al.*, (1983), en la cual se utilizaron 1 mL de caseína al 1% disuelta en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7, para proteasas neutras y amortiguador de glicina 0.1 M pH 9, para proteasas alcalinas. La reacción se inició al adicionar al sustrato 250 µL de extracto enzimático, y se incubó durante 10 min a 37°C. La reacción se detuvo con 200 µL de ácido tricloroacético al 50% para posteriormente centrifugarse durante 10 min a 10,000 rpm. Al sobrenadante obtenido se leyó la absorbancia a 280 nm.

La actividad proteasas (U mL⁻¹) se determinó de acuerdo a la fórmula establecida por Yamaguchi *et al.* (1983):

$$\frac{U}{mL} = \frac{A * dil}{0.001 * t * v}$$

Dónde:

A = Absorbancia medida a 280nm

dil = dilución

t = tiempo en min

v = volumen del extracto enzimático (mL)

6.9. Determinación de actividad peroxidasa

6.9.1. Actividad Lignina Peroxidasa (LiP)

La actividad LiP se evaluó por espectrofotometría UV a 310 nm (Tien y Kirk. 1988), mediante la detección del veratraldehído ($\epsilon_{310}^{TM} = 9300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) producido durante la oxidación del alcohol veratrílico. La mezcla de reacción contenía 400 µL de amortiguador de tartrato de sodio 125mM pH 3.0, 200 µL de alcohol veratrílico 10mM, 200µL de

peróxido de hidrógeno al 2mM y 200µL de extracto enzimático. La reacción se incubó a 30°C y se siguió durante 3 min midiendo los cambios de absorbancia

6.9.2. Actividad Manganeso Peroxidasa (MnP)

Se cuantificó la actividad enzimática de MnP a 610 nm ($\epsilon_{610} = 4460 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) usando la metodología descrita por Kuwahara *et al.* (1987). La mezcla de reacción contenía 500 µL de extracto enzimático, rojo de fenol al 0.01% (p/v), lactato de sodio 25 mM, albúmina bovina 0.1% (p/v), sulfato de magnesio 100 µM y 100µM de peróxido de hidrógeno preparado en amortiguador de succinato de sodio 20 mM pH 4.5.

La reacción se mantuvo en incubación a 30°C durante 5 min y se detuvo con la adición de 40 µL de NaOH 2N.

Para determinar la actividad enzimática volumétrica de lignina y manganeso peroxidasa se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{V}{v * e * d * \Delta A \text{min}^{-1}}$$

Dónde:

V = Volumen total de reacción (mL)

v = volumen extracto enzimático (mL)

e = coeficiente de extinción ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

d = diámetro de la cubeta (cm)

$\Delta A \text{min}^{-1}$ = Cambio de la absorbancia por min

6.10. Determinación de proteína soluble

A los extractos extracelulares se les cuantificó la proteína soluble por medio del microensayo de Bradford (1976).

La curva de calibración se realizó con diferentes concentraciones de seroalbúmina bovina, partiendo de una solución stock de 100 µg mL⁻¹. Las concentraciones utilizadas para la

curva fueron desde $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ hasta $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. A cada dilución se le adicionaron $200 \mu\text{L}$ del reactivo Bradford (Bio-Rad 500-0006), se homogenizó con vórtex y se dejaron reposar durante 5 min, posteriormente se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 595 nm. Cada dilución se realizó por triplicado.

Para la determinación de proteína soluble en los extractos enzimáticos, se tomaron $800 \mu\text{L}$ de extracto extracelular. Mientras que para el extracto intracelular se tomaron $2 \mu\text{L}$ y se diluyeron en $798 \mu\text{L}$ de agua desionizada. La misma dilución se realizó para los extractos concentrados que se utilizaron en la zimografía (ver más adelante). En ambos casos se colocó $200 \mu\text{L}$ del reactivo de Bradford para llevar a cabo la reacción.

6.11. Inducción de las actividades enzimáticas

De acuerdo a los antecedentes previamente presentados, las peroxidasas y fenoloxidasas son las enzimas que podrían participar en la degradación de xenobióticos, por lo que es de importancia probar el efecto de elementos reportados como inductores de las actividades enzimáticas cuantificadas.

Como se señala en la parte de resultados, se cuantificó la actividad de LiP en el medio extracelular donde se creció a *R. oryzae* ENHE, por lo cual se probó la inducción de esta enzima utilizando alcohol veratrílico (Kirk y Farrell. 1987) en una concentración de 1g L^{-1} , al momento de colocar el inóculo según lo reportado por León-Santiesteban *et al.* (2008). Estos mismos autores observaron un incremento en la actividad tirosinasa al adicionar al medio MN, 0.1g L^{-1} tirosina, por lo que se decidió agregar este reactivo al sistema en estudio, a pesar de no haber cuantificado dicha actividad.

6.12. Zimogramas

Una vez que se determinaron las actividades enzimáticas presentes en el sistema de trabajo (*R. oryzae* ENHE en medio Lee) mediante pruebas espectrofotométricas, se procedió a caracterizar dichas enzimas mediante zimogramas.

Los zimogramas permiten la detección de isoenzimas por medio de sus actividades enzimáticas sobre geles de electroforesis (SDS-PAGE) que contienen el sustrato copolimerizado o disuelto en el amortiguador específico para la actividad enzimática deseada.

6.12.1. Extracción de proteína extracelular

Se tomó el contenido total de cada matraz como muestra, a las 48h del cultivo de *R. oryzae* ENHE. En este caso, con la finalidad de obtener la mayor concentración de proteína posible, las muestras provienen de 6 matraces con 50 mL de medio Lee cada uno; inmediatamente después de tomadas las muestras se adicionaron 60 µL de cocktail inhibidor de proteasas (Sigma P9599) (sin embargo para la determinación de proteasas no fue necesario agregarlo) por cada 50 mL de medio y las muestras se mantuvieron en hielo durante todo el proceso. Las muestras se filtraron con nyal estéril para separar la biomasa del medio extracelular. La biomasa se reservó para la extracción de proteína intracelular. Una vez obtenido el medio extracelular libre de biomasa se transfirió a través de una membrana de ultrafiltración (Millipore P60085), con la finalidad de concentrar la muestra hasta aproximadamente 15 mL para posteriormente someterla a otra ultrafiltración en tubos Amicon de 15 mL (Millipore, UFC901024), para reducir los 15 mL a 1 mL aproximadamente. El concentrado de proteína se utilizó de inmediato (de preferencia) o se almacenó de 0 a 4°C por no más de tres días, ya que la actividad enzimática se pierde con el tiempo.

6.12.2. Extracción de proteína intracelular

Una vez filtrado el medio Lee y recolectado la biomasa en nyal estéril se procedió a secarla al máximo con papel filtro y posteriormente se colocó en un mortero estéril y enfriado previamente a -70°C. El micelio se maceró hasta obtener una pasta totalmente uniforme (todo el procedimiento se realizó en hielo). Se cuantificó el peso de la biomasa obtenida, y se consideró que por cada 0.01 g de biomasa obtenida se debería de colocar 1 mL de regulador de solubilización y 20 µL de cocktail inhibidor de proteasas (en caso de ser

necesario). La solución se mezcló de manera constante por 1 h, procurando mantenerla a 4°C. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min y el sobrenadante se filtró a través de membranas de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.22 µm. Por último, se ultrafiltró el sobrenadante empleando tubos Amiconde 0.5 mL y de 10 kDa de tamaño de corte (Millipore, UFC501024) en una centrifuga Eppendorf 5417R a 13,000 rpm por 3 min.

6.12.3. Zimogramas

Para los zimogramas se siguió la metodología descrita por Laemmli (1970) para geles SDS-PAGE pero bajo condiciones no reductoras (no se usó DTT o 2-mercaptoetanol ni tampoco se calentó). Se utilizó un gel de apilamiento de 4% y un gel de separación del 12% de acrilamida (Bio-Rad 161-0158). Las muestras se mezclaron con el regulador de carga (v/v) y se inyectó en cada pozo 25 µL. El gel se corrió a 4°C a 90 V por 3h. Después de la electroforesis, el gel se lavó con agua desionizada y posteriormente se incubó en triton X-100 a temperatura ambiente con agitación constante durante 2h. Una vez concluido dicho paso, se lavó nuevamente el gel para eliminar el triton X-100 y se colocó en el regulador idóneo para la actividad enzimática deseada por 2 h a 4°C. Pasado este tiempo, se incubó a la temperatura óptima para la actividad enzimática deseada con agitación constante.

Uno de los pozos del gel de acrilamida se utilizó para colocar 4 µL de marcador de peso molecular (Bio-Rad 161-0373).

6.12.3.1. Zimogramas para proteasas

Los zimogramas para proteasas se realizaron a pH 3, 7 y 9 con la finalidad de determinar proteasas ácidas, neutras y alcalinas, respectivamente. Como sustrato se utilizó caseína al 0.1% (p/v) copolimerizada en el gel de acrilamida (el sustrato se disolvió en la acrilamida después de ser sonicada).

Para el pH ácido se utilizó amortiguador de Glicina-HCl 0.04M, para el neutro amortiguador de fosfatos 0.05M y para el básico Glicina-NaOH 0.1M. En todos los casos, la

incubación se realizó a 37°C con agitación constante durante una noche. Posteriormente, los geles se tiñeron con azul de Comassie G-250 al 0.1% (se preparó según lo reportado por Candiano *et al.* 2004) durante 2 h y por último se destiñeron con agua desionizada. Las actividades enzimáticas de las proteasas se observaron como halos translucidos sobre un fondo azul.

6.12.3.2. Zimogramas para actividad LiP

Para el caso de la actividad enzimática LiP se utilizó como sustrato azul de anilina a una concentración de 0.01% copolimerizado en el gel de acrilamida. La incubación se realizó a 30°C en regulador de tartrato de sodio 125 mM pH 3 y 2 mM de H₂O₂. La actividad se observó cada 5 min por 1h. La actividad enzimática de LiP se observó como un halo translucido sobre y fondo azul. En el momento en que se observó el halo, el gel fue procesado en el fotodocumentador. Como control positivo se utilizó peroxidasa de rábano comercial.

6.12.3.3. Zimogramas para fenoloxidasas

Como se mencionó en los antecedentes, León-Santiesteban en el 2008, cuantificó actividad tirosinasa en *R. oryzae* ENHE en medio MN, sin embargo bajo las condiciones en las que se trabajó el presente proyecto no se cuantificó, por lo que, se buscó mediante zimografía indicios de actividad enzimática monofenolasa y/o difenolasa.

6.12.3.3.1. Zimogramas para actividad monofenolasa

En este caso, el sustrato se adicionó al amortiguador en el cual se incubó el gel de acrilamida. El amortiguador utilizado fue de fosfatos 50mM pH 7 con 5 mM de MBTH y 100 mM de L-tirosina; la incubación se realizó a 30°C durante 12 horas en agitación constante, posteriormente se lavaron con agua desionizada para eliminar tanto el sustrato como el amortiguador y se conservaron en agua desionizada con 10mM de azida de

sodio. La actividad se observa en forma de bandas rosas. Como control positivo se utilizó tirosinasa comercial.

6.12.3.3.2. Zimogramas para actividad difenolasa

Se incubaron los SDS-PAGE en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 con 0.1% de L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) a 30°C durante 12 horas y en agitación constante posteriormente se lavaron con agua desionizada para eliminar tanto el sustrato como el amortiguador y se conservaron en agua desionizada con 10mM de azida de sodio. La actividad se observa como bandas negras en un fondo oscuro. Como control positivo se utilizó tirosinasa comercial.

6.13. Diseño experimental y tratamiento estadístico

R. oryzae ENHE fue crecido en 50 mL de medio Lee regulado con amortiguador de citratos 0.1M pH 5.8 con una concentración inicial de esporas de $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, con una temperatura de 30°C y 150 rpm. Se tomaron muestras de los extractos enzimáticos extracelulares a las 24, 36, 48, 72 y 96h de incubación para determinar las actividades enzimáticas (variable de respuesta) presentes bajo dichas condiciones. Las metodologías se realizaron mediante un diseño experimental completamente al azar contemplando como factores de estudio el medio Lee y el medio Lee con alcohol veratrílico y tirosina como inductores de las actividades LiP y tirosinasa respectivamente.

Las variables de respuesta fueron las actividades enzimáticas correspondientes y se analizaron usando el programa SPSS 19. El diseño presenta un tamaño de muestra (N) igual a 3 y se realizó tomando en consideración una significancia del 95%. Los parámetros estadísticos correspondientes a cada análisis se muestran en el anexo 2.

7. RESULTADOS

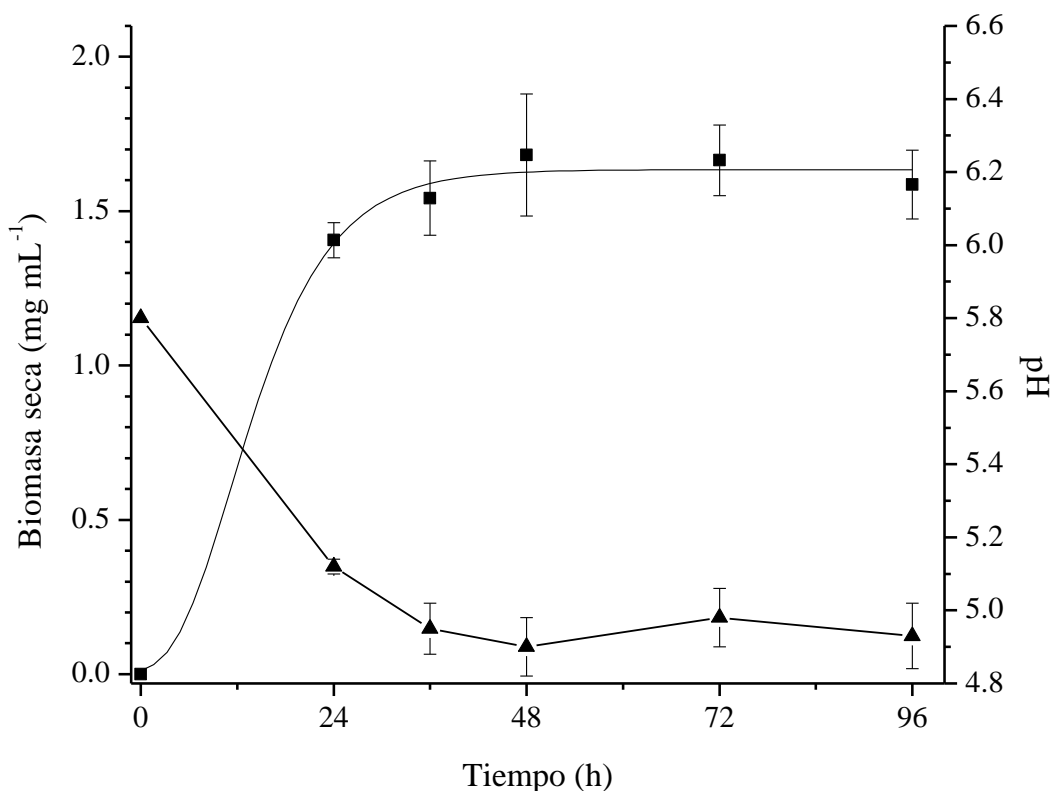
En este apartado se plantearán los resultados obtenidos de las pruebas anteriormente citadas, mediante la presentación de los mismos a través de gráficas y las imágenes de los zimogramas realizados.

7.1. Crecimiento de *R. oryzae* ENHE

El crecimiento del Zygomycete en el medio Lee fue monitoreado mediante la cuantificación de su biomasa por peso seco. Además, se tomó la lectura del pH del medio durante el transcurso de la fermentación.

La biomasa en base seca tomada del sistema con alcohol veratrílico, no tuvo diferencia significativa con respecto al medio sin ningún tipo de inductor. Sin embargo, los datos referentes a la biomasa obtenida del medio con tirosina, no fueron reportados debido a presentar cristales precipitados, los cuales no permitían una cuantificación precisa de la misma.

En la gráfica 1 se observa el crecimiento de *R. oryzae* ENHE determinado como biomasa seca y la disminución del pH en el medio de cultivo.



Gráfica 1. Crecimiento de *R. oryzae* ENHE en cuanto a su biomasa seca obtenida de medio Lee sin inductores (■); pH del medio extracelular sin inductores (▲).

Bajo las condiciones en estudio, *R. oryzae* ENHE tiene un máximo crecimiento de 1.63 ± 0.03 mg biomasa seca mL⁻¹, calculado mediante la ecuación de Gompertz; el pH del medio extracelular tuvo una disminución significativa ($p < 0.005$) del tiempo cero a las 24 h (0.69 unidades) y de las 24 h a las 36 h (0.21 unidades).

7.2. Actividades enzimáticas

Bajo las condiciones de crecimiento de *R. oryzae* ENHE anteriormente planteadas únicamente se lograron cuantificar las siguientes actividades enzimáticas:

A nivel extracelular: proteasas ácidas, neutras y alcalinas y LiP.

A nivel intracelular: proteasas ácidas, neutras y alcalinas.

La actividad tirosinasa no pudo ser cuantificada a nivel intra ni extracelular, incluso agregando 0.1 g L⁻¹tirosina al medio de cultivo.

7.3. Actividades enzimáticas extracelulares

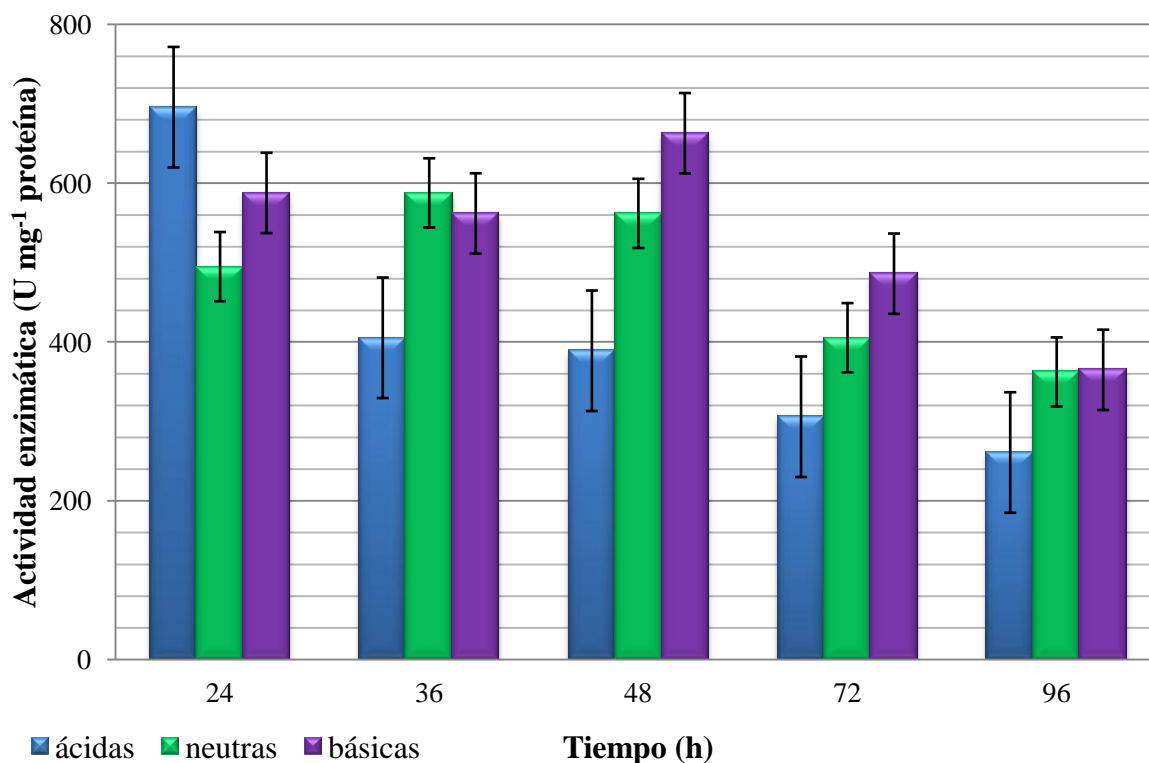
7.3.1. Actividad enzimática de proteasas

La cuantificación de proteasas en el medio extracelular de *R. oryzae* ENHE se realizó empleando las siguientes metodologías:

Proteasas ácidas: Anson(1938) y Asakura *et al.* (1997).

Proteasas neutras y alcalinas: técnica de Kunitz (1946) reportada por Yamaguchi *et al.*, (1983).

La gráfica 2 muestra las actividades enzimáticas correspondientes a proteasas ácidas, neutras y alcalinas.



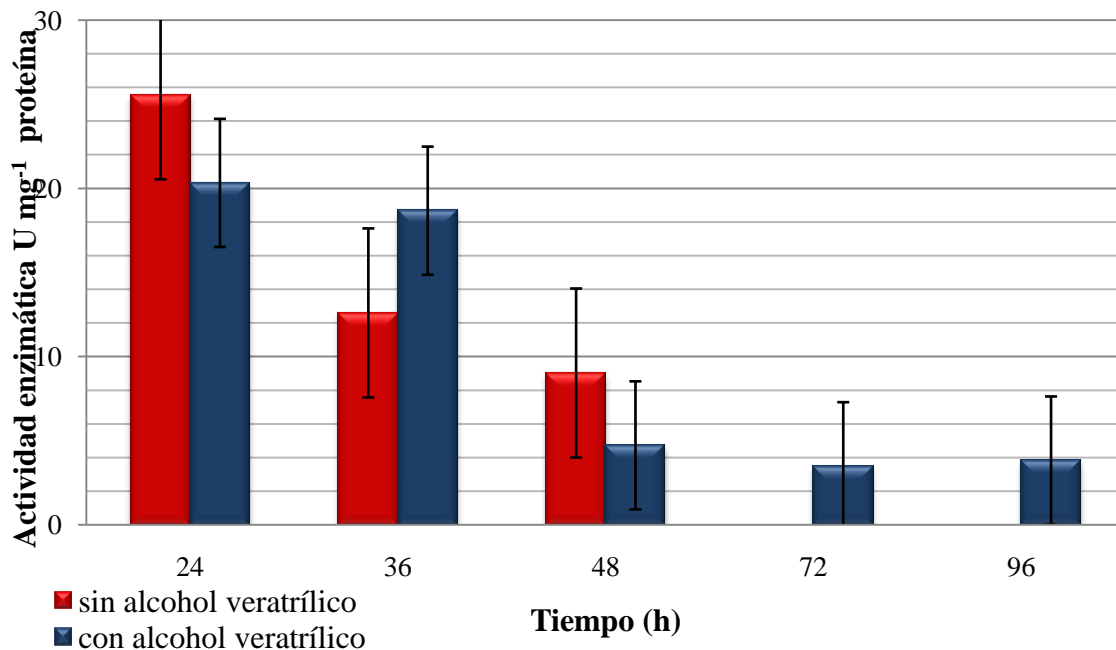
Gráfica 2. Actividades enzimáticas proteasas ácidas, neutras y alcalinas a nivel extracelular en *R. oryzae* ENHE

La actividad cuantificada para proteasas ácidas a las 24 h fue la más alta registrada ($695.81 \pm 134.17 \text{ U mg}^{-1}$ proteína), sin embargo decae por lo menos en un 40% con forme pasa el tiempo. Por otro lado, la actividad para proteasas neutras se mantiene hasta las 48 h, para posteriormente disminuir en promedio un 35%. Las proteasas alcalinas presentan su máxima actividad a las 24 y 48 h ($587.78 \pm 48.59 \text{ U mg}^{-1}$ proteína y $663.07 \pm 34.72 \text{ U mg}^{-1}$ proteína, respectivamente), posteriormente la actividad disminuye en un 30% en promedio. En general las actividades enzimáticas correspondientes para proteasas extracelulares en el sistema bajo el cual se creció *R. oryzae* ENHE, muestran una disminución significativa ($p < 0.005$) a partir de las 72 h, excepto para las proteasas ácidas, las cuales sufren esa disminución desde las 36h.

7.3.2. Actividad enzimática para LiP

La actividad LiP en *R. oryzae* ENHE bajo las condiciones de trabajo anteriormente señaladas se determinó utilizando la metodología señalada por Tien y Kirk. (1988).

En la gráfica 3 se observan las actividades de LiP obtenidas con y sin alcohol veratrílico a nivel extracelular.

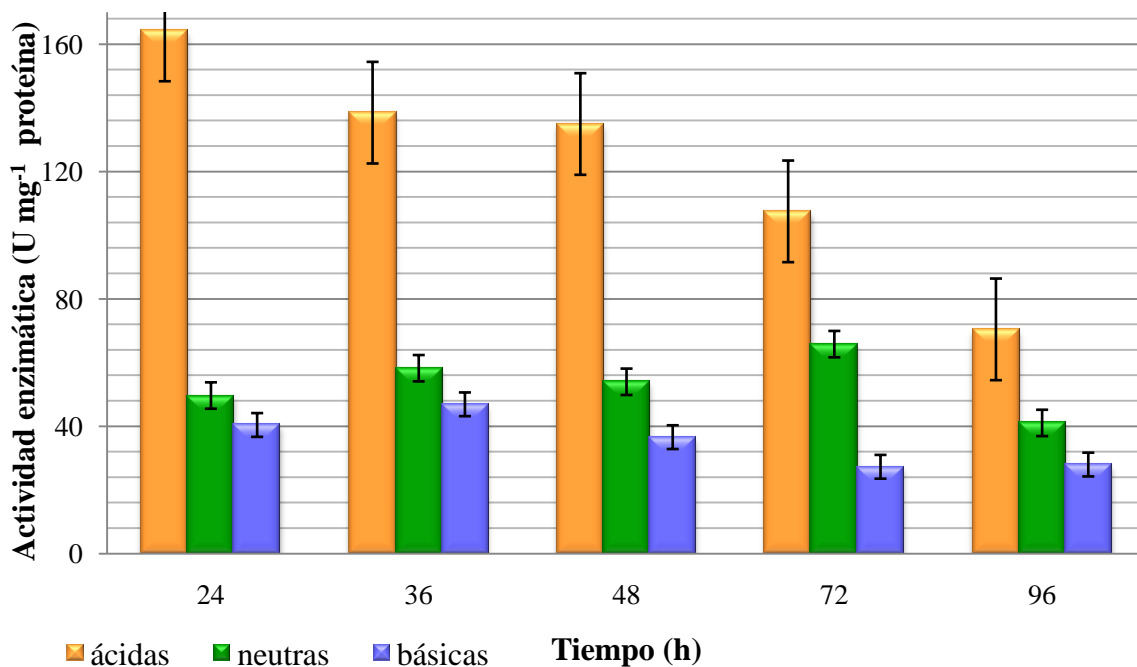


Gráfica 3. Actividad LiP a nivel extracelular en *R. oryzae* ENHE crecido con y sin alcohol veratrílico en el medio Lee

La mayor actividad LiP se presenta a las 24 h con y sin alcohol veratrílico, así como a las 36h con alcohol veratrílico. En el medio sin alcohol veratrílico, la actividad es indetectable a partir de las 72 h, sin embargo con dicho compuesto, la actividad enzimática permanece durante toda la cinética, pero, se nota un decaimiento de la misma en aproximadamente un 75%.

7.4. Actividades enzimáticas intracelulares

A nivel intracelular solamente se logró cuantificar actividad enzimática de proteasas ácidas, neutras y alcalinas en *R. oryzae* ENHE mediante la metodología anteriormente descrita. La gráfica 4 presenta los resultados de dicha prueba.



Gráfica 4. Actividades enzimáticas proteasas ácidas, neutras y alcalinas a nivel intracelular en *R. oryzae* ENHE

Las proteasa ácida representan la mayor actividad proteasa a nivel intracelular en *R. oryzae* ENHE, bajo el sistema en el que fue crecido; esta actividad es de por lo menos un 60% mayor a la registrada para proteasas neutras y al menos un 72% más de lo cuantificado para

proteasas alcalinas. La actividad proteasa ácida presenta su mayor actividad desde las 24 hasta las 48h, posteriormente ésta baja de manera significativa ($p < 0.005$) hasta en un 68%. Las proteasas neutras presentan su mayor actividad a las 72 h (65.81 ± 3.36 U mg^{-1} proteína) y las alcalinas de las 24 a las 48 h. Tanto a nivel intra como extracelular la mayoría de las proteasas cuantificadas sufren un decaimiento significativo ($p < 0.005$) de su actividad a partir de las 72 h. En el medio intracelular, la actividad proteasa ácida predomina por sobre las demás, a comparación de las presentes en el medio extracelular, en donde las neutras y alcalinas son significativamente ($p < 0.005$) mayores a las ácidas, en los tiempos 36 y 48 h.

7.5. Zimogramas

Mediante zimogramas se observó la actividad de cada una de las enzimas a las que se les cuantificó su actividad enzimática, además de visualizar sus isoenzimas y sus respectivos pesos moleculares.

Las concentraciones de proteína que se cargaron para cada prueba fue de aproximadamente 0.01 mg de proteína mL^{-1} para extracelulares y de 6 mg mL^{-1} para intracelulares. El cálculo de los pesos moleculares para cada uno de los zimogramas se realizó mediante el programa ImageLab 3.0.

7.5.1. Zimograma para proteasas

En las figuras 12 y 13 se observan los zimogramas para las proteasas extra e intracelulares, respectivamente.

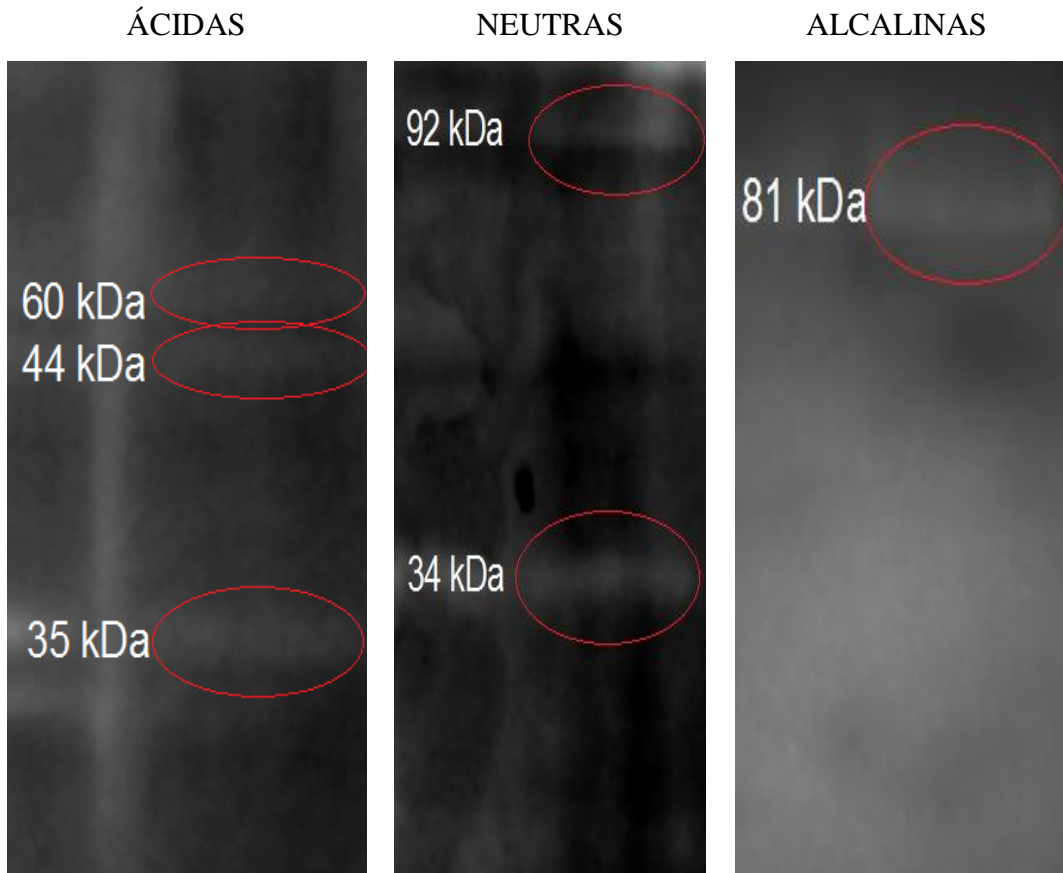


Figura 12 Zimogramas de proteasas extracelulares en *R. oryzae* ENHE

Los halos de hidrólisis observados en los zimogramas correspondientes a las proteasas extracelulares presentan una baja intensidad, debido a la poca concentración de proteína que se logró obtener, por lo que es probable que existan otras isoenzimas que no pudieron ser observadas. Para las proteasas ácidas se observan 3 isoenzimas (60.7, 44.2 y 35.4 kDa), para las neutras 2 (92.6 y 34.3 kDa) y para las básicas solo una (81 kDa).

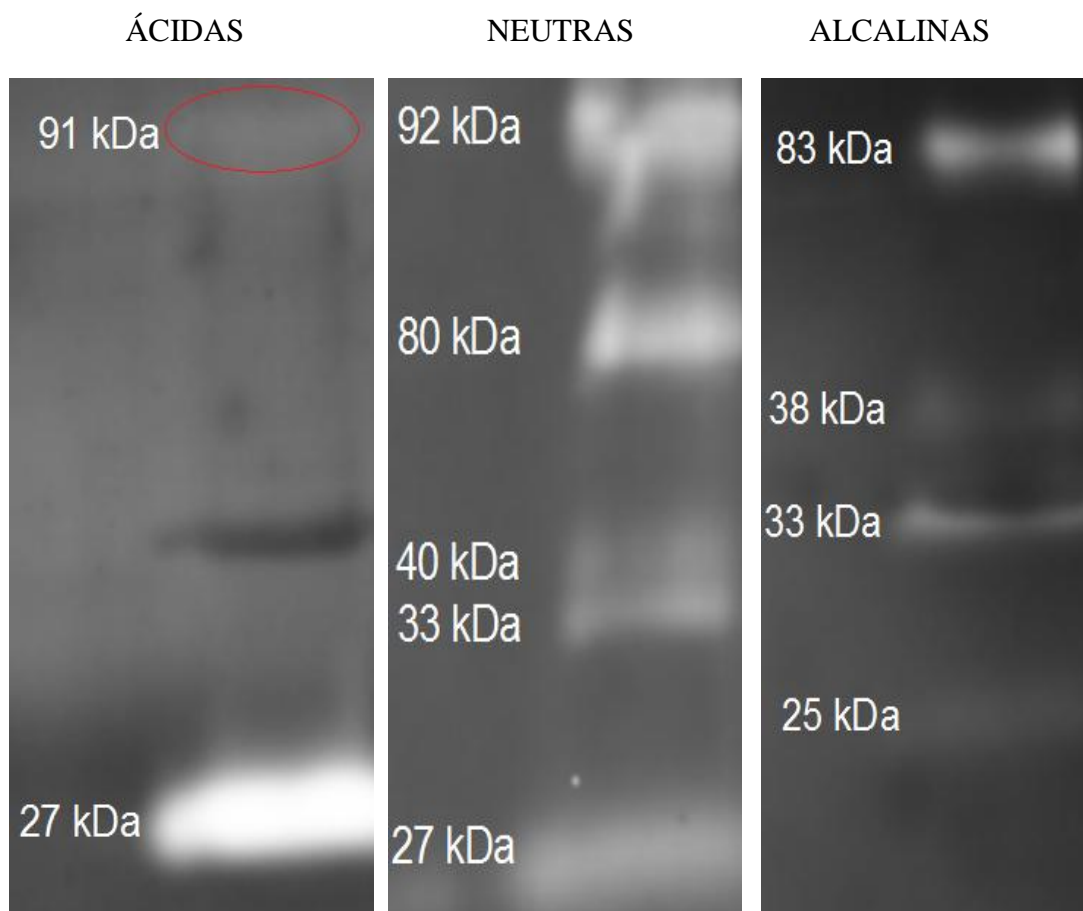


Fig. 13 Zimogramas de proteasas intracelulares en *R. oryzae* ENHE

A pesar de la alta concentración de proteína cargada para los zimogramas de proteasas intracelulares, no se descarta la posibilidad de no poder observar isoenzimas que se encuentren en poca concentración. Dos isoenzimas fueron las encontradas para las proteasas ácidas (27.5 y 91.1 kDa); cinco para las neutras (27.3, 33.2, 40.4, 80.6 y 92.2 kDa) y cuatro para las alcalinas (25, 33.6, 38.8 y 83.6 kDa).

En los zimogramas presentados se puede observar que existe una mayor diversidad de isoenzimas a nivel intracelular que extracelular, además algunas de las isoenzimas ácidas, neutras y alcalinas presentan pesos moleculares muy semejantes, sobre todo alrededor de los 25, 30 y 80 kDa.

7.5.2. Zimograma para fenoloxidasas

En el presente trabajo no se lograron cuantificar actividades fenoloxidasas, por las metodologías espectrofotométricas de Mazzocco y Pefferri (1976) y Niku-Paavola *et al.* (1990), para monofenolasa y lacasa, respectivamente. Los resultados obtenidos en esta investigación difieren de lo reportado por León-Santiesteban *et al.* (2008) en cuanto a la actividad tirosinasa. Con la finalidad de corroborar la presencia de fenoloxidasas en el medio extra e intracelular, se realizaron dos metodologías zimográficas (MBTH y tirosina; L-DOPA).

CONCENTRADO INTRACELULAR



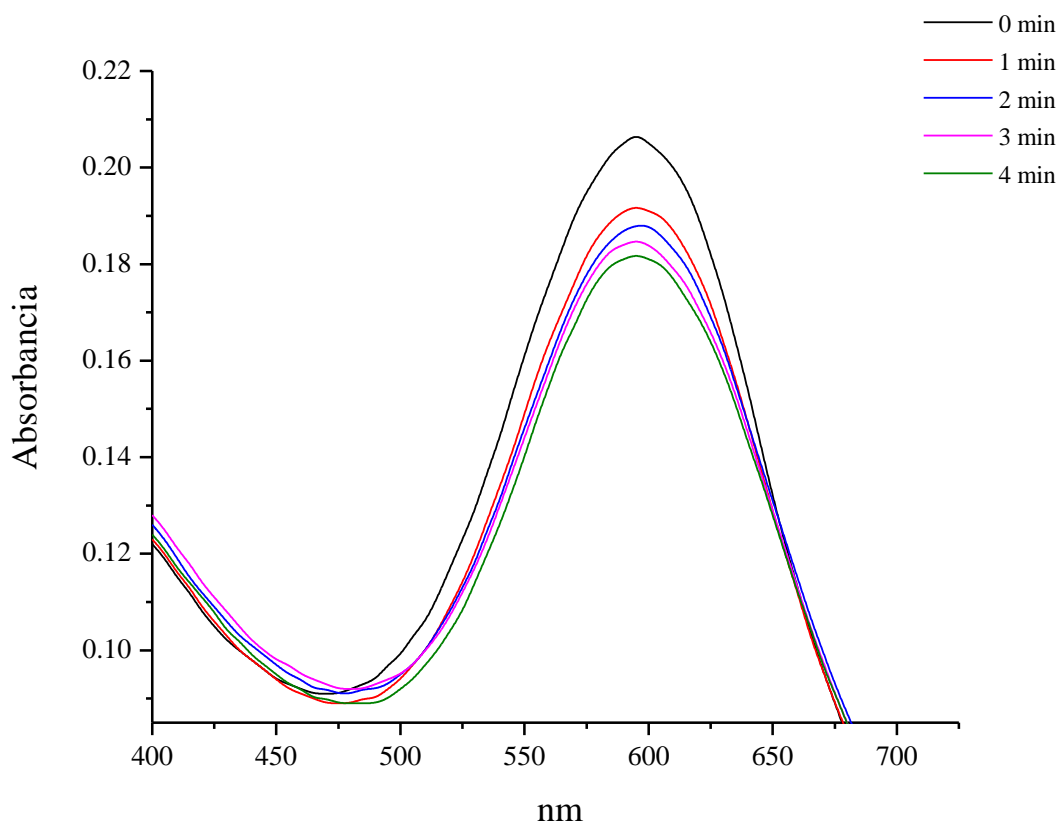
Figura 14 Zimograma realizado con L-DOPA como sustrato

Los zimogramas que contenían MBTH y tirosina resultaron negativos tanto para los extractos extracelulares como los intracelulares, en cambio, estos últimos incubados con L-DOPA presentaron una única banda a 203.6 kDa (figura 14).

7.5.3. Zimograma para LiP

En el zimograma correspondiente a LiP no se logró detectar las bandas, probablemente debido a la baja concentración de proteína extracelular que se obtuvo.

Debido a lo anterior se llevó a cabo la metodología descrita por Kashinath *et al.*, (2012), que consiste en seguir la decoloración que lleva a cabo la LiP en ciertos colorantes reportados (en este caso azul de anilina o también llamado azul algodón), con la finalidad de confirmar esta actividad enzimática. En la gráfica 5 se observan los espectros de absorción correspondientes a la decoloración de azul de anilina (máxima absorción 600nm) a través del tiempo agregando los concentrados de extractos extracelulares que se ocuparon para realizar los zimogramas.



Gráfica 5. Decoloración de azul de anilina a través del tiempo por parte de la LiP presente en los extractos extracelulares.

Para cuantificar el porcentaje de decoloración se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%Decoloración = \frac{A_i - A_f}{A_i} \times 100$$

Dónde:

A_i = absorbancia inicial

A_f = absorbancia final

Por lo cual, el máximo porcentaje de decoloración que tiene la LiP presente en *R. oryzae* ENHE fue del 12%.

8. DISCUSIÓN

R. oryzae ENHE fue crecido en medio mínimo Lee regulado con amortiguador de citratos y bajo estas condiciones de trabajo, dicho Zygomycete presentó el máximo crecimiento a las 24h y fue en promedio de, 1.63 ± 0.03 mg biomasa seca mL^{-1} . El mismo fenómeno fue observado por León-Santiesteban *et al.* (2008), pero creciendo la cepa en medio MN, sin embargo, su crecimiento en este último fue de hasta 2 veces más es decir 3 mg biomasa seca mL^{-1} , esto debido a la composición del medio MN. Sin embargo, su crecimiento en este último fue de hasta 2 veces mayor, es decir 3 mg biomasa seca mL^{-1} , esto debido principalmente a la composición del medio MN que es un medio complejo, además de lo reportado para el medio Lee, el medio MN contiene el doble de glucosa, extracto de malta y extracto de levadura.

Como se observa el gráfico 1, el pH del medio extracelular desciende de manera significativa ($p < 0.005$) de las 0 a las 24 h y de las 24 a las 36 h de incubación de *R. oryzae* ENHE, lo cual nos indica la posible síntesis y secreción de ácidos orgánicos como láctico, fumárico y málico, principalmente (Ghosh y Rani, 2011), los cuales son metabolitos propios del género *Rhizopus*.

En *R. oryzae* ENHE se encontró actividad proteasa ácida, neutra y básica; contrario a lo reportado por Pérez de los Santos. (2009) en el Zygomycete *A. rouxii*, en el cual solo se cuantificaron proteasa ácida, casi en su totalidad.

Dentro del género *Rhizopus* se han cuantificado y purificado diferentes clases de proteasas principalmente con la finalidad de ser aplicadas en la industria química de los detergentes o la alimentaria (Kumar y Takagi. 1999; Oberoi *et al.*, 2001), como es el caso de la proteasa ácida, aspartato proteasa (Farley y Sullivan. 1998) y diversas proteasas alcalinas (Banerjee y Bhattacharyya. 1992). En el caso específico de *A. rouxii*, Marcial. (2011) identificó una aspartato proteasa (rhizopuspepsina-2) que interviene de manera negativa en la actividad tirosinasa, la cual contribuye en la remoción de PCF bajo el sistema en el cual es crecido dicho hongo filamentoso (Montiel. 2005). La actividad proteasa encontrada en los cultivos

de *R. oryzae* ENHE hace pensar en un fenómeno análogo al descrito en *A. rouxii* (Marcial, 2011), es decir probablemente las proteasas afectan de manera negativa la actividad de las otras enzimas en estudio, peroxidasa y fenoloxidasas, que pudieran intervenir en la degradación de PCF lo cual ha sido observado por León-Santiesteban (resultado no publicados).

Existen proteasa específicas que se encargan de la regulación de otras enzimas a nivel celular. Diferentes trabajos se han publicado en torno a las proteasas de hongos, en cuanto a sus isoenzimas y la sensibilidad que demuestran frente a inhibidores, con la finalidad de estudiar su efecto sobre diferentes enzimas de interés, como ejemplo, la actividad citocromo oxidasa en *Neurosporacrassa* (Kula y Padmanaban. 1981) y celulasas en *Trichoderma reesei* (Haabet *al.*, 1990). Enfocándonos en *R. oryzae* ENHE, el estudio de las isoformas de proteasas presentes en él sería de utilidad para futuros trabajos referentes a su interacción con otras enzimas de interés biotecnológico.

Los zimogramas son una herramienta de gran utilidad para conocer los pesos moleculares de las diferentes isoformas de las enzimas; en este caso se analizaron las de proteasas tanto intra como extracelular.

Como se mencionó con anterioridad, las proteasas son enzimas que dentro de la célula juegan un papel de regulación de los niveles proteicos, además de ser un arma contra agentes externos que puedan ser perjudiciales para la misma, por lo que la mayor diversidad de proteasas a nivel intracelular era de esperarse, dada la mayor concentración de proteína y actividad metabólica a nivel intracelular. En el caso específico de los hongos, las proteasas que secreta le son de gran utilidad para degradar la materia orgánica en descomposición de la cual se nutre y como factores de virulencia (Sikura y Bevzenko. 1974) para los patógenos, como lo es *R. oryzae*.

En el zimograma donde se observa la actividad de proteasas ácidas a nivel intracelular, se aprecia una banda muy intensa a 27kDa, por lo cual es probable que se trate de aspartato proteasas, las cuales se caracterizan por tener pesos moleculares entre 30 y 45 kDa y ser

activas a pH ácido (Labarére y Barnet. 1978), así como representar hasta el 90% del total de proteasas intracelulares, las cuales se encuentran en las vacuolas (Wlemken *et al.*, 1979).

Los halos en los zimogramas para proteasas neutras y alcalinas, indican la posible presencia de cisteín y serín proteasas, respectivamente, dado el pH de trabajo y los pesos moleculares entre 35 y 45kDa que presentan (North. 1982). Los zimogramas de proteasas a nivel intra y extracelular presentan halos con pesos moleculares muy similares, lo cual indica que probablemente sean las mismas enzimas. Diversos trabajos han observado que ciertas proteasas pueden permanecer a nivel intracelular y a la vez liberarse al medio extracelular (Arnoys y Wang. 2007).

En el presente trabajo se determinó la actividad lignina y manganeso peroxidasa por las metodologías de Tien y Kirk. (1988) y Kuwahara *et al.* (1987), respectivamente sin embargo bajo las condiciones en las que se llevó a cabo la cinética, no se logró cuantificar actividad MnP, pero sí LiP. Se corroboró de esta manera lo obtenido por León-Santiesteban *et al.* (2008), sobre la presencia de actividad lignina peroxidasa en *R. oryzae* ENHE.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la LiP no es inducida por el alcohol veratrílico, como ha sido reportado para *Morchellacrassipes* (Kanwall y Reddy, 2011) o *P.chrysosporium* (Leisola *et al.*, 1984), pero se ve afectada de manera positiva por la presencia de dicho compuesto, al mantener por más tiempo la actividad enzimática, ya que en los experimentos donde no se colocó el alcohol veratrílico en el medio no se pudo cuantificar la actividad hasta el final de la cinética. Hay estudios que reportan que el alcohol veratrílico es uno de los metabolitos secundarios presentes en la degradación de lignina en *P.chrysosporium* (Kirk y Farrell. 1987) y ha sido reportado que estimula la degradación de dicho polímero (Leisola *et al.*, 1984; Ulmer *et al.*, 1984) no precisamente por inducir la actividad de dicha enzima, si no que la mantiene reducida de la oxidación que provoca el H₂O₂, de tal manera que no alcanza el estado superior de oxidación, el cual es su forma inactiva (Cancel *et al.*, 1993). También sería interesante saber si el PCF puede inducir esta actividad en *R. oryzae* ENHE. También se ha comprobado que el alcohol veratrílico no favorece la síntesis de novo de la LiP (Tonon y Odier, 1988).

Los zimogramas correspondientes a LiP no se obtuvieron probablemente debido a no haber podido concentrar suficiente cantidad de esta enzima, por lo que se realizó la técnica descrita por Kashinath *et al.* (2012) con la finalidad de corroborar la actividad LiP mediante decoloración de azul de anilina, la cual ha sido reportada por este mismo autor como uno de los colorantes que LiP puede decolorar hasta en un 60%. El alto potencial redox que presenta la LiP, le permite reaccionar con una amplia gama de compuestos fenólicos y no fenólicos. Los radicales que se forman como consecuencia de la reacción que lleva a cabo la actividad LiP, eliminan los cromóforos que están presentes en los colorantes. Sin embargo, entre mayor sea la complejidad de la estructura del colorante menor será la eficiencia de decoloración que se lleva a cabo por la LiP. En el caso de la LiP presente en *R. oryzae* ENHE, presentó un porcentaje de decoloración del 12%, valor por debajo de lo establecido para esta enzima en otros organismos, posiblemente debido a que estos trabajos previos (Dawkaret *al.*, 2009; Kalyaniet *al.*, 2010) sometieron al extracto enzimático a una solución amortiguadora con un pH cercano a la neutralidad dado que la enzima es bastante sensible ante variaciones de pH (sobre todo a pHs ácidos), temperatura y concentraciones de H₂O₂. También se debe considerar que en el presente trabajo se utilizó un pH 3 y una temperatura de 30°C, condiciones que son las ideales en la mayoría de las LiP, sin embargo hay excepciones como para *P. chrysosporium*, el cual no presenta su máxima actividad a pHs cercanos a 3 y en cuanto a la temperatura, la LiP de *Kocuria rosea* (por ejemplo) tiene su máxima actividad a los 50°C (Kashinath *et al.* 2012). Otro aspecto a considerar es la mayor actividad proteasa con respecto a la cuantificada para LiP, la cual es de por lo menos 650 unidades.

La actividad peroxidasa se ha cuantificado en diferentes basidiomicetes degradadores de compuesto xenobióticos como *P. chrysosporium* (Higson. 1991), *P. sordida* (Rüttimann-Johnson *et al.*, 1994). Sin embargo su cuantificación y caracterización en zygomycetes es inexistente.

Se ha comprobado que *R. oryzae* ENHE tiene la capacidad de degradar PCF tanto intra como extracelularmente (León-Santiesteban, no publicado) y considerando la participación

de LiP en degradación de diferentes compuestos xenobióticos, no se descarta la posibilidad de que dicha enzima sea una de las involucradas en este metabolismo de degradación.

Al comparar el tamaño de banda obtenida en el zimograma para fenoloxidasa conteniendo como sustrato L-DOPA con la de otros organismos se observan tamaños de entre 163 a 203 kDa, cabe destacar que ninguna de estas pertenece a un hongo.

La tirosinasa tiene la capacidad de actuar sobre diversos compuestos aromático, como el fenol, L-DOPA y la tirosina (este es el único sustrato específico de dicha actividad), sin embargo, otras enzimas fenoloxidasas también actúan sobre la L-DOPA, por lo que la banda observada en el zimograma trabajado con este sustrato y el extracto intracelular, no asegura la presencia de tirosinasa bajo las condiciones en las que se creció *R. oryzae* ENHE. Pero se debe considerar también que bajo otras condiciones, como las trabajadas por León-Santesteban *et al.* (2008) se logró cuantificar; probablemente por la mayor concentración de nutrientes presentes en el medio MN.

9. CONCLUSIONES

- Las actividades enzimáticas cuantificadas en *R. oryzae* ENHE en las condiciones de estudio mencionadas con anterioridad son: Proteasas ácidas, neutras y alcalinas, además de LiP, a nivel extracelular; proteasas ácidas, neutras y alcalinas a nivel intracelular.
- La máxima actividad de LiP (sin estar presente el alcohol veratrílico en el medio) se presentó a las 24 h; después de las 48 h, ésta es incuantificable. Sin embargo al estar el alcohol veratrílico presente en el medio de cultivo, la actividad enzimática perdura durante toda la cinética. Este compuesto no resultó ser un inductor para esta enzima.
- Existe una mayor diversidad de proteasas a nivel intracelular que extracelular, cuantificándose hasta 5 isoenzimas en las proteasas de tipo neutras.
- Se puede pensar en la presencia de aspartato, serín y cisteín proteasas, tanto a nivel intra como extracelular, debido al pH en estudio y los pesos moleculares que presentan.
- No se puede asegurar la presencia de una tirosinasa bajo las condiciones en estudio, debido a los resultados negativos espectrofotométricos y zimográficos con tirosina y MBTH tanto a nivel extra como intracelular, sin embargo, a nivel intracelular se detectó actividad fenoloxidasa mediante una prueba zimográfica con L-DOPA como sustrato.

10. PERSPECTIVAS

Con la finalidad de tener mayor información con respecto a la diversidad de enzimas presentes en *R. oryzae* ENHE se sugiere la realización de análisis proteómicos tanto del medio extracelular como intracelular, ya que es una herramienta con mayor sensibilidad, de tal manera que se puedan detectar proteínas que incluso no se han considerado detectarlas mediante técnicas espectrofotométricas.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

También sería oportuno trabajar sobre las proteasas presentes en el hongo de tal manera que se detecte aquella o aquellas involucradas en la regulación de las enzimas involucradas en la remoción del PCF, mediante inhibidores de proteasas específicos.

Otro aspecto a considerar es purificar la LiP y probarla en sistemas contaminados con xenobióticos o colorantes.

11. BIBLIOGRAFÍA

Anson M., 1938, The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22:79-89.

Arnoys E., Wang J., 2007, Dual localization: Proteins in extracellular and intracellular compartments, *Acta Histochemica*, 109:89-110.

Asakura T., Watanabe H., Ab K., Arai S., 1997, Oryzasin as an aspartic proteinase occurring in rice seeds: purification, characterization, and application to milk clotting. *J. Agric. Food Chem.* 45:1070-1075.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., 2002, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, 4a edición, Nueva York, EUA, 1616pp

Banerjee R. y Bhattacharyya C., 1992, Purification and characterization of protease from a newly isolated *Rhizopus oryzae*, *Bioprocess. Biosyst. Eng.*, 7:369-374.

Banci L., Bertini I., Dal P., del Conte R., Tien M., 1998, Monitoring the role of oxalate in manganese peroxidase. *Biochemistry*, 37: 9009-15.

Betancourt Y., 2009, Estudio bioquímico y molecular de las proteasas vacuolares de *Candida glabrata*, Tesis doctoral, Instituto Politécnico Nacional, México DF., 14-16.

Bollag J., Shuttleworth K., Anderson D., 1988, Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:3086-3091.

Bourbannais R., Paice M., 1988, Veratryl alcohol oxidases from the lignin degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. *Biochem J*, 255:445-450.

Bradford Marion M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254

Buswell J., Odier E., 1987, Lignin biodegradation. *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, 6:01-60.

Cancel A., Orth A., Tien M., 1993, Lignin and veratryl alcohol are not inducers of the ligninolytic system of *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59:2909-2913.

Candiano G., Bruschi M., Musante L., Santucci L., Ghigger G., Carnemolla B., Orecchia P., Zardi L., Righetti P., Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis, *Electrophoresis*, 25:1327-1333.

Carlile M., Watkinson S., Gooday G., 2001, *The Fungi*, Academic Press, 2a edición, San Diego California, 205-210.

Carvalho M., Martins I., Leitão M., García H., Rodrigues C., San Romão, McLellan I., Hursthouse A., Silva C., 2009, *J. Ind Microbiol. Biotechnol.*, 36:1249-1256.

Castillo I., Bárcenas C., 1998, Pentaclorofenol: toxicología y riesgos para el ambiente, *REDALyC*, 4:21-37.

Chevalier T., Rigal D., Mbeguie-A-Mbeguie, Gaillard F., Richard-Forget, Fils-Lycaon, 1999, Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxidase, *Plant Physiol*, 119:1261.

Cino P., Tewari R., 1973, Proteolytic activity of *Oidiodendron kalrai*, *Can. J. Microbiol.*, 21:1362-1368.

Dawkar V., Jadhav U., Telke A., Govindwar S., 2009, Peroxidase from *Bacillus* sp. VUS and its role in the decolorization of textile dyes, *Biotechnol. Bioprod. Eng.* 14:361-368.

Decker H., Dillinger R., Tuzek F., 2000, How does tyrosinase work? Recent insights from model chemistry and structural biology, *Angew.Chemie Int.*, 39:1587-1591.

Durán N., Rosa Ma., Dannibale A., Gianfreda L., 2002, Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review, *Enzyme Microbial. Technol.*, 31:907-931.

Ebeling W., Hennrich N., Klockow M., Metz H., Orth D., Lang H., 1974, Proteinase K from *Tritirachium álbum* Limber, *Eur. J. Biochem.* 47:91-97.

Ellis J., 1986, Species and varieties in the *Rhizopus microspores* group as indicated by their DNA complementary. *Mycologia* 77:243-247.

Espín J., García P., Tudela J., García F., 1998, Study of stereospecificity in mushroom tyrosinase, *Biochem. J.*, 331:547-551.

Farley P., Sullivan P., 1998, The *Rhizopus oryzae* secreted aspartic proteinase gene family: an analysis of gene expression, *Microbiology*, 144:2355-2366.

Finzel B., Poulos T., Kraut J., 1987, Crystal structure of nitric oxide inhibited cytochrome c peroxidase, *J. Biol. Chem.* 259:13027-13036.

García-Carreño, Dimes L., Haard N., 1993, Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors, *Anal. Biochem.*, 214:65-69.

Gerdemann C., Eicken C., Krebs B., 2001, The crystal structure of catechol oxidase: new insight into the function of type-3 copper proteins, *Acc. Chem. Res.*, 35:183-191.

Glenn J., Morgan M., Mayfield M., Kuwahara M., Gold M., 1983, An extracellular H₂O₂ – requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 14:1077-1083.

Ghosh B., Rani R., 2011, Current commercial perspective of *Rhizopus oryzae*: A review, *J. Applied. Sci.*, 1-17.

Haab D., Hagspiel K., Szakmary K., Kubicek C., 1990, Formation of the extracellular proteases from *Trichoderma reesei* QM 9414 involved in cellulose degradation, *J. Biotech*, 16:187-198.

Halaouli S., Asther M., Kruus K., Gou L., Hamid M., Sigoillot J., Lomascolo A., 2005, Characterization of a new tyrosinase from *Pycnoporus* species with high potential food technological applications. *J. Appl. Microbiol.* 98:332-343.

Halalouili S., Record E., Casalot L., Hamdi M., Sigoillot C., Asther M., 2006, Cloning and characterization of a tyrosinase gene from the white-rot fungus *Pycnoporus sanguinensis* and overproduction of the recombinant protein in *Aspergillus niger*, *Appl. Gen. Mol. Biotechnol.*, 70:580-589.

Hartley B., 1960, Proeolytic enzymes, *Annu. Rev. Biochem.*, 29:45-72

Higson F., 1991, Degradation of xenobiotics by white rot fungi, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 122:111-141.

Higuchi T., 1989, Mechanisms of lignin degradation by lignin peroxidase and laccase of white-rot fungi, vol. 399, ACS Symposium Series, 482-502.

Hunter R., Markert C., 1957, Histochemical demonstration of enzymes separated by zones electrophoresis in starch gels. *Science*, 125:1294-1295.

Hofrichter M., 2002, Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP), *Enzyme and microbial technology*, 30:454-466

Kalyani D., Phugare S., Shedbalkar U., Jadhav J., 2010, Purification and characterization of a bacterial peroxidase from the isolated strain *Pseudomonas* sp. SUK1 and its application for textile dye decolorization, *Ann. Microbiol.* 61:483-491.

Kanwal H., Reddy M., 2011, Effect of carbon, nitrogen sources and inducers on ligninolytic enzyme production by *Morchellacrassipes*, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 27:687-691.

Kashinath G., Parshetti D., Kalyani C., Doong R., Govindwar S., 2012, Industrial dye decolorizing lignin peroxidase from *Kocuriarosea* MTCC 1532, *Ann. Microbiol.*, 62:217-223.

Kavanagh K., 2002, *Fungi. Biology and Applications*, John Wiley & Sons, Inglaterra, 340-343.

Kersten P., Kirk T., 1987, Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*, *J. Bacteriol.* 169:2195-2201.

Kirk T., Farrell R., 1987, Enzymatic “combustión”: the microbial degradation of lignin, *Ann. Rev. Microbiol.*, 41:465-505.

Kula M., Padmanaban G., 1981, Evidence for the involvement of a rapidly turning over protease in the degradation of cytochrome oxidase in *Neurospora crassa*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100:576-583.

Kumar C. y Takagi H., 1999, Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint *Biotechnol. Adv.*, 17:561-594.

Kunitz M., 1946, Crystalline soybean trypsin inhibitor II, J.Gen. Physiol. 30:291-310.

Kuwahara M., Glenn J., Morgan M., Gold M., 1984, Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaetechrysosporium*, FEBS Lett, 169:247-250.

Kuwahara M, Glenn JK, Morgan MA, Gold MH., 1987, Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Lett.169:247-250.

Labarére J., 1980, Proteolytic activities during growth and aging in the fungus *Podospora anserine*: effect of specific mutations, Arch. Microbiol., 124:269-274.

Labarére J., Bernet J., 1978, A mutation inhibiting protoplasmic incompatibility in *Podospora anserine* that suppresses an extracellular laccase and protoperithecium formation, J. Gen. Microbiol., 109:187-189.

Laemmli U. 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 227:680-685

Leisola M., Ulmer R., Waldner, Fiechter A., 1984, Role of veratryl alcohol in lignin degradation by *Phanerochaetechrysosporium*, J. Biotechnol, 1:331-339.

León-Santiesteban, Bernal R., Fernández F., Tomasini A., 2008, Tyrosinase and peroxidase production by *Rhizopus oryzae* strain ENHE obtained from pentachlorophenol-contaminated soil, J. Chem. Technol. Biotechnol., 83:1394-1400.

León-Santiesteban, 2008, Contribución al estudio bioquímico del zigomiceto Ñ, Tesis de especialidad, Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F., 21pp.

León-Santiesteban H., 2010, Inmovilización de *Rhizopus oryzae* ENHE, Tesis Doctoral, Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F., 54-70.

Lewis N., Yamamoto E., 1990, Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation, Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol., 41:455-496.

Liou G., Chen C., Yuan G., Chien C., 2001, A taxonomic study of the genus *Rhizopus* by isozyme patterns, Nov Hedwig, 72:231-239.

Longacre A., Reimers J., Gannon J., Wright B., 1997, Flux analysis of glucose metabolism in *Rhizopus oryzae* for the purpose of increased lactate yields, Fungal Genet Biol. 21:30-39.

Maganhotto S., Soares I., Olivera P., 2005, Ligninolytic enzyme production by *Ganoderma* spp. Enz. Micr. Tech. 37:324-329.

Manson H., 1956, Structure and functions of the phenolase complex, Nature, 177:79-81.

Marcial J., Barrios J., Tomasini A., 2006, effect of médium composition on pentachlorophenol removal by *Amylomyces rouxii* in soild-state culture, Process Biochem., 41:496-500.

Marcial J., 2011, Identificación de una aspartateprotease producida por *A. rouxii*, silenciamiento del gen que la codifica y efecto sobre la actividad tirosinasa, Tesis doctoral, Universidad Autónoma Metropolitana, México, DF, 86-90.

Markert L., Moller F., 1959, Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns, Proc. Natl. Acad. Sci., 45:753-762.

Martinez A., 2002, Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. Enzyme Microb.Technol, 30:425-44.

- Mayer A., 1987, Polyphenol oxidases in plants-recent progress, *Phytochemistry*, 26:11-20.
- Mazzocco F., Pifferi P., 1976, An improvement of the spectrophotometric method for the determination of tyrosinase catecholase activity by Besthorn'sHydrazone, *Analytical Biochemistry*, 72: 643-647.
- Mino Y, Wariishi H., Blackburn N., Loehr T., Spectral characterization of manganese peroxidase, an extracellular heme enzyme from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*, Gold M., 1988, *J. Biol. Chem.*, 263:7029-7036.
- Montiel A., Fernández F., Marcial J., Soriano J., Barrios-González, Tomasini A., 2004, A fungal phenoloxidase (tyrosinase) involved in pentachlorophenol degradation, *Biotech. Letters*, 26:1353-1357.
- Montiel A., 2005, 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 peroxidases, Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana, México, D.F., 142pp.
- Nakanishi T., Matsumura Y., Minamiura N., Yamamoto T., 1974, Purification and some properties of an alkalophilic proteinase of streptomyces species. *Agric. Biol. Jhem.*, 38: 37-44.
- Nelson C., 1971, The binding of detergents to proteins. The maximum amount of dodecyl sulfate bound to preteins and the resistance to binding of several proteins, *The Journal of Biological Chemistry*, 12:3895-3901.
- Neto S., 2006, Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybecastanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno, Tesis Doctoral, Sao Paulo, Brazil, 145pp.

Niku-Paavola, Raaska L., Itävaara M., 1990, Detection of White rot fungi by a non-toxic stain. *Mycol. Res.* 94:27-31.

North M., 1982, Comparative Biochemistry of the proteinases of eukaryotic microorganisms, *Microbiol. Rev.*, 46:308-340.

Nout M., Rombouts F., 1990, Recent developments in tempe research. *J ApplBacteriol.*, 69:609–633.

Oberoi R., Beg Q., Puri S., Saxena R., Gupta R., 2001, Characterization and wash performance analysis of an SDS-stable alkaline protease from a *Bacillus* sp., *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 17:493-497.

Ong K. y Chang F., 1997, Analysis of proteins from defferent phase variants of the entomopathogenic bacteria *Photorhabdusluminescens* by two-dimensional zymography. *Electrophoresis*, 18:834-839.

Park Y., Juárez M., Ramos M., Haenlein G., 2007, Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk, *Small Ruminant Research*, 68:88-113.

Paszczynski A., Huynh V., Crawford R., 1985, Enzymatic activities of an extracellular, manganese-dependent peroxidases from *Phanerochaetechrysosporium*, *Arch BiochemBiophys*, 242:329-341.

Pérez de los Santos A., 2009, Contribución al estudio de tirosinasas y proteasas producidas por *Amylomyces rouxii*, Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, México, D.F., 82pp.

Plantas y hongos, [en línea], <http://www.plantasyhongos.es/glosario/esporeangioforo.htm>, 3 de marzo del 2013.

Poulos T. y Kraut J., 1980, The stereochemistry of peroxidase catalysis, *J. Biol. Chem.*, 255, 8199-8205.

Rast D., Baumgarten D., Mayer C., Hollestein G., 2003, Cell wall-associated enzymes in fungi. *Phytochemistry*, 64, 339-366.

Radford A., Stone P., Taleb F., 1996, Cellulase and amylase complexes. In the *Mycota III*. *Biochemistry and Molecular Biology*, 269-294.

Robinson R., 1996, Return to resistance. Breeding crops to reduce pesticide dependence, Agaches, Davis, CA, USA. 480p

Rüttimann-Johnson C., Cullen D., Lamar R., 1994, Manganese peroxidases of the white rot fungus *Phanerochaetesordida*, 60, 599-605.

Sabotic J., Trcek T., Popovic T., Brzin J., 2007, Basidiomycetes harbor a hidden treasure of proteolytic diversity, *J. of Biotech*, 128:297-307.

Sánchez-Ferrer, Rodriguez J., García-Cánovas, García-Carmona, 1995, Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism, *Biochim. Biophys. Acta.* 1, 1-11.

Schimke R. y Doyle D., 1970, Control of enzyme levels in animal tissues, *Microbiol.*, 26, 103-126.

Schipper M., Stalpers J., 1984, A revision of the genus *Rhizopus* II. The *Rh. Microspores*-group. *Stud Mycol* 25:20-34.

Selinheimo E., Saloheimo M., Ahola E., Westerholm-Parvinen A., Kalkkinen N., Bucher T. J., Cruz K. (2006). Production and characterization of a secreted, C-terminally processed tyrosinase from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *FEBS J.* 273:4322-4335.

Shoemaker H., Harvey P., Bowen R., Palmer J., 1985, On the mechanism of enzymatic lignin breakdown, FEBS, 220:149-154.

Sikura A., Bevzenko T., 1974, Activity of some enzymes of the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill under deep cultivation conditions. Abstracted from Mikol. Fitopatol., 8:65-67.

Steven E., Reetta R., Hiroyuki W., Michael H., Thomas P., 1993, Crystal structure of lignin peroxidase, Proc. Natl Acad. Sci., 90:750-754.

Suárez-Rendules P. y Wolf D., 1988, Proteinase function in yeast: Biochemical and genetic approaches to a central mechanism of posttranslational control in the eukaryotic cell. FEMS. Microbiol. Lett., 54:17-46

Taherzadeh M., Fox M., Hjorth H., Edebo L., 2003, Production of mycelium biomass and ethanol from paper pulp sulfite liquor by *Rhizopus oryzae*, Bioresour. Technol., 88:167-177.

Tapia G., Curotto E., O'Reilly S., González G., 1981, Isolation and partial characterization of an extracellular protease from *Sporotrichum dimorphosporum*, FEBS Lett, 130:205-207.

The Armstrong Research Group, Inorganic Chemistry Laboratory, University of Oxford, [en línea], <http://armstrong.chem.ox.ac.uk/fuelcell.html>, 09 de marzo de 2012.

Thurston C., 1994, The structure and function of fungal laccases, Microbiology, 140:19-26.

Tien M., Kirk T., 1988, Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. Science 221:661-663.

Tien M., 1987, Properties of ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* and their possible applications. CRC. Crit. Rev. Microbiol. 15:141-168.

Tonon F., Odier E., 1988, Influence of veratryl alcohol and hydrogen peroxide on ligninase activity and ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods Enzymol.* 161:238-249.

Tsao G., Cao N., Du J., Gong C., 1999, Production of multifunctional organic acids from renewable resources, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 65:243-279

Ulmer D., Leisola M., Fiechter A., 1984, Possible induction of the ligninolytic system of *Phanerochaete chrysosporium*. *Burds. J. Biol. Chem.*, 26:1687-1693.

University of Maine, Department of Chemistry, [en línea], <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Wood4.html>, 12 de marzo del 2012.

Vastag M., Papp T., Kasza Z., Vágvölgyi C., 1998, Differentiation of *Rhizomucor* species by carbon source utilization and isoenzyme analysis, *J. Clin. Microbiol.* 36:2153-2156

Walter M., Boul L., Chong R., Ford C., 2004, Growth substrate selection and biodegradation of PCP by New Zealand white-rot fungi, *J. Environ. Manage.*, 71:361-369.

Wang H., Liu W., Ulbrich N., 1995, Isolation and characterization of a tyrosinase from the skin of the white silky fowl (*Gallinallaninera*) employing copper saturated diethylaminoethyl-cellulose. *Biochim.Biophys.Acta.* 1243:251-255.

Wesenberg D., Kyriakides I., Agathos S., 2003, White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol Adv.* 22:161-187.

Wlemken A., Schellenberg M., Urech K., 1979, Vacuoles: the sole compartments of digestive enzymes in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), *Arch. Microbiol.* 123:23-35

Yamaguchi T., Yashita Y., Takeda I., Kiso H. (1983). Proteolytic enzymes in green asparagus kiwi fruit and mait, occurrence a partial characterization. *Agric. Biol. Chem.* 46:1983-1986.

Yaropolov A., Skorobogatko O., Vartanov S., Varfolomeyev S., 1994, Laccase-properties, catalytic mechanism and applicability, *Appl. Biochem. Biotech.* 49:257-280.

Zhang X., van Leeuwen J., Wichers H.J., Flurkey W.H. (1999). Characterization of tyrosinase from the cap flesh of Portabella mushrooms. *J. Agric. FoodChem.* 47:374-378

ANEXO 1 MATERIAL Y EQUIPO UTILIZADO**Anexo 1.1.MEDIOS DE CULTIVO, AMORTIGUADORES Y REACTIVOS**

- Medio mineral Lee (pH 5.8)

Composición por litro

5g Glucosa, 5g KH₂PO₄, 4g MgSO₄, 2.5g (NH₄)SO₄, 10g NaCl. El medio se preparó con 500 mL de amortiguador de citratos al 0.1M pH 5.8 y posteriormente se aforó con agua destilada 1L.

- Solución de azocaseína 1% (p/v)

Se preparó en amortiguador de citratos

- Solución de hemoglobina 2% (p/v)

Se preparó en amortiguador universal 25 mM pH 3.5, calentándose a 60°C por 20 min.

- Amortiguador universal 25mM pH 3.5

7g de C₂H₂O₃ monohidratado con 50.5mL de HCl al 0.1N y aforar a 100mL con agua destilada

- Rojo de Fenol

Pesar 0.01g de rojo de fenol en 100mL de agua destilada previamente ajustada a pH 7 con NaOH. Almacenar a 4°C; si cambia de color o precipita desechar.

- Lactato de sodio 25 mM

Almacenar a 4°C en frasco ámbar. No ajustar pH.

- Amortiguador de solubilización

50 mM de Tris-HCl pH 6.8 y 50 mM NaCl

- Amortiguador de carga

3.55 mL de agua desionizada; 1.25 mL 0.5M Tris-HCl, pH 6.8; 2.5 mL glicerol; 2 mL 10% (p/v) SDS; 0.2 mL 0.5% (p/v) azul de bromofenol.

Anexo 1.2.ESPECIFICACIONES DEL EQUIPO UTILIZADO

- Centrífuga eppendorf 5417R
- Espectrofotómetro UV-1800
- Gel Doc EZ Imager. Bio-Rad
- Equipo de electroforesis: Bio-Rad Mini-ProteanPrecastGels

ANEXO 2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Anexo 2.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO. CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA EN BASE SECA DE *R. oryzae* ENHE.

Descriptivos

Biomasa

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
24 horas	3	1.406000	.0571664	.0330051	1.263991	1.548009	1.3420	1.4520
36 horas	3	1.542000	.1204658	.0695509	1.242746	1.841254	1.4100	1.6460
48 horas	3	1.682000	.1977574	.1141753	1.190743	2.173257	1.4680	1.8580
72 horas	3	1.664667	.1142337	.0659528	1.380894	1.948439	1.5420	1.7680
96 horas	3	1.586000	.1109775	.0640729	1.310317	1.861683	1.4960	1.7100
Total	15	1.576133	.1493480	.0385615	1.493427	1.658840	1.3420	1.8580

Prueba de homogeneidad de varianzas

Biomasa

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1.121	4	10	.400

ANOVA

Biomasa

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.148	4	.037	2.246	.137
Intra-grupos	.165	10	.016		
Total	.312	14			

Biomasa

	Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05
			1
HSD de Tukey ^a	24 horas	3	1.406000
	36 horas	3	1.542000
	96 horas	3	1.586000
	72 horas	3	1.664667
	48 horas	3	1.682000
	Sig.		

Anexo 2.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE EXTRACELULAR EN *R. oryzae* ENHE.

Descriptivos

Proteína

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
24horas	3	.0500114	.00040256	.00023242	.0490114	.0510114	.04955	.05026
36horas	3	.0487313	.00048911	.00028239	.0475163	.0499463	.04828	.04925
48horas	3	.0489986	.00049753	.00028725	.0477627	.0502345	.04845	.04942
72horas	3	.0493081	.00040987	.00023664	.0482899	.0503262	.04896	.04976
96horas	3	.0487876	.00113784	.00065693	.0459611	.0516141	.04803	.05010
Total	15	.0491674	.00073232	.00018908	.0487619	.0495729	.04803	.05026

Prueba de homogeneidad de varianzas

Proteína

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2.868	4	10	.080

ANOVA

Proteína

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.000	4	.000	1.945	.179
Intra-grupos	.000	10	.000		
Total	.000	14			

Proteína

	Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05
			1
HSD de Tukey ^a	36horas	3	.0487313
	96horas	3	.0487876
	48horas	3	.0489986
	72horas	3	.0493081
	24horas	3	.0500114
	Sig.		.189

Anexo 2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO. pH DEL MEDIO EXTRACELULAR EN *R. oryzae* ENHE.

Descriptivos

Ph

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
24 horas	3	5.1167	.02082	.01202	5.0650	5.1684	5.10	5.14
36 horas	3	4.9233	.03215	.01856	4.8435	5.0032	4.90	4.96
48 horas	3	4.8967	.08386	.04842	4.6883	5.1050	4.80	4.95
72 horas	3	4.9167	.03215	.01856	4.8368	4.9965	4.88	4.94
96 horas	3	4.9333	.08505	.04910	4.7221	5.1446	4.87	5.03
Total	15	4.9573	.09669	.02497	4.9038	5.0109	4.80	5.14

Prueba de homogeneidad de varianzas

Ph

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
3.952	4	10	.035

ANOVA

Ph

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.097	4	.024	7.258	.005
Intra-grupos	.034	10	.003		
Total	.131	14			

pH

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
HSD de Tukey	48 horas	3	4.8967
	72 horas	3	4.9167
	36 horas	3	4.9233
	96 horas	3	4.9333
	24 horas	3	5.1167
Sig.			.932
			1.000

Anexo 2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXTRACELULAR DE PROTEASAS ÁCIDAS, NEUTRAS Y ALCALINASEN *R. oryzae* ENHE.

	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		
				Límite inferior	Límite superior	
Proteasas ácidas	24 horas	695.81441	134.172949	77.464788	362.51033	1029.11849
	36 horas	405.37624	139.892394	80.766911	57.86427	752.88821
	48 horas	389.01213	52.153177	30.110651	259.45645	518.56780
	72 horas	305.92547	38.112702	22.004379	211.24827	400.60267
	96 horas	260.82794	14.771284	8.528205	224.13404	297.52185

	Total	411.39124	175.174119	45.229763	314.38304	508.39943
Proteasas neutras	24 horas	495.03729	42.993544	24.822334	388.23540	601.83917
	36 horas	587.85912	25.306630	14.610790	524.99397	650.72428
	48 horas	562.03938	52.294217	30.192080	432.13334	691.94542
	72 horas	405.52674	43.409447	25.062456	297.69169	513.36178
	96 horas	362.30228	8.315228	4.800799	341.64611	382.95845
	Total	482.55296	95.701905	24.710126	429.55501	535.55091
Proteasas alcalinas	24 horas	587.78128	48.592703	28.055010	467.07031	708.49224
	36 horas	561.99364	31.624089	18.258177	483.43504	640.55223
	48 horas	663.07388	34.725995	20.049063	576.80973	749.33804
	72 horas	486.09110	7.920254	4.572761	466.41610	505.76610
	96 horas	364.99535	9.735083	5.620553	340.81206	389.17864
	Total	532.78705	107.905152	27.860991	473.03117	592.54293

Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Proteasas ácidas	1.996	4	10	.171
Proteasas neutras	2.221	4	10	.140
Proteasas alcalinas	3.255	4	10	.059

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Proteasas ácidas	Inter-grupos	345677.637	4	86419.409	10.297	.001
	Intra-grupos	83925.970	10	8392.597		
	Total	429603.607	14			
Proteasas neutras	Inter-grupos	113869.807	4	28467.452	19.832	.000
	Intra-grupos	14354.157	10	1435.416		
	Total	128223.965	14			
Proteasas alcalinas	Inter-grupos	153559.845	4	38389.961	40.627	.000
	Intra-grupos	9449.462	10	944.946		
	Total	163009.306	14			

Proteasas ácidas

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
HSD de Tukey ^a 96 horas	3	260.82794	
72 horas	3	305.92547	
48 horas	3	389.01213	
36 horas	3	405.37624	
24 horas	3		695.81441
Sig.		.361	1.000

Proteasas neutras

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
HSD de Tukey ^a 96 horas	3	362.30228		
72 horas	3	405.52674	405.52674	
24 horas	3		495.03729	495.03729
48 horas	3			562.03938
36 horas	3			587.85912
Sig.		.643	.092	.078

Proteasas alcalinas

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
HSD de Tukey ^a 96 horas	3	364.99535			
72 horas	3		486.09110		
36 horas	3		561.99364	561.99364	
24 horas	3			587.78128	587.78128
48 horas	3				663.07388
Sig.		1.000	.076	.837	.078

Descriptivos

PROTEÍNA 24 HORAS

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
ÁCIDAS	3	695.81441	134.172949	77.4647	362.51033	1029.11849	561.392	829.736
NEUTRAS	3	495.03733	42.993650	24.8223	388.23519	601.83948	448.506	533.289
ALCALINAS	3	587.78133	48.592843	28.0550	467.07002	708.49265	547.105	641.591
Total	9	592.87769	114.568881	38.1896	504.81226	680.94313	448.506	829.736

Prueba de homogeneidad de varianzas

PROTEÍNA 24 HORAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1.401	2	6	.317

ANOVA

PROTEÍNA 24 HORAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	60584.030	2	30292.015	4.091	.076
Intra-grupos	44424.197	6	7404.033		
Total	105008.227	8			

PROTEÍNA 24 HORAS

	PROTEASAS	N	Subconjunto para alfa = 0.05
HSD de Tukey ^a	NEUTRAS	3	495.03733
	ALCALINAS	3	587.78133
	ÁCIDAS	3	695.81441
	Sig.		.065

Descriptivos

PROTEÍNA 36 HORAS

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		

ÁCIDAS	3	405.37633	139.892475	80.766958	57.86416	752.88851	255.678	532.787
NEUTRAS	3	587.85933	25.306970	14.610986	524.99333	650.72533	562.115	612.705
ALCALINAS	3	561.99400	31.623937	18.258089	483.43578	640.55222	526.396	586.840
Total	9	518.40989	112.315958	37.438653	432.07620	604.74358	255.678	612.705

Prueba de homogeneidad de varianzas

PROTEÍNA 36 HORAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
3.810	2	6	.086

ANOVA

PROTEÍNA 36 HORAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	58498.154	2	29249.077	4.137	.074
Intra-grupos	42420.841	6	7070.140		
Total	100918.996	8			

PROTEÍNA 36 HORAS

	PROTEASAS	N	Subconjunto para alfa = 0.05
			1
HSD de Tukey ^a	ÁCIDAS	3	405.37633
	ALCALINAS	3	561.99400
	NEUTRAS	3	587.85933
	Sig.		.084

Descriptivos

PROTEÍNA 48 HORAS

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
ÁCIDAS	3	389.01233	52.152974	30.110534	259.45716	518.56750	333.615	437.163
NEUTRAS	3	562.03933	52.294218	30.192081	432.13329	691.94537	521.852	621.164
ALCALINAS	3	663.07400	34.726120	20.049135	576.80954	749.33846	623.495	688.434

Descriptivos

PROTEÍNA 48 HORAS

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
ÁCIDAS	3	389.01233	52.152974	30.110534	259.45716	518.56750	333.615	437.163
NEUTRAS	3	562.03933	52.294218	30.192081	432.13329	691.94537	521.852	621.164
ALCALIN AS	3	663.07400	34.726120	20.049135	576.80954	749.33846	623.495	688.434
Total	9	538.04189	126.775977	42.258659	440.59325	635.49053	333.615	688.434

Prueba de homogeneidad de varianzas

PROTEÍNA 48 HORAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
.347	2	6	.720

ANOVA

PROTEÍNA 48 HORAS

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	115256.144	2	57628.072	25.957	.001
Intra-grupos	13321.043	6	2220.174		
Total	128577.187	8			

PROTEÍNA 48 HORAS

	PROTEASAS	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
HSD de Tukey ^a	ÁCIDAS	3	389.01233	
	NEUTRAS	3		562.03933
	ALCALINAS	3		663.07400
	Sig.		1.000	.087

Descriptivos

PROTEÍNA 72 HORAS

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
ÁCIDAS	3	305.9256	38.112770	22.0044	211.24830	400.60304	261.949	329.371
NEUTRAS	3	405.5266	43.408977	25.0621	297.69279	513.36054	355.423	431.826
ALCALINA S	3	486.0910	7.920435	4.57286	466.41555	505.76645	477.308	492.691
Total	9	399.1811	83.418995	27.8063	335.05960	463.30263	261.949	492.691

Prueba de homogeneidad de varianzas

PROTEÍNA 72 HORAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
5.162	2	6	.050

ANOVA

PROTEÍNA 72 HORAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	48870.518	2	24435.259	21.563	.002
Intra-grupos	6799.312	6	1133.219		
Total	55669.830	8			

PROTEÍNA 72 HORAS

	PROTEASAS	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			1	2	3
HSD de Tukey ^a	ÁCIDAS	3	305.92567		
	NEUTRAS	3		405.52667	
	ALCALINAS	3		486.09100	
	Sig.		1.000	.059	

Descriptivos

PROTEÍNA 96 HORAS

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
ÁCIDAS	3	260.828	14.771165	8.528136	224.13439	297.52161	244.011	271.70

NEUTRAS	3	362.302	8.315111	4.800732	341.64612	382.95788	355.579	371.60
ALCALIN AS	3	364.995	9.735020	5.620517	340.81254	389.17880	354.876	374.29
Total	9	329.375	52.344209	17.448070	289.13990	369.61054	244.011	374.29

Prueba de homogeneidad de varianzas

PROTEÍNA 96 HORAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1.006	2	6	.420

ANOVA

PROTEÍNA 96 HORAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	21155.131	2	10577.566	83.048	.000
Intra-grupos	764.198	6	127.366		
Total	21919.329	8			

PROTEÍNA 96 HORAS

	PROTEASAS	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
HSD de Tukey ^a	ÁCIDAS	3	260.82800	
	NEUTRAS	3		362.30200
	ALCALINAS	3		364.99567
	Sig.		1.000	.954

Anexo 2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

INTRACELULAR DE PROTEASAS ÁCIDAS, NEUTRAS Y ALCALINAS EN *R. oryzae* ENHE.

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		
					Límite inferior	Límite superior	
Proteasas ácidas	24 HORAS	3	164.34068	37.082786	21.409756	72.22194	256.45943
	36 HORAS	3	138.51261	20.490133	11.829984	87.61229	189.41292
	48 HORAS	3	134.95832	12.548409	7.244827	103.78634	166.13029

	72 HORAS	3	107.51351	5.167226	2.983299	94.67741	120.34961
	96 HORAS	3	70.45291	7.473596	4.314883	51.88746	89.01835
	Total	15	123.15560	37.177949	9.599305	102.56714	143.74407
Proteasas neutras	24 HORAS	3	49.67522	7.011639	4.048172	32.25735	67.09310
	36 HORAS	3	58.25666	4.316756	2.492280	47.53324	68.98008
	48 HORAS	3	53.98333	5.019363	2.897931	41.51454	66.45212
	72 HORAS	3	65.81448	3.362572	1.941382	57.46139	74.16757
	96 HORAS	3	41.06222	2.075257	1.198150	35.90700	46.21744
	Total	15	53.75838	9.440445	2.437512	48.53044	58.98633
Proteasas alcalinas	24 HORAS	3	40.42835	2.830477	1.634177	33.39705	47.45964
	36 HORAS	3	46.91702	7.497343	4.328593	28.29259	65.54145
	48 HORAS	3	36.60406	3.190609	1.842099	28.67814	44.52997
	72 HORAS	3	27.29575	.163301	.094282	26.89009	27.70141
	96 HORAS	3	27.99680	2.126654	1.227824	22.71390	33.27970
	Total	15	35.84840	8.428150	2.176139	31.18104	40.51575

Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Proteasas ácidas	3.533	4	10	.048
Proteasas neutras	2.012	4	10	.169
Proteasas alcalinas	3.469	4	10	.050

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Proteasas ácidas	Inter-grupos	15280.806	4	3820.202	9.386	.002
	Intra-grupos	4069.992	10	406.999		
	Total	19350.798	14			
Proteasas neutras	Inter-grupos	1030.498	4	257.624	11.861	.001
	Intra-grupos	217.210	10	21.721		
	Total	1247.708	14			
Proteasas alcalinas	Inter-grupos	836.570	4	209.142	13.245	.001
	Intra-grupos	157.902	10	15.790		
	Total	994.472	14			

Proteasas ácidas

TIEMPO	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
HSD de Tukey ^a 96 HORAS	3	70.45291		
72 HORAS	3	107.51351	107.51351	
48 HORAS	3		134.95832	134.95832
36 HORAS	3		138.51261	138.51261
24 HORAS	3			164.34068
Sig.		.238	.384	.432

Proteasas neutras

TIEMPO	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
HSD de Tukey ^a 96 HORAS	3	41.06222		
24 HORAS	3	49.67522	49.67522	
48 HORAS	3		53.98333	53.98333
36 HORAS	3		58.25666	58.25666
72 HORAS	3			65.81448
Sig.		.233	.236	.066

Proteasas alcalinas

TIEMPO	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
HSD de Tukey ^a 72 HORAS	3	27.29575		
96 HORAS	3	27.99680		
48 HORAS	3	36.60406	36.60406	
24 HORAS	3		40.42835	
36 HORAS	3		46.91702	
Sig.		.096	.060	

Descriptivos

Proteína 24 horas

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
ácidas	3	164.34100	37.082829	21.409781	72.22215	256.45985	132.614	205.108
neutras	3	49.67533	7.011300	4.047976	32.25830	67.09237	41.679	54.770
alcalinas	3	40.42833	2.830583	1.634238	33.39677	47.45989	37.348	42.915

Descriptivos

Proteína 24 horas

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
ácidas	3	164.34100	37.082829	21.409781	72.22215	256.45985	132.614	205.108
neutras	3	49.67533	7.011300	4.047976	32.25830	67.09237	41.679	54.770
alcalinas	3	40.42833	2.830583	1.634238	33.39677	47.45989	37.348	42.915
Total	9	84.81489	62.702357	20.900786	36.61759	133.01219	37.348	205.108

Prueba de homogeneidad de varianzas

Proteína 24 horas

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
6.097	2	6	.036

ANOVA

Proteína 24 horas

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	28588.071	2	14294.036	29.939	.001
Intra-grupos	2864.613	6	477.436		
Total	31452.685	8			

Proteína 24 horas

Proteasas	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
HSD de Tukey ^a alcalinas	3	40.42833	164.34100
Neutras	3	49.67533	
Ácidas	3		
Sig.		.865	1.000

Descriptivos

Proteína 36 horas

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
ácidas	3	138.512	20.490075	11.829950	87.61217	189.41250	115.785	155.572
neutras	3	58.2570	4.316812	2.492312	47.53345	68.98055	55.049	63.165

alcalinas	3	42.2413	2.780335	1.605227	35.33460	49.14807	40.279	45.423
Total	9	79.6702	45.904714	15.301571	44.38474	114.95571	40.279	155.572

Prueba de homogeneidad de varianzas

Proteína 36 horas

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
-----------------------	-----	-----	------

Descriptivos

5.925	2	6	.038
-------	---	---	------

ANOVA

Proteína 36 horas

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	15965.526	2	7982.763	53.671	.000
Intra-grupos	892.417	6	148.736		
Total	16857.942	8			

Proteína 36 horas

HSD de Tukey^a

	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Proteasas			
alcalinas	3	42.24133	
Neutras	3	58.25700	
Ácidas	3		138.51233
Sig.		.313	1.000

Proteína 48 horas

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
ácidas	3	134.95	12.548617	7.244948	103.78584	166.13083	120.491	142.892
neutras	3	53.9833	5.019793	2.898179	41.51348	66.45319	48.196	57.157
alcalinas	3	36.6043	3.190804	1.842212	28.67794	44.53073	34.160	40.214
Total	9	75.1820	45.986661	15.328887	39.83352	110.53048	34.160	142.892

Prueba de homogeneidad de varianzas

Proteína 48 horas

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
5.919	2	6	.038

ANOVA

Proteína 48 horas

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	16532.490	2	8266.245	128.593	.000
Intra-grupos	385.695	6	64.282		
Total	16918.184	8			

Proteína 48 horas

HSD de Tukey^a

Proteasas	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
alcalinas	3	36.60433	
Neutras	3	53.98333	
Ácidas	3		134.95833
Sig.		.084	1.000

Descriptivos

Proteína 72 horas

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
ácidas	3	107.51367	5.167114	2.98323	94.67784	120.34949	101.549	110.623
neutras	3	65.81467	3.362377	1.94126	57.46206	74.16727	62.710	69.386
alcalinas	3	27.29567	.163531	.094415	26.88943	27.70190	27.157	27.476
Total	9	66.87467	34.881066	11.6270	40.06271	93.68663	27.157	110.623

Prueba de homogeneidad de varianzas

Proteína 72 horas

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
5.837	2	6	.039

ANOVA

Proteína 72 horas

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	9657.447	2	4828.724	380.900	.000
Intra-grupos	76.063	6	12.677		
Total	9733.510	8			

Proteína 72 horas

HSD de Tukey^a

Proteasas	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
alcalinas	3	27.29567		
Neutras	3		65.81467	
Ácidas	3			107.51367
Sig.		1.000	1.000	1.000

Descriptivos

Proteína 96 horas

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
ácidas	3	70.4526	7.473710	4.314949	51.88694	89.01839	61.991	76.152
neutras	3	41.0623	2.075332	1.198193	35.90692	46.21774	39.665	43.447
alcalina s	3	27.9970	2.126750	1.227880	22.71386	33.28014	26.038	30.259
Total	9	46.5040	19.256009	6.418670	31.70252	61.30548	26.038	76.152

Prueba de homogeneidad de varianzas

Proteína 96 horas

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
5.154	2	6	.050

ANOVA

Proteína 96 horas

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2836.978	2	1418.489	65.786	.000
Intra-grupos	129.373	6	21.562		
Total	2966.351	8			

Proteína 96 horas

HSD de Tukey^a

Proteasas	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
alcalinas	3	27.99700		
Neutras	3		41.06233	
Ácidas	3			70.45267
Sig.		1.000	1.000	1.000

Anexo 2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA LiP EN *R. oryzae* ENHE

Descriptivos

LiP

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
24 horas	3	25.561253	17.00029903	9.8151272	-16.6698303	67.7923376	7.50917	41.26576
36 horas	3	12.591947	5.50196789	3.1765626	-1.0756986	26.2595933	9.35874	18.94473
48 horas	3	9.0188994	4.52403077	2.6119503	-2.2194160	20.2572149	5.35141	14.07429
Total	9	15.724033	11.90649195	3.9688306	6.5718936	24.8761734	5.35141	41.26576

Prueba de homogeneidad de varianzas

LiP

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2.609	2	6	.153

ANOVA

LiP

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	454.619	2	227.310	2.007	.215
Intra-grupos	679.497	6	113.250		
Total	1134.116	8			

LiP

	Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05
			1
HSD de Tukey ^a	48 horas	3	9.0188994
	36 horas	3	12.5919474
	24 horas	3	25.5612537
	Sig.		.218

Anexo 2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA LiP CON ALCOHOL VERATRÍLICO EN *R. oryzae* ENHE.

Descriptivos

LiP+veratrílico

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
36 horas	3	18.672	11.96312	6.90691	-11.0456	48.3905	5.21	28.08
48 horas	3	4.7258	.85265	.49228	2.6077	6.8439	3.89	5.60
72 horas	3	3.4827	2.23058	1.28783	-2.0583	9.0238	1.12	5.56
96 horas	3	3.8236	2.03470	1.17473	-1.2309	8.8781	2.54	6.17
Total	12	7.6761	8.48564	2.44959	2.2846	13.0677	1.12	28.08

Prueba de homogeneidad de varianzas

LiP+veratrílico

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
7.529	3	8	.010

ANOVA

LiP+veratrílico

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	486.149	3	162.050	4.238	.045
Intra-grupos	305.917	8	38.240		
Total	792.067	11			

LiP+veratrílico

	Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05
HSD de Tukey ^a	72 horas	3	3.4827
	96 horas	3	3.8236
	48 horas	3	4.7258
	36 horas	3	18.6724
	Sig.		



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00161

Matricula: 2113801104

ESTUDIO DE LAS ENZIMAS
FENOLOXIDASAS, PROTEASAS Y
PEROXIDASAS PRESENTES EN
Rhizopus oryzae ENHE

En México, D.F., se presentaron a las 10:00 horas del día 17 del mes de julio del año 2013 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ PERRINO
DRA. ALBA MONICA MONTIEL GONZALEZ
DR. HECTOR HUGO LEON SANTIESTEBAN
DR. FRANCISCO FIERRO FIERRO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

DE: ARIANNA RUIZ BADILLO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBADO

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



ARIANNA RUIZ BADILLO
ALUMNA

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. RUBEN ROMAN RAMOS

PRESIDENTE

DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ
PERRINO

VOCAL

DRA. ALBA MONICA MONTIEL GONZALEZ

VOCAL

DR. HECTOR HUGO LEON SANTIESTEBAN

SECRETARIO

DR. FRANCISCO FIERRO FIERRO