

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

“Identificación de una aspartato proteasa producida por *Amylomyces rouxii*, silenciamiento del gen que la codifica y efecto sobre la actividad tirosinasa”

TESIS

Que para obtener el grado de:
Doctor en Biotecnología

P R E S E N T A

M. en B. Jaime Marcial Quino

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

Junio 2011

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios del Departamento de Biotecnología, perteneciente a la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, en la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa.

**El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma
Metropolitana está incluido en el Padrón Nacional de Posgrado (PNP) del
CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo.**

**Este trabajo fue financiado por el CONACyT, a través del la beca de
Doctorado No. 172706**

México D.F. a 06 de junio de 2011

A mi familia

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

**Identificación de una aspartato proteasa producida por *Amylomyces rouxii*,
silenciamiento del gen que la codifica y efecto sobre la actividad tirosinasa**

que presentó
Jaime Marcial Quino

Comité Tutorial:

Director: Dra. Araceli Tomasini Campocosio
Co-director: Dr. Francisco José Ferandéz Perrino
Asesora: Dra. Alba Mónica Montiel González

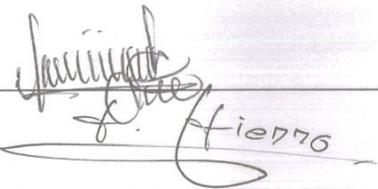
Jurado:

Presidente: Dr. Octavio Loera Corral

Secretario: Dr. Francisco Fierro Fierro

Vocal: Dra. Alba Mónica Montiel González

Vocal: Dr. Gerardo Díaz Godinez



DEDICATORIA

A mi familia

A mis padres

Mis verdaderos maestros de vida y quienes estarán orgullosos de que haya logrado mi objetivo final.

A Maythé, Alan, Alancito y Juan Carlos[†]

A Yuridia y Camila, quienes siempre han creído en mí

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los Doctores Araceli Tomasini Campocosio y Francisco José Fernández Perrino por darme la oportunidad nuevamente de trabajar con ellos y por todo el apoyo brindado durante la realización de la tesis.

Al Dr. Francisco Fierro Fierro por ayudarme en la elaboración de la biblioteca genómica, por enseñarme parte de sus conocimientos y darle un rumbo final al trabajo.

A los Doctores Javier Barrios Gonzáles y Armando Alvarez Mejía, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio.

Al Dr. Gerdardo Díaz Godines por su ayuda durante la purificación de las proteínas y enseñarme a utilizar el equipo FPLC.

A mi gran amigo, hermano y compadre Edgar Sierra Palacios, porque sin su ayuda en todos los aspectos no hubiera logrado esto, no hay palabras para describir su apoyo. Gracias por tu amistad.

Al maestro Arturo quien siempre me dio buenos consejos, por su espíritu de lucha y por no dejarme caer situaciones complicadas.

A mis grandes amigas del Alma Mónica, Anita, Yenni, Isadora y Violeta, por su ayuda, amistad y apoyo en momentos difíciles.

A todos mis compañeros de laboratorio: Tania, Sandra, Angel, Jesús, Maura, Yessi, Cristian, Ara Itzel, Karla, Paola, Tere, Omar, Octavio, Hugo, Daniel, Alfonso, Luis, Roxana, Gabi, Vicky, Ana, Marisol.

A mis amigos: Hermilo, Marco, Victor, Pule, Mario, Lenin, Adolfo, Casanova, Roberto y mi tío Ignacio.

RESUMEN

Amylomyces rouxii es un zigomiceto, aislado de un efluente de la industria de papel y que ha sido estudiado para la degradación de pentaclorofenol (PCF), encontrándose que produce una fenoloxidasa (tirosinasa) extracelular involucrada en la degradación del tóxico. Cepa que se empleó en todos los estudios bioquímicos y moleculares mencionados en este documento.

En el presente trabajo se mostró que *A. rouxii* produce fenoloxidasas extra e intracelulares, de tipo tirosinasa. Se purificó parcialmente una fenoloxidasa extracelular producida por *A. rouxii* y la enzima semipurificada mostró actividad con diferentes sustratos fenólicos (mono y difenoles). Sin embargo, la secuencia del amino terminal de la proteína no se encontró la fenoloxidasa sino que dicha secuencia presentó similitud con una aspartato proteasa, lo que indicaba que probablemente la proteína de interés estaba contaminada con una proteasa, o bien que se estaba purificando selectivamente una proteasa.

Se observó que, en las condiciones de cultivo utilizadas, *A. rouxii* produce proteasa extracelular, en los mismos tiempos en los que se produce la tirosinasa (48 horas). La proteasa secretada fue purificada por cromatografía de intercambio aniónico, obteniéndose un factor de purificación de 4.2 y una masa molecular similar a la de la fenoloxidasa (40 kDa), determinada por SDS-PAGE. La secuencia fue obtenida por LC-MS/MS y su análisis reveló que corresponde a una aspartato proteasa tipo 2 (también llamada rhizopuspepsina-2), con 99% de similitud a la de *Rhizopus oryzae*. El pH óptimo de la rhizopuspepsina purificada fue de 3.5, utilizando como sustrato hemoglobina y fue estable en un rango de temperatura de 37 a 50°C. En presencia del inhibidor de proteasas pepstatina A, 3 mM, la actividad proteasa disminuyó 3.6 veces, mientras que la actividad tirosinasa se incrementó 2 veces con respecto a los cultivos sin inhibidor. Por esta razón, se propuso estudiar el efecto de esta proteasa sobre la actividad tirosinasa, a través de la disminución y/o eliminación de su actividad en *A. rouxii*, mediante el silenciamiento de su gen, mediado por un mecanismo de RNA de interferencia.

Los fragmentos de 910 y 412 pb de la rhizopuspepsina-2 se obtuvieron a partir del gen codificante de la proteasa purificada de *A. rouxii*. Mientras que el fragmento de 455 pb del gen de la rhizopuspepsina-6, se obtuvo de la base de datos GenBank a partir de la

secuencia del gen que codifica para esta enzima, del hongo *Rhizopus oryzae*. Se construyó un plásmido con cada uno de los fragmentos de genes de rhizopuspepsina, insertado entre dos promotores orientados en sentido contrario, el *Pgpd* y *Ppki*. Se seleccionaron 5 transformantes, provenientes de *A. rouxii*, con la construcción que incorporaba el fragmento de 412 pb y 2 con cada uno de los fragmentos de 910 y 455 pb. La transformante A412-3 presentó mayor inhibición de actividad proteasa, 80%, y 91% a las 48 y 96 h de cultivo, respectivamente, mientras que las transformantes obtenidas con el fragmento de 910 pb inhibieron el 25% de la actividad proteasa a las 48 h. Las dos transformantes obtenidas con el fragmento de 455 pb presentaron 68% de inhibición de la actividad proteasa a las 48 h de cultivo.

Las transformantes seleccionadas se usaron para estudiar su efecto sobre la actividad tirosinasa. La transformante A412-3, con un fragmento de la rhizopuspepsina-2, incrementó, a las 48 h de cultivo, 4 veces la actividad monofenolasa utilizando L-tirosina como sustrato e incrementó 2.7 y 2.0 veces la actividad difenolasa con L-dopa y 4-*tert*-butilcatecol como sustratos, respectivamente. Sin embargo este efecto no se observó en las transformantes con el fragmento de la rhizopuspepsina-6, ya que no se obtuvo incremento de actividad tirosina en los sustratos analizados. Los resultados obtenidos permiten proponer que la fenoloxidasa producida por *A. rouxii* es afectada de manera negativa por la aspartato proteasa de tipo 2, lo que provoca una disminución de su actividad y la posible degradación de la proteína, mientras que la proteasa de tipo 6 probablemente no afecta a la fenoloxidasa.

A partir de la transformante A412-3, se volvió a purificar parcialmente la fenoloxidasa. La purificación se realizó mediante cromatografía de intercambio aniónico y filtración en gel, obteniéndose un factor de purificación final de 8.2 para la actividad monofenolasa y 10.6 para la actividad difenolasa. Las dos bandas obtenidas a partir de la cromatografía por filtración en gel, visualizadas en geles de acrilamida con un tamaño de 43 y 128 kDa, fueron secuenciadas por espectrometría de masas. Las bandas mostraron 100% de similitud a una tirosinasa y polifenoloxidasa de *Agaricus bisporus*, mientras que solo el 38%, 37%, 33% y 27% de similitud con tirosinasas de especies como *Pholiota nameko*, *Lentinula edodes*, *Pycnoporus sanguineus* y *Neurospora crassa*, respectivamente. Finalmente, identificamos la proteína producida por *A. rouxii* como una tirosinasa

extracelular. Los resultados sugieren que la aspartato proteasa de tipo 2 identificada podría estar involucrada en un mecanismo de regulación post-transduccional de la tirosinasa de *A. rouxii*.

ABSTRACT

Amylomyces rouxii is a zigomycete, it was isolated from a paper industry effluent and has studied for pentachlorophenol (PCF) degradation, it has been reported that *A. rouxii* produces an extracellular phenoloxidase (tyrosinase) involved in the toxic degradation. This strain was used in the biochemistry and molecular studies of this work.

In this work, it was showed that *A. rouxii* produces extra and intracellular phenoloxidases, type tyrosinase. An extracellular phenoloxidase produced by *A. rouxii* was partially purified and the partially purified enzyme showed activity on different phenolic substrates (mono and diphenol). However, the amino terminal sequence of the protein obtained do not showed similitude with the phenoloxidase, in spite it was found similitude with an aspartate protease, indicating that probably the interest protein was contaminated with a protease or it was selectivity purified a protease.

It was observed that under culture conditions used, *A. rouxii* produces an extracellular protease at the same time that the tyrosinase is produced (48 h). This secreted protease was purified by anionic interchange chromatography, it was obtained a purification factor of 4.2 and a similar molecular mass to the phenoloxidase (40 kDa) determined by SDS-PAGE. The sequence was obtained by LC-MS/MS and the analysis of sequence revealed that this protein correspond to an aspartate protease type 2, also named rhizopuspepsin-2, with 99% of similitude to a rhizopuspepsin-2 from *Rhizopus oryzae*. Optimum pH of this purified enzyme was 3.5, using hemoglobin as substrate and was stable between 37 to 50° C. In presence of protease inhibiter pepstatin A at 3mM, protease activity diminished 3.6-time, while tyrosinase activity increased 2-time with respect to assays without inhibiter. For this reason we proposed study the effect of this protease on tyrosinase activity, through diminished protease activity by silencing of the protease gen of *A. rouxii*, using a RNA interference mechanism.

The fragments of rhizopuspepsin-2 of 412 and 910 pb were obtained from the gen that codify it from the purified protease of *A. rouxii*. While, the fragment of rhizopuspepsin-6 of 455 pb was obtained from the sequence of the gen that codify it, presented in data base GenBank of the *Rhizopus oryzae*. Plasmids were constructed with each one of the fragments, inserted between two promoters in sense opposite, *Pgpd* y *Ppki*. It was selected 5 transformants obtained frond *A. rouxii*, containing the plasmid with the

fragment of 412 pb, and 2 transformants containing the fragments of 910 and 2 of 455 pb. The transformant A412-3 presented the highest protease activity inhibition, 80 and 91 % at 48 and 96 h of culture respectively, the transformants obtained with the fragment of 910 pb inhibited 25% protease activity at 48 h. The transformants obtained with the fragment of 455 pb presented 65% of protease activity inhibition, also at 48 h.

The transformants were used to study the effect of protease on tyrosinase activity. A412-3 transformant, from rhizopuspepsin-2, showed 4-times higher monophenolase activity using L-tyrosine as substrate, and 2.7-times and 2-times higher diphenolase activity using L-dopa and 4-*ter*-butylcatecol as substrates respectively, all these results compared with tyrosinase activity of the wild strain of *A. rouxii*. However, transformants obtained from the fragment of rhizopupspepsin-6 do not produce higher tyrosinase activity. Results indicate that the tyrosinase produced by *A. rouxii* is negatively affected by the aspartate protease type 2, and probably the aspartate protease type 6 does not affect tyrosinase activity.

Phenoloxidase produced by transformant A412-3 of *A. rouxii* was partial purified. Enzyme purification was carried out by anion interchange and by gel filtration chromatography, the final purification factor was 8.2 to monophenolase activity and 10.6 to diphenolase activity. The two bands obtained from an acrylamide gel showed a molecular mass of 43 and 128 kDa, these bands were sequenced by mass spectrophotometry. The bands showed 100% similitude to a tyrosinase and poliphenoloxidase from *Agaricus bisporus*, while for *Pholia nameko* (38%), *Lentinula edodes* (37%), *Pycnoporus sanguineus* (33%) and *Neurospora crassa* (27%). Finally, we identified the protein produce by *A. rouxii* as an extracellular tyrosinase. Results suggest that the aspartate protease type 2 produced by *A. rouxii*, identified in this work could de involved in a post-transductional regulation mechanism in the tyrosinase of *A. rouxii*.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 IMPORTANCIA Y APLICACIONES DE LOS HONGOS FILAMENTOSOS.....	1
1.2 CARACTERÍSTICAS DE <i>Amylomyces rouxii</i>	1
1.2.1 Ciclo de vida de <i>A. rouxii</i>	2
1.2.2 Aplicaciones de <i>A. rouxii</i>	3
1.3 PROTEASAS FÚNGICAS	4
1.3.1 Clasificación y características de las proteasas	4
1.3.1.1 Exopeptidasas.....	4
1.3.1.2 Endopeptidasas.....	5
1.3.2 Funciones fisiológicas de las proteasas	6
1.3.3 Aspartato proteasas	6
1.3.3.1 Aspartato proteasas del género <i>Rhizopus</i>	7
1.4 TIROSINASAS FÚNGICAS	8
1.4.1 Estructura de las tirosinasas	8
1.4.2 Localización y propiedades bioquímicas de las tirosinasas	10
1.4.3 Función fisiológica	11
1.4.4 Producción y uso.....	11
1.5 RELACIÓN ENTRE PROTEASAS, PEROXIDASAS Y FENOLOXIDASAS.....	12
1.6 ESTRATEGÍA PARA EL USO DE LA FUNCIÓN GÉNICA	13
1.6.1 Silenciamiento génico.....	14
II. ANTECEDENTES	16

III. JUSTIFICACIÓN	17
IV. HIPÓTESIS	18
V. OBJETIVOS.....	18
5.1 OBJETIVO GENERAL	18
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	18
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	19
6.1 MICROORGANISMOS UTILIZADOS	19
6.2 VECTORES	19
6.3 MEDIOS DE CULTIVO.....	20
6.3.1 Medios de cultivos para bacterias	20
6.3.2 Medios de cultivo para hongos	20
6.4 CONDICIONES DE CULTIVO	22
6.4.1 Crecimiento de <i>E. coli</i>	22
6.4.2 Crecimiento de <i>A. rouxii</i>	23
6.4.2.1 Propagación y conservación de la cepa <i>A. rouxii</i>	23
6.4.2.2 Obtención de esporas	23
6.4.2.3 Condiciones de fermentación líquida para <i>A. rouxii</i>	23
6.4.3 Cultivos para la extracción de ADN	23
6.5 OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS.....	24
6.5.1 Obtención de proteínas extracelulares	24
6.5.2 Obtención de proteínas intracelulares	24
6.5.3 Extracción de tirosinasa adherida a la pared celular	24
6.6 TÉCNICAS ANALÍTICAS	25

6.6.1 Determinación de pH	25
6.6.2 Determinación de biomasa.....	25
6.6.3 Cuantificación de proteínas.....	25
6.6.4 Determinación de actividad tirosinasa	26
6.6.4.1 Determinación de la actividad monofenolasa	26
6.6.4.2 Determinación de la actividad difenolasa	27
6.6.4.3 Determinación cualitativa de actividad tirosinasa en medio sólido	28
6.6.5 Determinación de la actividad de proteasas	29
6.6.5.1 Determinación cualitativa de actividad proteasa en medio sólido	29
6.7 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE <i>A. rouxii</i>	29
6.7.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	31
6.7.2 Isoelectroenfoque	33
6.7.3 Identificación de proteínas	33
6.8 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	33
6.8.1 Extracción de ADN plasmídico de bacterias	33
6.8.1.1 Minipreparaciones (<i>boiling minipreps</i>).....	33
6.8.1.2 Megapreparaciones	34
6.8.2 Extracción de ADN genómico de <i>Amylomyces rouxii</i> y <i>Aspergillus niger</i>	35
6.8.2.1 Extracción a pequeña escala.....	35
6.9 TÉCNICAS ANALÍTICAS	36
6.9.1 Eliminación de ARN.....	36
6.9.2 Eliminación de proteínas.....	37
6.9.3 Digestión con endonucleasas	37
6.9.4 Desfosforilación de plásmidos	38
6.9.5 Ligación	38

6.9.6 Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR).....	39
6.9.6.1 PCR estándar.....	40
6.10 ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA.....	41
6.10.1 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	43
6.11 FRACCIONAMIENTO DEL ADN EN GRADIENTES DE SACAROSA.....	43
6.12 ENCAPSIDACIÓN “in vitro” DE ADN DE LOS BACTERIOFAGOS RECOMBINANTES	45
6.13 CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pGpdPkai-RNAi.....	46
6.14 TRANSFORMACIÓN DE MICROORGANISMOS	47
6.14.1 Transformación de <i>Escherichia coli</i>	47
6.14.1.1 Preparación de células electro-competentes.....	47
6.14.1.2 Transformación por electroporación	48
6.14.2 Transformación de <i>Amylomyces rouxii</i>	49
6.14.2.1 Condiciones de cultivo.....	49
6.14.2.2 Elaboración de protoplastos	49
6.14.2.3 Transformación	50
6.15 REACTIVOS Y EQUIPOS	51
6.15.1 Reactivos para biología molecular.....	51
6.15.1.1 Ácidos nucleicos	51
6.15.1.2 Antibióticos.....	53
6.15.1.3 Enzimas.....	53
6.15.1.4 Sistemas comerciales para manipulación de ADN	53
6.15.2 Equipos	54

VII. RESULTADOS	55
7.1. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS DE LA FENOLOXIDASA PRODUCIDA POR <i>A. rouxii</i>	55
7.1.1 Determinación de actividad tirosinasa en extractos de <i>A. rouxii</i>	55
7.1.2 Obtención de tirosinasa asociada a la pared celular de <i>A. rouxii</i>	58
7.2. PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA TIROSINASA DE <i>A. rouxii</i>.....	59
7.2.1 Determinación del punto isoeléctrico	62
7.2.2 Actividad tirosinasa sobre diferentes sustratos fenólicos	63
7.2.3 Secuenciación de la proteína parcialmente purificada de <i>A. rouxii</i>	64
7.3 OBTENCIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA TIROSINASA DE <i>A. rouxii</i> MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES	65
7.3.1 Construcción de la biblioteca genómica de <i>A. rouxii</i>	70
7.3.2 Análisis de la secuencia de nucleótidos del fragmento obtenido por PCR.....	73
7.4 ESTUDIOS BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES DE LA ASPARTATO PROTEASA PRODUCIDA POR <i>A. rouxii</i>	73
7.4.1 Determinación de la actividad proteasa	73
7.4.2 Purificación de la proteasa	74
7.4.2.1 Identificación de la proteína y secuencia de aminoácidos	76
7.4.2.1.1 Análisis de la secuencia de aminoácidos	77
7.4.3 Caracterización bioquímica de la aspartato proteasa de <i>A. rouxii</i>	79
7.4.3.1 Determinación de pH óptimo	79
7.4.3.2 Determinación de temperatura óptima	80
7.4.3.3 Termoestabilidad de la enzima.....	81
7.4.3.4 Determinación de K_m y V_{max}	84
7.4.4 Estudio del efecto de inhibidores de proteasas	84
7.4.5 Estudio del efecto de inhibidores sobre la actividad tirosinasa	84

7.5 IDENTIFICACIÓN Y SILENCIAMIENTO DEL GEN DE LA ASPARTATO PROTEASA	85
7.5.1 Obtención de ADN de <i>Amylomyces rouxii</i> y <i>Aspergillus niger</i>	85
7.5.2 Construcción del plásmido pGpdPki-RNAi.....	85
7.5.2.1 Construcción del plásmido pJasp-RNAi	90
7.5.3 Obtención de transformantes de <i>A. rouxii</i> que silencian el gen de la aspartato proteasa	95
7.5.4 Efecto del silenciamiento sobre la actividad proteasa	95
7.5.5 Efecto del silenciamiento sobre la actividad tirosinasa	102
7.5.5.1 Determinación de la actividad tirosinasa producida por las transformantes A- 412.....	103
7.5.5.2 Determinación de la actividad tirosinasa producida por las transformantes A- 910.....	105
7.5.5.3 Determinación de la actividad tirosinasa producida por las transformantes A- 455.....	106
7.6 PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA TIROSINASA A PARTIR DE LA CEPA SILENCIADA A412-3.....	109
7.6.1 Obtención de la secuencia de aminoácidos de las proteínas tirosinasa purificadas de la cepa silenciada A412-3	112
VIII. DISCUSIONES	115
IX. CONCLUSIONES.....	120
PERSPECTIVAS.....	121
X. BIBLIOGRAFÍA	122

ANEXOS	140
Anexo 1	140
Anexo 2	142
Anexo 3	143

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Ciclo del vida del zigomiceto <i>A. rouxii</i>	3
Fig. 2. Estereografía del centro activo de una polifenoloxidasas	8
Fig. 3. Ciclo catalítico de tirosinasas, con sus dos actividades mono y difenolasa (Solomon <i>et al.</i> , 1996). T=tirosina, D=Dopa Escribir el título del capítulo (nivel 1).....	9
Fig. 4. Esquema general del proceso de silenciamiento mediado por siRNAs	15
Fig. 5. Marcadores de peso molecular para geles de poliacrilamida. A) SDS-PAGE Molecular Weight Standards Low Range; B) Precision Plus Protein TM Standards; C) PageRuler TM Prestained Protein Ladder	32
Fig. 6. Marcadores de peso molecular empleados para geles de agarosa. a) λ HindIII; b) GeneRuler TM , 1kb DNA Ladder (Fermentas); c) DNA Ladder 1 kb (promega).....	43
Fig. 7. Vector pGpdPpki-RNAi utilizado para el silenciamiento de genes, con los promotores <i>Pgpd</i> y <i>Ppki</i> , en sentido opuesto y enfrentados, separados por un sitio de restricción <i>NcoI</i>	47
Fig. 8. Actividad tirosinasa extracelular de <i>A. rouxii</i> en cultivo líquido. (A) Biomasa; (B) Actividad monofenolasa; (C) Actividad difenolasa. Cultivo control sin tirosina y sin PCF, (Δ) y cultivo suplementado con 0.1 g tirosina L ⁻¹ y 12.5 mg PCF L ⁻¹ , (\blacksquare)	56
Fig. 9. Determinación de actividad tirosinasa intracelular de <i>A. rouxii</i> en cultivo líquido. (A) Actividad monofenolasa; (B) Actividad difenolasa; Cultivo control sin tirosina y sin PCF, (Δ) y Cultivo suplementado con 0.1 g tirosina L ⁻¹ y 12.5 mg PCF L ⁻¹ (\blacksquare)	57
Fig. 10. Determinación de actividad tirosinasa asociada con la membrana y pared celular de <i>A. rouxii</i> . La actividad enzimática se realizó utilizando como sustrato L-Dopa (4.2 mM). Barras negras: medio M-N suplementado con tirosina y PCF; barras blancas: control (medio M-N sin aditivos)	58
Fig. 11. Fracciones recuperadas de la columna de intercambio aniónico Econo-Pac High Q Cartridge. (\blacktriangle) Proteína cuantificada a 280 nm (\blacksquare) Actividad tirosinasa difenolasa determinada con L-Dopa (4.2 mM).....	60

Fig. 12. Fracciones recuperadas de la columna de intercambio aniónico Bio-Scale Q5. (▲) Proteína cuantificada a 280 nm. (■) Actividad tirosinasa difenolasa determinada con L-Dopa (4.2 mM)	60
Fig. 13. SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en los pasos de purificación parcial de las proteínas extracelulares producidas por <i>A. rouxii</i> . (1) Marcador de peso molecular; (2), tirosinasa comercial; (3) fracción obtenida de la columna de filtración en gel	62
Fig. 14. Determinación del punto isoeléctrico de la proteína extracelular parcialmente purificada de <i>A. rouxii</i> . (■) Punto isoeléctrico de la proteínas (Δ) Actividad difenolasa determinada con L-Dopa (4.5 mM).....	63
Fig. 15. Regiones conservadas en el alineamiento de secuencias de aminoácidos de las tirosinasas de hongos. (PYC, <i>Pynoporus sanguineus</i> ; AGA, <i>Agaricus bisporus</i> ; ASP, <i>Aspergillus clavurigerus</i> ; HYP; <i>Hipocrea jecorina</i> ; LEN; <i>Lentinula edodes</i> ; NEU; <i>Neurospora crasa</i> ; PHO; <i>Pholiota nameko</i> ; POD, <i>Podospora anserina</i>).....	66
Fig. 16. Banda amplificada por PCR a partir del ADN cromosómico de <i>A. rouxii</i> con los cebadores diseñados para el gen de la tirosinasa. (M) Marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas).....	69
Fig. 17. Bandas amplificada por PCR a partir del ADN cromosómico de <i>A. rouxii</i> con los cebadores diseñados para el gen de la tirosinasa y los oligos comerciales. (M) Marcador de peso molecular (Ladder 1 kb); Carril 1-4, Fragmentos obtenido partir de ADN digerido con las diferentes enzimas del kit utilizando el primer AP1 y 58°C; Carril 5-8, Fragmentos obtenidos partir de ADN digerido con las diferentes enzimas del kit utilizando el primer AP2 y 58°C	70
Fig. 18. A) Obtención de ADN total de <i>A. rouxii</i> . B) Digestiones parciales del ADN total con la endonucleasa <i>Sau3AI</i> . Las líneas negras delimitan los tamaños útiles para la construcción de la biblioteca	71
Fig. 19. Fracciones obtenidas por centrifugación en gradiente de sacarosa de la digestión parcial seleccionada para el ADN de <i>A. rouxii</i> . La fracción óptima (en este caso carril 5) es aquella que posee moléculas de ADN de alrededor de 15 kpb. (M) Marcador de peso molecular λ / <i>HindIII</i>	71

Fig. 20. Ligación obtenida a partir de fragmentos seleccionados (15 kpb) de ADN de <i>A. rouxii</i> con los brazos del vector λ -DASH [®]	72
Fig. 21. Cinética de crecimiento y actividad proteasa en medio M-N suplementado con tirosina y PCF. (▲) Biomasa (mg mL ⁻¹); (■) Actividad proteasas (U mL ⁻¹).....	74
Fig. 22. (A) Purificación de la proteasas aislada de <i>A. rouxii</i> por intercambio aniónico. (▲) Proteína (280 nm); (■) Actividad proteasa determinada con hemoglobina (2%). (B) SDS-PAGE de la fracción 10 obtenida en la purificación con columna de intercambio aniónico	76
Fig. 23. Secuencias peptídicas obtenidas a partir de la fracción 10, purificada por intercambio aniónico e identificada por LC-MS/MS	76
Fig. 24. Dominios conservados de los péptidos secuenciados a partir de la proteína purificada de <i>A. rouxii</i> obtenido del programa informático BLAST.....	77
Fig. 25. Comparación de la secuencia teórica y péptidos secuenciados de la aspartato proteasa identificada de <i>A. rouxii</i> con secuencias de aspartato proteasas de <i>A. oryzae</i> (GenBank Accession No. AAB35849.1), <i>F. venetatum</i> (GenBank Accession No. AF462062.1), <i>H. jeroquina</i> (GenBank Accession No. AM168137.1), <i>L. edodes</i> (GenBank Accession No. AB446454.1), <i>R. oryzae</i> (GenBank Accession No. FJ539004.1). Aminoácidos idénticos en todas las proteínas están marcados en negro. Los que están presentes en casi todas las proteínas están coloreados en gris. La secuencia de péptidos que esta subrayada es la obtenida por LC-MS/MS. La secuencia correspondiente al péptido señal presenta doble línea. Los residuos catalíticos están señalados por asteriscos. Los residuos involucrados en la especificidad del sustrato están indicados en rectángulos. Las líneas punteadas negras indican los sitios de N-glicosilación. Los residuos de cisteína se indican por flechas. El alineamiento de secuencias fue hecho por el método CLUSTALX V, usando el programa MegAlign del paquete informático DNASTAR (Lasergene)	78
Fig. 26. Determinación del pH óptimo de la aspartato proteasa de <i>A. rouxii</i> . La actividad proteolítica fue determinada con hemoglobina (2%) como sustrato, en amortiguador universal 20 mM e incubada la reacción a 37°C. El experimento se realizó por triplicado .	80

Fig. 27. Efecto de la temperatura sobre la proteasa de <i>A. rouxii</i> . La actividad proteolítica fue determinada con hemoglobina (2%) como sustrato, en amortiguador universal 20 mM, pH 3.5. La actividad proteasa se determinó por triplicado para cada temperatura.....	81
Fig. 28. Estudio de la estabilidad de la aspartato proteasa de <i>A. rouxii</i> durante 4 h. La actividad proteolítica fue determinada con hemoglobina (2%) como sustrato, en amortiguador universal 20 mM a pH 3.5. 37°C (▲), 40°C (●), 50°C (■). Cada uno de los ensayos fue realizado por triplicado	82
Fig. 29. Gráfica de Lineweaver-Burk para determinar los valores de K_m y V_{max} de la aspartato proteasa de <i>A. rouxii</i> sobre diferentes concentraciones de hemoglobina. Cada ensayo se realizó por triplicado y se representan las desviaciones estándar en cada punto .	83
Fig. 30. Efecto de inhibidores sobre la actividad tirosinasa extracelular producida por <i>A. rouxii</i>	84
Fig. 31. Obtención de ADN genómico de las cepas <i>A. rouxii</i> y <i>A. niger</i> . El marcador de peso molecular utilizado fue GeneRuler™ 1 kb Plus ADN Ladder.....	85
Fig. 32. Mecanismo de silenciamiento de genes mediante la construcción de un vector con promotores enfrentados y orientados en sentido contrario.....	86
Fig. 33. Secuencia para obtener el promotor <i>Ppki</i> . Las cajas TATA y CCAAT del promotor de la piruvato kinasa, están marcadas con líneas y son regiones conservadas en <i>A. niger</i> y <i>A. nidulans</i>	87
Fig. 34. Obtención del promotor <i>Ppki</i> mediante PCR de gradiente. El marcador de peso molecular utilizado fue GeneRuler™ 1 kb Plus ADN Ladder.....	88
Fig. 35. Minipreparacioness realizada a partir de 18 transformantes obtenidas en <i>E. coli</i> con el plásmido con nuevo promotor <i>Ppki</i>	89
Fig. 36. A) Vector con y sin el promotor <i>Ppki</i> . M) Marcador de peso molecular (GeneRuler™ 1 kb Plus ADN Ladder); carril 1, megaprep de vector sin inserto; carril 2, plásmido linearizado sin inserto; carril 3, miniprep de plásmido linerarizado con la enzima de restricción <i>NcoI</i> con el nuevo promotor <i>Ppki</i> , carriles 4 y 5, plásmido linerarizado con <i>EcoRI</i> y <i>NcoI</i> a partir de megapreps. B) Vector pGpdPki-RNAi, con los promotores <i>Ppki</i> y <i>Pgpd</i> , orientados en sentido contrario y enfrentados entre sí	90

- Fig. 37.** Obtención de fragmentos para las rhizopuspepsinas-6 (455 pb) y -2 (910 pb) por PCR. El marcador de peso molecular utilizado fue GeneRuler™ 1 kb Plus ADN Ladder. 91
- Fig. 38.** Secuencia obtenida del gen de la rhizopuspepsina-2, los nuevos primers diseñados y el nuevo fragmento de 412 pb a amplificar 92
- Fig. 39.** Obtención del fragmento para la rhizopuspepsina-2, con un tamaño de 412 pb. (1) 68.4°C (2) 69.1°C y (3) 69.4°C. El marcador de peso molecular utilizado fue GeneRuler™ 1 kb Plus ADN Ladder 92
- Fig. 40.** Construcción del vector de expresión para el silenciamiento de la aspartato proteasa tipo 2, para el fragmento de 412 pb..... 93
- Fig. 41.** Digestiones con *NcoI* de los plásmidos con los diferentes fragmentos de la aspartato proteasa. Carril 1, plásmido linerizado sin vector, carril 2 plásmido digerido para el fragmento de 910 pb, carril 3 plásmido digerido para el fragmento de 455 pb y carril 4 plásmido digerido para el fragmento de 412 pb. El marcador de peso molecular utilizado fue GeneRuler™ 1 kb Plus ADN Ladder 94
- Fig. 42.** Bioensayo realizado con leche descremada para *A. rouxii* y la transformante A412-3 para la determinación de actividad proteasa..... 96
- Fig. 43.** (A) Perfil de crecimiento de *A. rouxii* en medio M-N y de las transformantes obtenidas con un fragmento de 412 pb de la rhizopuspepsina-2. (B) Cuantificación de la actividad proteasa de la cepa parental y de las transformantes. (▲) *A. rouxii*; (Δ) *A. rouxii* + pGpdPki-RNAi; (●) A412-1; (x) A412-2; (▲) A412-3; (◆) A412-4; (■) A412-5. El experimento refleja valores promedio de tres repeticiones 98
- Fig. 44.** (A) Perfil de crecimiento de *A. rouxii* en medio M-N y de las transformantes obtenidas con un fragmento de 910 pb. (B) Cuantificación de la actividad proteasa de la cepa silvestre y de las transformantes. (▲) *A. rouxii*; (Δ) *A. rouxii* + pGpdPki-RNAi; (■) A910-1; (◆) A910-2. Los experimentos se realizaron por triplicado 100
- Fig. 45.** (A) Perfil de crecimiento de *A. rouxii* en medio M-N y de las transformantes obtenidas con un fragmento de 455 pb de la rhizopuspepsina-6. (B) Cuantificación de la actividad proteasa de la cepa silvestre y de las transformantes. (▲) *A. rouxii*; (Δ) *A. rouxii*

+ pGpdPki-RNAi; (■) A455-1; (◆) A455-2. Cada uno de los puntos es un promedio de tres experimentos diferentes 102

Fig. 46. Determinación de la actividad monofenolasa de las transformantes silenciadas con el fragmento de 412 pb. (▲) *A. rouxii*; (Δ) *A. rouxii* + pGpdPki-RNAi; (●) A412-1; (×) A412-2; (▲) A412-3; (◆) A412-4; (■) A412-5. El experimento refleja valores promedio de tres repeticiones 103

Fig. 47. Determinación de la actividad difenolasa sobre las transformantes silenciadas con un fragmento de 412 pb. (A) Sustrato L-dopa y (B) Sustrato TBC. (▲) *A. rouxii*; (Δ) *A. rouxii* + pGpdPki-RNAi; (●) A412-1; (×) A412-2; (▲) A412-3; (◆) A412-4; (■) A412-5. El experimento refleja valores promedio de tres repeticiones..... 104

Fig. 48. Determinación de la actividad monofenolasa de las transformantes silenciadas con el fragmento de 910 pb. (▲) *A. rouxii*, (Δ) *A. rouxii* + pGpdPki-RNAi, (▲) Transformante A910-1, (◆) Transformante A910-2 105

Fig. 49. Determinación de la actividad difenolasa sobre las transformantes silenciadas con el fragmento de 910 pb. (A) Sustrato L-dopa y (B) Sustrato TBC. (▲) *A. rouxii*, (Δ) *A. rouxii* + pGpdPki-RNAi (▲) Transformante A910-1 (◆) Transformante A910-2 106

Fig. 50. Determinación de la actividad monofenolasa empleando como sustrato tirosina sobre las transformantes silenciadas para la rhizopuspepsina-6 con un fragmento de 455 pb. (▲) *A. rouxii*; (Δ) *A. rouxii* + pGpdPki-RNAi; (■) Transformante A455-1; (◆) Transformante A455-2 107

Fig. 51. Determinación de la actividad difenolasa sobre las transformantes silenciadas para la rhizopuspepsina-6 con un fragmento de 455 pb. (A) Sustrato L-dopa y (B) Sustrato TBC. (▲) *A. rouxii*; (Δ) *A. rouxii* + pGpdPki-RNAi; (■) Transformante A455-1; (◆) Transformante A455-2 109

Fig. 52. Ensayos realizados para determinar actividad proteasa y tirosinasa de la cepa silvestre y de las transformantes que mostraron mayor nivel de silenciamiento. La actividad proteasa se determinó con leche descremada, mientras que la tirosinasa con L-tirosina como sustrato..... 109

Fig. 53. Cromatogramas obtenidos de (A) columna de intercambio aniónico y (B) columna de filtración en gel de la tirosinasa parcialmente purificada a partir de la transformante A412-3 de *A. rouxii*. (●) Proteína 280 nm, (Δ) Actividad monofenolasa 111

Fig. 54. Gel de acrilamida obtenido de los procesos de purificación de la columna de intercambio aniónico y filtración en gel de la tirosinasa parcialmente purificada a partir de la transformante A412-3 de *A. rouxii*. M) Marcador de peso molecular PageRuler™ prestained Protein Ladder. 1 y 2) Fracción 6 de la columna de intercambio aniónico; 3) Fracción 23 de columna de filtración en gel; 4) Fracción 14 de la columna de intercambio aniónico; 5) Tirosinasa comercial, tras columna de intercambio aniónico 112

Fig. 55. Secuencias peptídicas obtenidas para la banda de 43 kDa, obtenida a partir de la fracción 23 de la cromatografía de filtración en gel. Letras en negritas y subrayadas indican los aminoácidos encontrados por espectrometría de masas..... 113

Fig. 56. Parte del alineamiento de aminoácidos obtenidos de la secuenciación de la fenoloxidasa producida por *A. rouxii* (subrayado en negro): Residuo de histidina característico en los sitios de unión a cobre 114

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales características bioquímicas de tirosinasas de hongos	10
Tabla 2. Concentración de agarosa utilizada en los geles de acuerdo al tamaño de ADN ..	42
Tabla 3. Fracciones colectadas a partir del gradiente de sacarosa y volúmenes utilizados en los procesos posteriores de purificación.....	45
Tabla 4. Pasos de la purificación parcial de la tirosinasa de <i>A. rouxii</i> y actividades enzimáticas producidas en cada una de la etapas de purificación	59
Tabla 5. Actividad monofenol y difenol oxidasa de extractos extra e intracelulares obtenidos a partir de <i>A. rouxii</i>	64
Tabla 6. Purificación parcial de la proteasa de <i>A. rouxii</i>	75
Tabla 7. Estudio de diferentes inhibidores sobre la actividad proteasa de <i>A. rouxii</i>	84
Tabla 8. Colonias transformantes obtenidas a partir de <i>A. rouxii</i>	95
Tabla 9. Pasos de la purificación parcial de la tirosinasa a partir de la transformante A412-3 de <i>A. rouxii</i>	110

ABREVIATURAS

°C: grado centígrado
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADNasa: desoxirribonucleasa
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
CIA: Cloroformo-alcohol isoamílico
Da: Dalton
DAN: diazoacetil-DL-norleucinametiléster
Dicer:
DMSO: dimetilsulfóxido
D.O.: Densidad óptica
DTT: ditioneitol
dsRNA: “double-stranded RNA” ARN de doble cadena
ed.: Editor
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
EPNP: 1,2-epoxi-3-(*p*-nitrofenoxi) propano
E.U.A.: Estados Unidos de America
fig.: figura
g: gramo
IPTG: isopropil-β-D-galactopiranosido
L: litro
LC/MS-MS: cromatografía líquida/espectrometría masa-masa
M: molar
MBTH: 3-metil-2-benzotiazolona hidrazona hidroclicorada
M-N: Melin-Norkrans
MOPS: ácido morfolinopropanosulfónico
PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida
pb: pares de bases
PCF: pentaclorofenol
PCR: “polymerase chain reaction”, reacción en cadena de la polimerasa
PDA: agar dextrosa papa
PEG: polietilenglicol
PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonato
PVDF: Polivinildenedifloride
p/v: relación peso volumen
RISC: “RNA-induced Silencing Complex”, silenciamiento inducido por el complejo-ARN.
RNAi: RNA de interferencia
rpm: revoluciones por minuto
SDS: laurilsulfato sódico
siRNA: “small interfering RNA” pequeños ARN de interferencia
TBC: 4-*tert*-butilcatecol
TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
Tris: tris(hidroximetil)aminometano
U: unidades
u.f.p.: unidades formadoras de colonia
UV: ultravioleta
V: voltio
v/v: relación volumen/volumen
X-gal: 5-bromo-4-cloro 3-indol- β-D-galactopiranosido

Abreviaturas para aminoácidos

Ala	Alanina	A
Arg	Arginina	R
Asn	Asparagina	N
Asp	Ácido aspártico	D
Cys	Cisteína	C
Gln	Glutamina	Q
Glu	Ácido glutámico	E
Gly	Glicina	G
His	Histidina	H
Ile	Isoleucina	I
Leu	Leucina	L
Lys	Lisina	K
Met	Metionina	M
Phe	Fenilalanina	F
Pro	Prolina	P
Ser	Serina	S
Thr	Treonina	T
Trp	Triptófano	W
Tyr	Tirosina	Y
Val	Valina	V

I. INTRODUCCIÓN

1.1 IMPORTANCIA Y APLICACIONES DE LOS HONGOS FILAMENTOSOS

Los hongos filamentosos tienen muchas aplicaciones biotecnológicas: desde el desarrollo y producción de diferentes fármacos (por ejemplo los antibióticos β -lactámicos) y enzimas industriales (entre otras muchas, proteasas, celulasas y lipasas), hasta su uso como sistemas para la expresión homóloga y heteróloga de diferentes productos génicos.

El hecho de que estos hongos puedan secretar una amplia gama de diferentes enzimas ha despertado un gran interés en su estudio y en proponer nuevas aplicaciones, por ejemplo la degradación de compuestos tóxicos. En esta última aplicación destacan los basidiomicetos, particularmente los denominados hongos de pudrición blanca como *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* y de pudrición café como *Tyromyces palustris*, *Gloeophyllum trabeum*, que se han empleado para la eliminación de residuos peligrosos y en procesos de biorremediación de suelos (Higuchi, 1993; Cameron *et al.*, 2000; Rabinovich *et al.*, 2004).

Sin embargo, la capacidad para degradar tóxicos no sólo se limita a los basidiomicetos; también se han encontrado ascomicetos (*Aspergillus*) y zigomicetos (*Rhizopus* y *Amylomyces*) que son capaces de degradar compuestos como los clorofenoles (Jolivet *et al.*, 1998; Nagarathama y Bajpai, 1999; Tomasini *et al.*, 2001; Rabinovich *et al.*, 2004; Freitas *et al.* 2009), dicha capacidad para degradar compuestos tóxicos se debe a los sistemas enzimáticos que presentan estos hongos.

1.2 CARACTERÍSTICAS DE *Amylomyces rouxii*

Amylomyces es un género monotípico, que contiene una sola especie: *A. rouxii*, clasificada en la división Eumicota y dentro de ésta, en la clase de los zigomicetos. Está estrechamente relacionada con la especie *Rhizopus oryzae* (Abe *et al.*, 2006; Kito *et al.*, 2009); entre sus similitudes morfológicas destaca el que su micelio presente tres tipos de hifas: estolones, rizoides y esporangióforos. Los estolones se disponen paralelamente sobre la superficie del sustrato, se levantan un poco sobre el mismo y a cierta distancia, se inclinan y toman contacto con la superficie del medio, son hifas anchas, de pared gruesa y protoplasma cenocítico. En ciertos sitios forman rizoides, de 1 a 4 mm de longitud, que se introducen al medio y absorben los nutrientes. Los esporangióforos son hifas fértiles, que

en número de una o varias, se levantan desde los rizoides, quedando rígidos y perpendiculares a los estolones y a la superficie del sustrato. Son hifas gruesas, que alcanzan de 1 a 3 cm de longitud y se notan a simple vista como filamentos de algodón (Herrera y Ulloa, 1998). Una diferencia morfológica de *A. rouxii* es la gran cantidad de clamidosporas producidas en el micelio aéreo y el sustrato; son globosas, con pared rugosa y tienen gran importancia en la supervivencia del hongo (Watanabe y Oda, 2008).

Los dos géneros (*Rhizopus* y *Amylomyces*) tienen amplia distribución en la naturaleza y se desarrollan rápidamente sobre sustratos amiláceos o azucarados, por ejemplo frutos, raíces, tallos, pan, pastas, harinas y jaleas, donde forman grandes cantidades de esporas negras, razones por las que son conocidos como “moho del pan”. Como las esporas son muy abundantes en el aire, al caer en el sustrato propicio germinan produciendo hifas que en pocos días constituyen un abundante micelio, que a simple vista muestra un aspecto algodonoso y blanquecino.

1.2.1 Ciclo de vida de *A. rouxii*

Durante la mayor parte del ciclo de vida de los géneros *Rhizopus* y *Amylomyces*, el organismo es haploide.

La reproducción asexual ocurre por la formación de esporangióforos, cuyos esporangios producen esporas del mismo tipo de compatibilidad sexual que la de la espora original. Cuando los esporangios maduran, sus delgadas paredes se desintegran, desprendiendo las esporas que son transportadas por el viento. En condiciones favorables de humedad y temperatura, las esporas germinarán y darán origen a un nuevo grupo de hifas.

La reproducción sexual ocurre cuando las hifas especializadas (progametangios) de dos cepas compatibles (designadas como + y -) se encuentran y se fusionan, atraídas entre sí por hormonas que difunden en forma de gas. Se forman entonces dos células apicales (los gametangios). Una de las células contiene numerosos núcleos + y la otra, numerosos núcleos -. Los dos gametangios se fusionan, produciendo núcleos diploides. La célula multinucleada resultante forma una pared dura, pigmentada y rugosa, y se transforma en un zigosporangio latente, que contiene una única zigospora. Cuando las condiciones ambientales son favorables, justo antes de la germinación, los núcleos diploides sufren

meiosis. Luego ocurre la germinación, se rompe la pared del zigosporangio y emerge el esporangióforo a partir de la zigospora. En su extremo, el esporangióforo porta un esporangio que dará origen a esporas que, al germinar, producirán micelio + o - (**Fig. 1**) (Herrera y Ulloa, 1998).

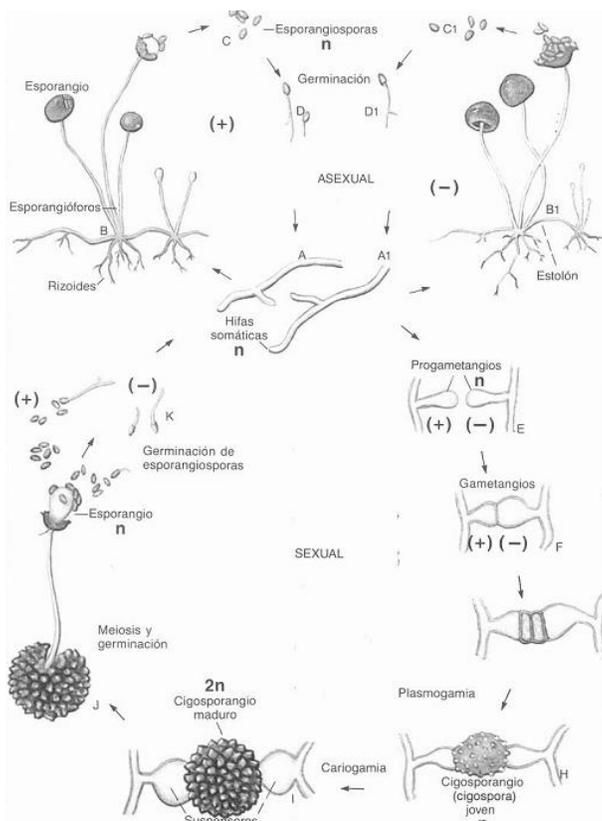


Fig. 1. Ciclo del vida del zigomiceto *A. rouxii*.

1.2.2 Aplicaciones de *A. rouxii*

Amylomyces rouxii, es un hongo filamentoso utilizado principalmente para la elaboración de alimentos fermentados, bebidas alcohólicas, y en la producción de ácidos orgánicos (ácido láctico, fumárico y málico) en el sureste de Asia, China y Japón (Ping *et al.*, 2005). El género *Rhizopus* ha sido utilizado también para la producción de proteasas ácidas (Preetha y Boopathy, 1997; Fernández-Lahore *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009). En años recientes, se ha reportado el uso de especies de *Rhizopus sp.* para la absorción de metales pesados como cromo y cadmio (Ahmad *et al.* 2005). También se ha reportado el uso de algunas especies de *Rhizopus* y *Amylomyces* para el tratamiento de

efluentes de la industria de papel (Kumar *et al.*, 2008; Diniz *et al.*, 2009; Freitas *et al.*, 2009), y para la degradación de clorofenoles (Montiel *et al.*, 2004; Marcial *et al.*, 2006; León-Santiesteban *et al.*, 2009).

1.3 PROTEASAS FÚNGICAS

1.3.1 Clasificación y características de las proteasas

De acuerdo con el comité de nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, las proteasas están clasificadas dentro del grupo de las hidrolasas. Sin embargo, las proteasas no se ajustan con facilidad al sistema de nomenclatura de las enzimas debido a la enorme diversidad de sus mecanismos de acción y estructura. En la actualidad, las proteasas se clasifican de acuerdo a tres criterios principales: (i) el tipo de reacción que catalizan, (ii) la naturaleza de su sitio catalítico y (iii) la relación evolutiva, de acuerdo a su estructura.

Las proteasas están además subdivididas en dos grandes grupos: exopeptidasas y endopeptidasas, dependiendo de su sitio de acción.

1.3.1.1 Exopeptidasas

Este tipo de proteasas actúan cerca de los extremos de las cadenas polipeptídicas. Dependiendo de su sitio de acción, cerca del amino y carboxilo terminal, se clasifican en:

a) Aminopéptidasas, las cuales actúan de manera libre sobre la región N terminal de la cadena polipeptídica y pueden liberar un único residuo de aminoácido, un dipéptido o un tripéptido. Se sabe que estas proteasas tienen la capacidad de eliminar la metionina del extremo amino terminal de las proteínas expresadas de manera heteróloga, pero no la de las proteínas maduras de origen natural. En general, estas enzimas son intracelulares, aunque se ha reportado la presencia de aminopéptidasas extracelulares en *A. oryzae* (Barett, 1994; Rao *et al.*, 1998; Kudryavtseva *et al.*, 2008).

b) Carboxipeptidasas, que actúan en las regiones carboxilo terminales de las cadenas polipeptídicas y liberan un solo aminoácido o un dipéptido. Estas enzimas se dividen en tres grupos principales: serina carboxipeptidasas, metalocarboxipeptidasas y cisteína carboxipeptidasas, de acuerdo a los residuos de aminoácidos presentes en sus sitios activos. Se han aislado serina carboxipeptidasas de *Penicillium spp.*, *Saccharomyces spp.* y

Aspergillus spp. y son similares en cuanto a la especificidad de sustrato, aunque difieren ligeramente en otras propiedades, como pH óptimo, estabilidad, peso molecular y efecto de inhibidores (Rao *et al.*, 1998).

1.3.1.2. Endopeptidasas

Se caracterizan por su acción preferencial sobre los enlaces peptídicos de las regiones internas del polipéptido. Su clasificación en subgrupos se basa principalmente en la estructura de su centro catalítico; por lo general, los grupos funcionales del centro activo son identificados por medio de inhibidores específicos. De acuerdo a la estructura de su centro activo, las endopeptidasas son divididas en cuatro subgrupos (Rao *et al.*, 1998; Kudryavtseva *et al.*, 2008):

i) Serin proteasas, que se caracterizan por presentar tres residuos de aminoácidos en su centro activo, serina, ácido aspártico e histidina, y son inhibidas principalmente por el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). Estas proteasas se han aislado de hongos filamentosos como *Neurospora spp* (Lindberg *et al.*, 1981) y *Conidiobolus sp.*, (Phadataré *et al.*, 1993)

ii) Cistein proteasas, que contienen residuos de cisteína e histidina en el centro activo. Son inhibidas por agentes sulfhidrilos, como el benzoato de *p*-cloromercuribenceno (PCMB) o el ácido moniodiniacético, y pueden ser activadas por ditiotretitol y 2-mercaptoetanol.

iii) Aspartato proteasas, que contienen dos grupos carboxilos en el centro activo; son inhibidas por pepstatina, acetil pepstatina y epóxidos, como el 1,2-epoxi-3-(*p*-nitrofenoxi) propano (EPNP) y el diazoacetil-DL-norleucinametiléster (DAN) y

iv) Metaloproteasas, que requieren de iones de metales bivalentes (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} o Zn^{2+}) y son inhibidos por compuestos que se unen a estos metales, como el etilendiaminotetraacético (EDTA) o la fenantrolina.

Otra clasificación diferente de las proteasas se basa en su pH óptimo, así se pueden distinguir las de tipo ácido, neutro y alcalino. En general, los hongos producen una gran variedad de proteasas de los tres tipos, con una amplia especificidad por diferentes sustratos. Las proteasas ácidas tienen un pH óptimo de entre 4.0 y 4.5, pero llegan a ser estables a pH 2.5 y 6.0. Las proteasas neutras son metaloproteasas y son activas a pH 7.0 e

inhibidas principalmente por agentes quelantes. Las proteasa alcalinas son capaces de hidrolizar proteínas en medios cuyos pHs son mayores a 7, y exhiben su actividad óptima entre pH 9 y 11, en algunos casos son estabilizados por iones de Ca^{2+} (Rao *et al.*, 1998).

1.3.2 Funciones fisiológicas de las proteasas

Las proteasas participan en procesos metabólicos y en funciones de regulación; están presentes en todos los organismos vivos. Las proteasas desempeñan un papel crítico en muchos procesos fisiológicos y patológicos, tales como el catabolismo de proteínas, la coagulación de la sangre, el crecimiento celular y los procesos de morfogénesis, por ejemplo (Howell, 2003). Las proteasas pueden modificar proteínas de manera específica y selectiva, incluyendo la activación de enzimas zimogénicas o la formación de hormonas y otros péptidos fisiológicamente activos a partir de precursores inactivos. Además, pueden participar en el transporte de proteínas secretadas a través de la membrana. En general, las proteasas extracelulares catalizan la hidrólisis de proteínas grandes en moléculas más pequeñas para su posterior absorción por la célula, mientras que las intracelulares desempeñan un papel importante en la regulación del metabolismo.

También se ha encontrado que las proteasas tienen un importante papel durante el proceso de formación de cuerpos fructíferos, así como en los procesos de germinación (donde se degradan proteínas no funcionales para las esporas y se utilizan los aminoácidos, necesarios para la síntesis de nuevas proteínas que intervienen durante la germinación). Sin embargo, y aún cuando se conoce la participación de las proteasas en muchos procesos celulares, todavía no se conoce la función exacta de estas enzimas en el desarrollo de dichos procesos (Rao *et al.*, 1998; Kudryavtseva *et al.*, 2008).

1.3.3. Aspartato proteasas

Las aspartato proteasas, también conocidas como proteasas de tipo ácido, son endopeptidasas que dependen de residuos de ácido aspártico para su actividad catalítica. También exhiben especificidad frente a residuos de aminoácidos aromáticos. Las proteasas ácidas han sido agrupadas en tres familias, denominadas pepsinas (A1), retropepsinas (A2) y enzimas pararetrovirus (A3) (Barett, 1995). La mayoría de las aspartato proteasas muestran su actividad máxima a pHs entre 3 y 4, y presentan puntos isoeléctricos en un

intervalo de entre 3 y 4.5. Su masa molecular se encuentra entre los 30 y 45 kDa. Los miembros de la familia de las pepsinas tienen una estructura bilobal, con una hendidura en el centro activo localizado entre los lóbulos (Sielecki *et al.*, 1991). Los residuos de ácido aspártico del sitio activo están situados en la región conservada Asp-X-Gly, en el que X puede ser Ser o Thr. Las aspartato proteasas son inhibidas por pepstatina (Fitzgerald *et al.*, 1990), aunque también son sensibles a diazocetona, a diazoacetil-DL-norleucinametiléster (DAN) y a 1,2-epoxi-3-(*p*-nitrofenoxi) propano (EPNP) en presencia de iones de cobre. Este tipo de aspartato proteasas pueden ser divididas en dos grupos: (i) enzimas como la pepsina, producidas por *Aspergillus*, *Penicilium*, *Rhizopus* y *Neurospora* y (ii) y enzimas como la renina, producidas por *Endothia* y *Mucor* (Rao *et al.*, 1998; Barret, 1995).

1.3.3.1 Aspartato proteasas del género *Rhizopus*

Debido a que no hay reportes acerca de las proteasas secretadas por *A. rouxii*, y sí de las proteasas de *Rhizopus*, género morfológica, fisiológica y filogenéticamente muy cercano a *Amylomyces* (Kito *et al.*, 2009), se realizará una breve descripción de las enzimas identificadas en este género.

Las especies que secretan importantes cantidades de aspartato proteasas pertenecen a los géneros *Mucor* y *Rhizopus*. El estudio de las aspartato proteasas comenzó con *Mucor miehei*, *Mucor reninn* y *Mucor pusillus* (Gray *et al.*, 1986; Etoh *et al.*, 1982; Tonouchi *et al.*, 1986) y actualmente algunos autores han informado de la purificación y caracterización de aspartato proteasas entre ellas de *Rhizopus chinesis*, *Rhizopus hangchow*, *Rhizomucor miehei*; *Mucor sp.*, *Rhizopus microsporus var rhizopodiformis*, *Rhizopus oryzae* (Fukumoto *et al.*, 1967; Ichishima *et al.*, 1995; Preetha y Boopathy, 1997; Fernández-Lahore *et al.*, 1999; Schoen *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009).

Este tipo de proteasas, principalmente pepsina, renina y papaína, tiene gran importancia para procesos industriales de alimentos y productos farmacéuticos (Ikasari y Mitchell, 1996). Estas enzimas están involucradas en el procesamiento de alimentos, como por ejemplo en la elaboración de quesos (se usan en la coagulación de la leche), así como en la maduración de los mismos, interviniendo en el sabor y textura de éstos (Fox *et al.*, 1993; Bertola *et al.*, 2000). Otro ejemplo de utilización es para la producción de bebidas fermentadas (Ikasari y Mitchell, 1996).

1.4 TIROSINASAS FÚNGICAS

1.4.1 Estructura de las tirosinasas

La tirosinasa o polifenol oxidasa (PPO) es una metaloenzima ampliamente distribuida en organismos, tanto procariotas como eucariotas. La característica estructural más importante de estas enzimas es la presencia en su centro activo de dos átomos de cobre (CuA y CuB), unidos cada uno de ellos a tres histidinas y el conjunto a un solo residuo de cisteína (**Fig. 2**). Esta disposición se ha conservado a lo largo de la evolución, en todas las enzimas de este tipo (Mayer, 2006). En su entorno se sitúa, además, una serie de aminoácidos hidrofóbicos, con anillos aromáticos, que también son importantes en la actividad de la enzima (concretamente, para la unión de los sustratos).

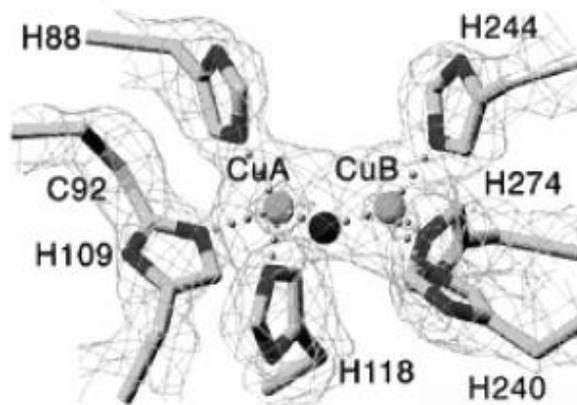


Fig. 2. Estereografía del centro activo de una polifenoloxidasa.

Para comprender el mecanismo de reacción complejo de esta enzima hay que tener en cuenta la estructura de su centro activo, con los dos átomos de cobre, la existencia de dos actividades catalíticas y la posterior evolución química de los compuestos formados.

Las tirosinasas se caracterizan por catalizar dos reacciones: una actividad monofenol oxigenasa o cresolasa, que consiste en la hidroxilación en la posición orto de monofenoles y la oxidación del *o*-difenoil intermedio hasta la *o*-quinona, y una actividad catecol oxidasa o catecolasa, que consiste en la oxidación de dos moléculas de un *o*-difenoil a dos moléculas de *o*-quinona y la reducción de oxígeno molecular, formándose dos moléculas de agua.

Algunos estudios han demostrado la existencia de tres formas de enzima: “met”, “oxi” y “desoxi”. Las particularidades de cada una de las dos actividades de la enzima se muestran en la **Figura 3**.

1.4.2 Localización y propiedades bioquímicas de las tirosinasas

La ubicación de las tirosinasas de los hongos no está del todo clara, por lo general parece ser una enzima citoplasmática, aunque en algunos casos están asociadas a la pared celular (Rast *et al.*, 2003). Se han reportado casos de tirosinasas extracelulares, una sobreexpresada en *Aspergillus niger* y otra polifenoloxidasas (PPO) de *Trichoderma reesei* (Halaouli *et al.*, 2006a; Selinheimo *et al.*, 2006). Montiel *et al.* (2004) y León-Santesteban *et al.* (2008), por su parte, reportaron tirosinasas extracelulares producidas por *A. rouxii* y *R. oryzae* ENHE.

Los pesos moleculares de las tirosinasas muestran una considerable diversidad, algunos investigadores atribuyen esta propiedad a los procedimientos realizados durante su purificación, a la isomería conformacional, diferenciación en procesamiento del preARNm o a mecanismos de proteólisis (Lerch, 1981; Halaouli *et al.*, 2006b). Entre otras propiedades, estas enzimas pueden ser activadas por detergentes como el SDS, enzimas proteolíticas o choques ácidos. Los tamaños y propiedades bioquímicas más importantes de algunas de estas enzimas se reportan en la **tabla 1**.

Tabla 1. Principales características bioquímicas de tirosinasas de hongos

Hongo	PM de la forma activa (kDa)	pH óptimo	pI	Km (mM)	Vm	Act. específica (U/mg proteína)	Referencias
<i>A. bisporus</i>	47	nd	5.1-5.2	0.44 (L-Dopa) 0.76 (catecol)	24.5 μM/min (L-Dopa) 288 μM/min (catecol)	nd	Espín <i>et al.</i> , 1997 Wichers <i>et al.</i> , 2003
<i>A. bisporus</i> (portabella mushroom)	48	nd	5.1-5.3	9 (L-Dopa) 5 (catecol)	nd	nd	Zhang <i>et al.</i> 1999 Fan y Flurkey, 2004
<i>A. oryzae</i>	67	5-0-6.0	nd	nd	nd	nd	Ichishima <i>et al.</i> 1984
<i>L. edodes</i>	70-105	6.0-6.5	4.3-4.7	nd	nd	nd	Kanda <i>et al.</i> , 1996
<i>N. crassa</i>	46	nd	8.3	0.88 (L-Dopa)	nd	1340 (L-Dopa)	Lerch, 1983
<i>P. sanguineus</i>	45	6.5-7.0	4.5-5.0	1.0 (L-tirosina) 0.9 (L-Dopa)	54 (U/mg proteína) (L-tirosina) 112 (U/mg proteína) (L-Dopa)	30 (L-tirosina) 84 (L-Dopa)	Halaouli <i>et al.</i> , 2005

Las tirosinasas son inhibidas por el ácido koji (2-Hidroximetil-5-hidroxi- γ -pirona) (Kahn, 1995), el cual es efectivo en concentraciones de 10-50 μ M. Otro inhibidor de tirosinasas es el hexilresorcinol, activo en una concentración de 100 μ M (Dawley y Flurkey, 2003). Las tretacetonas (Khan *et al.*, 2006), activas en concentraciones de 2.06 μ M, o los derivados de decanoatos, los cuales provocan efectos irreversibles en concentraciones de 96.5 μ M, ocasionan inhibición del 50% de la actividad tirosinasa (Qui *et al.*, 2005). Algunos reportes han indicado que análogos como el 1,3,4-oxadiazol y las *N*-benzilbenzamidias también muestran actividad inhibitoria de las tirosinasas, en concentraciones de 2.18 y 2.2 μ M, respectivamente (Khan *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2006).

1.4.3 Función fisiológica

No se conoce mucho sobre la función de las tirosinasas en hongos. Sin embargo, unas de las funciones mejor documentadas es que están involucradas en la pigmentación de las esporas durante el metabolismo secundario. Otro papel importante es el fenómeno de oscurecimiento provocado en hongos comestibles como *A. bisporus* y *Lentinula edodes*, durante su crecimiento, recogida y almacenamiento, problema de primera magnitud en la industria alimentaria (Jolivet *et al.*, 1998; Seo *et al.*, 2003). Una lesión, corte o infección en el tejido de una estructura del hongo ocasiona la mezcla de la tirosinasa con sustratos fenólicos, dando lugar a *o*-quinonas. Estas pueden unirse a proteínas e inactivarlas o bien pueden polimerizarse para dar lugar a melaninas, que son las que oscurecen o dan coloración parda a la zona afectada, haciéndola poco accesible para ciertos patógenos (Martínez y Whitaker, 1995; Jacobson, 2000).

La infección del hongo *A. bisporus* con *Pseudomonas tolaasii* provocó la decoloración del cuerpo fructífero, efecto que se vió acompañada de la inducción de una tirosinasa del hongo (Soler-Rivas *et al.*, 2000). Estos autores demostraron que el tratamiento con el extracto bacteriano tuvo un doble efecto: la modificación post-traducciona l de la tirosinasa y la inducción de la formación de su ARNm.

1.4.4 Producción y uso

La tirosinasa en hongos fue caracterizada inicialmente en *A. bisporus* (Robb y Guttridge, 1981; Nakamura *et al.*, 1996; Wichers *et al.*, 1996), debido al oscurecimiento

enzimático del hongo durante su desarrollo y conservación post-cosecha, lo que disminuye el valor comercial del producto (Jolivet *et al.*, 1998). Posteriores estudios de tirosinasas en otros hongos se dieron a conocer en *Neurospora crassa* (Kupper *et al.*, 1989), *L. edodes* (Kanda *et al.*, 1996), *A. oryzae* (Nakamura *et al.*, 2000), *Trametes* spp (Tomsovsky y Homolka, 2004) *Pycnoporus sanguineus* (Halaouli *et al.*, 2005) *T. reesei* (Selinheimo *et al.*, 2006) y *Pholiota nameko* (Kawamura-Konishi *et al.*, 2007).

Las tirosinasas fúngicas tienen en la actualidad diferentes aplicaciones, sobre todo de interés biotecnológico y ambiental (Duran y Esposito., 2000; Halaouli *et al.*, 2006). La capacidad de las tirosinasas de poder convertir monofenoles a difenoles permite la producción de antioxidantes orto-difenoles, con propiedades benéficas como aditivos en alimentos o para el diseño de medicamentos farmacéuticos. Estas enzimas también han sido utilizadas en procesos de biorremediación de suelos y aguas contaminadas con compuestos fenólicos (Girelli *et al.*, 2006). Kim *et al.* (2008), reportaron la elaboración de electrodos, utilizando la tirosinasa con nanopartículas de oro, para la medición de plaguicidas. Las tirosinasas inmovilizadas de *A. bisporus* han sido también utilizadas para la detección de fenoles en aguas de desecho (Marín-Zamora *et al.*, 2006).

Extractos obtenidos de tirosinasas purificadas de hongos han demostrado, así mismo, ser efectivos en la precipitación o biotransformación de fenoles (Ensuncho *et al.*, 2005) y clorofenoles (Ikehata y Nicell, 2000). Las tirosinasas extracelulares reportadas por Montiel *et al.* (2004) y León-Santiesteban *et al.* (2008) fueron detectadas en un medio para la degradación de pentaclorofenol, un compuesto xenobiótico utilizado como plaguicida.

1.5 RELACIÓN ENTRE PROTEASAS, PEROXIDASAS Y FENOLOXIDASAS

La función de las proteasas en la regulación de las peroxidasas y fenoloxidasas producidas por hongos filamentosos ha sido poco estudiado, algunos autores como Palmieri *et al.* (2001) demostraron que una isoenzima de lacasa (POXA 1b; polifenol oxidasa) es degradada en la fase inicial del crecimiento del hongo por las proteasas presentes en el caldo de cultivo de *P. ostreatus*, por lo que la desaparición de POXA1b parece estar correlacionada con la actividad proteasa extracelular. Una relación similar se observó con la lignina peroxidasa de *Phanerochaete chrysosporium*, en este caso, las proteasas extracelulares provocaron una disminución casi completa de la actividad de la lignina

peroxidasa debido a la degradación de todas sus isoenzimas (Dosoretz *et al.*, 1990). Por otra parte, Staszczak *et al.* (2000) publicaron que tanto proteasas intracelulares como extracelulares están relacionadas en la regulación de actividades ligninolíticas en cultivos de *Trametes versicolor* bajo condiciones de limitación de nutrientes. En sentido contrario, se ha reportado que las proteasas no son responsables de la disminución de la actividad peroxidasa en *P. pulmonaris*, así como de la lacasa de *P. ostreatus*; estas proteasas incluso activan diferentes isoenzimas de las peroxidasa y lacasas (Bockle *et al.*, 1999; Palmieri *et al.*, 2001). Espin *et al.* (1999) reportaron una tirosinasa latente de *A. bisporus* (considerada como zimógena) que fue activada por una serin proteasa endógena. Estos autores realizaron estudios cinéticos, utilizando altas y bajas concentraciones, con proporciones iguales de tirosinasa y serin proteasa, y encontraron que el tamaño de la proteína latente de 67 kDa se modificó a una forma activa de 43 kDa.

1.6 ESTRATEGIA PARA EL ESTUDIO DE LA FUNCIÓN GÉNICA

Una de las estrategias más efectivas para determinar la función biológica de una proteína es examinar el fenotipo de organismos que contienen mutaciones en el gen codificante para la misma. Una vía de estudio puede ser aislar mutantes nulos mediante el escrutinio de una colección previamente obtenida por mutagénesis o, si es posible, mediante la interrupción del gen de interés utilizando *cassettes* apropiados, mostrándose esta última aproximación como la más útil y efectiva. Sin embargo, existen muchos organismos en los que esta técnica no representa una herramienta eficaz, ya que depende directamente de la frecuencia de recombinación homóloga propia de cada sistema.

Amylomyces y *Rhizopus* representan uno de esos casos en los que la frecuencia de recombinación homóloga es baja (menos del 5%), aunque varía según la cepa y la forma de ser introducido el plásmido: si éste se lineariza, la frecuencia de recombinación se puede incrementar hasta un 20% (Skory, 2002 y 2004). Hasta la fecha no se ha descrito ningún reporte de interrupción génica en este tipo de hongos, por lo que podría pensarse en un enfoque molecular diferente para ser utilizado en el zigomiceto *A. rouxii*. El uso del ARN de interferencia para las proteasas extracelulares que produce es una de esas opciones.

1.6.1 Silenciamiento génico

El silenciamiento génico mediado por ARN es un mecanismo regulador de la expresión que suprime, a nivel transcripcional y/o la expresión de un gen con base en la especificidad de secuencia. Este sistema está descrito en diferentes clases de organismos eucariotas, hongos como *N. crassa* (Romano y Macino, 1992), *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans* (Nakayashiki, 2005a), plantas (Napoli *et al.*, 1990) o animales (Elbashir *et al.*, 2001). Cabe destacar que Andrew Z. Fire y Craig C. Mello recibieron el Premio Nobel de Fisiología y Medicina de 2006 por sus trabajos con siRNA para analizar la regulación de la expresión génica en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998).

El mecanismo común descrito actualmente parte del estudio del ARN producido por los transgenes o transposones. Estos ARN son reconocidos por la maquinaria de silenciamiento, desencadenando la respuesta. Una ARN-polimerasa dependiente de ARN es la enzima que reconoce estos ARN y los convierte en ARN bicatenarios. Estos ARN son procesados por una endonucleasa del tipo ARNasa III (*Dicer*), en una reacción dependiente de ATP, para generar moléculas bicatenarias cortas de ARN, denominados ARN de interferencia (siRNA), que contienen tanto la cadena sentido como la antisentido de la molécula bicatenaria original. Los siRNA, que presentan una longitud variable según el organismo, suelen tener entre 21 y 25 nucleótidos. Estos ARNs cortos se incorporan en un complejo de ARNasa multicomponente denominado *RNA-inducing silencing complex* (RISC) y sirven como moléculas “guía” que conducen a la degradación endonucleolítica del ARNm diana (**Fig. 4**) (Agarwal *et al.*, 2003).

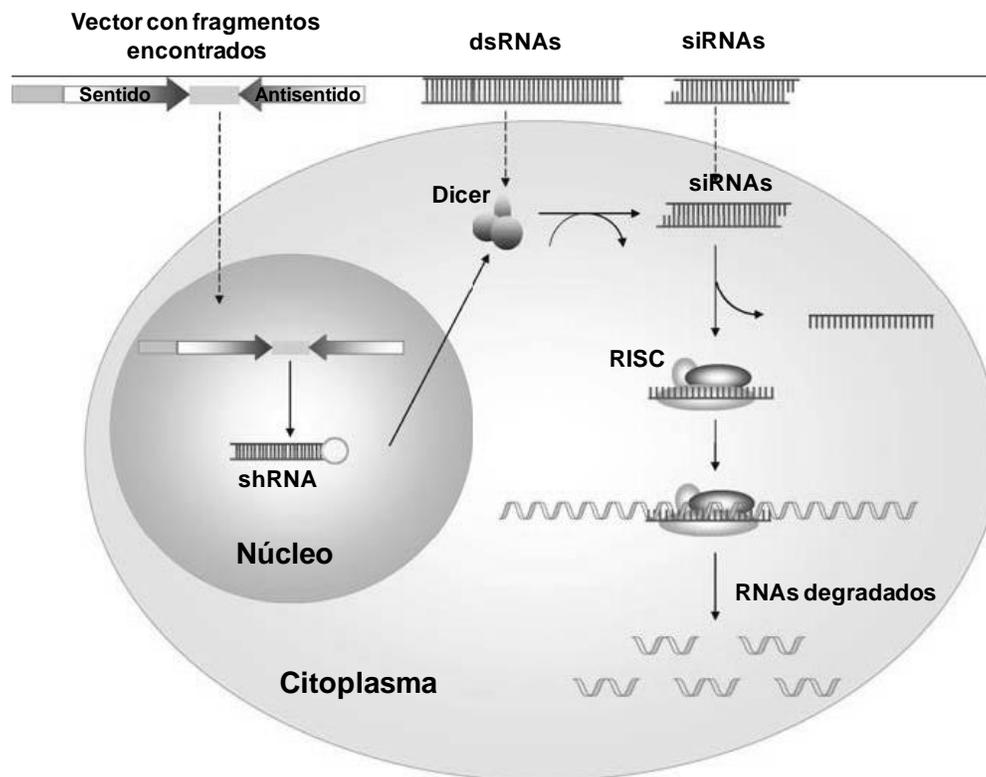


Fig. 4. Esquema general del proceso de silenciamiento mediado por siRNAs.

Los objetivos de este trabajo fueron por un lado, purificar e identificar, la proteasa extracelular producida por *A. rouxii*, así como el silenciamiento de ésta mediante el mecanismo de ARN de interferencia. Finalmente estudiar el efecto de la proteasa sobre la actividad tirosinasa, producida por el mismo hongo.

II. ANTECEDENTES

A partir de un efluente de la industria de papel, en el laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolismo Secundario se aisló una cepa de hongo capaz de tolerar y degradar pentaclorofenol (PCF) (Tomasini *et al.*, 1996). La cepa fue identificada, por observaciones microscópicas y microcultivos, como *Rhizopus nigricans* y posteriormente por técnicas moleculares (utilizando primers universales del ARN ribosomal) como *Amylomyces rouxii*. *Amylomyces rouxii* produce una fenoloxidasa extracelular que está involucrada en la degradación del PCF y, probablemente, el hongo puede degradar también otros compuestos tóxicos aromáticos (Tomasini *et al.*, 2001; Montiel *et al.*, 2004).

Amylomyces rouxii está estrechamente relacionado con la especie *Rhizopus oryzae* (Abe *et al.*, 2006; Kito *et al.*, 2009) y se conoce que las especies de *Rhizopus* producen proteasas extracelulares que tienen aplicación en alimentos, principalmente en la elaboración de quesos.

Un estudio realizado con *A. rouxii* demostró que produce proteasas extracelulares y se encontró actividad sobre hemoglobina e inhibición la actividad proteasa por pepstatina A que es un inhibidor específico para proteasas ácidas (Pérez de los Santos, 2009). Hasta el momento no se ha reportado el efecto de las proteasas extracelulares producidas por estos hongos sobre la actividad de otras enzimas producidas por ellos mismo, como la tirosinasa. Selinheimo *et al.*, (2007) reportó que las tirosinasas purificadas de origen fúngico (*T. reesei*, *P. sanguineus* y *A. bisporus*) muestran actividad catalítica sobre caseína, en presencia de L-dopa, los autores proponen que es debido a la presencia de este último compuesto. La hipótesis que planteamos en este trabajo es que la tirosinasas obtenidas por estos autores esten contaminada con proteasas fúngicas.

III. JUSTIFICACIÓN

Este trabajo se enmarca dentro de un proyecto de identificación y análisis de proteínas con valor biotecnológico del zigomiceto *A. rouxii*, que fue aislado de un efluente de la industria de papel. Se ha demostrado que *A. rouxii* puede metabolizar pentaclorofenol y que una de las enzimas involucradas en este proceso es la tirosinasa producida por el mismo hongo.

A lo largo de la experimentación para analizar la capacidad de degradar este tipo de compuesto tóxico por *Amylomyces* se observó la existencia de al menos una proteasa ácida, que aparentemente estaba dificultando la purificación de la tirosinasa. Por ello, resultó de interés purificar e identificar el tipo de proteasa extracelular secretada por el hongo, así como determinar su posible relación con la tirosinasa producida.

Una herramienta molecular que nos permitiría estudiar si la tirosinasa de *A. rouxii* está regulada por una proteasa y si afecta directamente a la actividad de esta enzima es el silenciamiento mediante ARN de interferencia, tecnología que no se había utilizado con anterioridad en zigomicetos.

IV. HIPÓTESIS

Amylomyces rouxii produce proteasas extracelulares, posiblemente de tipo aspartato proteasa, que podrían afectar de forma negativa a la actividad tirosinasa. El silenciamiento del gen que codifica para esta proteasa por el mecanismo de ARN de interferencia puede ser una alternativa para incrementar la actividad tirosinasa.

V. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar la proteasa extracelular producida por *A. rouxii*, y estudiar el efecto del silenciamiento del gen que codifica para esta proteasa sobre la actividad de la tirosinasa.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Purificar e identificar a la proteasa ácida y tirosinasa producidas por *A. rouxii*.
- Caracterizar bioquímicamente la proteasa y tirosinasa producidas por *A. rouxii*.
- Identificar los genes que codifican para aspartato proteasas y obtener transformantes silenciadas de *A. rouxii* para su análisis funcional.
- Determinar actividad proteasa y estudiar su efecto sobre la actividad tirosinasa en las transformantes silenciadas de *A. rouxii*.

VI. METODOLOGÍA

6.1 MICROORGANISMOS UTILIZADOS

Amylomyces rouxii: Zigomiceto perteneciente a la colección de cepas del laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, aislado a partir de un efluente de la industria del papel (Tomasini *et al.*, 1996).

Aspergillus niger ED8: Cepa empleada para obtener el promotor constitutivo *Ppki*, para la construcción del plásmido pGpdPki-RNAi.

Escherichia coli DH5 α : Cepa utilizada en experimentos de transformación por electroporación debido a la alta eficacia que puede conseguirse con ella, 5×10^8 transformantes/ μ g de ADN. Entre sus características destaca la de poseer el fragmento α de la β -galactosidasa, lo que permite seleccionar por color las células transformadas que contengan plásmidos capaces de originar α -complementación, tales como pGEM-T[®] Easy (Promega, Madison, WI, E.U.A). Genotipo: *deoR*, *endA1*, *gyrA96*, *recA1*, *hsdR17* (r_k^- , m_k^+), *relA1*, *supE44*, *thi-1*, $\Delta(lacZYA-argFV169)$, $f80\delta lacZ\Delta M15F^- \lambda^-$.

E. coli XL1-BLUE MRA y XL1-BLUE MRA (P2): Cepa bacteriana empleada para la construcción y análisis de la biblioteca genómica. Fueron obtenidas con el kit comercial Lambda DASH[®] II Library (*Stratagene*). Genotipo: XL1-Blue MRA: $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac$
XL1-Blue MRA (P2): XL1-Blue MRA (P2 lisogénica).

6.2 VECTORES

pGEM-T[®] Easy (Promega) (3015 pb): Plásmido utilizado para la clonación de ADN. Contiene un sitio de corte *EcoRV* digerido, al cual se le han añadido dos residuos de timina en los extremos 3', lo que permite la clonación de productos de PCR generados por polimerasas que permiten la incorporación de un nucleótido de adenina adicional en los extremos 3'. Contiene un sitio de clonación múltiple dentro de la región codificante de la enzima β -galactosidasa, lo que permite identificar los clones recombinantes por color y por

su resistencia a ampicilina. Posee además un origen de replicación monocatenaria del fago ϕ 1.

pJET (Fermentas) (2974 pb): Vector de clonación comercial para *E. coli*, se encuentra en forma lineal y está diseñado para la clonación de productos amplificados por PCR. Contiene un gen letal (*eco47IR*) que es interrumpido al ligar el inserto de ADN en el sitio de clonación, lo que facilita la selección de las recombinantes. Como marcador de selección posee resistencia a ampicilina y fue utilizado para la clonación de los genes de la aspartato proteasa.

pJL43b1 (Gutiérrez *et al.*, 1997) (4488 pb): Vector que contiene el promotor del gen gliceraldehído-3-P-deshidrogenasa A (*gdpA*) de *Aspergillus nidulans*, el terminador del gen que codifica la citocromo oxidasa 1 (*cyc1*) de *Saccharomyces cerevisiae* y el gen de resistencia a fleomicina (*ble*). Este vector se utilizó como intermediario en la construcción del vector pGpdPki-RNAi.

6.3 MEDIOS DE CULTIVO

6.3.1 Medio de cultivo para bacterias

Medio Luria-Bertani (LB) (Miller, 1972):

	g L ⁻¹
Bactotripton	10
NaCl	10
Extracto de levadura	5
pH	7.5

Se empleó como medio general para la propagación de las cepas de *E. coli*. Cuando se requirió usarlo como medio sólido (Medio LA), se le adicionó 2% de agar bacteriológico. El medio se complementó con ampicilina (100 μ g mL⁻¹) para la selección de bacterias portadoras de plásmidos con resistencia al antibiótico. Para bacterias portadoras de plásmidos con selección por color (β -galactosidasa), el medio se suplementó con IPTG (25 μ M) y X-gal (40 μ g mL⁻¹).

Medio TB (Sambrook y Rusell, 2001)

Triptona	12 g
Extracto de levadura	24 g
Glicerol	4 mL

Medio de cultivo para *E. coli*, se emplea cuando se requiere obtener ADN plásmidico. Se mezclan todos los componentes y se disuelven totalmente, aforándose a 900 mL. Antes de emplearse el medio, se añaden 100 mL de una solución estéril de KH_2PO_4 0.17 M y K_2HPO_4 0.72 M.

6.3.2 Medios de cultivos para hongos

Agar Dextrosa Papa (PDA)

Utilizado para propagación y esporulación de la cepa de *A. rouxii*, la preparación del medio se realizó de acuerdo a las especificaciones de producto (Bioxon), 39 g L⁻¹.

Medio Melin-Norkrans (M-N) modificado (Ainsworth, 1995; Villareal, 1996)

	g L ⁻¹
Glucosa	10
Extracto de levadura	1
KH_2PO_4	0.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.15
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0.5

Este medio se preparó en una solución de agua: amortiguador de citratos pH 5.5 (50:50).

Amortiguador de citratos:

Acido cítrico monohidratado 0.1 M 137 mL

Citrato de sodio 0.1 M 363 mL

Aforar a un litro de H₂O destilada.

Medio Mínimo (MM) (Lee *et al.*, 1975)

	g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1.3
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	1.13
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.75
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.30
Urea	0.25
CaCl ₂	0.30

Este medio fue utilizado en la incubación de *A. niger* para la obtención de micelio y extracción de ADN.

Medio PMY (modificado por Anné, 1977)

	g L ⁻¹
Glucosa	40
NaNO ₃	3
Extracto de levadura	2
KCl	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
pH	6

Medio empleado para desarrollo de micelio de *A. rouxii* y extracción de ADN.

Todos los medios mencionados, para hongos y bacterias, fueron esterilizados en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

6.4 CONDICIONES DE CULTIVO

6.4.1 Crecimiento de *E. coli*

Para el crecimiento de *E. coli* se utilizaron los medios LA, LB y TB, dependiendo de si se requería sólido o líquido, con la adición o no, del antibiótico ampicilina.

6.4.2 Crecimiento de *A. rouxii*

6.4.2.1 Propagación y conservación de la cepa *A. rouxii*

A. rouxii se propagó colocando discos de agar con micelio en matraces de 250 mL con 50 mL de medio PDA, durante 5 días a 30°C. Se obtuvo una suspensión de esporas con Tween 80 al 0.1% (v/v) y se conservó en viales de 2 mL con glicerol al 40% a -20°C.

6.4.2.2 Obtención de esporas

A partir de la suspensión de esporas conservadas a -20°C se inocularon matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio PDA y se incubaron a 30°C durante 5 días para su esporulación. Las esporas se cosecharon con ayuda de un agitador magnético y solución de Tween 80 (0.1%) estériles; se colocaron los matraces sobre una parrilla de agitación hasta el desprendimiento de éstas. La suspensión concentrada de esporas se filtró a través de una gasa estéril para separar los restos de micelio. Por último, la cuantificación de las esporas se realizó con una cámara de Neubauer.

6.4.2.3 Condiciones de fermentación líquida para *A. rouxii*

Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio Melin-Norkrans y se inocularon con 10^6 esporas mL^{-1} . Los matraces se incubaron a 30°C y 125 rpm. El medio se suplementó con 0.1 g L^{-1} de tirosina (adicionado después de la esterilización, a una temperatura de aproximadamente 40°C) y 12.5 mg PCF L^{-1} adicionado a las 48 h, una vez que germinaron las esporas. El muestreo se realizó cada 24 h para la determinación de actividades enzimáticas; para la purificación de enzimas se colectaron los matraces a las 48 h de cultivo.

6.4.3 Cultivos para la extracción de ADN

Se utilizaron matraces de 250 mL con 100 mL de medio PMY para *A. rouxii* y con 100 mL de MM para *A. niger*, inoculados con esporas de cada hongo a una concentración de 10^8 esporas mL^{-1} , se incubaron a 30°C durante 48 h en agitación (150 rpm). Después de ese tiempo, se filtró el micelio a través de un filtro Nyltal estéril y se lavó con 100 mL de solución de NaCl 0.9% (p/v) y, posteriormente, con 100 mL de tampón A. Se eliminó el exceso de agua del micelio con papel de filtro estéril y se congeló a -80°C durante 12 h. A

continuación, el micelio se liofilizó y se pulverizó con un mortero y pistilo estéril, conservándose el polvo a -20°C hasta su utilización.

Tampón A: EDTA 100 mM pH 8.0; NaCl 150 mM; Tris-HCl 50 mM pH 8.0.

6.5 OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS

6.5.1 Obtención de proteínas extracelulares

Las proteínas extracelulares se obtuvieron directamente del cultivo, libre de biomasa. Estos extractos fueron empleados para la purificación de tirosinasa y proteasas, así como para cuantificar las actividades enzimáticas correspondientes; cuando se realizó el estudio con los inhibidores se les adicionaron en el momento.

Los inhibidores de proteasas empleados y sus concentraciones fueron: PMSF (1 mM); EDTA (1 mM), Pepstatina A (3 mM) y cocktail comercial SIGMA (este fue utilizado de acuerdo a las indicaciones del producto, número de catálogo P8215).

6.5.2 Obtención de proteínas intracelulares

La obtención de proteínas intracelulares se realizó siguiendo el método descrito por Halaouli *et al.* (2005). La biomasa obtenida de los cultivos de *A. rouxii*, separada por filtración, se resuspendió en 5 mL de amortiguador de fosfato de sodio (0.1 M, pH 6.8) con 0.65 M de sorbitol y el inhibidor de proteasas correspondiente. El rompimiento del micelio se realizó con un homogenizador manual (Broeck #7727) y los extractos obtenidos se centrifugaron a 15,000 rpm en un rotor F0485 (centrifuga Beckman, modelo Avanti™ 30) durante 30 minutos. El sobrenadante obtenido después de la centrifugación se utilizó inmediatamente para determinar actividades enzimáticas y/o para la purificación.

6.5.3 Extracción de tirosinasa adherida a la pared celular

Para obtener la tirosinasa adherida a la pared, la biomasa fue tratada con diferentes soluciones y reactivos.

1. Para obtener las enzimas presentes en la pared celular, se comenzó resuspendiendo la biomasa en amortiguador Tris-HCl (0.25 M, pH 8), con sucesivas

homogenizaciones y se realizaron tres lavados con esta solución, centrifugándose las muestras a 4,000 rpm en un rotor Beckman F0650 durante 15 minutos.

2. Al precipitado obtenido después de la centrifugación se le adicionó digitonina (0.3% w/v), que permite desprender las proteínas adheridas a la membrana y algunas asociadas a la pared celular. El precipitado se mantuvo resuspendido con dicho compuesto durante 3 h, para después ser centrifugado nuevamente.

3. El último tratamiento fue realizado con NaCl (2 M), por duplicado durante 3 h. La mezcla se centrifugó en las mismas condiciones, para obtener las proteínas solubles con la solución tratada, mientras que la biomasa fue resuspendida en presencia de L-Dopa, (tendría que dar una coloración rosa, indicando la presencia de tirosinasa).

4. A cada uno de los extractos obtenidos con los tratamientos señalados se les cuantificó la actividad enzimática con L-Dopa (4.5 mM).

6.6 TÉCNICAS ANALÍTICAS

6.6.1 Determinación de pH

El pH se midió directamente del caldo de cultivo, empleando un potenciómetro Orion (molelo 410 A).

6.6.2 Determinación de biomasa

La biomasa se cuantificó mediante peso seco para cada una de las muestras obtenidas. Se usó papel de filtro Whatman No. 1, el cual inicialmente se colocó en una estufa a 65°C durante 24 horas, para mantenerlos a peso constante. Una vez filtrada la biomasa, se colocaron nuevamente a 70°C durante 24 horas, después de ese tiempo se metieron en un desecador durante 30 minutos y posteriormente se registró el peso. De esta manera se obtuvo un peso constante que se tomó como el peso final.

6.6.3 Cuantificación de proteínas

La cantidad de proteína en solución se determinó por el método de Bradford (1976), utilizando el reactivo *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad), siguiendo el procedimiento de microensayo recomendado (1-20 µg proteína mL⁻¹). Se utilizaron 800 µL de la muestra

convenientemente diluida en agua y se añadieron 200 μL del reactivo. Las muestras se mezclaron, se dejaron reposar durante 15 min y se midieron en un biofotómetro a una densidad óptica de 595 nm. La cantidad de proteína se determinó por extrapolación sobre una curva patrón, realizada simultáneamente en el biofotómetro con diluciones seriadas en el rango de 1-20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de seroalbúmina bovina (Sigma).

6.6.4 Determinación de actividad tirosinasa

Debido a que la tirosinasa, como ya se mencionó anteriormente, puede actuar sobre una gran cantidad de mono y difenoles. En el presente trabajo se emplearon los sustratos más reportados y con más afinidad para las fenoloxidasas para cuantificar las actividades mono y difenolasa, tanto para los extractos extracelulares como intracelulares.

6.6.4.1 Determinación de la actividad monofenolasa

Uno de los métodos utilizados para cuantificar la actividad monofenolasa se realizó de acuerdo a lo reportado por Rodríguez-López *et al.* (1994), usando un amortiguador de acetato de sodio (0.1 M, pH 6.0), 3-metil-2-benzotiazolona hidrazona hidroclicorada (MBTH) (1 mM) como agente cromóforo, tirosina (5 mM) y PCF como sustrato, tirosinasa comercial como control positivo, además de lacasa y peroxidasa de rábano como controles negativos.

El volumen de la reacción fue de 1 mL y las pruebas se realizaron de la siguiente manera:

	Volumen
Amortiguador	355 μL
MBTH	100 μL
Sustrato	500 μL
Enzima o extracto enzimático	20 μL

También se cuantificó la actividad monofenolasa de las muestras, mediante el método de hidrazona Besthorn (Mazzoco y Pefferi, 1976). Es un método espectrofotométrico, en el que se usa una curva estándar con yodo en distintas concentraciones ($1-8 \times 10^{-4}$ M) para oxidar el sustrato (fenol). Como agente cromóforo se

usó MBTH y se empleó amortiguador de fosfato-ácido cítrico 0.4 M, pH 4.2 la reacción se detuvo con la adición de ácido sulfúrico (5%) y acetona y se midió la absorbancia a 495 nm. El volumen final de la reacción fue de 6 mL y la reacción se llevó cabo como se menciona a continuación:

	Blanco (mL)	Muestra (mL)
Fenol	0.5	0.5
Amortiguador	1.5	1
MBTH	0.5	0.5
I ₂ (1-8 x 10 ⁻⁴ M)	-	0.5
H ₂ SO ₄	0.5	0.5
Acetona	3	3

La actividad monofenolasa se determinó también utilizando *p*-cresol como sustrato. El *p*-cresol (50 mM) se disolvió en H₂PO₄ para evitar su oxidación, se empleó amortiguador de fosfatos (50 mM, pH 6.8) y se leyó su absorbancia a una D.O. de 400 nm. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 3 mL:

	Volumen
Amortiguador de fosfatos	2.5 mL
<i>p</i> -cresol	0.3 mL
Enzima o extracto enzimático	0.2 mL

6.6.4.2 Determinación de la actividad difenolasa

La actividad difenolasa se determinó utilizando cuatro sustratos diferentes, L-Dopa, catequina, catecol y 4-*tert*-butilcatecol (TBC). Todas la reacciones se llevaron a cabo en amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 6.8), como lo describieron Wang *et al.* (1995) y Zhang *et al.* (1999).

Se preparó una solución de L-Dopa (25 mM) en el amortiguador mencionado y se utilizó a una concentración final de 4.5 mM. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y en presencia de 5 mM de MBTH, cuantificándose su absorbancia a 484 nm (Halaouli *et al.*, 2005; Selinheimo *et al.*, 2009). Cuando se utilizó la catequina como sustrato, se midió la absorbancia a 410 nm, con el catecol a 510 nm y empleando el 4-*tert*-

butilcatecol a 400 nm (Fan and Flurkey, 2004; Kawamura-Konishi *et al.*, 2007). Debido a que la reacción con estos difenoles es muy rápida y genera coloración no se requirió de la presencia del MBTH.

También se realizaron reacciones en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1%, para determinar la posible actividad latente de la tirosinasa.

La cuantificación de las actividades mono y difenolasas de la tirosinasa se obtuvo a partir de curvas estándar con cada uno de los sustratos utilizados y sus respectivas ecuaciones. Para la cuantificación, cuando se utilizó fenol como sustrato, se realizó de la siguiente manera.

$$y = 0.754x - 0.0099$$

Donde : y = absorbancia a 495 nm

x = concentración de sustrato

Se definió una unidad de actividad como la cantidad de enzima capaz de producir un μmol de quinona por minuto.

El resto de las curvas patrón se realizaron con diferentes concentraciones de enzima, por lo que en los extractos se cuantificó la cantidad de enzima producida.

6.6.4.3 Determinación cualitativa de la actividad tirosinasa en medio sólido

Se realizó en cajas de Petri desechables con 30 mL de medio, que contenían peptona (5 g L^{-1}), extracto de carne (3 g L^{-1}), agar 1.5% (p/v) y tirosina 5% (p/v), con un pH final de 7.0. Una vez solidificado, se perforó en el centro de la caja con un sacabocados y se le agregaron 150 μL de extracto enzimático, proveniente de cultivos sumergidos de *A. rouxii*. Las cajas se incubaron a 4°C durante toda la noche para permitir la difusión del extracto por el medio y posteriormente se colocaron a 37°C . La reacción de actividad tirosinasa se observó después de 14 días, al oxidarse la tirosina y presentar una coloración rosa (Bojalil *et al.*, 1959).

6.6.5 Determinación de la actividad de proteasas

La determinación de la actividad proteasa fue realizada de acuerdo a los métodos descritos por Anson (1938) y Asakura *et al.* (1997), Se utilizó hemoglobina al 2% p/v (Sigma, E.U.A) disuelta en amortiguador universal 25 mM a pH 3.5.

A 1 mL de hemoglobina se le adicionaron 0.25 mL del extracto enzimático, la mezcla se incubó a 37°C durante 20 min. Transcurrido este tiempo, la reacción se detuvo con 0.25 mL de ácido tricloroacético (10% p/v), se incubó a 4°C durante 15 min y se centrifugó a 14,000 rpm en un rotor F45-30-11 (centrifuga Eppendorf, modelo 5415 R) durante 15 min para descartar el precipitado y hacer la lectura de la absorbancia del sobrenadante a 280 nm. Una unidad de actividad proteasa fue definida como la cantidad necesaria para producir un aumento en la absorbancia de 0.001 a 280 nm.

La concentración en U mL⁻¹ de la actividad proteasa fue determinada de acuerdo a la fórmula establecida por Yamaguchi *et al.* (1985):

$$U \text{ mL}^{-1} = (\text{abs} \times \text{dilución}) / (0.001 \times \text{tiempo} \times \text{mL de extracto})$$

6.6.5.1 Determinación cualitativa de actividad proteasa en medio sólido

Se utilizó el método de ensayo en placa para determinar la actividad proteasa (Li *et al.*, 2009). Para ello, se empleó como sustrato leche descremada (Difco) y agar bacteriológico 1.5% (p/v). El medio se esterilizó y se vertieron 30 mL en cajas de Petri. Una vez solidificado, se realizaron orificios donde se colocaron 150 µL del extracto enzimático proveniente de cultivos sumergidos de *A. rouxii*. Las cajas se incubaron durante toda la noche a 4°C, para permitir la difusión del extracto enzimático a través del medio y después se incubaron a 37°C hasta la formación de los halos de hidrólisis.

6.7 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE *A. rouxii*

Los extractos enzimáticos (extra e intracelulares) se obtuvieron como se menciona en la sección 6.5, a partir de 20 matraces cultivados durante 48 h (tiempo en que la tirosinasa y la proteasa mostraron su mayor actividad).

Para la purificación de proteínas extracelulares se colectaron aproximadamente 900 mL de caldo de cultivo, se les adicionó el inhibidor de proteasas correspondiente y se congelaron a -80°C para su posterior concentración por liofilización.

La biomasa de los 20 matraces se lavó con agua destilada (500 mL) y con 500 mL de amortiguador de fosfatos 10 mM (pH 7.0) dos veces, se congeló a -80°C y se liofilizó.

El polvo liofilizado obtenido a partir del caldo de cultivo y de la biomasa, se resuspendió en 30 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7.0) y se continuó con el fraccionamiento con sulfato de amonio. En la purificación de la proteasa, la precipitación se realizó de manera directa a un 80% de saturación, mientras que para la tirosinasa se realizó de manera fraccionada: primero con un 0-35% de saturación, se agitó la mezcla durante 4 h a 4°C , para después centrifugar a 20,000 rpm en un rotor F0485 durante 30 min. Se recuperó el sobrenadante y nuevamente se precipitó hasta alcanzar un 80% de saturación (la adición del sulfato del amonio a los extractos intra y extracelular se realizó de manera directa y con agitación constante durante toda la noche a 4°C). La mezcla se centrifugó a 25,000 rpm en un rotor Beckman F0485 durante 50 minutos a 4°C , las proteínas precipitadas se resuspendieron en 10 mL del mismo amortiguador. La eliminación de las sales se realizó utilizando columnas de filtración en gel (1×14 cm, Econopac Bio-gel, 10 DG desalting) para volúmenes grandes (15 mL) y columnas micro Bio-Spin para volúmenes de 0.5 mL. En algunos casos se utilizaron también membranas de diálisis con un tamaño de poro de 10 kDa. La diálisis se mantuvo a 4°C durante 24 h, con al menos tres cambios de amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.0.

Las columnas de cromatografía empleadas para la purificación de proteínas extra e intracelulares fueron Econo-Pac High Q Cartridge, Bio-Scale Q5 (Bio-Rad) y DEAE-sepharosa (Amersham), empleando buffer de Tris-HCl 25 mM pH 7.0. Las proteínas precipitadas fueron eluidas en un gradiente lineal de NaCl de 0-0.5 M y el flujo empleado en todas las columnas fue de 1 mL min^{-1} , colectándose fracciones de 1.5 mL. A cada fracción se le cuantificó la cantidad de proteína y la actividad tirosinasa (mono y difenolasa), así como la actividad proteasa.

Las fracciones que mostraron actividad enzimática se concentraron con tubos MICROCON (0.5 mL, Millipore, Ultracel YM- 10 membrane, MA, E.U.A), para los posteriores pasos de purificación.

Para la cromatografía de filtración en gel se utilizó una columna de 1.5×36 cm, con Sephadex-200 como soporte. Se colocó una cama de lana de vidrio en el fondo de la columna y se desgasificó con agua destilada. Posteriormente se llenó la columna con un amortiguador que tiene la siguiente composición:

	Concentración
NaCl	0.4 M
2-mercaptoetanol	20 mM
KH ₂ PO ₄	2.6 mM
K ₂ HPO ₄	32.5 mM
Azida sódica	0.02% (p/v)

Este amortiguador tiene un pH de 7.5 y una fuerza iónica (μ) de 0.5. Al llenar la columna con el amortiguador se eliminaron las burbujas de aire, iniciándose a continuación el llenado con el gel. Se dejó pasar el amortiguador a través de la columna durante 1 día para la estabilización del soporte.

Se utilizaron azul de dextrano (2 mg mL^{-1}) y DNP-L-Alanina (2 mg mL^{-1}), los cuales se densificaron con sacarosa. para determinar el volumen vacío y total de la columna, respectivamente. Los estándares y las muestras se colocaron en una proporción del 5% del volumen total de la columna. Se colectaron fracciones con 2 mL de muestra a un flujo de 0.35 mL min^{-1} . A todas las fracciones colectadas se les determinó proteína, a 280 nm, empleando un espectrofotómetro (RAYLEIGH, UV-1800).

El estándar utilizado para esta columna (150 μL) fue de la marca Bio-Rad y permite diferenciar las siguientes masas moleculares:

Estándar	Masa (Da)
Tiroglobulina	670,000
Gamaglobulina	158,000
Ovoalbumina	44,000
Mioglobina	17,000
Vitamina B-12	1,350

6.7.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La purificación de la proteínas obtenidas en cada uno de los pasos se observó mediante geles de poliacrilamida (Laemmli, 1970). El gel de separación y el de empaque se realizaron con concentraciones de 12 y 4% de acrilamida, respectivamente. Los amortiguadores empleados fueron Tris-HCl (50 mM, pH 8.8) para el gel de separación y Tris-HCl (50 mM, pH 6.8) para el de empaque. Los geles se cargaron con 15 μ L de muestra y 5 μ L de tampón de carga. Se empleó una cámara Mini-Protean III electrophoresis system (Bio-Rad) y la electroforesis se desarrolló a 150 V durante 1.1 horas. Después de la electroforesis, los geles fueron teñidos con sales de plata y azul de Coomassie (R-205, Sigma). En el anexo se detalla la elaboración de los geles así como la tinción de estos.

Los marcadores de peso molecular para electroforesis de proteínas fueron adquiridos de Bio-Rad: SDS-PAGE Molecular Weight Standards Low Range; Precision Plus ProteinTM Standards) y de Fermentas: PageRulerTM Prestained Protein Ladder, que van de tamaños de 10 a 250 kD (**Figura 5**).

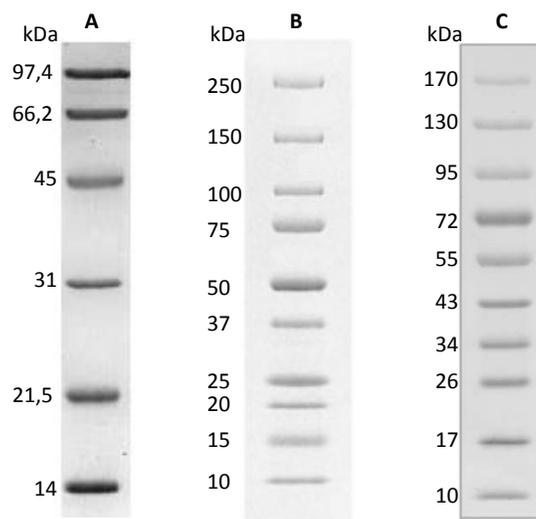


Fig. 5. Marcadores de peso molecular para geles de poliacrilamida. A) SDS-PAGE Molecular Weight Standards Low Range; B) Precision Plus ProteinTM Standards; C) PageRulerTM Prestained Protein Ladder.

6.7.2 Isoelectroenfoque

El sistema Rotofor[®] cell (Bio-Rad) fracciona muestras complejas de proteínas que están en solución mediante isoelectroenfoque, lo cual nos permitió determinar el punto isoeléctrico de la proteína purificada. El extracto proteico se mezcló con anfolitos (Bio-Lyte[®], Bio-Rad) que tienen un rango de pH de 3.5 a 9.5, se cargaron en una cámara con capacidad de 18 mL, la corrida se hizo durante 4 horas y se colectaron 20 fracciones separadas a través de una membrana con tamaño de poro de 10 µm. Se determinó el pH y la actividad enzimática difenolasa de cada fracción.

6.7.3 Identificación de proteínas

Las bandas de interés fueron escindidas de los geles y se identificaron por espectrometría de masas de alta resolución, en la unidad de Proteómica del IBT/UNAM. La metodología empleada para el procesamiento de las muestras fue la siguiente:

La muestra fue digerida “in gel” con tripsina y los péptidos resultantes fueron aplicados en un sistema LC-MS constituido de un cromatógrafo líquido de micro-flujo Accela (Thermo-Fisher Co. San Jose, CA) con “splitter” (1/20) y un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap XL (Thermo-Fisher Co.) con sistema de ionización tipo nano-electrospray (ESI). Para la fragmentación de los péptidos se utilizó el método de CID (Collision-Induced Dissociation), seleccionándose iones con carga 2⁺ y 3⁺ para este evento de fragmentación. Los iones con carga superiores a 4⁺ y de cargas indefinidas no fueron considerados. Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. Durante la captura automática de los datos se utilizó la exclusión dinámica de iones, con un tiempo de exclusión de 60 segundos. Los datos espectrométricos fueron sometidos a la búsqueda contra la base de datos del NCBIInr a través del programa Matrix science (Mascot Search Result).

6.8 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

6.8.1 Extracción de ADN plasmídico de bacterias

6.8.1.1 Minipreparaciones (*boiling minipreps*)

El método de Holmes y Quigley (1981) modificado se empleó como método de rutina para la obtención de ADN plasmídico a pequeña escala de *E. coli*.

1. Se inocularon tubos con 1 mL de medio LB suplementado con ampicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) y una colonia de bacteria, se incubaron a 37°C y agitación de 250 rpm, con un mínimo de 6 horas de cultivo.
2. Transcurrido el tiempo se centrifugaron los tubos a 5,000 rpm en un rotor F0650 durante 3 min, eliminándose el sobrenadante.
3. Al precipitado obtenido se le agregaron 350 mL de STET y $10 \mu\text{L}$ de una solución de lizosima (10 mg mL^{-1}), se mezcló durante 30 segundos y se hirvió durante 45 segundos. Los restos celulares y proteínas se precipitaron por centrifugación a 14,000 rpm en un rotor F45-18-11 (centrifuga 5417 -Eppendorf-) durante 10 min y el precipitado se eliminó con un palillo estéril.
4. El ADN plasmídico se precipitó con $40 \mu\text{L}$ de acetato de sodio (3 M, pH 5.2) y $600 \mu\text{L}$ de isopropanol frío, se homogenizaron los tubos y se incubaron 15 min a temperatura ambiente.
5. Se centrifugaron los tubos a 14,000 rpm en un rotor F45-18-11 durante 5 min a temperatura ambiente y el precipitado se lavó con etanol al 70% (v/v). Nuevamente se centrifugaron los tubos a 14,000 rpm durante 5 min, se desechó el sobrenadante y se secaron los tubos.
6. Finalmente se resuspendió el ADN en 30-50 μL de TE o H_2O . Dos microlitros de esta solución fueron suficientes para llevar a cabo cada uno de los ensayos de digestión en endonucleasas de restricción necesarios para el análisis de los plásmidos recuperados.

STET: Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; sacarosa al 8% (p/v); tritón X-100 al 0.5% (v/v); EDTA 50 mM, pH 8.0.

TE: Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; EDTA 1 mM pH 8.0

6.8.1.2 Megapreparaciones

Este método se utilizó para aquellos experimentos en los que se requería una mayor cantidad de ADN fácilmente digerible o, incluso, para la secuenciación automática de genes. Los pasos requeridos son los siguientes:

1. Se inocularon 100 mL de medio LB con ampicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) con la colonia que se quiere amplificar, se incubó toda la noche a 37°C y 250 rpm.

2. Se centrifugó a 5,000 rpm durante 10 min, se desechó el sobrenadante por decantación y el precipitado se resuspendió con 6 mL de STET; se agitó la mezcla y la suspensión de bacterias se repartió en tubos Eppendorf con alícuotas de 350 μL (aproximadamente 9 tubos). A cada tubo se le agregaron 20 μL de lisozima, a una concentración de 10 mg mL^{-1} en agua.
3. Se mezclaron los tubos y se hirvieron durante 45 segundos. Las proteínas, los restos celulares y el ADN cromosómico bacteriano se precipitaron por centrifugación a 14,000 rpm en un rotor F45-18-11 (utilizado para todo el proceso de extracción) durante 15 min y se eliminaron con un palillo estéril.
4. El ADN plasmídico se precipitó añadiendo 40 μL de acetato de sodio (3 M, pH 5.2) y 600 μL de isopropanol frío, se homogenizaron los tubos y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 min.
5. Transcurrido el tiempo, se centrifugaron los tubos a 14,000 rpm durante 5 min, se desechó el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol al 70% (v/v); se centrifugaron nuevamente los tubos para desechar el etanol y se dejaron secando para posteriormente resuspender el ADN en 100 μL de TE o H_2O .
6. Se juntó el ADN obtenido de todos los tubos y se trató con RNAsa durante 90 min. La solución de ADN se limpió mediante fenolización y posteriormente se precipitó de acuerdo con los métodos habituales, resuspendiéndose en un volumen aproximado de 400 μL de TE.

6.8.2 Extracción de ADN genómico de *Amylomyces rouxii* y *Aspergillus niger*

6.8.2.1 Extracción a pequeña escala

La extracción de ADN genómico a pequeña escala se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Fernández (1997), y se empleó para la obtención de ADN necesario para reacciones de PCR.

1. El micelio pulverizado (obtenido de acuerdo a la sección 3.5) se colocó en un tubo Eppendorf estéril (100 mg de micelio) y se añadieron 500 μL de tampón de lisis, homogenizándose la mezcla.
2. A continuación, se añadieron 500 μL de fenol y 500 μL de CIA, se mezcló cuidadosamente y se incubó a 50°C durante 20 min (mezclando cada 5 min).

3. Transcurrido este tiempo, se centrifugó la mezcla a temperatura ambiente y 14,000 rpm en un rotor F45-18-11 durante 5 min y se recuperó la fase superior. La eliminación de proteínas se realizó mediante extracciones sucesivas con fenol-CIA hasta obtener una interfase limpia.
4. Se realizó una extracción con un volumen de CIA, y el ADN se precipitó con 1/10 de volumen de acetato sódico 3M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto (-20°C), dejándolo a -20° C al menos 2 h o toda la noche.
5. Se centrifugó el tubo con el ADN precipitado a 14,000 rpm en un rotor F45-30-11 (Eppendorf, modelo 5417R) durante 20 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 µL de etanol 70% (v/v). Se centrifugó nuevamente durante 5 min a 14,000 rpm a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante, y se dejaron unos minutos los tubos abiertos para el secado del precipitado.
6. Por último, se resuspendió el ADN en 30 µL de TE y se mantuvo a 4°C.

Tampón de lisis: Tris-HCl 0,2 M pH 8.0, EDTA 100 mM pH 8.0, SDS 1% (p/v). Se ajusta el pH a 8.2 con HCl

Fenol Neutro: Se mezclan por agitación 4 volúmenes de fenol ácido con 1 volumen de Tris-HCl 1M pH 8.0. Se mantiene la mezcla en reposo hasta que se separen la fase superior acuosa y la inferior fenólica. El fenol así preparado se conserva a 4°C en un recipiente opaco, manteniéndose durante al menos un mes. Para la preparación del **fenol ácido** se mezcla 1 volumen de fenol con 1 volumen de H₂O, se agita, se deja reposar durante toda la noche a 4°C. En este estado se puede mantener hasta 3 meses.

CIA: Se prepara mezclando 24 volúmenes de cloroformo con un volumen de alcohol isoamílico.

Fenol-CIA: Se prepara mezclando volúmenes iguales de fenol neutro y CIA.

6.9 MANIPULACIÓN ENZIMÁTICA DE ÁCIDOS NUCLEICOS

6.9.1 Eliminación de ARN

Una vez extraído el ADN, por cualquiera de los protocolos descritos en la sección anterior, es necesario eliminar el ARN que se encuentra junto al ADN para poder utilizarlo en otros ensayos. Para ello, el ADN obtenido se trató con una solución de ARNasa: se

adicionó la cantidad suficiente para alcanzar una concentración final de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ y se incubó la reacción 37°C , durante 90 minutos.

6.9.2. Eliminación de proteínas

1. Se añadió un volumen de fenol neutro a la solución de ADN, mezclando por inversión durante 5 min y centrifugando a temperatura ambiente a 14000 rpm en un rotor F45-18-11 durante el mismo tiempo.
2. Se extrajo la parte superior (fase acuosa) y se puso en un tubo limpio estéril, posteriormente se agregó un volumen de fenol-CIA, se mezcló por inversión durante 5 minutos y se centrifugó durante el mismo tiempo a 14,000 rpm con un rotor F45-18-11. Normalmente no fueron necesarias más de dos extracciones en este paso.
3. Se agregó un volumen de CIA, mezclando durante 3 minutos y centrifugando en las mismas condiciones que en los pasos anteriores. Para precipitar el ADN se agregó 1/10 de volumen de acetato sódico 3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C).
4. Se centrifugó el tubo con el ADN precipitado a 14,000 rpm en un rotor F45-30-11 (Eppendorf, modelo 5417R) durante 20 min a 4°C , se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con $500 \mu\text{L}$ de etanol 70% (v/v). Se centrifugó nuevamente durante 5 min a 14,000 rpm a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante, y se dejaron unos minutos los tubos abiertos para el secado del precipitado.
5. Por último, se resuspendió el ADN en $30 \mu\text{L}$ de TE y se mantuvo a 4°C .

ARNasa: Se disuelve la ARNasa, en una concentración de 10 mg mL^{-1} , en una solución de NaCl 15 mM y tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,5. La mezcla se hierve durante 15 minutos y se deja enfriar lentamente a temperatura ambiente. Posteriormente se reparte en alícuotas y se conserva a -20°C .

6.9.3 Digestión con endonucleasas

Las enzimas de restricción se usaron siguiendo las recomendaciones de los distintos proveedores. Por regla general, la enzima se utilizó en un 1/10 del volumen final de la mezcla de reacción, debido a la elevada concentración de glicerol con que se almacenan estas enzimas (lo que puede inhibir parcial o totalmente la reacción). Asimismo, es

conveniente que el ADN esté lo suficientemente diluido y limpio con el fin de no alterar las condiciones de reacción. Se mezclaron en un tubo Eppendorf de 1.5 mL:

1. Un décimo del volumen total de digestión de ADN.
2. Se agregó la cantidad necesaria de tampón para la enzima de restricción a utilizar, para obtener una concentración final de 1X.
3. Se agregó la cantidad de agua desionizada estéril necesaria para alcanzar el volumen de la reacción.
4. Por último, se adicionó la enzima (las unidades que se consideren necesarias). A continuación el tubo se incubó a la temperatura óptima (normalmente 37°C), sin agitación, durante 3 h.

Transcurrido el tiempo, se analizó una pequeña alícuota de la reacción (de 5 a 8 μ L) en un gel de agarosa (la concentración del gel depende del tamaño de los fragmentos que se quieran visualizar).

En el caso de digestiones simultáneas con dos enzimas, el tampón utilizado fue aquel en el que ambas enzimas presentaran la máxima actividad. Si las enzimas no fueron compatibles, la digestión se llevó a cabo en pasos separados.

6.9.4 Desfosforilación de plásmidos

Las reacciones de desfosforilación se realizaron empleando la fosfatasa alcalina de camarón (Promega). La mezcla de la reacción se preparó en un volumen final de 30 μ L, con 3 μ L de tampón de fosfatasa alcalina 10X, 50 ng de ADN digerido y 1 U de fosfatasa alcalina. La mezcla se incubó a 37°C durante 15 min y posteriormente la reacción se inactivó a 65°C durante 15 min.

6.9.5 Ligación

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo con la enzima ligasa del fago T4 (Fermentas). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 20 μ L y el protocolo realizado fue el siguiente:

1. A una cantidad de ADN vector de entre 10-40 ng se le añadió una cantidad equimolar de ADN inserto (cuando se requiere integrar un fragmento de ADN a un plásmido es conveniente añadir cuatro veces más inserto que el vector, en una relación molar), se

adicionó agua destilada estéril para alcanzar el volumen final de reacción, se mezcló y se incubó a 65°C durante 5 min.

2. Después de calentar, se enfrió en un baño de hielo y se agregaron 2 µL de tampón de reacción 10X (concentración final 1X) de la enzima. Cuando los extremos a unir son romos se agregan 5 U de ADN ligasa y cuando son extremos cohesivos 1 U de la enzima, para que se lleve a cabo la reacción.

3. La reacción se mezcló bien y se mantuvo a 14°C durante toda la noche. 5 µL de esta reacción fueron suficientes para realizar experimentos de transformación.

6.9.6 Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR)

Esta técnica, universalmente empleada para la amplificación de ácidos nucleicos, se basa en el proceso natural de la replicación del ADN. Este método consta principalmente de 3 pasos, que se describen a continuación:

1) *Desnaturalización*: para realizar la amplificación de un ADN se necesita de un fragmento de ADN blanco o molde, el cual se debe someter a una temperatura de 92 a 96°C con el fin de que las cadenas de ADN se separen y puedan hibridar los cebadores. Las hebras separadas se mantendrán disociadas hasta que la temperatura baje lo suficiente para que se dé el proceso de hibridación.

2) *Hibridación de los cebadores*: los cebadores utilizados son oligonucleótidos sintéticos que se unen al ADN blanco en puntos distintos y son los que delimitan el fragmento que se quiere amplificar. Cada uno de los cebadores es complementario a una de las cadenas del ADN blanco y su diseño es tal que quedan enfrentados por sus extremos 3' tras la unión a la molécula de ADN molde.

La asociación de los cebadores a la cadena de ADN blanco se ve favorecida sobre la renaturalización de la doble cadena de ADN, en el momento del descenso de la temperatura, por la mayor concentración de los dos cebadores. La temperatura óptima para la hibridación está determinada por la composición de nucleótidos de los dos cebadores (por esto es importante el equilibrio porcentual en la composición de los mismos).

3) *Elongación a partir de los cebadores*: el último de los pasos consiste en la polimerización del fragmento que se quiere amplificar. Las condiciones en las cuales se desarrolla este proceso dependen de la ADN polimerasa empleada para la amplificación. El

resultado de este proceso es una cadena de ADN que en sus extremos contiene las secuencias de los cebadores. La velocidad de elongación también depende estrictamente de la enzima utilizada, de manera normal se necesitan 2 minutos de amplificación para cada kpb.

En la técnica de reacción en cadena de la ADN polimerasa los tres pasos anteriormente descritos conforman un ciclo, el cual se repite de 20 a 30 veces a lo largo de un proceso completo de amplificación. A partir del tercer ciclo se empieza a acumular, en forma exponencial, el producto de interés. Esto es así porque, a medida que aumenta el número de ciclos, el producto amplificado pasa a ser también una molécula blanco a la que se unirán preferentemente los cebadores. Durante la reacción se obtienen también otros productos distintos, los denominados productos largos, aunque estos no interfieren al no estar sujetos a la amplificación exponencial.

La temperatura a la que se realiza el paso de la hibridación de los cebadores y la duración del paso de la elongación, así como la adición de determinados compuestos químicos a la mezcla de reacción, son parámetros modificables en función de la especificidad de los cebadores.

6.9.6.1 PCR estándar

Esta técnica fue empleada para identificar los genes de las proteasas, tirosinasas y el promotor *Ppki*. Para la obtención de fragmentos codificados mediante la técnica de PCR inverso se utilizó el kit comercial Genome Walker (Promega), se digirió el ADN de *A. rouxii* con cuatro enzimas diferentes (*DraI*, *EcoRV*; *PvuII* y *StuI*) y se llevó a cabo la reacción, con los cebadores comerciales del kit (AP1 y AP2). Todos los cebadores diseñados y empleados con en este trabajo se mencionan en la sección 6.14.1.1.

En un microtubo de 200 μ L, en un baño de hielo, se agregaron los siguientes reactivos:

	Volumen (μL)
ADN molde (20-30 ng)	10
Tampón de reacción 10X	5
MgCl ₂ (50 mM)	3
Mezcla de nucleótidos (20 mM)	2
Cebador 1 (20 μM)	2
Cebador 2 (20 μM)	2
H ₂ O estéril	25.75
ADN polimerasa (5 U μL)	0.25

A continuación, el microtubo de 0.2 mL se mezcló bien en un vórtex y se colocó en un termociclador Mastercycler Personal Eppendorf^{MR} con el siguiente programa:

Paso 1: 94°C	6 minutos
Paso 2: 94°C desnaturalización	3 minuto
Paso 3: 55°C hibridación	1 minuto
Paso 4: 72°C elongación	2 minutos

Los pasos del 2 al 4 se repiten de 20 a 30 veces. Después de terminada la amplificación, los productos se pueden identificar mediante electroforesis. La temperatura de hibridación se maneja de acuerdo a la T_m de los cebadores utilizados en su momento.

6.10 ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA

Para realizar la electroforesis se usó el método descrito por Sambrook y Russell (2001), el cual consiste en los siguientes pasos:

1. La cantidad de agarosa empleada para la elaboración del gel va a depender del tamaño de los fragmentos de ADN que se quieran analizar (**Tabla 2**).

Tabla 2. Concentración de agarosa utilizada en los geles de acuerdo al tamaño de ADN

Concentración de agarosa (p/v)	Tamaño de los fragmentos de ADN
0.3	5-60 kpb
0.5	1-30 kpb
0.7	0.8-12 kbp
1.0	0.5-10 kpb
1.2	0.4-7 kpb
1.5	0.2-3 kpb
2.0	0.05-2 kpb

2. Para elaborar el gel, la agarosa se disolvió en tampón TAE 1X, calentando en microondas hasta ebullición. Una vez que la agarosa alcanzó una temperatura aproximada de 45°C se vertió en un molde para que solidificara el gel.

3. Las mezclas de ADN se mezclaron con 1/10 de volumen de tampón de carga concentrado 6X, se calentaron durante 5 min (en un Thermomixer 5436, Eppendorf), enfriándose posteriormente en un baño de hielo durante 3 minutos.

4. El ADN se cargó en el gel y la electroforesis se realizó utilizando como tampón TAE 1X o TBE 0.5X. Siempre se debe tener en cuenta que la carga eléctrica del ADN es negativa y por consiguiente migrara hacia el polo positivo. El voltaje que se aplicó para el corrimiento electroforético es de 5 volts/cm, tomando como referencia la distancia que existe entre el polo positivo y el negativo en la cámara de electroforesis.

5. La tinción del ADN se realizó en una solución de bromuro de etidio con una concentración final de 0.5 µg mL⁻¹. El bromuro de etidio se intercala entre las moléculas de ADN y al exponerse a luz ultravioleta se genera fluorescencia detectable, que permite visualizar el ADN. El ADN en los geles se visualizó con un transiluminador Gel-Doc (Bio-Rad 2000).

Los marcadores de tamaño molecular que se usaron como referencia para determinar el tamaño del ADN plasmídico, o de fragmentos resultantes de cortes con

enzimas de restricción, fueron λ HindIII, GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas), DNA Ladder 1 kb (Promega), se muestran en la **figura 6**.

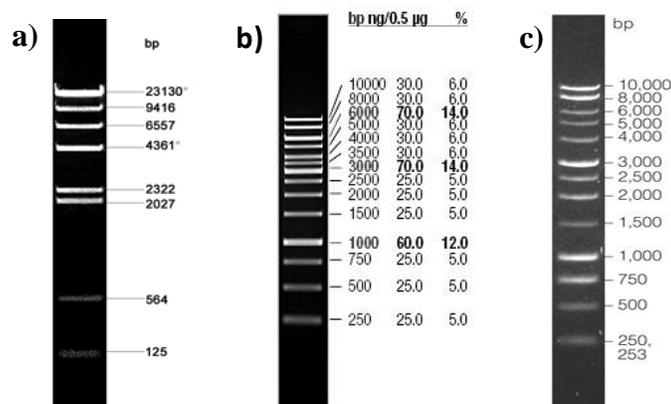


Fig. 6. Marcadores de peso molecular empleados para geles de agarosa. a) λ HindIII; b) GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas); c) DNA Ladder 1 kb (Promega).

6.10.1 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de ADN de interés se cortaron del gel de agarosa y se purificaron con el kit QIAEX II Gel Extraction System (Qiagen) y la purificación directa de fragmentos de ADN amplificados por PCR: Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega). Ambos procedimientos se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

TAE 50X: 57.1 mL de ácido acético glacial, 100 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0, 242 g de Tris base y agua destilada hasta completar un litro.

Tampón de carga 6X: Azul de bromofenol al 0.25% (p/v), Sacarosa al 40% (p/v) y Xileno cianol al 0.25% (p/v). Se esteriliza durante 20 minutos. Se conserva a 4°C para evitar el crecimiento de microorganismos.

Bromuro de etidio: se prepara una solución 10 mg mL⁻¹ en agua y se conserva a 4°C. Para un litro de agua destilada se requieren de 50 µL de esta solución.

6.11 FRACCIONAMIENTO DEL ADN EN GRADIENTES DE SACAROSA

Esta técnica se utilizó para seleccionar fragmentos de ADN de un tamaño adecuado para la construcción de bibliotecas genómicas a partir de digestiones parciales del ADN total de *A. rouxii*. El método seguido fue el descrito por Ausubel *et al.* (1987).

1. Se prepararon 10 mL de un gradiente lineal de sacarosa entre el 10% y 40% en un tubo de ultracentrifuga. Para ello se depositaron 4 mL de la solución de sacarosa al 40% en el fondo del tubo, añadiéndose por encima con mucho cuidado 4 mL de la solución de sacarosa al 10%. El tubo se selló con Parafilm® y se mantuvo en posición horizontal durante cinco horas, sin movimiento alguno.
2. Una vez realizadas las digestiones parciales del ADN total de *A. rouxii* con la enzima de restricción *Sau3AI*, se seleccionó el tamaño de ADN requerido (15 kpb) a partir de la digestión, calentándose 5 min a 65°C antes de cargarlo al gradiente (esto permite disociar las uniones entre extremos cohesivos del ADN que se hubieran podido formar y que podrían interferir con el fraccionamiento correcto de las moléculas a lo largo del gradiente).
3. Se cargó muy cuidadosamente el ADN en la parte superior del gradiente y se centrifugó a 22°C y 35,000 rpm en un rotor SW-41 (Ultracentrifuga Beckman) durante 8 horas.
4. Transcurrido el tiempo se introdujo con cuidado en el fondo del tubo un capilar estéril conectado a una manguera limpia, a su vez acoplada a una bomba peristáltica (para limpiarla se pasaron a través de ella 50 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0, 50 mL de etanol absoluto y 50 mL de H₂O_d estéril, en ese orden). La obtención de las fracciones se consiguió con un flujo lento y constante, colectándose volúmenes de 500 µL del gradiente. Las primeras fracciones obtenidas poseyeron una concentración de sacarosa cercana al 40% decreciendo ésta de modo gradual a medida que aumentó el número de fracciones obtenidas.
5. Se mezclaron 10 µL de cada fracción con 40 µL de agua destilada estéril y 5 µL de tampón de carga concentrado. Se calentaron las muestras durante 5 min a 65°C, se enfriaron 2 minutos en un baño de hielo y agua y se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.3% (p/v) en tampón TAE.
6. Una vez seleccionadas las fracciones con los tamaños de interés, se diluyó cada una de ellas con TE hasta que la sacarosa quedó en la muestra en una concentración aproximada

del 10% (**tabla 3**), precipitándose el ADN con 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol frío.

7. Se recuperó el ADN por centrifugación; el precipitado se lavó con etanol al 70% (v/v), se secó y se resuspendió en un volumen de 10 µL.

Solución de sacarosa al 10%/sacarosa al 40%: EDTA 5 mM; NaCl 1 M, Sacarosa al 10%/40% (p/v) y Tris-HCl 20 mM pH 8.0. Se esteriliza en autoclave durante 20 min.

Tabla 3. Fracciones colectadas a partir del gradiente de sacarosa y volúmenes utilizados en los procesos posteriores de purificación.

No de fracción	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
% de sacarosa	40	38.4	36.8	35.2	33.6	32.1	30.5	28.9	27.3	25.7
Volumen de TE (µL)	1,500	1,420	1,340	1,260	1180	1,105	1,025	945	865	785
Acetato sódico 3 M (µL)	200	192	184	176	168	160	152	144	136	128
Etanol absoluto frío (µL)	4,400	4,224	4,048	3,872	3696	3,530	3,354	3,178	3,002	2,826

No de fracción	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
% de sacarosa	24.2	22.6	21.0	19.4	17,8	16.3	14.7	13.1	11.57	10
Volumen de TE (µL)	710	630	550	470	390	315	235	155	75	0
Acetato sódico 3 M (µL)	121	113	105	97	89	81	73	65	57	0
Etanol absoluto frío (µL)	2,662	2,486	2,310	2,134	1,958	1,792	1,616	1,440	1,264	1,100

6.12 ENCAPSIDACIÓN “in vitro” DE ADN DE LOS BACTERIÓFAGOS RECOMBINANTES

La reacción de encapsidación se realizó de la siguiente forma:

1. Se sacaron del congelador (-70°C) un tubo con el extracto de la cepa AI88A (colas preformadas) y otro con el extracto de la cepa AI89B (cabezas preformadas) y se dejó que se descongelaran lentamente en hielo (estos componentes están incluidos en el sistema Gigapack II Gold (Stratagene)).
2. Se añadió el ADN (4-7 µL) que se quiere encapsidar al tubo que contiene el extracto de la cepa AI88A, e inmediatamente se transfirieron a este mismo tubo 15 µL del extracto de la cepa AI89B. Se mezcló suavemente con la micropipeta, sin introducir burbujas de aire.
3. Se centrifugó durante 5 segundos para que todo el contenido se situara en el fondo del tubo y se mantuvo durante dos horas a 20°C.

4. Transcurrido el tiempo se añadieron 500 µL de tampón SM y 10 µL de cloroformo, se mezcló y se centrifugó brevemente para eliminar los residuos celulares. La suspensión de fagos obtenida se infectó en la cepa de *E. coli* XL-Blue MRA (P2). El resultado de esta infección determinaría si el número de bacteriófagos obtenido fue significativamente representativo del genoma completo del hongo. Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - F)}$$

Esta ecuación, relaciona el número de clones recombinantes obtenidos (N) con la probabilidad de que un determinado gen se encuentre integrado dentro de algunos de esos clones (P) y con la fracción del genoma contenido en cada unidad de recombinación (se define F al cociente entre el tamaño medio de los insertos integrados en el vector y el tamaño total del genoma que se pretende clonar).

5. La biblioteca genómica encapsidada es estable durante largos periodos de tiempo, pudiéndose conservar a 4°C durante varios meses (en tampón SM con un 1% (v/v) de cloroformo) o durante varios años a -70°C (añadiendo 7% (v/v) de DMSO a la solución de mantenimiento).

Tampón SM: Gelatina 0.01% (p/v), MgSO₄ 10 mM, NaCl 100 mM y Tris-HCl 50 mM pH 7.5.

6.13 CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pGpdPki-RNAi

El plásmido pGpdPki-RNAi (**figura 7**) se construyó de la siguiente manera: el cassette de resistencia a fleomicina (Pgdh::ble::Tcyc) fue obtenido del plásmido pRANPb (García-Rico *et al.*, 2007) por digestiones con las endonucleasas *KpnI* y *EcoRI* e insertado en el plásmido pLITMUS28i (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) para generar el plásmido pLgbc. El sitio de restricción *NcoI* entre el promotor *Pgdh* y el gen *ble* fue eliminado por mutagenesis *in vitro*, y el cassette de resistencia a fleomicina fue extraído de pLgbc con la enzima *XhoI* e insertado al plásmido pJL43b1 (Gutiérrez *et al.*, 1997) que lleva el promotor *gpd* de *A. nidulans* (Pgpd::ble::Tcyc) para dar origen al plásmido pB1gbc. El promotor *pki* fue amplificado a partir de ADN total de *A. niger* con los primers PpkiF y

PpkiR, los cuales poseen sitios de restricción en sus extremos para *EcoRI* y *NcoI*, respectivamente. El fragmento amplificado *Ppki* fue purificado y digerido con las enzimas *EcoRI* y *NcoI* y ligado al plásmido pB1gbc, para generar el plásmido pGpdPki-RNAi, el cual contiene los promotores *Pgpd* y *Ppki*, en sentido opuesto y enfrentados, separados por un sitio de restricción *NcoI*, así como el marcador de resistencia a fleomicina para la selección en hongos.

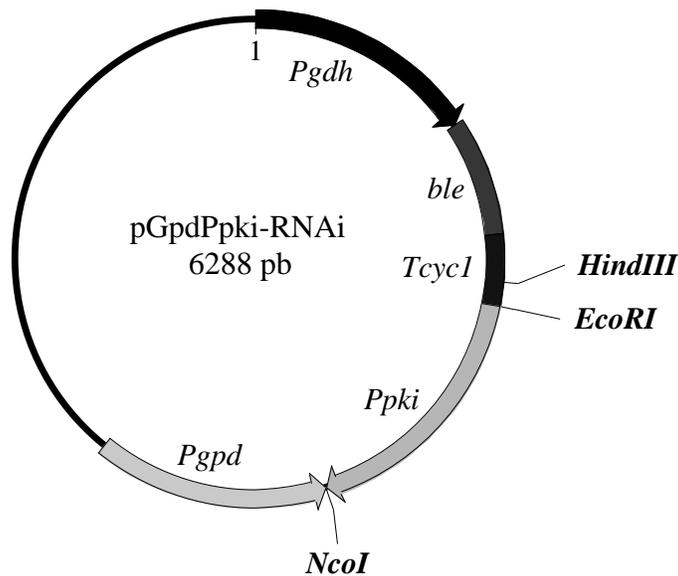


Fig. 7. Vector pGpdPki-RNAi utilizado para el silenciamiento de genes, con los promotores *Pgpd* y *Ppki*, en sentido opuesto y enfrentados, separados por un sitio de restricción *NcoI*.

6.14 TRANSFORMACIÓN DE MICROORGANISMOS

6.14.1. Transformación de *Escherichia coli*

6.14.1.1 Preparación de células electro-competentes

La electroporación se basa en la exposición de las células a una carga eléctrica elevada, que desestabiliza la membrana de las bacterias e induce la formación de poros transitorios por donde el ADN se introduce. En la preparación de las células para ser usadas en este método, sólo fueron lavadas con una solución de glicerol, para eliminar todas las

sales (Neuman *et al.*, 1982). Se emplearon células de las cepas *E.coli* XL1-Blue MR y DH5 α . El protocolo se describe a continuación (Sambrook y Russell, 2001):

1. En una caja de Petri con medio LA se sembraron, por estría cruzada, las células a utilizar, procurando obtener colonias aisladas.
2. Se seleccionó una colonia aislada, con la cual se inoculó un matraz de 500 mL con 100 mL de medio TB. Se incubó a 37°C con una agitación de 250 rpm, hasta que el cultivo alcanzó una lectura de 0.6 a 0.9 a 600 nm. En ese momento, se transfirió el cultivo a 4°C, en un baño de hielo, durante 20 min.
3. Se recogieron las células por centrifugación en un rotor Beckman F0650 a 4,000 rpm durante 15 minutos, a 4°C.
4. Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en un volumen de solución de lavado fría (4°C). A continuación se centrifugó bajo las mismas condiciones del paso anterior.
5. Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 0.5 volúmenes de solución de lavado fría a 4°C, tomando como referencia el volumen inicial. Se centrifugó en las mismas condiciones que en el paso 3.
6. Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en una cantidad de solución de lavado fría a 4°C. Se recogieron las células por centrifugación bajo las condiciones señaladas en los pasos anteriores.
7. Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en una cantidad de solución de lavado fría a 4°C que permitiera obtener una concentración celular final de $1-3 \times 10^{11}$ células mL⁻¹. Posteriormente se repartió la suspensión celular en alícuotas de 50 μ L.
8. Si se desea conservar las células electro-competentes por un largo período, éstas se congelan inmediatamente con nitrógeno líquido y se guardan a -70°C.

6.14.1.2 Transformación por electroporación

Este método fue originalmente desarrollado para la introducción de ADN a células eucarióticas (Neuman y Rosenheck, 1972; Neuman *et al.*, 1982), siendo posteriormente adaptado para bacterias (Dower *et al.*, 1988). Es un método muy eficiente, rápido fácil y con un alto porcentaje de reproducibilidad en la transformación de células bacterianas.

El protocolo utilizado es el descrito por Sambrook y Russell (2001), describiéndose a continuación los pasos realizados:

1. Se descongelaron las células electro-competentes en un baño de hielo; una vez descongeladas se mezclaron con 1 μL de ADN (aproximadamente 25 ng).
2. Inmediatamente después de mezclar, se depositó la mezcla ADN-células en una cubeta para electroporación fría (0-4°C). A continuación, se insertó en el equipo de electroporación programado para 1250 volts y 10 μF de capacitancia, aplicándose una descarga eléctrica durante aproximadamente 5 milisegundos (la descarga eléctrica va a depender de la distancia entre los electrodos en la cubeta de electroporación).
3. Se adicionaron de forma inmediata a la cubeta de electroporación 800 μL de medio LB y toda la mezcla se depositó en un microtubo de 1.5 mL, incubándose a 37°C durante una hora, con agitación de 250 rpm.
4. Una alícuota de la transformación se extendió en una caja de Petri que contenía medio LA con antibiótico y las cajas fueron incubadas a 37°C durante aproximadamente 12 horas.

La concentración final de los antibióticos en el medio de cultivo para poder seleccionar transformantes fue descrita por Sambrook y Russell (2001); 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ampicilina, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para kanamicina, 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cloranfenicol y 12.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para el caso de tetraciclina.

6.14.2 Transformación de *Amylomyces rouxii*

El proceso de transformación para este hongo se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado por Ohnuki *et al.*, (1982) y Montiel (2005), con algunas modificaciones. En las secciones siguientes se detallan los procedimientos.

6.14.2.1 Condiciones de cultivo

Las esporas de *A. rouxii* propagadas en matraces con PDA y lavadas dos veces con 30 mL de agua destilada estéril, se utilizaron para inocular 100 mL de medio PMY con 5×10^6 esporas mL^{-1} , las cuales se incubaron 3.5 h a 30°C con agitación de 200 rpm.

Las esporas se recuperaron nuevamente por centrifugación a 5,000 rpm en un rotor Beckman F0650 durante 20 min y se lavaron con NaCl 0.9% (p/v), recuperándose por centrifugación en cada lavado.

6.13.2.2. Elaboración de protoplastos

Las esporas precipitadas se resuspendieron en 50 mL de tampón SCS suplementado con DTT (1 mM), y se incubó la mezcla durante 2 h a 30°C, con agitación de 200 rpm.

Tampón SCS: Sorbitol 0.4 M; ácido cítrico 22 mM; fosfato de sodio 55 mM, pH 5.6

Transcurrido el tiempo, se concentraron nuevamente las esporas por centrifugación y se resuspendieron en 10 mL de tampón SCS. Se colocó la mezcla en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se adicionaron otros 10 mL de tampón SCS con 60 mg de enzimas líticas de *Trichoderma* (Sigma) disueltas en el mismo tampón y esterilizadas por filtración. La mezcla se incubó a 25°C durante 3 h, a 200 rpm. Durante este tiempo, se realizaron observaciones al microscopio para controlar la liberación de los protoplastos formados.

Transcurrido el tiempo de formación de los protoplastos, la suspensión que los contenía se centrifugó durante 10 min a 4,500 rpm en el rotor Beckman F0650, el precipitado se lavó tres veces con 10 mL de tampón SCM y en cada lavado se recuperó el precipitado por centrifugación a 2,500 rpm en un rotor Beckman F1010 durante 3 minutos.

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

6.14.2.3. Transformación

La transformación se realizó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL estéril donde se colocaron:

Suspensión de protoplastos	100 µL
ADN plasmídico (1-10 µg)	10 µL

La mezcla se homogenizó perfectamente con una pipeta y se mantuvo en hielo durante 20 min. Posteriormente se adicionaron 500 µL de tampón PCM, se mezcló y se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 min. Por último se le adicionaron 600 µL de

tampón SCM, se mezcló cuidadosamente y se mantuvo a temperatura ambiente hasta el momento de pasar la mezcla a las placas.

Tampón SCM: CaCl₂ 50 mM; Sorbitol 0.4 mM; MOPS 10 mM, pH 6.3

Tampón PCM: CaCl₂ 50 mM; MOPS 10 mM, pH 6.3; PEG 40% (p/v)

En cajas de Petri desechables estériles con una base de 5 mL de medio Czapek/sorbitol y 200 µg/µL de fleomicina (concentración inhibitoria para *A. rouxii*), se extendió en forma de cobertera la siguiente composición:

Mezcla de transformación	300 µL
Fleomicina (10 mg/mL)	100 µL
Medio Czapek/sorbitol a 45°C	5 mL

Se dejó solidificar la cobertera y las cajas se incubaron a 20°C durante 4 días.

El control negativo fue una caja de Petri con medio Czapek/sorbitol y fleomicina, inoculada con los protoplastos del hongo sin transformar. El control de regeneración se realizó con los protoplastos del hongo sin transformar en medio Czapek/sorbitol sin fleomicina.

Las colonias del hongo que aparecieron en las cajas con medio Czapek/sorbitol con el antibiótico fueron consideradas transformantes con el plásmido pGpdPki-RNAi. Sin embargo, las colonias seleccionadas se sometieron a una segunda resiembra bajo las mismas condiciones, con la intención de descartar a aquellas que no poseyeran el plásmido (falsos positivos) debido a que la concentración del antibiótico no fuera la adecuada.

6.15 Reactivos y equipos

6.15.1 Reactivos para biología molecular

6.15.1.1. Ácidos nucleicos

El ADN del bacteriófago lambda digerido con *Hind*III y el marcador GeneRuler TM 1 Kb DNA Ladder (comercial) fueron utilizados como marcadores de tamaño en los geles de electroforesis.

Los oligonucleótidos empleados como cebadores (primers) en los experimentos de análisis de secuencias de ADN, así como los demás oligonucleótidos utilizados a lo largo de este trabajo fueron sintetizados en el Instituto de Biotecnología-UNAM. La secuencia de los cebadores utilizados se indican a continuación:

JF 5'- TTC CCY ACY TGG CAY CGY CCY TAY -3'

JR 5'- VAR ACG RTC RAC GTT RGC RTG RTG -3'

JF TYR 5'- TTY CCD ACY TGG CAY CGK TAY -3'

JR TYR 5'- RTG GTG CAR CMA GAA RAT NGG RTC -3'

F TYR 5'- CGG GAA TTC TTG TTY CCY ACY TGG CAY CGT CCY -3'

R TYR 5'- CGG GAA TTC GTG GTG GAG CCA GAA AAT AGG ATC -3'

TYR FJ1 5'- TTY TTC CAR ATY GGW GGB ATY CAY-3'

TYR RJ1 5'- RTG RTG CAR RAA GAA RAT DGG RTC -3'

TYR FJ2 5'- TAC TWC CAR ATY GCH GGY ATY CAY

TYR RJ2 5'- RTG RTG SAR CCA GAA MAG VGG RTC

Oligonucleótidos para obtener el gen de tirosinasa mediante PCR inverso:

F inv TYR 5'- RGG ACG RTG CCA RGT RGG RAA CAA-3'

R inv TYR 5'- GAT CCT ATT TTC TGG CTC CAC CAC-3'

Para el gen de la proteasa de *A. rouxii*:

aspF 5'- GTC TCC ATG GAC TGG TTC TTC TGA TTT GTG GTT T -3'

aspR 5'- GCA TCC ATG GAA AGA CAA CAT AGT TGT TCT TCA A -3'

aspF6 5'- TAT TCC ATG GTG GTC CAT CTC CTA CGG TGA TGG -3'

aspF6 5'- GCT GCC ATG GCA AGA GTG TGG TAC CAG TAT CAA G -3'

Para el promotor piruvato kinasa (*Ppki*) de *A. niger*:

5'- AAC AGA **ATT** CAA ATG GAA GAG AAA ACC TCC G -3'

5'- ATA GCC **ATG** GTG ATT GAT CTC TAC TGA ACC G -3'

6.15.1.2 Antibióticos

Se utilizó ampicilina para la selección de los plásmidos en *E. coli* y fleomicina (Sigma) para la transformación del hongo.

6.15.1.3 Enzimas

Para este trabajo las enzimas de restricción que se utilizaron fueron ***EcoRI***, ***NcoI***, ***KpnI***, ***Sau3AI***, de Invitrogen y Fermentas.

Otras enzimas utilizadas fueron **ADN ligasa del fago T4** y **ARNasa** de Invitrogen y para la reacción de PCR, **Ventr[®] polimerasa** (Fermentas), **Elongase[®] Enzyme Mix** (Invitrogen) y ***Pfu* polimerasa** (Fermentas).

Las enzimas líticas usadas en la obtención de protoplastos se adquirieron de Sigma.

6.15.1.4 Sistemas comerciales para manipulación de ADN

En su momento se utilizaron sistemas comerciales para facilitar los procedimientos del trabajo, como:

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

Purificación directa de fragmentos de ADN amplificados por PCR: Wizard[®] PCR Preps DNA Purification System (Promega)

PCR inverso para obtención de regiones desconocidas de genes: GenomeWalker[™] Universal Kit.

Vector de clonación para la construcción de la biblioteca genómica de *A. rouxii*: Lambda DASH[®] II.

6.15.2 Equipos

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

Analizador de imágenes Gel Doc 2000 (BIO-RAD)
Autoclave, All American
Balanza analítica (Ohaus Corporation, Explorer)
Baños con temperatura controlada (LAB-LINE AQUABATH)
Biofotómetro (Eppendorf)
Bomba de vacío (Waters, Millipore)
Cámara de electroforesis (EC370M, Mini cell®)
Cámara de electroforesis (Mini protean III, Bio-rad)
Cámara de Neubauer, Boeco
Campana de seguridad química
Campanas de flujo laminar (VECO, S.A de C.V.)
Centrífugas refrigeradas (Beckman Avanti™ 30 y Eppendorf 5415R)
Colector de fracciones (BIO-RAD)
Congeladores de -20° y -80°C (REVCO y Forma scientific)
Electroporador 2510, Eppendorf
Espectrofotómetro (Shimadzu UV1201; RAYLEIGH, UV-1800)
Estufa, Binder
Fuentes de poder PowerPac 300 (Bio-Rad)
Horno de hibridación (Hybaid)
Incubadoras (20°-40°C), con y sin agitación (LAB-LINE Instrument, INC)
Liofilizadora (LABCONCO, FREEZE DRY SYSTEM LYPH.LOCKR 4.5)
Microcentrífugas (Eppendorf 5415C)
Microondas (Sanyo)
Micropipetas (Gilson)
Microscopio óptico (Olympus CH30)
Parrillas con agitación magnética (Cimarec 2, Termoline)
Potenciómetro (ORION 525^a)
Rotofor® cell (Bio-Rad)
Sistemas de purificación de agua Milli-Ro y Milli-Q (Millipore)
Sonicador (Branson, 1210, Ultrasonics)
Termociclador (Eppendorf Mastercycler Personal)
Thermomixer (Eppendorf modelo 5436)
Transiluminador (UVP)
Vórtex (Thermolyne Maxi Mix II 37600)

VII. RESULTADOS

7.1 ESTUDIOS BIOQUÍMICOS DE LA FENOLOXIDASA PRODUCIDA POR *A. rouxii*

7.1.1 Determinación de actividad tirosinasa en extractos de *A. rouxii*

Los primeros experimentos de este trabajo se realizaron para determinar la actividad de tirosinasa extra e intracelular durante el crecimiento de *A. rouxii* en cultivo sumergido, usando medio Melin-Norkrans suplementado con 0.1 g L⁻¹ de tirosina y 12.5 mg PCF L⁻¹, este último adicionado a las 48 h para evitar la inhibición de la germinación de las esporas (Tomasini *et al.*, 1996).

Se observó el efecto de ambos compuestos sobre el crecimiento y la actividad enzimática. En lo que se refiere al crecimiento, la biomasa producida fue similar en el cultivo con tirosina y PCF que en el control sin los compuestos (**Fig. 8A**). La máxima producción de biomasa fue de 3.74 mg mL⁻¹ en el medio M-N sin suplementar, mientras que en presencia de tirosina y PCF se obtuvieron 3.65 mg mL⁻¹. Como ya se había determinado en estudios previos, la tirosina parece no tener un efecto como componente nutricional en el medio que pudiera promover la aparición de mayor cantidad de biomasa fúngica (Montiel *et al.*, 2004) y, con ello, un incremento de las actividades enzimáticas en estudio.

Los resultados mostraron que la tirosina y el PCF incrementaron la actividad mono y difenolasa extracelular durante las 48 h de cultivo, cuando se emplearon fenol y L-dopa como sustratos; después de ese tiempo, las diferencias fueron menores. La máxima actividad extracelular monofenolasa fue de 0.028 U mL⁻¹ y la difenolasa fue de 1.43 U mL⁻¹ en 48 h, en cultivos con tirosina y PCF (**Fig. 8B y C**). La actividad monofenolasa extracelular fue cuatro veces mayor en cultivos con tirosina y PCF, que en los controles (**Fig. 8B**), mientras que la actividad difenolasa fue 1.4 veces superior en los cultivos suplementados (**Fig. 8C**).

Montiel *et al.* (2004) estudiaron el efecto de la tirosina y el PCF en la actividad monofenolasa extracelular producida por *A. rouxii*. Estos autores encontraron que en cultivos sin tirosina, pero con PCF (12.5 mg L⁻¹), la actividad monofenolasa era 1.7 veces mayor a las 48 h que en los cultivos que presentaban tirosina, sin embargo en cultivos controles sin tirosina y sin PCF no se encontraba dicha actividad.

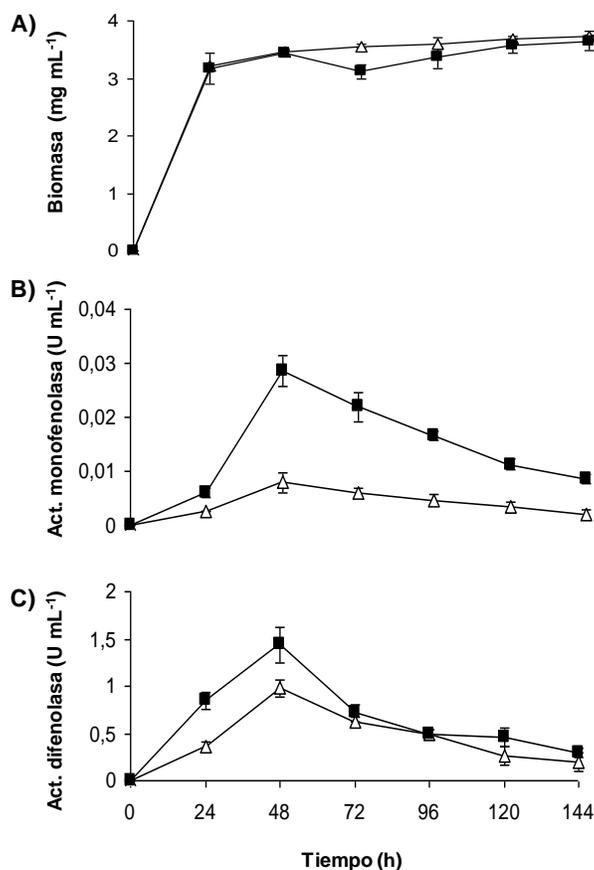


Fig. 8. Actividad tirosinasa extracelular de *A. rouxii* en cultivo líquido. (A) Biomasa; (B) Actividad monofenolasa; (C) Actividad difenolasa. Cultivo control sin tirosina y sin PCF, (Δ) y cultivo suplementado con 0.1 g tirosina L⁻¹ y 12.5 mg PCF L⁻¹, (■).

Respecto a las actividades intracelulares, los resultados indicaron que la máxima actividad monofenolasa fue de 0.3 U mL⁻¹ y la actividad difenolasa de 22 U mL⁻¹ a las 48 h, en cultivos con tirosina y PCF (**Fig. 9A y B**), siendo la actividad monofenolasa dos veces mayor en presencia de ambos compuestos que en los controles (**Fig. 9A**) y la actividad difenolasa 3.1 veces mayor que en los controles sin los compuestos (**Fig. 9B**). Selinheimo *et al.* (2009) demostraron la actividad tirosinasa de los hongos *P. sanguineus* y *A. bisporus* sobre los substrato *p*-cresol, *p*-tirosol, ácido cafeico, pirocatecol y pirogalol.

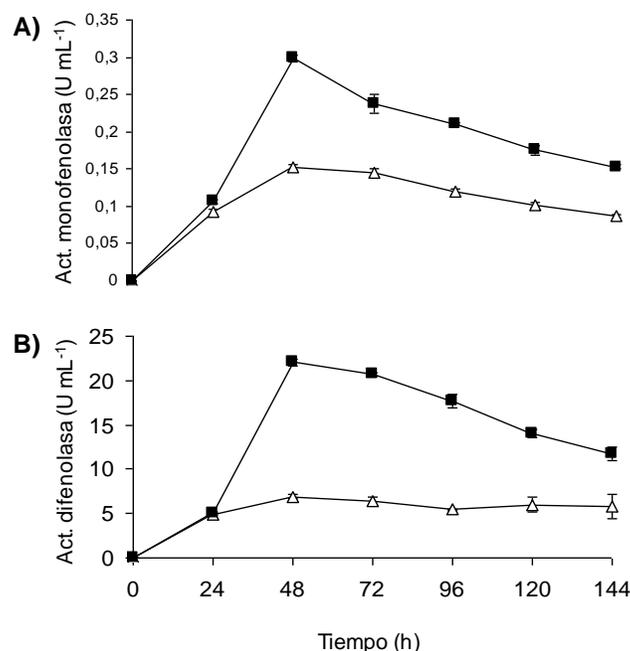


Fig. 9. Determinación de actividad tirosinasa intracelular de *A. rouxii* en cultivo líquido. (A) Actividad monofenolasa; (B) Actividad difenolasa; Cultivo control sin tirosina y sin PCF, (Δ) y Cultivo suplementado con 0.1 g tirosina L⁻¹ y 12.5 mg PCF L⁻¹ (■).

Las máximas actividades mono y difenolasa intracelulares se obtuvieron en presencia de tirosina y PCF a las 48 h de cultivo, con una diferencia significativa respecto de los controles (en la misma forma en la que se comportaron las actividades extracelulares). Un estudio realizado por Gukasyan (1999) reportó el efecto de la lignina sobre el crecimiento y la actividad tirosinasa de *Aspergillus*, demostrando que la tirosinasa de este hongo incrementa su actividad rápidamente cuando la lignina se añade en mayor proporción que otra fuente de carbono, como la glucosa, a las 48 h de cultivo. León-Santiesteban *et al.* (2008) también reportaron que las actividades monofenolasas intra y extracelular producidas por *Rhizopus oryzae* ENHE se incrementan cuando la tirosina es añadida al medio. Montiel *et al.* (2004) mostraron que el aumento en la actividad monofenolasa se debió al efecto de la tirosina y que no es producido por un efecto indirecto en el crecimiento, ya que al estudiar el efecto de la leucina (aminoácido que no tiene grupos fenólicos) no se incrementa la actividad. Estos autores mostraron, además, que el perfil de crecimiento del hongo en los distintos medios fue similar: la máxima biomasa producida

fue de 2.75, 2.61 y 2.68 mg mL⁻¹ con tirosina, leucina y el control sin aminoácido, respectivamente.

En el presente trabajo, la biomasa obtenida fue similar en el cultivo con tirosina y PCF a la obtenida en el cultivo control, produciéndose 3.5 mg de biomasa mL⁻¹ (**Fig. 6A**). Estos resultados confirman que la actividad mono y difenolasa se puede incrementar con la adición de algunos de sus sustratos, como la tirosina y el PCF.

7.1.2 Obtención de tirosinasa asociada a la pared celular de *A. rouxii*

Diversos estudios han demostrado que fenoloxidasas, como la tirosinasa, obtenidas de diversos hongos como *Neurospora crassa*, *A. niger*, *Pycnoporus sanguineus* (Katan y Galun, 1975; Ichisima *et al.*, 1984, Halouli *et al.*, 2005) se encuentran en la fracción citosólica, aunque parte de esta enzima también se ha encontrado adherida a la pared y/o membrana celular, como ocurre en *Agaricus bisporus* (Sassoon y Mooibroek, 2001; Rast *et al.*, 2003) y *Cryptococcus neoformans* (Zhu *et al.*, 2001). En el presente estudio, se determinó la presencia de tirosinasa adherida a pared y membrana celular. Los resultados indicaron que la tirosinasa de *A. rouxii* se encontró en forma soluble, celular, mostrando una actividad difenolasa de 8.7 U mL⁻¹ en los extractos tratados con diferentes lavados de amortiguador Tris-HCl (0.25 M, pH 8.0) y de 9.3 U mL⁻¹ al ser tratada con digitonina, en cultivos que contenían tirosina y PCF, tal y como se reportó en *Agaricus* donde parte de la tirosinasa estaba presente en membrana (Rast *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos de dichos tratamientos se muestran en la **Fig. 10**.

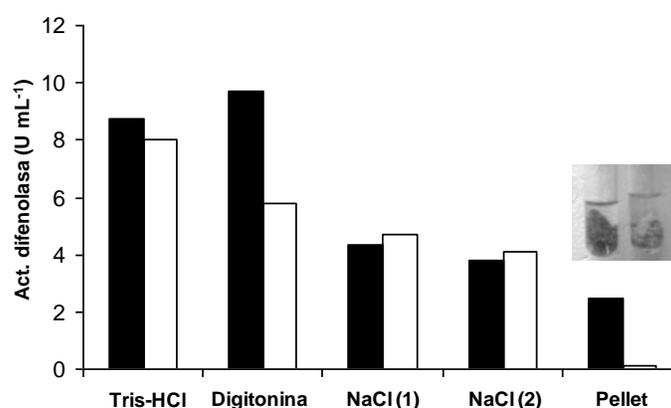


Fig. 10. Determinación de actividad tirosinasa asociada con la membrana y pared celular de *A. rouxii*. La actividad enzimática se realizó utilizando como sustrato L-Dopa (4.2 mM).

Barras negras: medio M-N suplementado con tirosina y PCF; barras blancas: control (medio M-N sin aditivos).

7.2 PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA TIROSINASA DE *A. rouxii*

La purificación parcial de la tirosinasa extracelular se realizó mediante el fraccionamiento con sulfato de amonio al 80% y parcialmente purificada al utilizar dos columnas diferentes de cromatografía de intercambio aniónico (Econo-Pac High Q Cartridge y Bio-Scale Q5), empleando un gradiente de NaCl de 0-0.5 M, para la elución de éstas. En la **tabla 4** se muestran los resultados obtenidos del proceso de la purificación.

Tabla 4. Pasos de la purificación parcial de la tirosinasa de *A. rouxii* y actividades enzimáticas producidas en cada una de la etapas de purificación.

Etapas de purificación	Concentración proteína (mg mL ⁻¹)	Actividad monofenolasa			Actividad difenolasa		
		Actividad Total (U mL ⁻¹)	Actividad específica (U mg proteína ⁻¹)	Factor de purificación (veces)	Actividad total (U mL ⁻¹)	Actividad específica (U mg proteína ⁻¹)	Factor de purificación (veces)
Extracto concentrado	0.068	82.9	1219.7	1	183.5	2701.8	1
80% (NH ₄) ₂ SO ₄	0.055	68.6	1252.7	1.02	150.6	2751.1	1.01
(Econo-Pac High Q)	0.041	54.3	1324.6	1.08	120.9	2951	1.09
(Bio-scale Q5)	0.026	37.1	1454.1	1.19	103.1	4034.6	1.49
Filtración en gel	0.015	22.9	1565.9	1.28	88.5	6061.1	2.24

La primera columna de intercambio aniónico empleada fue la Econo-Pac High Q Cartridge (Bio-Rad); con la cual, se obtuvo un pico con actividad tirosinasa en las fracciones 7 a 13. La **figura 11** muestra la proteína determinada a 280 nm y la actividad tirosinasa.

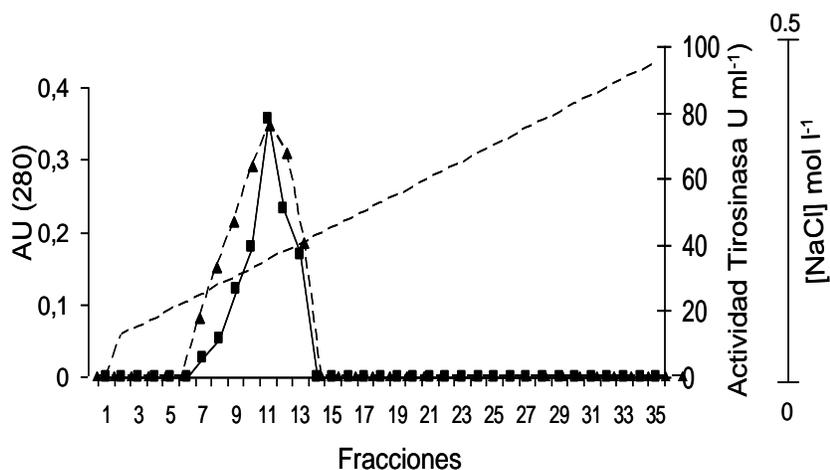


Fig. 11. Fracciones recuperadas de la columna de intercambio aniónico Econo-Pac High Q Cartridge. (▲) Proteína cuantificada a 280 nm (■) Actividad tirosinasa difenolasa determinada con L-Dopa (4.2 mM).

Las fracciones con actividad tirosinasa se juntaron y se inyectaron a la segunda columna de intercambio aniónico (Bio-Scale Q5), la cual tienen una mejor resolución para la separación de proteínas. En este paso de purificación, cuatro fracciones presentaron actividad enzimática para tirosinasa (26-29), siendo la fracción 27 la más activa (**figura 12**).

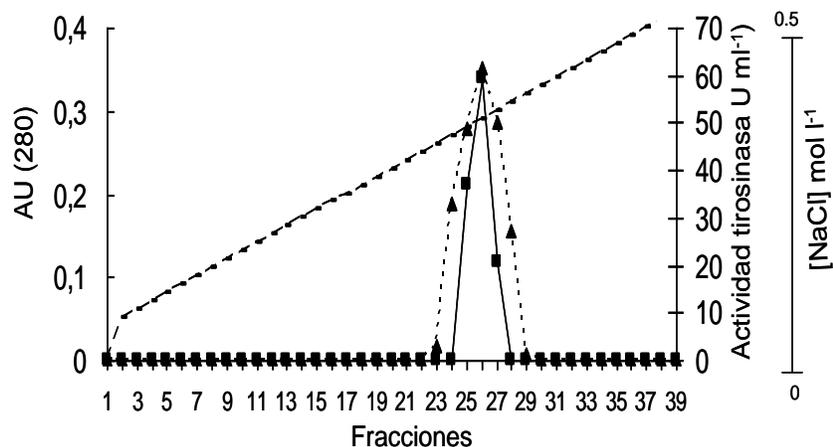


Fig. 12. Fracciones recuperadas de la columna de intercambio aniónico Bio-Scale Q5. (▲) Proteína cuantificada a 280 nm. (■) Actividad tirosinasa difenolasa determinada con L-Dopa (4.2 mM).

Las fracciones con actividad tirosinasa fueron pasadas nuevamente a través de una columna de filtración en gel (1 × 14 cm columna Econopac Bio-gel 10DG desalting), para eliminar el exceso de sales y otras proteínas de la muestra. Se colectaron ocho fracciones de 1 mL y sólo en la fracción 3 se obtuvo actividad enzimática, con un factor de purificación final de 1.28 y 2.24 veces para las actividades monofenolasa y difenolasa, respectivamente. El factor de purificación obtenido fue bajo (2.4), aunque similar al reportado por Selinheimo *et al.* (2006), quienes purificaron la tirosinasa de *Trichoderma reesei*, y al reportado por Halaouli *et al.* (2005) que purificaron la tirosinasa de *Pycnoporus sanguineus* y reportaron un factor de purificación de 2.1 después de realizar cromatografía de intercambio aniónico. Estos autores hicieron una purificación posterior, utilizando una columna de hidroxiapatita y lograron incrementar el factor de purificación a 37.6 veces.

La fracción con la proteína parcialmente purificada se corrió en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE (**Fig. 13**). El resultado de la electroforesis mostró una banda con masa molecular de entre 40 a 45 kDa y otras tres bandas de entre 55 y 65 kDa. La masa molecular de una proteína extracelular de *A. rouxii* reportada por Montiel *et al.*, (2004), obtenida a partir de una semipurificación en columna de filtración en gel, con actividad enzimática para tirosinasa, fue de 43 kDa, similar a la encontrada en este trabajo. Las bandas de mayor masa molecular podrían representar isoformas de la proteína buscada (Wichers *et al.*, 1996; Fan y Flurkey, 2004). Estos datos son muy similares a los obtenidos para las tirosinasas de *P. sanguineus*, 45 kDa (Halaouli *et al.*, 2005); *Pholiota nameko*, 45 kDa (Kawamura-Konishi *et al.*, 2007); *Trichoderma reesei*, 43.2 kDa (Selinheimo *et al.*, 2006); *A. bisporus* y *Portabella*, 43-47 kDa (Wichers *et al.*, 1996; Fan y Flurkey, 2004) y *Lentinula edodes*, 45 y 68 kDa (Sato *et al.*, 2009). Espín y Wichers (1999a) y Espín *et al.* (1999b) y reportaron una proteína de 67 kDa de *A. bisporus* que presentó actividad tirosinasa después de haber sufrido una activación proteolítica con proteasas endógenas del hongo, proteína a la que llamaron tirosinasa latente.

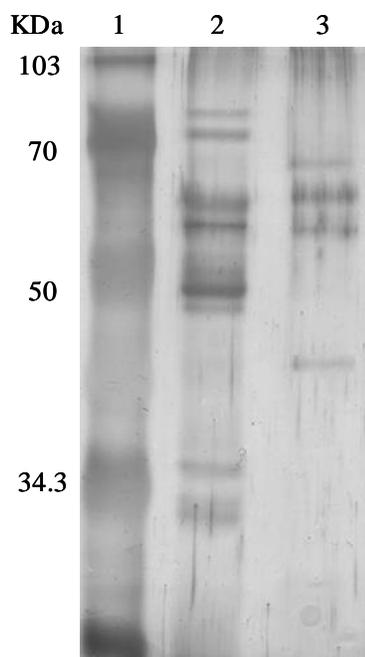


Fig. 13. SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en los pasos de purificación parcial de las proteínas extracelulares producidas por *A. rouxii*. (1) Marcador de peso molecular; (2), tirosinasa comercial; (3) fracción obtenida de la columna de filtración en gel.

7.2.1 Determinación del punto isoeléctrico

El punto isoeléctrico de la enzima extracelular producida por *A. rouxii* se obtuvo empleando un equipo Rotofor (Bio-Rad), con una cámara con capacidad de carga de 60 mL de extracto. Después de 4 horas de llevarse a cabo la separación de proteínas por puntos isoeléctricos se colectaron 20 fracciones, a cada una de las cuales se les midió el pH y la actividad enzimática para tirosinasa. La **figura 14** nos indica que las fracciones con mayor actividad enzimática se obtuvieron en las proteínas que presentaron pI en un rango de 4.5-5.5, similares a los reportados por Fan y Flurkey (2004), quienes encontraron de 3 a 4 isoformas con pI de 4.5 y 5.2 para una tirosinasa de *Portabella*, y Halaouli *et al.* (2005), quienes reportaron cuatro isoformas de *P. sanguineus* con pI de 4.5-5.

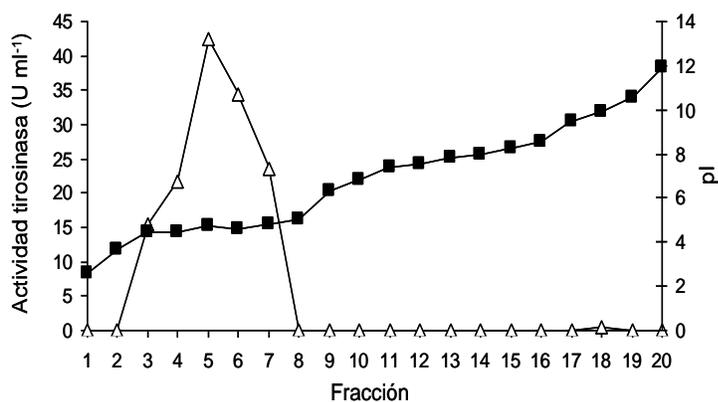


Fig. 14. Determinación del punto isoeléctrico de la proteína extracelular parcialmente purificada de *A. rouxii*. (■) Punto isoeléctrico de la proteínas (Δ) Actividad difenolasa determinada con L-Dopa (4.5 mM).

7.2.2 Actividad tirosinasa sobre diferentes sustratos fenólicos

La actividad de la tirosinasa extracelular y la de la biomasa fue determinada mediante espectrofotometría, utilizando dos monofenoles y cuatro *o*-difenoles como sustratos. Los dos tipos de extracto fueron capaces de hidroxilar monofenoles y oxidar los difenoles utilizados, es decir se demostró que *A. rouxii* produce tirosinasas intra y extracelular. Los resultados permitieron comprobar que la fenoloxidasa secretada por *A. rouxii* se encuentra en forma activa, al tener una importante actividad sobre los diferentes mono y difenoles sustratos utilizados (**Tabla 5**). Espin *et al.* (2000) y Fan y Flurkey (2004), quienes utilizaron tirosinasa comercial de hongo y tirosinasa intracelular extraída de *Portabella*, respectivamente, reportaron resultados similares, con actividad tirosinasa sobre los diferentes sustratos utilizados.

La mayoría de los trabajos, sin embargo, reportan actividad tirosinasa intracelular en hongos y son pocos los autores que han demostrado que las tirosinasas también son secretadas al medio, como son el caso de la de *Trichoderma reesei* y la de *Rhizopus oryzae* ENHE (Selinheimo *et al.*, 2006; León-Santesteban *et al.*, 2008).

Tabla 5. Actividad monofenol y difenol oxidasa de extractos extra e intracelulares obtenidos a partir de *A. rouxii*.

	Extracelular (U mL ⁻¹)	Intracelular (U mL ⁻¹)
<u>Monofenoles</u>		
L-tirosina	57	38
<i>p</i> -cresol	80	180
<u>Difenoles</u>		
Catequina	72,5	82,5
L-Dopa	67	225
Catecol	975	875
4- <i>tert</i> - Butilcatecol	666	2233

7.2.3 Secuenciación de la proteína parcialmente purificada de *A. rouxii*

Ya visualizadas las bandas de las proteínas extracelulares de *A. rouxii* en un gel de acrilamida y teñidas con azul de Comassie, se secuenció el extremo amino terminal, de las bandas que correspondían a los tamaños de 35, 40 y 80 kDa (tamaños promedios reportados para las tirosinas), mediante la técnica de degradación de Edman. Las tres bandas presentaron problemas durante la secuenciación, ya que en el primer ciclo de la secuencia se observaron prácticamente todos los aminoácidos en cantidades similares y en el segundo aumentaron casi todos en la misma proporción (a excepción de la G y la L, que aumentaron más que los otros); en el resto de los ciclos también hubo aumento en casi todos los aminoácidos con muy pocas diferencias entre ellos, lo que impidió interpretar la secuencia de las muestras.

El no haber obtenido la secuencia peptídica se pudo deber a que el tamaño de estas proteínas se convierten en un problema cuando no se pueden obtener en “buena” cantidad, sobre todo si se tienen en cuenta las pérdidas durante la transferencia a la membrana de PVDF: para una proteína de 40 kDa se requerirían al menos 20 microgramos o lo equivalente a 500 picomoles y para una de 80 kDa como mínimo 250 picomoles, para obtener unos 15 residuos o más.

Aunque durante el análisis de la banda de 40 kDa aparentemente no hubo errores, los resultados tampoco fueron los esperados, ya que en varios de los ciclos se observaron

aumentos similares en varios aminoácidos. Aún así, se lograron obtener 16 residuos con la siguiente composición de aminoácidos GTGSVPCTYNNCNREY, que se analizaron con el programa informático Protein BLAST. El resultado del análisis de dicha secuencia fue el siguiente:

Protein BLAST (GTGSVPCTYNNCNREY) vs. fungi (taxid:4751) 17oct08 ->

```
>sp|P43231|CARP2_RHINI Rhizopuspepsin-2 precursor (Aspartate
protease)
emb|CAA40284.1| aspartic proteinase II [Rhizopus niveus]
Length=391
```

```
Score = 25.2 bits (52), Expect = 45
Identities = 11/18 (61%), Positives = 12/18 (66%), Gaps =
4/18 (22%)
```

```
Query 1 GTGSVPCT--YNNCNREY 16
      GTGSVP T YN + EY
Sbjct 69 GTGSVPVTDYYN--DIEY 84
```

Los aminoácidos obtenidos mostraron cierta similitud con la rhizopuspepsina-2 de *Rhizopus niveus*, lo cual indicaría que la banda pudiera estar contaminada con esta proteasa. Sin embargo no se descarta la posibilidad de que la tirosinasa esté también presente en la banda, ya que los pesos moleculares reportados para la tirosinasa de hongos como *Neurospora*, *Agaricus*, *Pycnoporus*, *Pholiota* y *Trichoderma* están entre 39 y 45 kDa, (Lerch, 1983; Espín y Wichers, 1999a; Halaouli *et al.*, 2006b; Kawamura-Konishi *et al.*, 2007; Westerholm-Parvinen *et al.*, 2007; Flurkey *et al.*, 2008). Este intervalo de tamaños es muy similar a las masas moleculares reportadas para proteasas, por esta razón es posible que la tirosinasa y proteasas no puedan ser correctamente separadas por las técnicas de purificación que se emplearon, por lo que se necesitaría el uso de inhibidores específicos de proteasas y, posiblemente, otras columnas de purificación.

7.3 OBTENCIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA TIROSINASA DE *A. rouxii* MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES

En este punto, se planteó otra alternativa para encontrar la tirosinasa de *A. rouxii*, a través de la obtención del gen (rastreado una biblioteca genómica con una sonda

específica). Dicha sonda se podría obtener mediante la técnica de la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR), para lo cual se requirió del diseño de cebadores (primers) para la amplificación específica de la región de interés. Se realizó un alineamiento de las secuencias de aminoácidos correspondientes a tirosinasas de algunas especies de hongos, tomándose en cuenta las secuencias pertenecientes a especies lo más cercanas posible, desde el punto de vista filogenético. En la **figura 15** se muestra parte del alineamiento de las secuencias de aminoácidos de tirosinasa; las especies de hongos consideradas para el diseño de los cebadores, fueron *Pycnoporus sanguineus*, *Agaricus bisporus*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus flavipes*, *Hypocrea jecorinana*, *Lentinula edodes*, *Neurospora crassa*, *Pholiota nameko* y *Podospora anserina*.

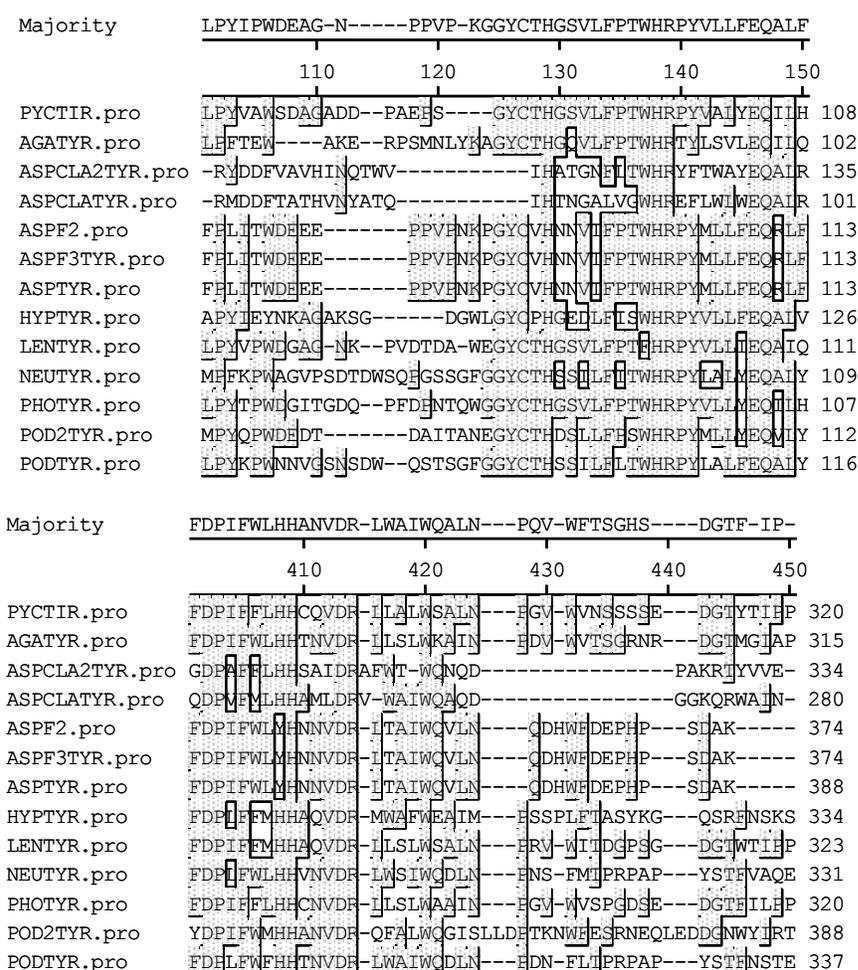
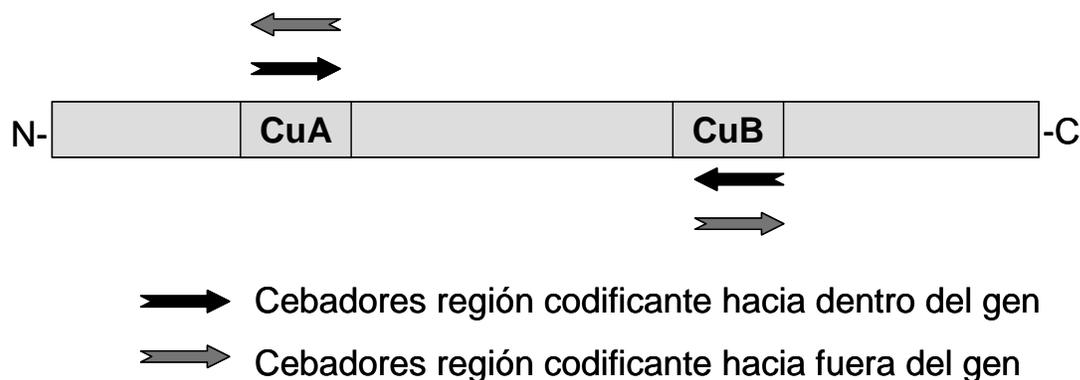


Fig. 15. Regiones conservadas en el alineamiento de secuencias de aminoácidos de las tirosinasas de hongos. (PYC, *Pycnoporus sanguineus*; AGA, *Agaricus bisporus*; ASP,

Aspergillus clavurigerus; HYP; *Hipocrea jecorina*; LEN; *Lentinula edodes*; NEU; *Neurospora crasa*; PHO; *Pholiota nameko*; POD, *Podospora anserina*).

Las regiones sombreadas en verde del alineamiento, algunas de las cuales corresponden al sitio activo de las enzimas o a los dominios de unión de cobre, fueron las más conservadas de las tirosinasas producidas por los hongos mencionados. Dichas regiones se utilizaron para el diseño de cebadores específicos, cambiando la secuencia de aminoácidos existente por su secuencia probable de nucleótidos.



Tomando en cuenta todas las proteínas de *A. rouxii* contenidas en las bases de datos, se obtuvo una tabla que permite asignar los tripletes más comúnmente empleados para cada aminoácido en este hongo. La existencia de varias posibilidades de codificación para cada aminoácido (en función de la degeneración del código genético) hace necesario diseñar oligonucleótidos degenerados, con los que se trataron de abarcar las combinaciones más probables para la codificación del gen.

Los cebadores diseñados para amplificar una región interna del gen de la tirosinasa, señalados con las flechas negras del esquema anterior, fueron:

JF 5'- TTC CCY ACY TGG CAY CGY CCY TAY -3'

JR 5'- VAR ACG RTC RAC GTT RGC RTG RTG -3'

JF TYR 5'- TTY CCD ACY TGG CAY CGK TAY -3'

JR TYR 5'- RTG GTG CAR CMA GAA RAT NGG RTC -3'

F TYR 5'- CGG GAA TTC TTG TTY CCY ACY TGG CAY CGT CCY -3'
R TYR 5'- CGG GAA TTC GTG GTG GAG CCA GAA AAT AGG ATC -3'

TYR FJ1 5'- TTY TTC CAR ATY GGW GGB ATY CAY-3'
TYR RJ1 5'- RTG RTG CAR RAA GAA RAT DGG RTC -3'

TYR FJ2 5'- TAC TWC CAR ATY GCH GGY ATY CAY
TYR RJ2 5'- RTG RTG SAR CCA GAA MAG VGG RTC

Con el objetivo de completar la secuencia interna que se obtendría por PCR se diseñaron también cebadores a partir de los sitios de unión al cobre, para utilizarlos en la técnica de PCR inverso; sus secuencias fueron las siguientes:

F inv TYR 5'- RGG ACG RTG CCA RGT RGG RAA CAA-3'
R inv TYR 5'- GAT CCT ATT TTC TGG CTC CAC CAC-3'

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

Con estos cebadores se realizó la reacción de PCR, en la cual se obtuvieron amplificaciones de fragmentos del tamaño esperado para la secuencia de la tirosinasa. La **figura 16** muestra uno de los varios fragmentos obtenidos para dicho gen, con los cebadores JF TYR y JR TYR, que fue de aproximadamente 819 pb.

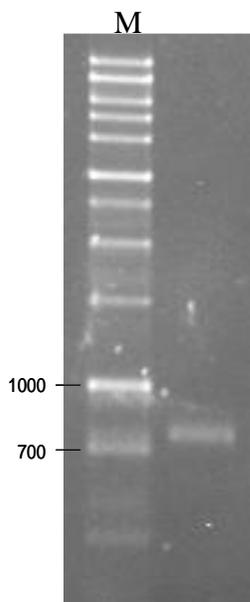


Fig. 16. Banda amplificada por PCR a partir del ADN cromosómico de *A. rouxii* con los cebadores diseñados para el gen de la tirosinasa. (M) Marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas).

La banda amplificada que se obtuvo se insertó en el plásmido comercial pGEM-T mediante una reacción de ligación (de acuerdo a las especificaciones del producto). La construcción del plásmido con el fragmento de interés insertado se clonó en células competentes de *E. coli* DH5 α (con las características mostradas en materiales y métodos), que fueron incubadas en medio LA con ampicilina, X-gal e IPTG y seleccionadas por la pérdida de color azul característico. Se realizaron megapreparaciones para obtener el ADN plasmídico y de esta manera secuenciar el vector con el inserto.

Cuando se realizó la técnica de PCR inverso con el kit comercial Genome Walker para la obtención de fragmentos de las regiones hacia fuera del gen de la tirosinasa, se obtuvieron amplificaciones con las cuatro enzimas diferentes (*Dra*I, *Eco*RV; *Pvu*II y *Stu*I) con las que se digirió el ADN de *A. rouxii* y los dos cebadores del kit (AP1 y AP2). La **figura 17** muestra las bandas amplificadas para cada una de las enzimas con la que se digirió el ADN.

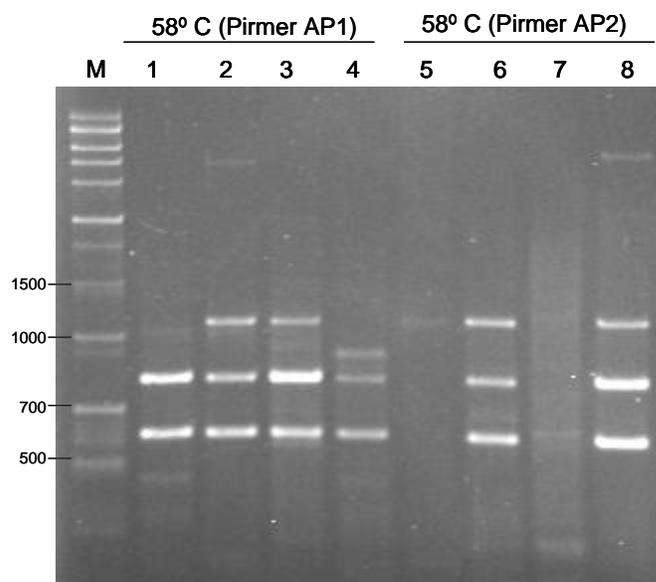


Fig. 17. Bandas amplificadas por PCR a partir del ADN cromosómico de *A. rouxii* con los cebadores diseñados para el gen de la tirosinasa y los oligos comerciales. (M) Marcador de peso molecular (Ladder 1 kb); Carril 1-4, Fragmentos obtenidos a partir de ADN digerido con las diferentes enzimas del kit utilizando el primer AP1 y 58°C; Carril 5-8, Fragmentos obtenidos a partir de ADN digerido con las diferentes enzimas del kit utilizando el primer AP2 y 58°C.

Los fragmentos de mayor longitud fueron purificados, para posteriormente conocer su secuencia y lo cual permitiría emplearlos como sondas específicas para rastrear el gen de tirosinasa en la biblioteca genómica de *A. rouxii*.

7.3.1 Construcción de la biblioteca genómica de *A. rouxii*.

Para la construcción de la biblioteca genómica se partió de la extracción de ADN total del hongo (**Fig. 18A**), por el método descrito en la sección de metodología, y se procedió a su digestión con la endonucleasa de restricción *Sau3AI*. La digestión con esta enzima se controló mediante la cantidad de enzima adicionada, para conseguir digestiones parciales del ADN y fracciones especialmente enriquecidas en tamaños concretos (**Fig. 18B**). Los tamaños óptimos para su ensamblaje con el vector λ -DASH[®] II se encuentran en un intervalo de 9-18 kpb y las digestiones parciales obtenidas con estos tamaños se sometieron a centrifugación en un gradiente de sacarosa (**Fig. 19**).

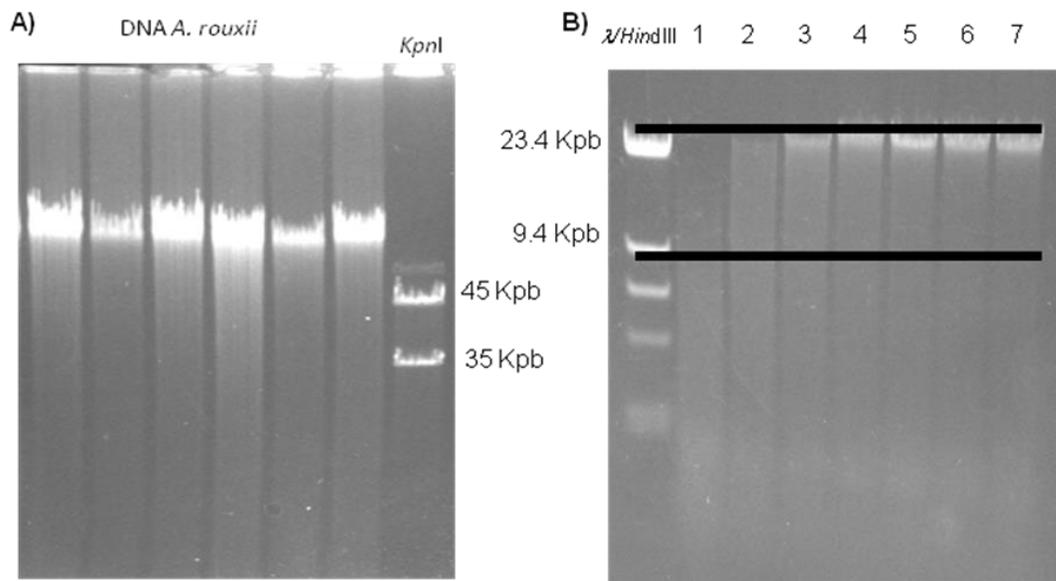


Fig. 18. A) Obtención de ADN total de *A. rouxii*. B) Digestiones parciales del ADN total con la endonucleasa *Sau3AI*. Las líneas negras delimitan los tamaños útiles para la construcción de la biblioteca.

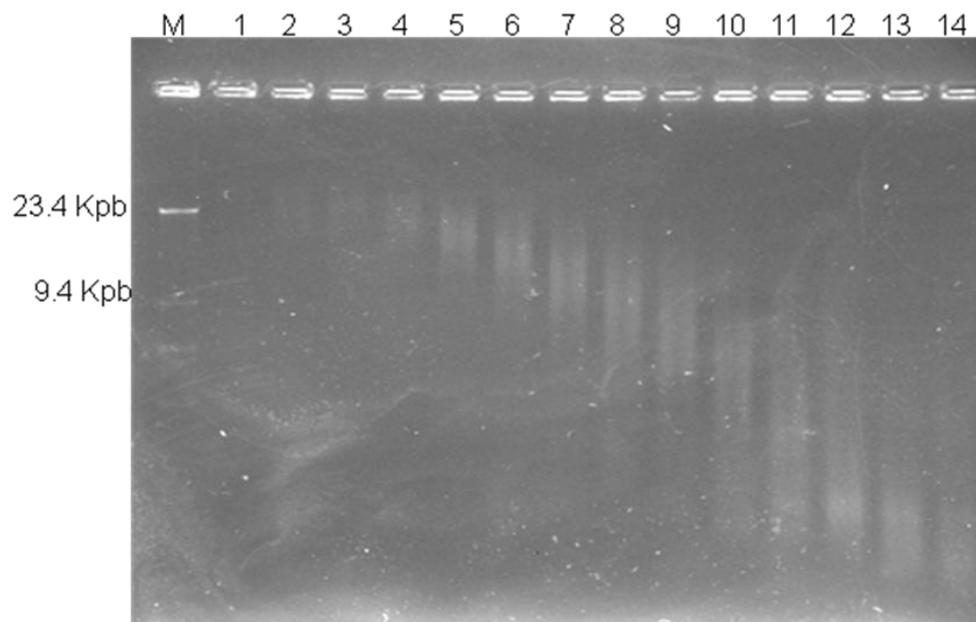


Fig. 19. Fracciones obtenidas por centrifugación en gradiente de sacarosa de la digestión parcial seleccionada para el ADN de *A. rouxii*. La fracción óptima (en este caso carril 5) es aquella que posee moléculas de ADN de alrededor de 15 kpb. (M) Marcador de peso molecular λ /*HindIII*.

Los fragmentos purificados a partir de las fracciones del gradiente se ligaron con el vector λ -DASH[®] II, digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI. La **figura 20** muestra la ligación de los fragmentos de ADN obtenidos de *A. rouxii* con los brazos del vector mencionado, generando tamaños aproximados de 44 kpb. Posteriormente, la mezcla de ensamblaje se encapsidó mediante el uso del sistema comercial “Gigapack II Plus” (Stratagene). Estas mezclas de encapsidación fueron utilizadas para realizar pruebas de infección con la cepa *E. coli* XL-Blue MRA P2, las cuales dieron como resultado la determinación del título de bacteriófagos presente en la biblioteca genómica construida.

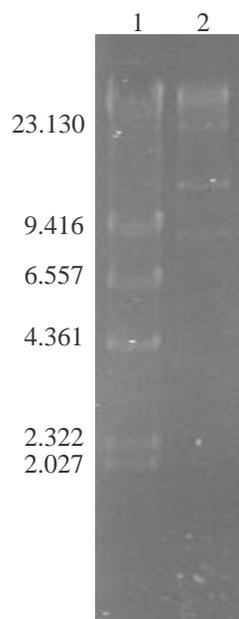


Fig. 20. Ligación obtenida a partir de fragmentos seleccionados (15 kpb) de ADN de *A. rouxii* con los brazos del vector λ -DASH[®] II.

Las unidades formadoras de placa obtenidas en la biblioteca genómica fueron de 577,500 (u.f.p., es una medida del número de bacteriófagos con capacidad infectiva real).

Una vez obtenida la biblioteca genómica, el siguiente punto sería hibridar la sonda de tirosinasa obtenida por la técnica de PCR. La construcción de la biblioteca genómica permitirá, además, identificar y aislar cualquier gen de interés de *A. rouxii*.

7.3.2 Análisis de la secuencia de nucleótidos del fragmento obtenido por PCR

Las secuencias se llevaron a cabo sobre la construcción de pGEM-T con el inserto, utilizándose cebadores universales T1 y T3, y los propios cebadores de tirosinasas diseñados para la técnica de PCR.

Las bandas amplificadas de las regiones internas y hacia fuera del gen (con PCR inverso) se purificaron y secuenciaron. Las secuencias nucleotídicas obtenidas no mostraron similitud con ninguna polifenoloxidasas. Una razón de no haber encontrado el gen con esta estrategia es que las tirosinasas son muy variables entre las especies de hongos y posiblemente las regiones utilizadas para el diseño de los cebadores no son conservadas en *A. rouxii*.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la purificación y secuenciación de la proteína, cuyos resultados sugieren una posible contaminación con una proteasa, y con el hecho de no obtener por PCR una sonda útil para poder rastrear el gen en la biblioteca genómica construida, se decidió utilizar una estrategia molecular diferente para obtener la tirosinasa: se decidió identificar la proteasa contaminante producida por *A. rouxii* e inhibirla mediante silenciamiento génico. De esta forma, la purificación de la proteína debería verse facilitada. A parte, y de acuerdo con lo mencionado en la revisión bibliográfica, como las fenoloxidasas pueden ser severamente afectadas por enzimas proteolíticas se analizaría la posible relación de la actividad proteasa con la actividad tirosinasa.

7.4 ESTUDIOS BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES DE LA ASPARTATO PROTEASA PRODUCIDA POR *A. rouxii*

7.4.1 Determinación de la actividad proteasa

Estudios previos mostraron que *A. rouxii* produce proteasas intra y extracelulares, determinándose la actividad proteasa sobre hemoglobina (sustrato usado para determinar proteasas de tipo ácido). Se encontró actividad proteasa intracelular de 0.045 U mg⁻¹ proteína, y extracelular de 0.14 U mg⁻¹ proteína, determinada a las 48 h de cultivo (Pérez de los Santos, 2009).

En el presente trabajo se realizó una cinética de crecimiento y de actividad proteasa extracelular durante 120 horas, tomándose muestras cada 12 horas. Para ello se realizaron

fermentaciones líquidas, utilizando medio sintético Melin-Norkrans suplementado con tirosina y PCF. El máximo peso seco obtenido fue de 3.5 mg biomasa L⁻¹ a las 96 horas. Respecto a la actividad proteasa producida, se observó que comienza a secretarse al medio desde las primeras horas de cultivo (fase exponencial del hongo) de una manera considerable (202 U mL⁻¹). La máxima actividad proteasa se alcanzó a las 36 horas (250 U mL⁻¹) y comenzó a decaer a partir de las 72 horas de cultivo (**Fig. 21**).

Se observó que la proteasa se secretó en los mismos tiempos que la tirosinasa: la máxima actividad se encontró entre las 12 y 48 horas de cultivo, lo cual es un dato importante a tener en cuenta a la hora de confirmar nuestra hipótesis de que la proteasa producida durante el cultivo podría ser un factor, al disminuir la actividad tirosinasa producida por *A. rouxii*, e incluso afectar su proceso de purificación.

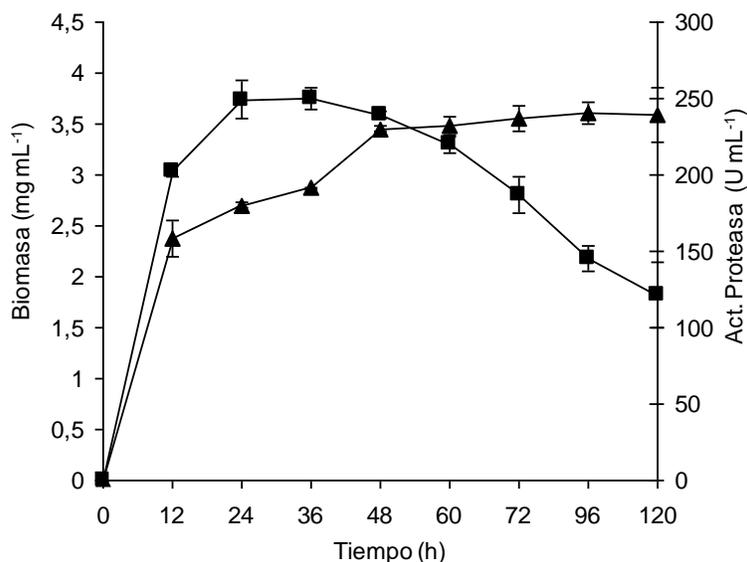


Fig. 21. Cinética de crecimiento y actividad proteasa en medio M-N suplementado con tirosina y PCF. (▲) Biomasa (mg mL⁻¹); (■) Actividad proteasa (U mL⁻¹).

7.4.2 Purificación de la proteasa

Para la purificación de la proteasa de *A. rouxii*, se utilizaron cultivos de 48 horas en medio M-N con tirosina. Una vez retirado el micelio por filtración, el líquido del cultivo (500 mL) se liofilizó para obtener un primer extracto enzimático. Al extracto se le adicionó sulfato de amonio, para precipitar las proteínas, y posteriormente la enzima se purificó en

una columna de intercambio aniónico (DEAE-sepharosa). Los resultados obtenidos de la purificación se muestran en la **tabla 6**.

Tabla 6. Purificación parcial de la proteasa de *A. rouxii*.

Etapas de purificación	Vol. (mL)	Concentración de proteína (mg mL ⁻¹)	Actividad proteasa (U mL ⁻¹)	Actividad específica (U mg proteína ⁻¹)	Factor de purificación
Extracto concentrado	30	0.232	1542	6646	1
80% (NH ₄) ₂ SO ₄	10	0.176	1304	7409	1.1
DEAE-Sepharosa	3	0.016	452	28250	4.2

La eliminación de las sales del extracto saturado se realizó con una columna de filtración en gel (Bio-gel 10D), y la fracción purificada se pasó posteriormente por una columna cromatografica de intercambio aniónico (DEAE-sepharosa). Las proteínas fueron eluidas en un gradiente de NaCl de 0-0.5 M en buffer de fosfato de sodio 50 mM pH 6.8, colectándose 40 fracciones de 2 mL. Se observó un pico bien definido en la fracción 10 (**Fig. 22A**). Se determinó la actividad proteasa en cada paso de purificación y se obtuvo un factor de purificación de 4.2, con una actividad específica de 28,250 U mg de proteína⁻¹. Esta fracción se utilizó para realizar un gel de poliacrilamida, en el cual se visualizó una sola banda con una masa molecular aparente de 40 kDa (**Fig. 22B**).

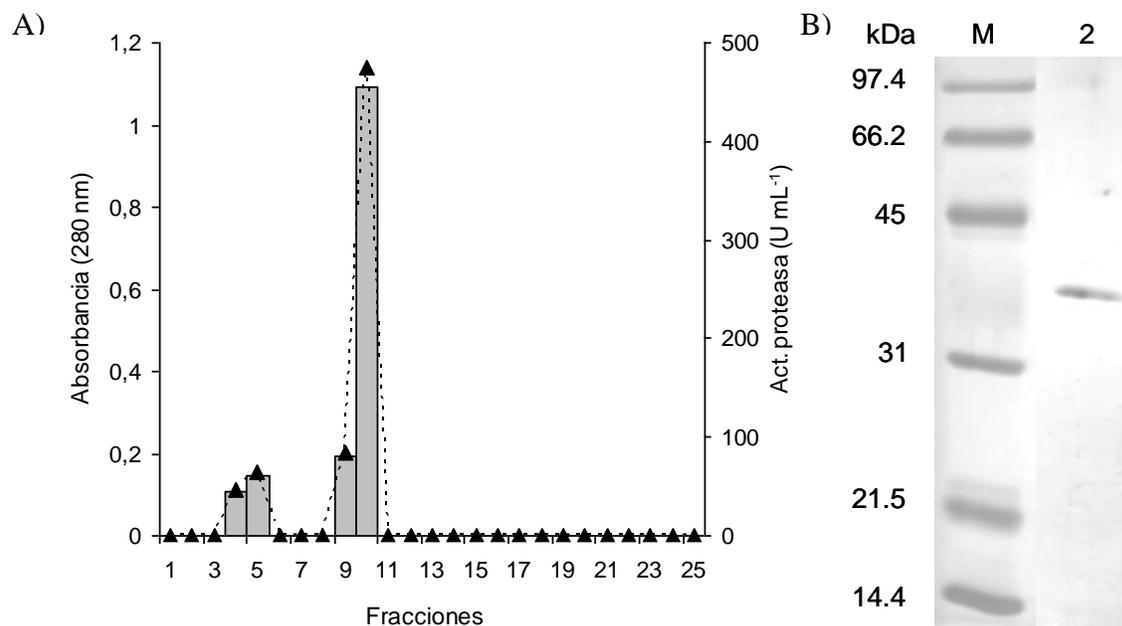


Fig. 22. (A) Purificación de la proteasa aislada de *A. rouxi* por intercambio aniónico. (\blacktriangle) Proteína (280 nm); (\blacksquare) Actividad proteasa determinada con hemoglobina (2%). (B) SDS-PAGE de la fracción 10 obtenida en la purificación con columna de intercambio aniónico.

7.4.2.1 Identificación de la proteína y secuencia de aminoácidos

La banda obtenida del gel de poliacrilamida se cortó y se secuenció mediante espectrofotometría de masas (LC-MS/MS), en la Unidad de Proteómica del IBT/UNAM. Los resultados de los péptidos secuenciados obtenida a partir de la proteína se muestra a en la **figura 23**.

```

1      MKLTL ISSCV ALAFM ALATE AAPSG KKLSI PLTKN TNYKP SAKNA IQKAL
51     AKYHR FRTTS SSNST STEGT GSVPV TDYYN DIEYY GKVTV GTPGV TLKLD
101    FDTGS SDLWF ASTLC TNCGS SQT KY NPNQS STYAK DGRTW SISYG DGSSA
151    SGILG TDTVT LGGLK ITKQT IELAK REATS FQSGP SYGLL GLGFD TITTV
201    RGVKT PVDNL ISQGL ISKPI FGVYL GKESN GGGGE YIFGG YDSSK YSGSL
251    TTIPV DNSNG WYGIT IKGTT IGSSK VSSSF SAILD TGTTL LILPN NVASA
301    VARSY GASDN GDGTY TIDCD TSSFK PLVFS IGSST FEVPA DSLVF EQDGS
351    TCYAG FGYGD YDFAI FGDVF LKNNY VVFNQ EVPEV QIAPI A

```

Fig. 23. Secuencia peptídica obtenida a partir de la fracción 10, purificada por intercambio aniónico e identificada por LC-MS/MS.

La secuencia de péptidos obtenida por electropray (LC-MS/MS) de la proteína purificada (aminoácidos en rojo) mostró alta similitud con los dominios conservados de las

proteína pertenecientes a la familia de las pepsinas (**Fig. 24**), con un 100% de similitud con la secuencia del precursor de la rhizopuspepsina-2 (aspartato proteasa) de *Rhizopus niveus* y un 99% de similitud con la de *Rhizopus oryzae*, de acuerdo a lo obtenido con el programa informático BLAST. Estos resultados confirman que la proteasa extracelular producida por *A. rouxii* es una aspartato proteasa.

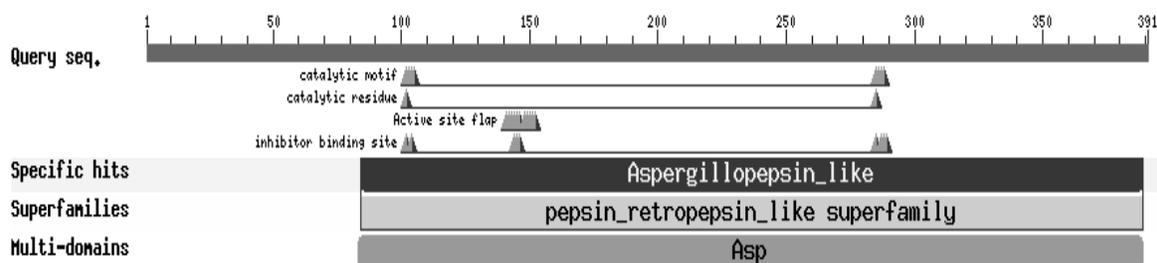


Fig. 24. Dominios conservados de los péptidos secuenciados a partir de la proteína purificada de *A. rouxii* obtenido del programa informático BLAST.

7.4.2.1.1 Análisis de la secuencia de aminoácidos

La secuencia teórica de la proteína purificada (aspartato proteasa), obtenida a partir de la búsqueda en la base de datos del programa informático Mascot con los péptidos secuenciados, nos indica que tendría un total de 491 aminoácidos, con un peso molecular de 40 kDa, similar a lo reportado para otras proteasas fúngicas, en particular a las del género *Rhizopus*. Así como la deducción de su péptido señal de la proteína el cual correspondería a los primeros 21 aminoácidos, de acuerdo al análisis realizado con el programa SignalP v3.0, y el sitio de rompimiento de éste se encuentra en los aminoácidos TEA²¹-A²².

La secuencia de aminoácidos encontrados en *A. rouxii* tiene un grado de similitud coherente con la de las aspartato proteasas producidas por otros hongos, de acuerdo con el análisis hecho por BLASTP (GenBank secuencias de proteínas no redundantes). La mayor identidad (99%) se presentó con la secuencia de la aspartato proteasa de *Rhizopus niveus* y *Rhizopus oryzae*, mientras que los porcentajes más bajos de identidad fueron encontradas con las proteasas de *Aspergillus oryzae*, 40%, *Fusarium venenatum*, 39%, *Hypocrea jecorina*, 37% y *Lentinula edodes*, 32% (**Fig. 25**).

En todas las aspartato proteasas los residuos catalíticos están contenidos dentro de las regiones conservadas DTGS y DTGT, secuencias que también se encontraron en la

secuencia peptídica de *A. rouxii*. Los residuos involucrados en la especificidad del sustrato están presentes en las posiciones Y¹⁴⁴, G¹⁴⁵ y D¹⁴⁶, conservados también en este tipo de proteasas. Las regiones responsables de la hidrofobicidad se localizaron en las posiciones LLD¹⁹¹ y IFD³⁶⁷.

Otra característica importante en las aspartato proteasas es la presencia de puentes disulfuro, que forman un determinado número de *loops* característicos: en el caso de las proteasas de mamíferos forman tres *loops*. El primero de ellos está presente en varias enzimas de hongos, se ha localizado por ejemplo en la secuencia de *Trichoderma harzianum*, entre los residuos de cisteína C⁹⁹ y C¹⁰⁵ (Suárez *et al.*, 2005). En el caso de *R. oryzae* y de *A. rouxii* se identificó entre las posiciones C¹¹⁵ y C¹¹⁸, con un segundo *loop* entre las posiciones C³¹⁹ y C³⁵².

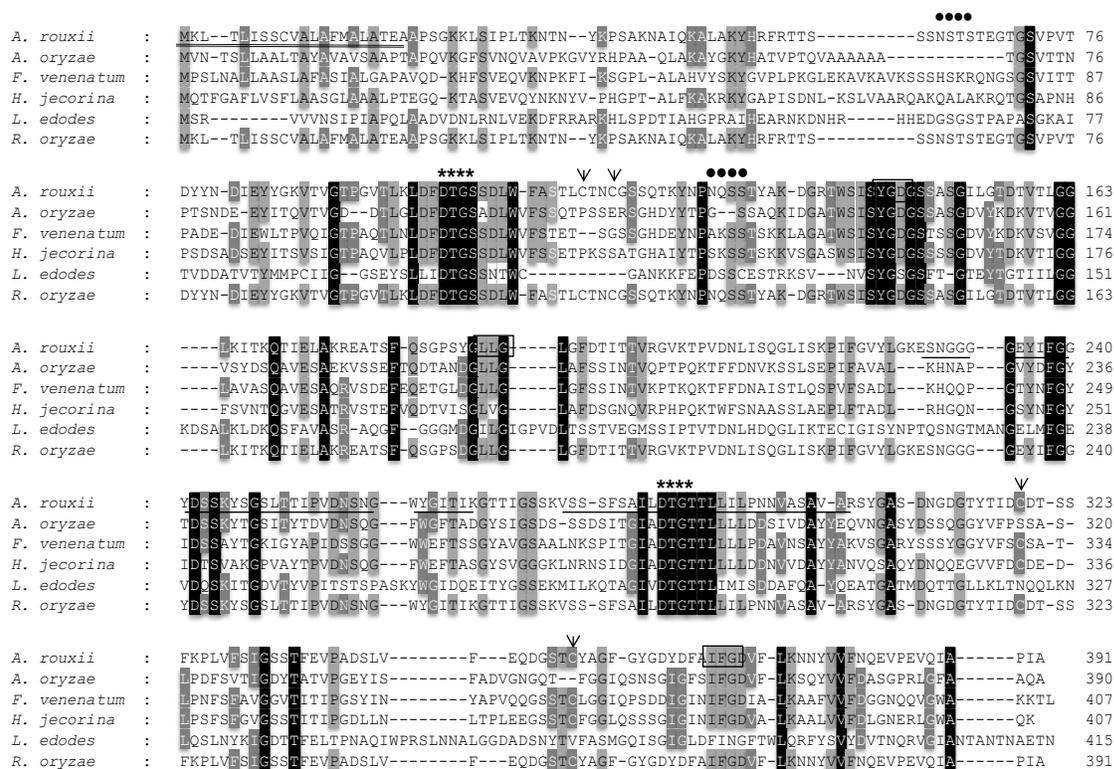


Fig. 25. Comparación de la secuencia teórica y péptidos secuenciados de la aspartato proteasa identificada de *A. rouxii* con secuencias de aspartato proteasas de *A. oryzae* (GenBank Accession No. AAB35849.1), *F. venenatum* (GenBank Accession No. AF462062.1), *H. jeroquina* (GenBank Accession No. AM168137.1), *L. edodes* (GenBank Accession No. AB446454.1), *R. oryzae* (GenBank Accession No. FJ539004.1).

Aminoácidos idénticos en todas las proteínas están marcados en negro. Los que están presentes en casi todas las proteínas están coloreados en gris. La secuencia de péptidos que está subrayada es la obtenida por LC-MS/MS. La secuencia correspondiente al péptido señal presenta doble línea. Los residuos catalíticos están señalados por asteriscos. Los residuos involucrados en la especificidad de sustrato están indicados en rectángulos. Las líneas punteadas negras indican los sitios de N-glicosilación. Los residuos de cisteína se indican por flechas. El alineamiento de secuencias fue hecho por el método CLUSTALX V, usando el programa MegAlign del paquete informático DNA STAR (Lasergene).

7.4.3 Caracterización bioquímica de la aspartato proteasa de *A. rouxii*.

7.4.3.1 Determinación de pH óptimo

La **figura 26** muestra el perfil de pH para la fracción de la proteasa parcialmente purificada, el ensayo se realizó utilizando hemoglobina como sustrato. La actividad proteasa se determinó en un rango de pH 2 a 7, en presencia de amortiguador universal 20 mM. La fracción analizada muestra un perfil con incremento continuo en la actividad a partir de pH 2, alcanzando un nivel máximo en la actividad relativa a pH 3.5. Se observó que a pH de 5 y superiores no hay actividad enzimática. Estos resultados son similares a los encontrados para otras proteasas de tipo ácido de *Rhizopus microsporus* (Schoen, *et al.*, 2002), *Rhizopus oryzae* NBRC 4749 (Chen, *et al.*, 2009) y para la aspartato proteasa de *Aspergillus clavatus* (Tremacoldi, *et al.*, 2004).

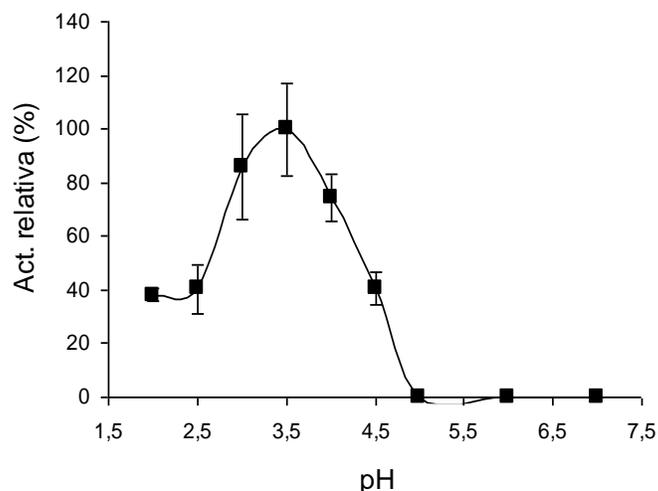


Fig. 26. Determinación del pH óptimo de la aspartato proteasa de *A. rouxii*. La actividad proteolítica fue determinada con hemoglobina (2%) como sustrato, en amortiguador universal 20 mM e incubada la reacción a 37°C. El experimento se realizó por triplicado.

7.4.3.2 Determinación de temperatura óptima

Para encontrar la temperatura óptima de la proteasa extracelular producida por *A. rouxii* se determinó la actividad proteasa a diferentes temperaturas, entre 20 y 70°C. De acuerdo a los resultados obtenidos, se encontró que la mayor actividad se presentó a 50°C, aunque no hubo diferencia significativa con las temperaturas de 37 y 40°C (**Fig. 27**). La actividad se ve drásticamente afectada a temperaturas de 60 y 70°C, observándose a estas temperaturas una disminución del 75% con respecto a la actividad encontrada a 50°C. Las aspartato proteasas de *Rhizopus chinensis* (Fukumoto et al., 1967), *Rhizopus microsporus* (Schoen, et al., 2002), *Aspergillus clavatus* (Tremacoldi et al., 2004) y *R. oryzae* NBRC 4749 (Chen et al., 2009) presentan también sus máximas actividades en este intervalo de temperatura (35-50°C), aunque difieren de las temperaturas óptimas encontradas para las rhizopuspepsinas de *R. chinensis* (Fukumoto et al., 1967) y *R. oryzae* (Kumar et al., 2005), o la aspartato proteasa de *Aspergillus oryzae* MTCC 5341 (Vishwanatha et al., 2009), cuyas temperaturas óptimas son de 60°C.

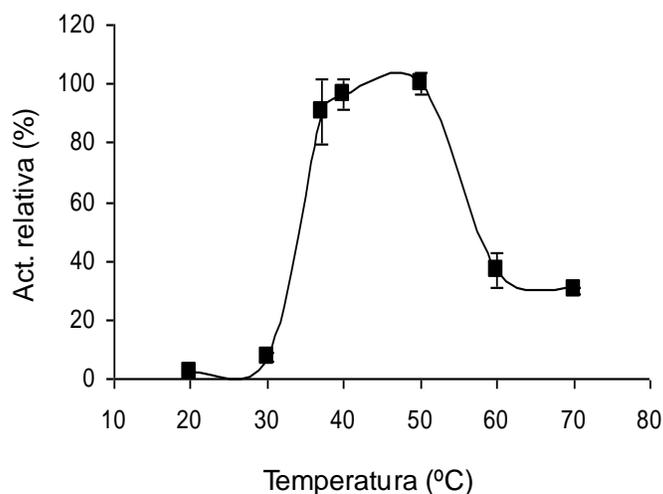


Fig. 27. Efecto de la temperatura sobre la proteasa de *A. rouxii*. La actividad proteolítica fue determinada con hemoglobina (2%) como sustrato, en amortiguador universal 20 mM, pH 3.5. La actividad proteasa se determinó por triplicado para cada temperatura.

La velocidad de la reacción enzimática varió al aumentar la temperatura de acuerdo a lo indicado en la **figura 27**. Esto es, la velocidad de la reacción enzimática se incrementó al aumentar la temperatura dentro de un determinado intervalo, alcanzando un valor máximo a la denominada temperatura óptima. A valores superiores la actividad disminuye debido a que la proteasa, como cualquier otra proteína, sufre procesos de desnaturalización y, por lo tanto de inactivación. Durante la fase de incremento de velocidad, la relación entre ésta y la temperatura viene denominada por la ecuación de Arrhenius, misma que nos permitió calcular la energía de la activación de la proteasa purificada, que fue de 55.82 kcal mol⁻¹. Los datos a partir de los cuales se obtuvo la energía de activación se muestran en el **anexo 2**.

7.4.3.3 Termoestabilidad de la enzima

Se estudió la termoestabilidad de la aspartato proteasa producida por *A. rouxii*. El extracto enzimático se incubó en amortiguador universal 20 mM pH 3.5 durante un periodo de 20 hasta 240 minutos, en un baño de agua manejando diferentes temperaturas: 37, 40 y 50°C (temperaturas que habían permitido obtener las más altas actividades en los estudios previos). Los resultados indican que la proteasa mostró una mayor estabilidad a 37°C,

manteniendo un 40% de su actividad relativa después de 240 minutos de incubación. La actividad proteasa fue menos estable a una temperatura de 50°C, con sólo un 11% de la actividad relativa a los 240 min de incubación (**Fig. 28**). Aspartato proteasas de hongos como *R. oryzae* (Kumar *et al.*, 2005), *R. oryzae* NBRC 4749 (Chen, *et al.*, 2009) y *A. oryzae* MTCC 5341 (Vishwanatha *et al.*, 2009) mostraron una termoestabilidad similar.

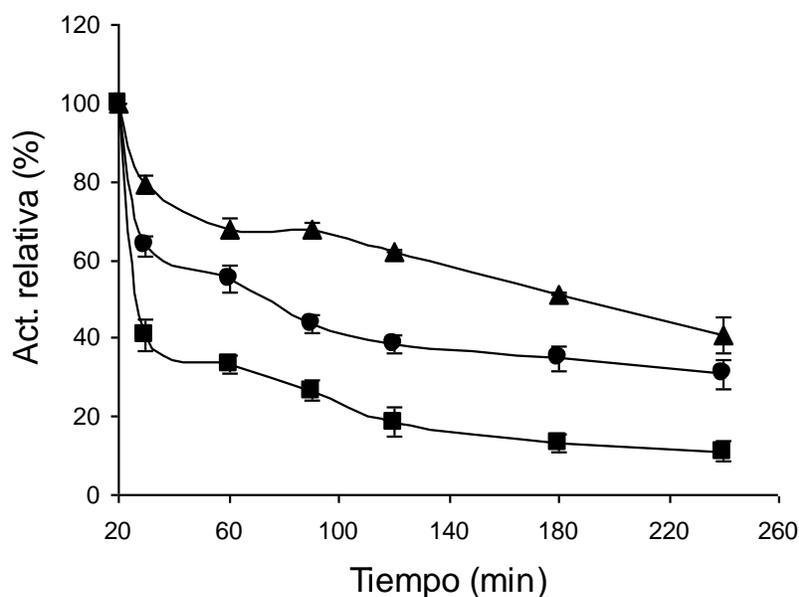


Fig. 28. Estudio de la estabilidad de la aspartato proteasa de *A. rouxii* durante 4 h. La actividad proteolítica fue determinada con hemoglobina (2%) como sustrato, en amortiguador universal 20 mM a pH 3.5. 37°C (▲), 40°C (●), 50°C (■). Cada uno de los ensayos fue realizado por triplicado.

7.4.3.4 Determinación de K_m y V_{max}

Los parámetros cinéticos K_m y V_{max} se obtuvieron incubando los extractos enzimáticos en diferentes concentraciones de hemoglobina (0 - 20 mg mL⁻¹) a pH 3.5 y 37°C durante 20 min. Con los datos experimentales se realizó la curva de Lineweaver-Burk (**Fig. 29**), y a partir de esta curva se obtuvo el valor de $K_m = 8.03$ mg mL⁻¹ y el de $V_{max} = 551.7$ μmol min⁻¹.

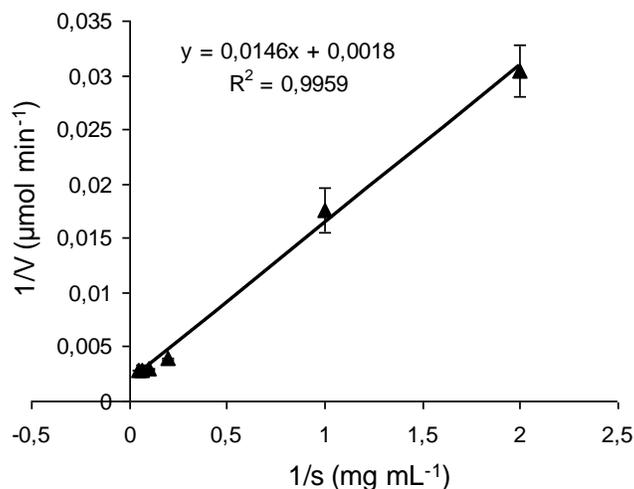


Fig. 29. Gráfica de Lineweaver-Burk para determinar los valores de K_m y V_{max} de la aspartato proteasa de *A. rouxii* sobre diferentes concentraciones de hemoglobina. Cada ensayo se realizó por triplicado y se representan las desviaciones estándar en cada punto.

7.4.4 Estudio del efecto de inhibidores de proteasas

Se ensayaron diferentes inhibidores específicos como el PMSF, EDTA, pepstatina A y un cocktail comercial de inhibidores, reportados para inhibir serin-, metalo- y aspartato-proteasas. Los resultados mostraron que la pepstatina A, en una concentración de 3 mM inhibió un 73% de la actividad aspartato proteasa. Se ha reportado que la pepstatina A es un inhibidor específico para las proteínas de tipo ácido, ya que el inhibidor se une directamente a los residuos de aspartato presentes en sus dos sitios activos (Palmieri *et al.*, 2001; Kudryavtseva *et al.*, 2008). Kumar *et al.* (2005) encontraron que la actividad de la proteasa ácida producida por *R. oryzae* se inhibe en un 73 a 93% utilizando concentraciones de 10 y 20 µM de pepstatina A, respectivamente, mientras que Vishwasnatha *et al.* (2009) reportaron un 100% de inhibición de la actividad aspartato proteasa producida por *A. oryzae* usando una concentración de 18 µM. En los dos trabajos mencionados también se reporta que el EDTA y el PMSF no inhiben a este tipo de proteasas: en el presente estudio sólo se inhibió entre el 20-14% de la actividad, respectivamente, con estos dos compuestos. Los resultados de los experimentos se muestran en la **tabla 7**.

Tabla 7. Estudio de diferentes inhibidores sobre la actividad proteasa de *A. rouxii*.

Inhibidor	Concentración (mM)	Actividad extracelular (U mL ⁻¹)	Actividad relativa (%)
Control	0	273 ± 7.16	100
Cocktail comercial	200 µl*	129 ± 0.00	47
Pepstatina A	3	75 ± 6.22	27
PMSF	1	237 ± 4.90	86
EDTA	1	219 ± 3.39	80

* Volumen adicionado de acuerdo a las especificaciones del producto.

7.4.5 Estudio del efecto de inhibidores sobre la actividad tirosinasa

La actividad tirosinasa extracelular también fue cuantificada en las muestras adicionadas con los diferentes inhibidores de proteasas, determinándose la actividad monofenolasa con tirosina como sustrato. En los cultivos de *A. rouxii* en los que se adicionaron los inhibidores cocktail comercial y/o pepstatina A se encontró un incremento de aproximadamente 2 veces en la actividad tirosinasa con respecto al cultivo control. En estos cultivos, como se mencionó en el apartado anterior, la actividad proteasa disminuyó un 73 y un 53%, respectivamente (**Fig. 30**). Estos resultados demuestran que la proteasa producida por *A. rouxii* tiene un efecto negativo sobre la actividad tirosinasa producida por este hongo.

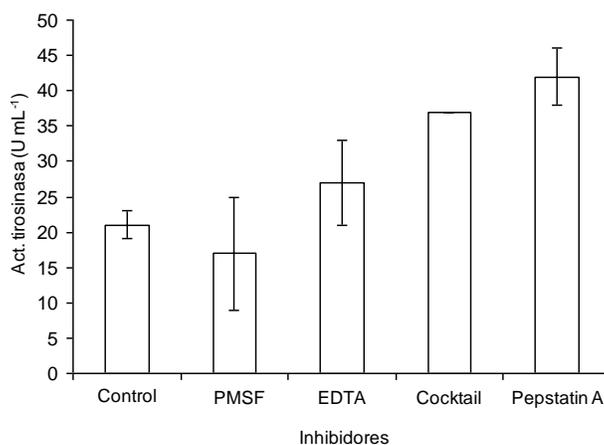


Fig. 30. Efecto de inhibidores sobre la actividad tirosinasa extracelular producida por *A. rouxii*.

7.5 IDENTIFICACIÓN Y SILENCIAMIENTO DEL GEN DE LA ASPARTATO PROTEASA

7.5.1 Obtención de ADN de *A. rouxii* y *A. niger*

La extracción de ADN a pequeña escala se obtuvo de acuerdo a lo mencionado en la sección de materiales y métodos. La **figura 31** muestra la imagen del gel con el ADN extraído de ambas cepas; el ADN de *A. niger* sirvió para obtener el promotor de la piruvato kinasa (*Ppki*), mientras que del ADN de *A. rouxii* se obtuvieron los fragmentos de los genes de proteasas que se utilizarían para el silenciamiento.

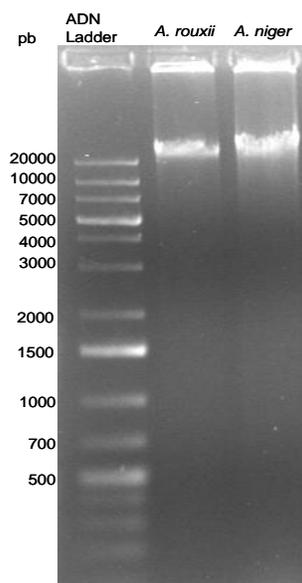


Fig. 31. Obtención de ADN genómico de las cepas *A. rouxii* y *A. niger*. El marcador de peso molecular utilizado fue GeneRuler™ 1 kb Plus ADN Ladder.

7.5.2 Construcción del plásmido pGpdPki-RNAi

La principal característica del plásmido pGpdPki-RNAi, utilizado para llevar a cabo el silenciamiento de la aspartato proteasa, es que debe tener dos promotores orientados en sentido contrario (*Ppki* y *Pgpd*) y enfrentados entre sí, que permitirán generar RNAs complementarios (los llamados dsRNA) del gen que se inserte en el medio de los dos promotores. La generación de estos dsRNA provocará la degradación del RNA mediante una serie de reacciones enzimáticas, silenciando de ese modo la expresión del gen de interés (**Fig. 32**).

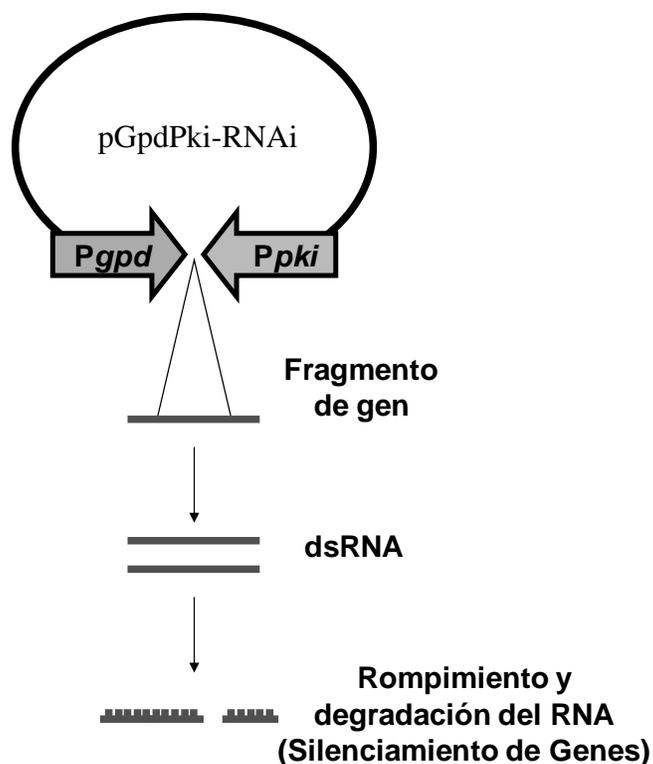


Fig. 32. Mecanismo de silenciamiento de genes mediante la construcción de un vector con promotores enfrentados y orientados en sentido contrario.

Diversos experimentos han demostrado la funcionalidad del promotor *Pgps* para el estudio de la sobreexpresión de distintos genes, en particular de aquellos que están involucrados en la síntesis de metabolitos secundarios. El uso del promotor de expresión *Ppki* se ha reportado poco (Graaff *et al.*, 1992; Storms *et al.*, 2005), aunque se decidió usarlo en la construcción del plásmido requerido para el silenciamiento debido a que es un promotor constitutivo de una vía central del metabolismo.

El promotor *Ppki* se obtuvo a partir del ADN de una cepa de *A. niger*, tomando como referencia la secuencia de nucleótidos del gen de la piruvato kinasa con número de acceso FG48829 en la base de datos GenBank (**Fig. 33**). Las regiones marcadas en amarillo indican los sitios empleados para el diseño de los primers.

Primer Forward (PpkiF)

5'- AACAGAATTCAAATGAAGAGAAAACCTCCG -3' (sitio de corte para *EcoRI*)

Primer Reverse (PpkiR)

5'-ATAGCCATGGTGATTGATCTCTACTGAACCG-3' (sitio de corte para *NcoI*)

AAATGGAAGAGAAAACCTCCGAGTACTTACTTAGGGCCCTGTCTACTGGCCAGAGTCTCGT
 CCTCTATTCACTATGATAAATTACCCACTGGACAAAAAATAAAATAAAATAAAAAATAAAA
 AGGGAGACAGCTTCTCCATCAACTGGCAACTGGGTCCGTCCGAGCAGAGCAAAATTCAGCC
 TTATGGGTTCCGATGGAGTCAGGGAAATAGTTCTTGCGAAGGGCATTGGGCTTTTTTGC GA
 GGAGAAAATTCAGCACCGACAAAGCATCCGAAATCCGACCTCGCTAGGAGAGAATGGATCC
 GCGACGATGTGGGGTCAACTGGACAGAGTGAGAGGGTATCATGTGGTCTTGCCAGATACTT
 CGCAGAATGTTGTGTGGGTGTCTGATTGTGGCTTGGGCGTGAATTGCTTTTGGTCTTCCCA
 ACCAATTATTATTGCATGCGGCGTATGAATGCCTGAGATGCGCGGAGGGAAGGTGCCTGAG
 GATGTAGTGGACAAATGCTGCTGATCGCTGGGCGGAAACCCTTGGCTGACCAGTGAAAAGA
 GCGGACGGAGGCAGCAGGTGTATCTACGATCAAAGAATAGTAGCAAAGCAGTGAAAGGTGG
 ATCACCCAGCAAATAATTGAGTTTTGATACCCAGCGATAGTGCCGGGGGGGAGAAAAAGTC
 ATTAATAATGGGAATTATGTAGGCGATGGGAAGTGTGATTGTA ACTACTCCGTAGCTGGAG
 GCACAACTAACAAGCCAGCTCTCAACCCGCGGGGAACCGACCGACAGATAAAAAAAGCGT
 CCCAAAGCAGGAATCCCACCAAAAAGGGCCGATCCAGCCAATCACCGCCGCAACATTTTT
 CCTTCCC GGGCACCCCTCCTCTAGTCCACCATCTCTCTCTTCTCTCGCTCACCGGCCCGT
 CTTTTCTTCCCTATTATCTCTCCCTCTTCTCCTCCCTTCTCTCCCTCCATTCTTTCTCCC
 ATCTTCATCACTCCCTTCTCTTCTGTCTTCCCCCCGGTTTCAGTAGAGATCAATCATCCGT
 CAAGATG

Fig. 33. Secuencia para obtener el promotor *Ppki*. Las cajas TATA y CCAAT del promotor de la piruvato kinasa, están marcadas con líneas y son regiones conservadas en *A. niger* y *A. nidulans*.

El promotor se obtuvo con una reacción de PCR de gradiente, las temperaturas de anillamiento que se manejaron fueron de 64.3°, 65.4°, y 66.5°C, siendo esta última la empleada para posteriormente purificar la banda del gel y secuenciarla. El fragmento obtenido fue de 1032 pb (**Fig. 34**).

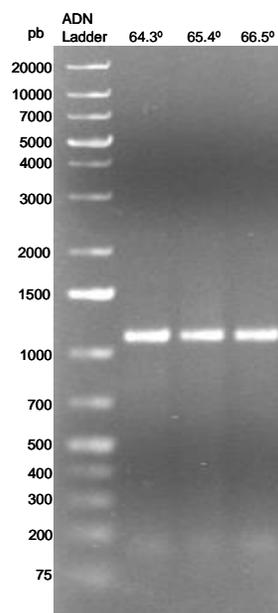


Fig. 34. Obtención del promotor *Ppki* mediante PCR de gradiente. El marcador de peso molecular utilizado fue GeneRuler™ 1 kb Plus ADN Ladder.

Una vez amplificado el fragmento por PCR, se cortó del gel, se purificó y se secuenció, para comprobar si se trataba del promotor buscado. El resultado de la secuencia se analizó con el programa de búsqueda de similitud BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), observándose un 100% de similitud (y un valor E de 0) con la secuencia de la piruvato kinasa de *A. niger* N402, con número de acceso S38698.1 en la base de datos Gen Bank.

El promotor *Ppki* ya identificado se ligó con el vector pB1gbc para generar el plásmido pGpdPki-RNAi, con un tamaño de 6288 pb y con los dos promotores en sentido opuesto. La ligación fue transformada en la cepa DH5 α de *E. coli*, para posteriormente obtener ADN plásmidico mediante minipreparaciones, que se observan en la **figura 35**.

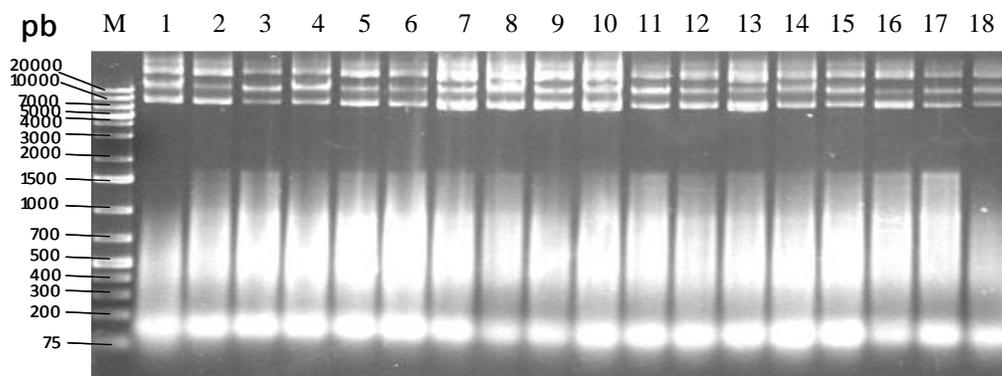


Fig. 35. Minipreparaciones realizadas a partir de 18 transformantes obtenidas en *E. coli* con el plásmido con nuevo promotor *Ppki*.

Debido a que no se observaron diferencias en el patrón del ADN plasmídico de las colonias analizadas, se tomó sólo una de ellas para realizar la digestión y obtener el plásmido linearizado. La imagen de la figura 36A, muestra en el carril 3 el vector sin el inserto, mientras que el carril 4 se muestra el plásmido linearizado con el promotor *Ppki* a partir de la digestión de la minipreparación con la enzima de restricción *NcoI* (con un único sitio de corte en el vector y con un tamaño esperado de 6228 pb). Con este gel se confirmó la inserción del nuevo promotor y la construcción del plásmido pGpdPki-RNAi, que será utilizado para el silenciamiento de los genes (**Fig 36A**). Mediante megapreps se obtuvo mayor cantidad del plásmido, y para verificar su tamaño se digirió nuevamente con las enzimas *EcoRI* y *NcoI* (con cortes únicos en el plásmido). El resultado se muestra en los carriles 4 y 5 de la **figura 36B**.

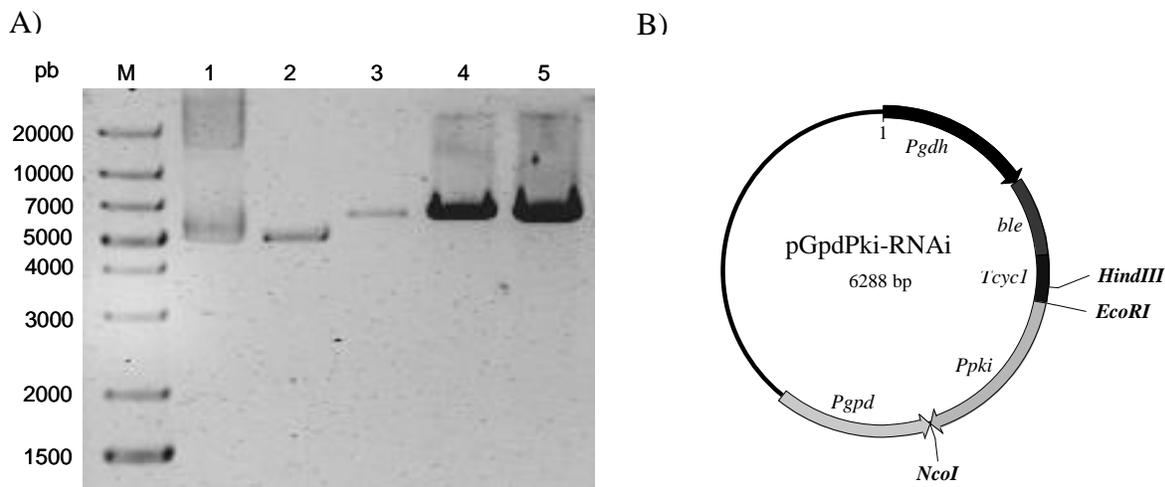


Fig. 36. A) Vector con y sin el promotor *Ppki*. M) Marcador de peso molecular (GeneRuler™ 1 kb Plus ADN Ladder); carril 1, megaprep de vector sin inserto; carril 2, plásmido linearizado sin inserto; carril 3, miniprep de plásmido linearizado con la enzima de restricción *NcoI* con el nuevo promotor *Ppki*, carriles 4 y 5, plásmido linearizado con *EcoRI* y *NcoI* a partir de megapreps. B) Vector pGpdPki-RNAi, con los promotores *Ppki* y *Pgpd*, orientados en sentido contrario y enfrentados entre sí.

7.5.2.1 Construcción del plásmido pJasp-RNAi

Para realizar la construcción de este vector se obtuvieron fragmentos de los genes de aspartato proteasas que se querían silenciar.

- Para la rhizopuspepsina-2 se utilizaron dos fragmentos de tamaños diferentes, obtenidos a partir del gen codificante de la aspartato proteasa purificada de *A. rouxii* (inicialmente 910 pb y posteriormente 412 pb).
- La otra proteasa estudiada fue la rhizopuspepsina-6, proteína secretada abundantemente por la mayoría de los hongos del género *Rhizopus*, en este caso se trabajó con un fragmento de 455 pb del gen. Los primers para la amplificación se obtuvieron a partir de la secuencia de *R. oryzae* con número de acceso FJ3289 en la base de datos GenBank.

Los fragmentos de las rhizopuspepsina-2 (910 pb) y -6 (455 pb) fueron obtenidos mediante la técnica de PCR, usando gradiente de temperatura, y los resultados de dichas amplificaciones se muestran en la **figura 37**.

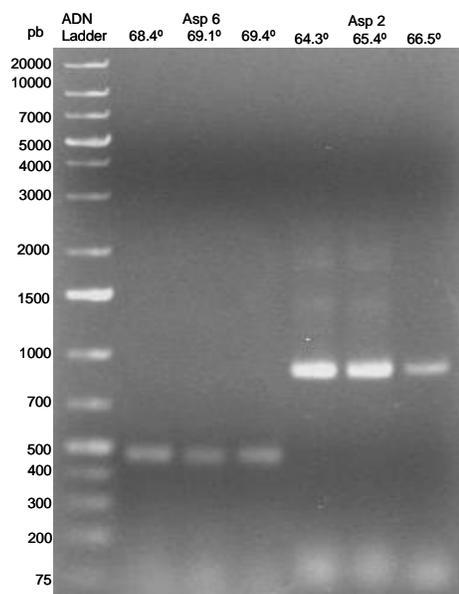


Fig. 37. Obtención de fragmentos para las rhizopuspepsinas-6 (455 pb) y -2 (910 pb) por PCR. El marcador de peso molecular utilizado fue GeneRuler™ 1 kb Plus ADN Ladder.

Los fragmentos obtenidos para las dos proteasas se purificaron y secuenciaron, comparándose dichas secuencias con la herramienta BLAST. El fragmento de 455 pb arrojó un 99% de similitud con el gen precursor de rhizopuspepsina-6 de *R. oryzae* (Chen *et al.*, 2009), con número de acceso FJ5349008.1 en la base de datos GenBank.

La secuencia de nucleótidos obtenida para el fragmento de 910 pb resultó ser similar en un 98% al precursor de la rhizopuspepsina-2 de *R. oryzae* y *R. niveus*, con número de acceso FJ539004.1 y X56964.1, respectivamente, en la base de datos GenBank. Esta secuencia de nucleótidos nos permitió diseñar nuevos primers (señalados en verde) para obtener un fragmento de 412 pb (tamaño recomendado para el silenciamiento de distintos genes en hongos), pudiendo así atacar el silenciamiento de la rhizopuspepsina-2 con dos fragmentos de diferente tamaño. La **figura 38** muestra la secuencia de nucleótidos obtenidos a partir del fragmento de 910 pb (cebadores señalados en negritas) y las regiones utilizadas para los nuevos oligos, para el fragmento de 412 pb, son las subrayadas.

ACTGGTTCCTCTGATTTGTGGTTTGGTAAGTCAATTGAGCCTGCTTTAGAGTGTATATATATATATATATCTAAC
 CTATACCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTCTTAGCTTCTACTTTATGTACCAACTGTGGTAGCTCTCAAACC
 AAGTACAACCCCAATCAATCCAGCACCTATGCTAAAGATGGCCGTACATGGTCTATCTCTTACGGTGATGGCT
 CTAGTGCTAGCGGTATCTTGGGTACAGATACTGTACACCTTAGGCGGCCTCAAGATCACCAAACAAACTATCGA
 ATTAGCCAAACGTGAAGCTACCAGTTTCCAAAGTGGACCCTCGGATGGTCTCCTCGGTCTTGGATTTGACACC
 ATCACGACCGTCCGTGGTGTCAAGACCCCTGTGGACAATTTGATCAGTCAGGGCTTGATCAGCAAGCCCATCT
 TTGGTGTCTATCTCGGTAAGGAAAGCAACGGTGGTGGAGGAGAATACATCTTTGGTGGCTATGATTCCAGCAA
 GTACAGCGGTTTCCTTGACCACGATCCCTGTGGACAACCTCCAATGGTTGGTATGGTATCACGATCAAGGGTACC
 ACGATCGGCTCATCCAAGGTCTCTAGTTCCTTCAGTGCCATCCTTGACACTGGTACCCTCTTTGATCTTGC
 CCAACAATGTTGCCCTCTGCCGTTGCTAGATCCATATGGTGCTAGCGATAACGGTGATGGTACCCTATACCATTGA
 CTGTGATACATCTAGCTTCAAACCTCTTGTCTTCTCTATCGGTTCCCTCTACCTTTGAAGTCCCCCGTGATTCC
 TTGGTCTTTGAACAAGATGGCAGCACTTGTATGCAGGCTTTGGTTATGGTGATTATGACTTTGCCATCTTTG
 GTGATGTCTTCT**TTGAAGAACA**ACTATGTTGTCTTT

Fig. 38. Secuencia obtenida del gen de la rhizopuspepsina-2, los nuevos primers diseñados y el nuevo fragmento de 412 pb a amplificar.

El primer empleado como forward fue 5'-GTCTCCATGGTACGGTGATGGCTCTAGTGCT-3' y el utilizado como reverse fue 5'-GCATCCATGGGAGAGTGGTACCAGTGTCAAG-3'. Los dos primers poseen sitio de corte para la enzima de restricción *NcoI* señalados en negrita. El fragmento se obtuvo utilizando un gradiente de temperaturas (68.4°, 69.1°, y 69.4°C), la amplificación del fragmento se puede observar en la **figura 39**.

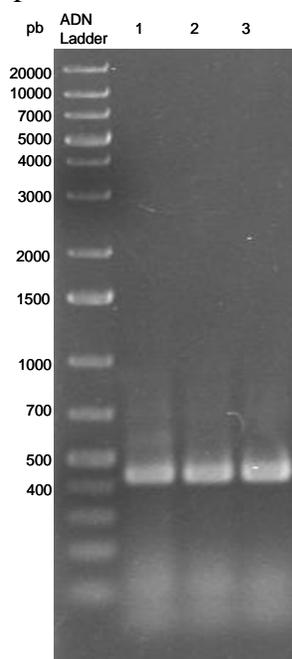


Fig. 39. Obtención del fragmento para la rhizopuspepsina-2, con un tamaño de 412 pb. (1) 68.4°C (2) 69.1°C y (3) 69.4°C. El marcador de peso molecular utilizado fue GeneRuler™ 1 kb Plus ADN Ladder.

Al igual que los otros fragmentos amplificados, éste fue purificado a partir del gel para su secuenciación. Los resultados de la secuencia indican un 100% de similitud con la rhizopuspepsina-2 de *R. oryzae*, con número de acceso FJ539004.1 en la base de datos GenBank, de acuerdo a lo obtenido con el programa informático BLAST.

La **figura 40** muestra el vector denominado pJasp412-RNAi, para realizar el silenciamiento de la rhizopuspepsina-2 con un tamaño de fragmento de 412 pb. El inserto se clonó entre los promotores *Pgpd* y *Ppki*. Cada vector construido fue denominado con el tamaño de fragmento empleado.

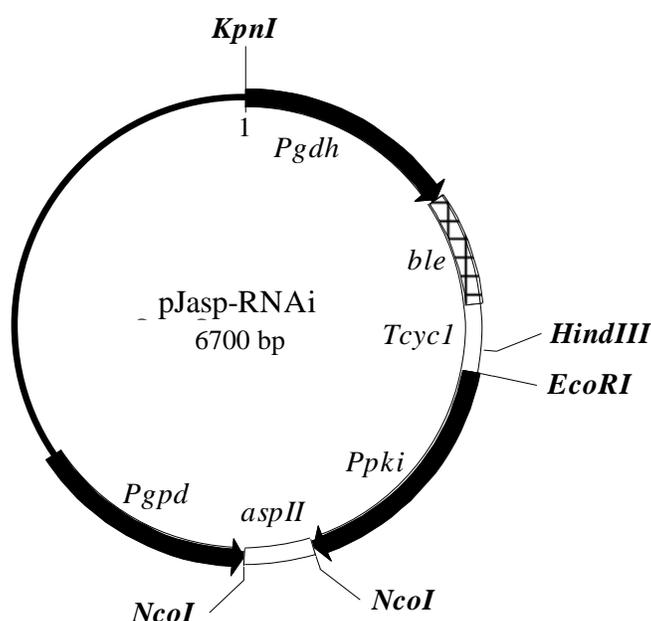


Fig. 40. Construcción del vector de expresión para el silenciamiento de la aspartato proteasa tipo 2, para el fragmento de 412 pb.

Una vez obtenidos los tres fragmentos de los genes de interés para el silenciamiento, cada uno de ellos fue clonado en el vector pGpdPki-RNAi. Tanto los fragmentos de los genes como el vector fueron digeridos con *NcoI* para poder ligarlos (el plásmido fue desfosforilado, para evitar la religación). Las mezclas de ligación fueron transformadas en la cepa DH5 α de *E. coli* y se realizaron minipreparaciones para obtener el ADN plasmídico, comprobándose la inserción de los fragmentos de interés mediante digestiones con enzimas

de restricción de corte único en el vector. Esto permitió identificar aquellas colonias transformantes que contenían el inserto, para posteriormente obtener mayor cantidad mediante megapreps. A partir de las megapreps realizadas se procedió a la comprobación de los plásmidos mediante digestión con la enzima de restricción *NcoI*. La digestión permitió la liberación de cada uno de los fragmentos de diferente tamaño insertados, como se observa en el gel de la **figura 41**.

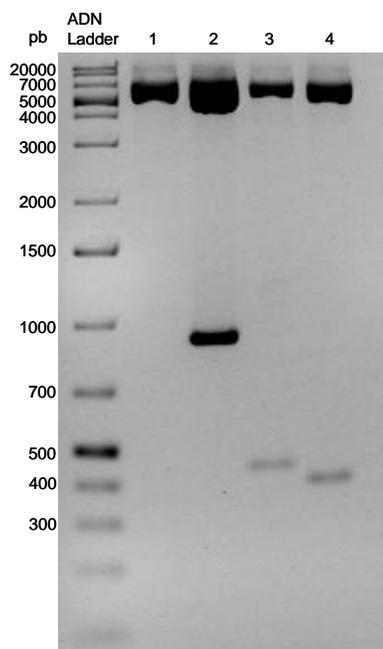


Fig. 41. Digestiones con *NcoI* de los plásmidos con los diferentes fragmentos de la aspartato proteasa. Carril 1, plásmido linerizado sin vector, carril 2 plásmido digerido para el fragmento de 910 pb, carril 3 plásmido digerido para el fragmento de 455 pb y carril 4 plásmido digerido para el fragmento de 412 pb. El marcador de peso molecular utilizado fue GeneRuler™ 1 kb Plus ADN Ladder.

7.5.3 Obtención de transformantes de *A. rouxii* que silencian el gen de la aspartato proteasa

Para obtener transformantes de *A. rouxii* que silencien los genes que codifican las aspartato proteasas, se llevó a cabo una transformación homóloga con los plásmidos pJasp412-RNAi, pJasp910-RNAi para la rhizopuspepsina-2 y con pJasp455-RNAi para la rhizopuspepsina-6.

Los protoplastos de la cepa empleada de *A. rouxii* se obtuvieron a las 5 horas de la adición de una mezcla de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum*. Esta mezcla fue usada porque los principales componentes de las paredes celulares de los Mucorales son los quitosanos y los β -1,3-glucanos (Bartnicki-Garcia, 1968). La formación de los protoplastos fue controlada periódicamente con un microscopio.

En la transformación se utilizaron 10 μ g del vector, obtenidos a partir de una megaprep. La **tabla 8** muestra el número de transformantes totales obtenidos con los diferentes plásmidos construidos.

Tabla 8. Colonias transformantes obtenidas a partir de *A. rouxii*.

Plásmido	No. de colonias
pGpdPki-RNAi	25
pJasp412-RNAi (rhizopuspepsina-2)	39
pJasp910-RNAi (rhizopuspepsina-2)	18
pJasp455-RNAi (rhizopuspepsina-6)	23

Se obtuvieron mayor número de transformantes con el plásmido de la rhizopuspepsina-2 con un fragmento de 412 pb. Las transformantes de las cepas aparecieron a partir del séptimo día, en contraste con los protoplastos regenerados de *A. rouxii* sin plásmido, que aparecieron en el segundo día de incubación.

Las transformantes obtenidas se confirmaron tras sucesivas rondas de crecimiento, en medio Czapeck-sorbitol suplementado con 200 μ g de fleomicina mL⁻¹ y en una ronda final con doble concentración de ésta (para asegurar el crecimiento exclusivo de verdaderas transformantes). Finalmente, se seleccionaron 5 transformantes para la rhizopuspepsina-2 con un fragmento de 412 pb (denominadas como A412), 2 transformantes para esta misma proteasa con un fragmento de 910 pb (denominadas A910) y 2 transformantes para la

rhizopuspepsina-6 con un fragmento de 455 pb (llamadas A455). Esta nomenclatura se mantendrá hasta el final de este documento.

7.5.4 Efecto del silenciamiento sobre la actividad proteasa

Una prueba cualitativa que permitió observar el silenciamiento de la aspartato proteasa fue un bioensayo con leche descremada, que posee un contenido de caseína alto y, por consiguiente, resulta un buen sustrato para las proteasas. La actividad proteasa se manifiesta en la formación de halos bien definidos. La **figura 42** muestra la formación de los halos con el extracto obtenido de la fermentación líquida en medio M-N a las 48 horas de cultivo de la cepa parental y la transformante A412-3, que es la que presentó la menor actividad proteasa.

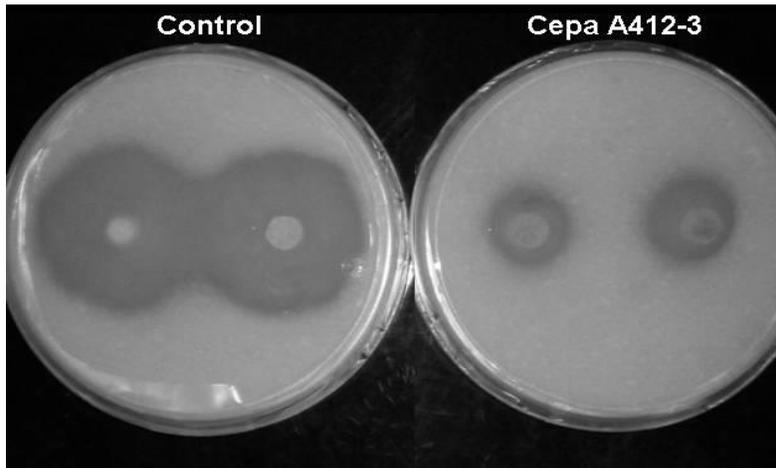


Fig. 42. Bioensayo realizado con leche descremada para *A. rouxii* y la transformante A412-3, para la determinación de actividad proteasa.

Con las transformantes seleccionadas se realizaron fermentaciones líquidas, en medio M-N suplementado con tirosina, para observar el efecto fenotípico del silenciamiento del gen de la aspartato proteasa. Como se mencionó anteriormente, de acuerdo a otros estudios y en función del tamaño del fragmento utilizado, se esperaba un mayor efecto en las transformantes con el fragmento de 412 pb de la rhizopuspepsina-2, por lo que se analizaron cinco transformantes con estas características.

La primera variable analizada fue la producción de biomasa, comparando el crecimiento de la cepa original de *A. rouxii* con respecto a las transformantes seleccionadas.

En la **figura 43 (A)** se puede observar que cuatro de las transformantes, al igual que la cepa silvestre y otra cepa que sólo contiene el vector pGpdPki-RNAi sin inserto (utilizado como control) no mostraron diferencias significativas en cuanto al crecimiento, de acuerdo con las barras de error obtenidas en cada punto. Las transformantes y la cepa parental muestran un perfil de crecimiento muy similar entre ellas, y la producción de biomasa fue de 2.7 mg mL⁻¹ en promedio. Sin embargo, la transformante A412-3 presentó menor crecimiento desde el inicio de la fermentación, con una producción de biomasa de sólo 1.89 mg mL⁻¹ (1.4 veces menos que el crecimiento presentado por las otras cepas). Algunas proteasas juegan un papel importante en el crecimiento de los hongos y posiblemente el silenciar la aspartato proteasa esté provocando en este caso un efecto inhibitorio en el desarrollo de *A. rouxii*, o lo cual pudo deberse también al lugar de integración del plásmido, generando diferencias entre las transformantes obtenidas.

En cuanto a la actividad proteasa, la máxima actividad se encontró entre las 24 y 48 horas de cultivo, como ya se había demostrado en los primeros estudios, tanto para la cepa parental como para las transformantes. Aún así, se observó una disminución de 1 a 5 veces en la actividad en todas las transformantes, excepto para la transformante con el vector sin inserto y la cepa silvestre. La cepa A412-4 fue la que menor porcentaje de inhibición presentó en la actividad proteasa (actividad de 123 U mL⁻¹, por 245 U mL⁻¹ de la cepa parental). La cepa A412-3 fue la que presentó mayor disminución de actividad proteasa (con una actividad de 48 U mL⁻¹, lo que representa un 91% de inhibición con respecto a la actividad proteasa producida por la cepa parental) (**Fig. 43B**).

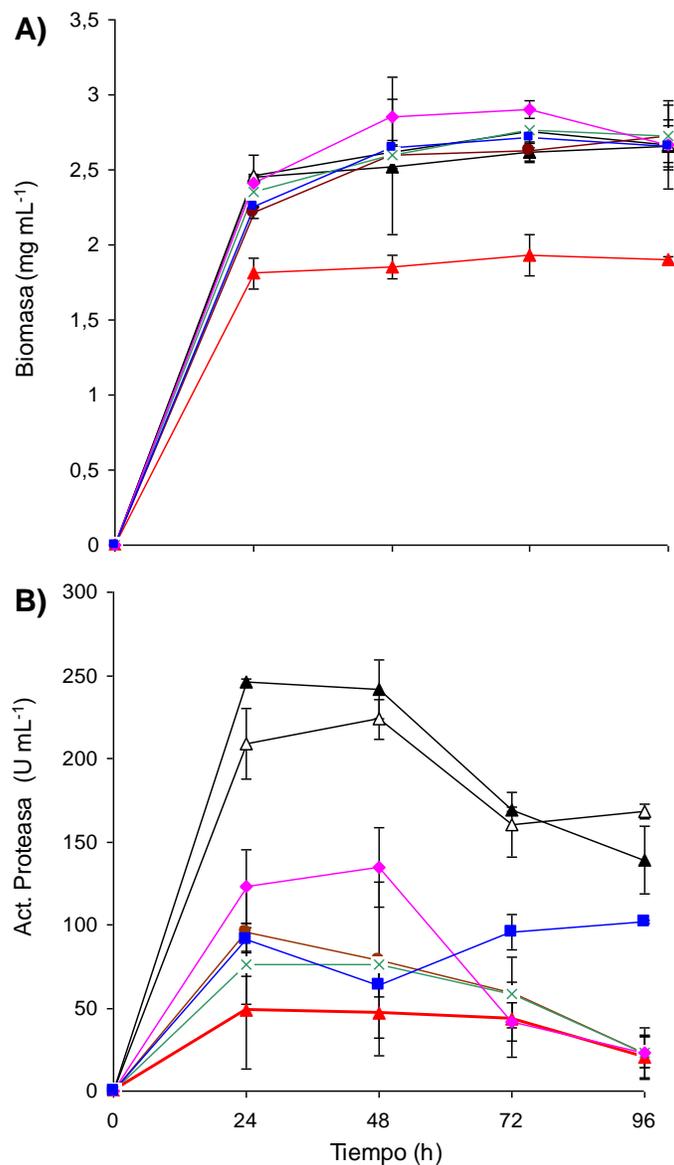


Fig. 43. (A) Perfil de crecimiento de *A. rouxii* en medio M-N y de las transformantes obtenidas con un fragmento de 412 pb de la rhizopuspepsina-2. (B) Cuantificación de la actividad proteasa de la cepa parental y de las transformantes. (▲) *A. rouxii*; (Δ) *A. rouxii* + pGdPki-RNAi; (●) A412-1; (×) A412-2; (▲) A412-3; (◆) A412-4; (■) A412-5. El experimento refleja valores promedio de tres repeticiones.

Los resultados de crecimiento y de actividad proteasa obtenidos con la cepa transformante de *A. rouxii* que incorpora el vector sin fragmento de proteasa indican que este vector no tiene efecto ni sobre el crecimiento del hongo ni sobre la actividad proteasa, ya que no existen diferencias significativas con respecto a la cepa parental. En cambio cuando el vector contiene un fragmento de proteasa de 412 pb, sí se observa una disminución significativa de la actividad.

A continuación, se realizaron fermentaciones líquidas con las transformantes que contienen el vector con un fragmento de 910 pb de la rhizopuspepsina-2, utilizando las mismas condiciones del experimento anterior. La cepa denominada A910-2 mostró mayor crecimiento (máxima producción de biomasa de 4.5 mg mL^{-1} , 1.6 veces más que la cepa parental), mientras que *A. rouxii* + pGpdPki-RNAi y la transformante A910-1 produjeron, en promedio, $2.8 \text{ mg biomasa mL}^{-1}$ (**Fig. 44A**).

Con lo que respecta a la actividad proteasa cuantificada para estas dos transformantes, se observó que la máxima actividad se encontró a las 48 h. La actividad proteasa de la transformante A910-1 fue 1.6 veces menor con respecto a la parental, no existiendo diferencia estadísticamente significativa entre ésta y la transformante A-910-2 (**Figura 44B**).

Estos resultados confirman que el utilizar un fragmento pequeño, de 412 pb, tuvo mejor efecto en el silenciamiento de la aspartato proteasa: se obtuvieron más transformantes que presentaron menor actividad proteasa que en el caso de la transformación con el vector que contenía un fragmento de 910 pb. La mayoría de los estudios sobre silenciamiento de proteínas, utilizan fragmentos de tamaño entre 300 y 500 pb, debido a que la proteína DICER (proteína que participa en el proceso de manera natural y lleva a cabo el procesamiento del dsRNA), reconoce de manera más eficiente fragmentos de menor longitud, facilitando así su fragmentación y por lo tanto el proceso de degradación del RNA (Carneiro *et al.*, 2010).

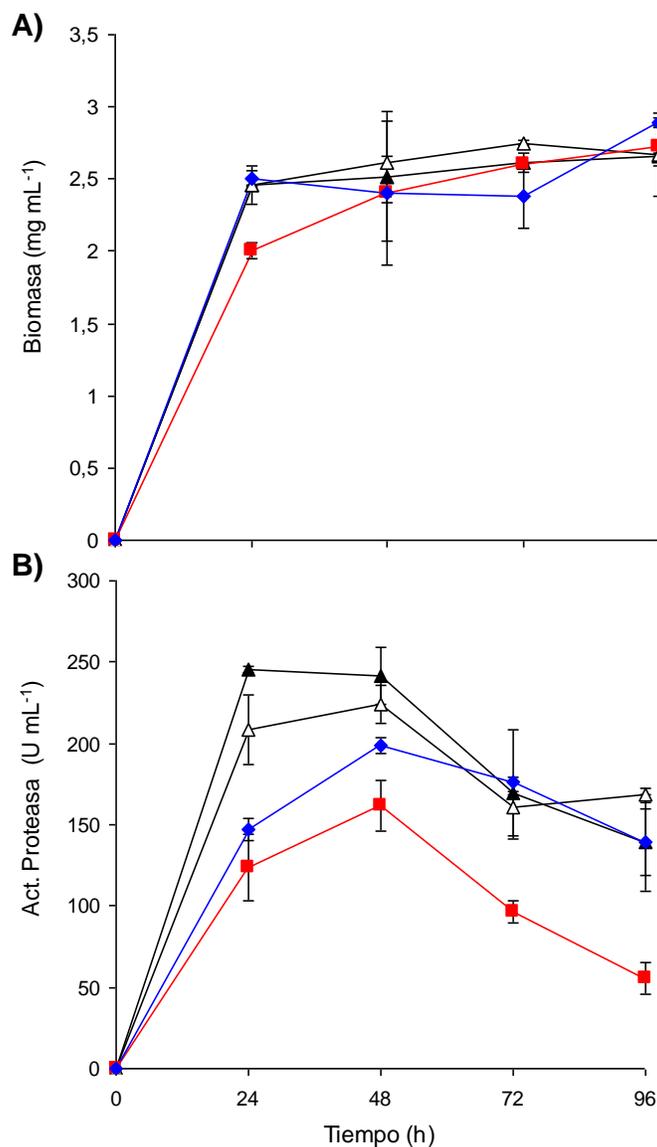


Fig. 44. (A) Perfil de crecimiento de *A. rouxii* en medio M-N y de las transformantes obtenidas con un fragmento de 910 pb. (B) Cuantificación de la actividad proteasa de la cepa silvestre y de las transformantes. (▲) *A. rouxii*; (Δ) *A. rouxii* + pGpdPki-RNAi; (■) A910-1; (◆) A910-2. Los experimentos se realizaron por triplicado.

El otro gen utilizado en el silenciamiento fue el de la rizopuspepsina-6; en este caso, como ya se comentó, se utilizó un fragmento de 455 pb.

Al igual que en los experimentos anteriores, se cuantificó la producción de la biomasa de la cepa parental y de las transformantes obtenidas. El perfil de crecimiento de todas las cepas analizadas fue muy similar entre sí, y la máxima biomasa producida también se mantuvo en promedio en 2.8 mg mL^{-1} , los resultados de dichos experimentos se muestran en la **figura 45A**.

En cuanto a la actividad proteasa producida por las cepas, se observó que la transformante A455-1 fue la que causó más inhibición de la aspartato proteasa. La máxima actividad proteasa se obtuvo a las 24 h de cultivo en todas las cepas, pero la transformante A455-1 presentó 3.5 veces menos actividad que la cepa parental (**Figura 45B**). Estos resultados confirman que el plásmido construido también fue funcional para el silenciamiento de esta proteína y que el vector pGpdPki-RNAi construido podría ser empleado para silenciar otros genes del mismo hongo, e incluso de hongos diferentes.

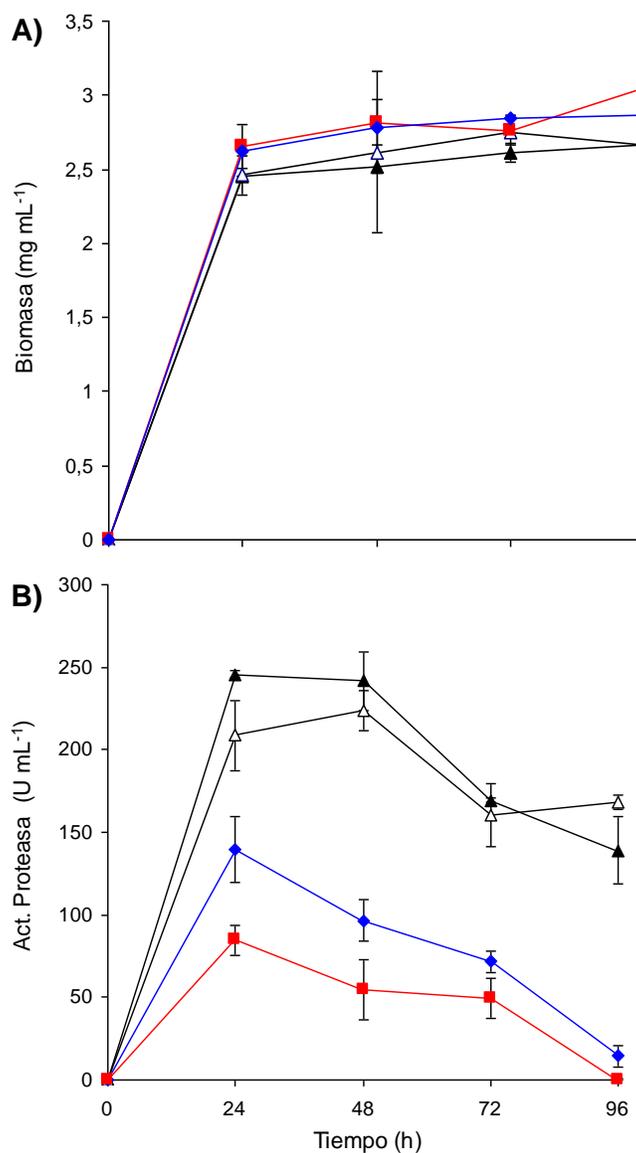


Fig. 45. (A) Perfil de crecimiento de *A. rouxii* en medio M-N y de las transformantes obtenidas con un fragmento de 455 pb de la rhizopuspepsina-6. (B) Cuantificación de la actividad proteasa de la cepa silvestre y de las transformantes. (▲) *A. rouxii*; (Δ) *A. rouxii* + pGpdPki-RNAi; (■) A455-1; (◆) A455-2. Cada uno de los puntos es un promedio de tres experimentos diferentes.

7.5.5 Efecto del silenciamiento sobre la actividad tirosinasa

A las transformantes seleccionadas para la rhizopuspepsina-2 y -6, que contenían el plásmido con fragmentos de 412, 910 y 455 pb, se les cuantificó la actividad tirosinasa.

Como sustratos, se utilizaron L-tirosina, para determinar actividad monofenolasa, y L-Dopa y 4-*tert*-butilcatecol, para la actividad difenolasa.

7.5.5.1 Determinación de la actividad tirosinasa producida por las transformantes A-412

Las cinco cepas A-412 analizadas mostraron un incremento en su actividad tirosinasa respecto a los controles (cepa silvestre y cepa con vector sin inserto). Esto confirma que la proteasa tiene un efecto negativo sobre la actividad tirosinasa cuando está presente en altas cantidades en el medio. A las 48 horas de cultivo, la cepa A412-4 (que había mostrado un menor nivel de silenciamiento al cuantificar su actividad proteasa) incrementó la actividad tirosinasa 2.4 veces respecto al control, mientras que la cepa A412-3 (la transformante es la que presentó menor actividad proteasa) la incrementó 4 veces (**Fig. 46**).

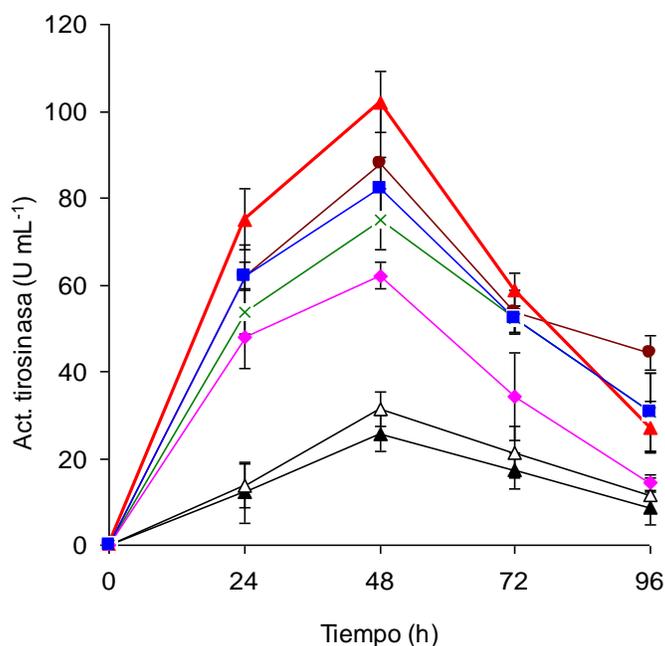


Fig. 46. Determinación de la actividad monofenolasa de las transformantes silenciadas con el fragmento de 412 pb. (▲) *A. rouxii*; (△) *A. rouxii* + pGpdPki-RNAi; (●) A412-1; (×) A412-2; (▲) A412-3; (◆) A412-4; (■) A412-5. El experimento refleja valores promedio de tres repeticiones.

De acuerdo a los resultados obtenidos con el sustrato tirosina y las transformantes silenciadas, el análisis estadístico, demostró que los errores se distribuyen normalmente de

acuerdo a la prueba Skewness (Prob. Level 0.70), mientras que el análisis de varianza mostró que al menos en una de las cepas encontradas su actividad monofenolasa fue estadísticamente diferente al resto con un nivel de significancia menor a 0.000, lo cual se comprobó con la prueba Tukey-Kramer indicando que la cepa A412-3 produjo en promedio 102 (U mL⁻¹) de actividad tirosinasa, siendo diferente para el resto de las cepas y los controles (*A. rouxii* y *A. rouxii*+pGpdPki-RNAi). Además se tiene la confianza del 95% de que la actividad tirosinasa encontrada en esta cepa está entre 96.4 y 109.2. El análisis estadístico realizado con el paquete informático NCSS, se muestra en el anexo 2.

Al determinar la actividad difenolasa, empleando como sustratos L-Dopa y 4-*tert*-butilcatecol (**Figura 47A y 47B**), se observó el mismo efecto descrito para la actividad monofenolasa, con un incremento significativo de las actividades de las transformantes sobre ambos difenoles. A las 48 horas de cultivo, la cepa A412-3 fue de nuevo la que mostró el mayor incremento en su actividad (2.6 veces sobre dopa y 2.0 veces para TBC),

En la cepa que contiene el vector sin inserto no se aprecia ningún efecto sobre la actividad tirosinasa, ya que las actividades encontradas, tanto mono como difenolasa, son muy similares a la cepa parental de *A. rouxii*.

Con estos resultados se confirma una relación inversa entre la actividad aspartato proteasa y la actividad tirosinasa.

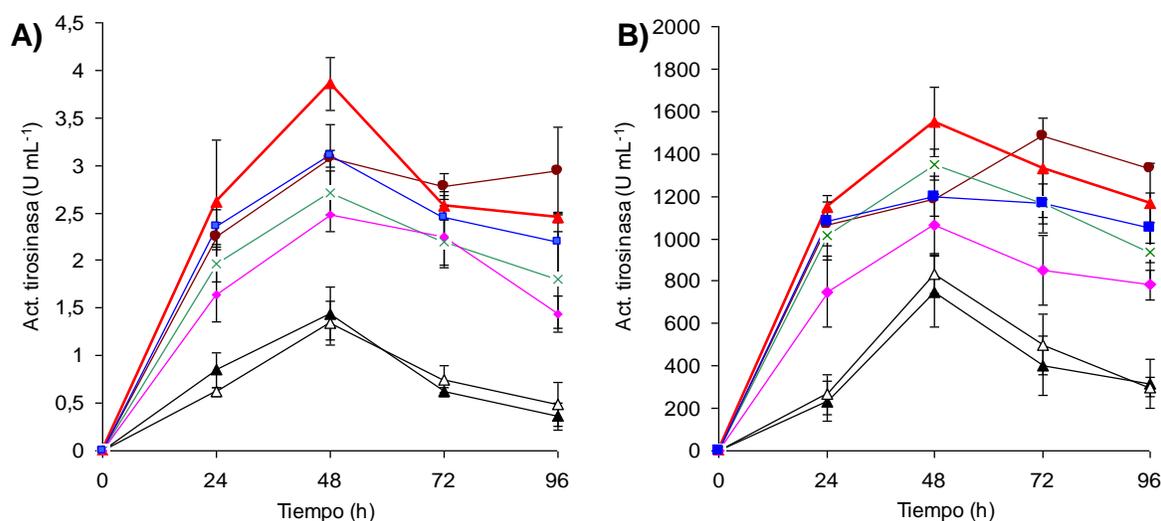


Fig. 47. Determinación de la actividad difenolasa sobre las transformantes silenciadas con un fragmento de 412 pb. (A) Sustrato L-dopa y (B) Sustrato TBC. (▲) *A. rouxii*; (Δ) *A. rouxii*+pGpdPki-RNAi.

rouxii + pGpdPki-RNAi; (●) A412-1; (X) A412-2; (▲) A412-3; (◆) A412-4; (■) A412-5. El experimento refleja valores promedio de tres repeticiones.

7.5.5.2 Determinación de la actividad tirosinasa producida por las transformantes A-910

A las 48 horas de cultivo, la cepa A910-1 incrementó 2.5 veces la actividad monofenolasa, mostrando una estabilidad importante hasta el final del cultivo, mientras que la cepa A910-2 presentó 2.1 veces más actividad monofenolasa con respecto a los controles. Los resultados se muestran en la **figura 48**.

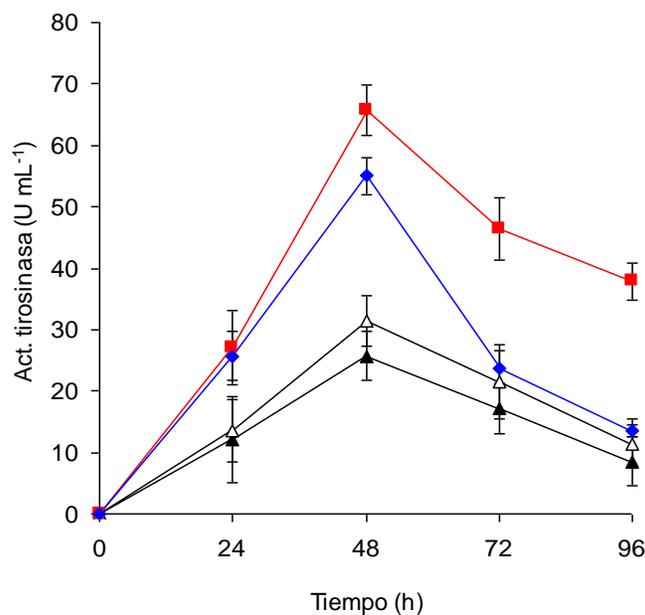


Fig. 48. Determinación de la actividad monofenolasa de las transformantes silenciadas con el fragmento de 910 pb. (▲) *A. rouxii*; (Δ) *A. rouxii* + pGpdPki-RNAi; (■) Transformante A910-1; (◆) Transformante A910-2.

La actividad difenolasa mostró el mismo efecto: a las 48 horas, la cepa A910-1 presenta 1.8 y 1.5 mayor actividad con L-dopa y TBC, respectivamente, comparada con los dos controles analizados (cepa silvestre y *A. rouxii* + pGpdPki-RNAi) a las 48 horas (**Figura 49A y 49B**).

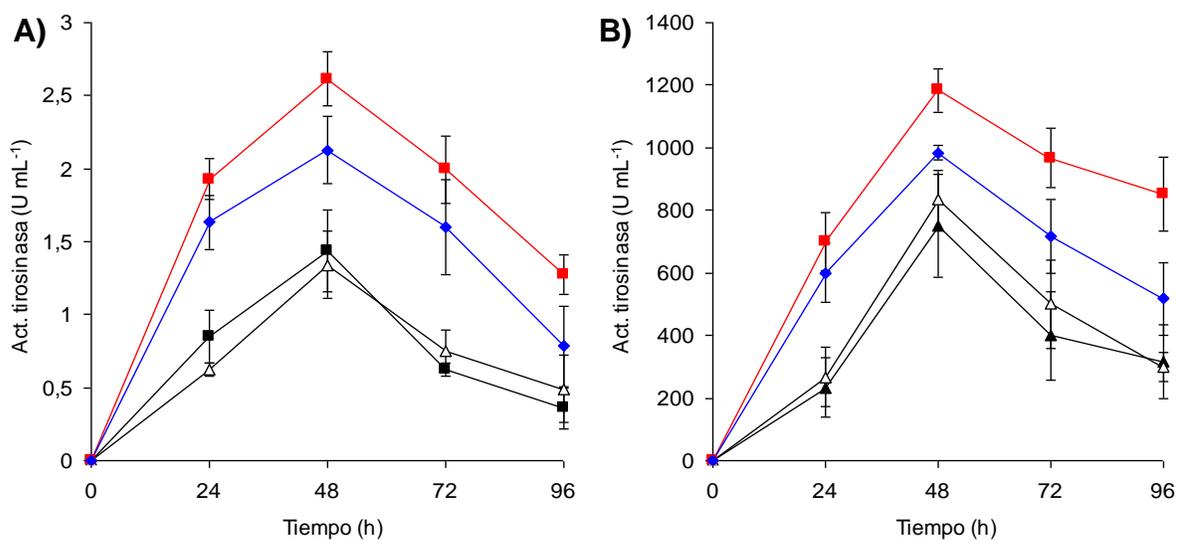


Fig. 49. Determinación de la actividad difenolasa sobre las transformantes silenciadas con el fragmento de 910 pb. (A) Sustrato L-dopa y (B) Sustrato TBC. (▲) *A. rouxii*; (Δ) *A. rouxii* + pGpdPki-RNAi; (■) Transformante A910-1; (◆) Transformante A910-2.

7.5.5.3 Determinación de la actividad tirosinasa producida por las transformantes A-455

Respecto a las transformantes que contienen el fragmento de 455 pb de la rhizopuspepsina-6, A455-1 y -2 mostraron 1.3 y 1.6 veces más actividad monofenolasa, respectivamente, que la cepa silvestre (**Fig. 50**).

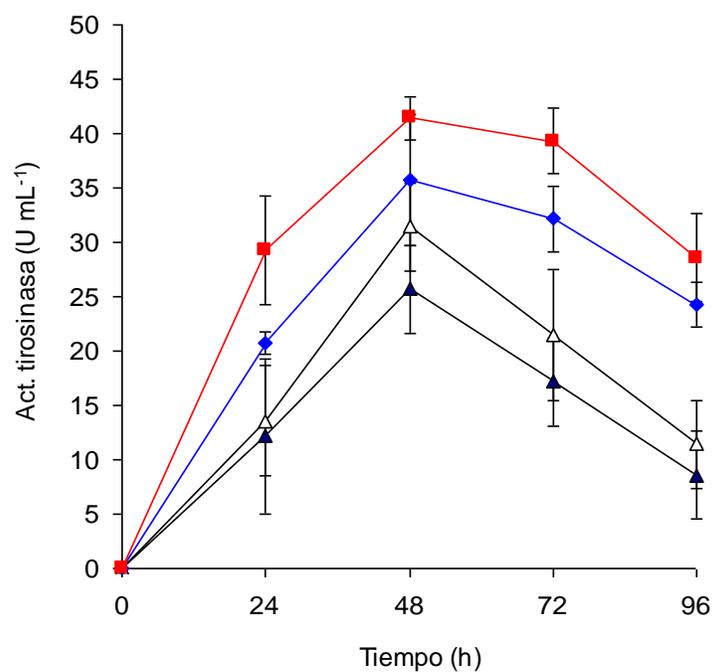


Fig. 50. Determinación de la actividad monofenolasa empleando como sustrato tirosina sobre las transformantes silenciadas para la rhizopuspepsina-6 con un fragmento de 455 pb. (▲) *A. rouxii*; (Δ) *A. rouxii* + pGpdPki-RNAi; (■) Transformante A455-1; (◆) Transformante A455-2.

En cuanto a la actividad difenolasa, se observó que tanto las transformantes como las dos cepas control presentaron actividades similares, no existiendo diferencias estadísticamente significativas (**Fig. 51A** y **51B**).

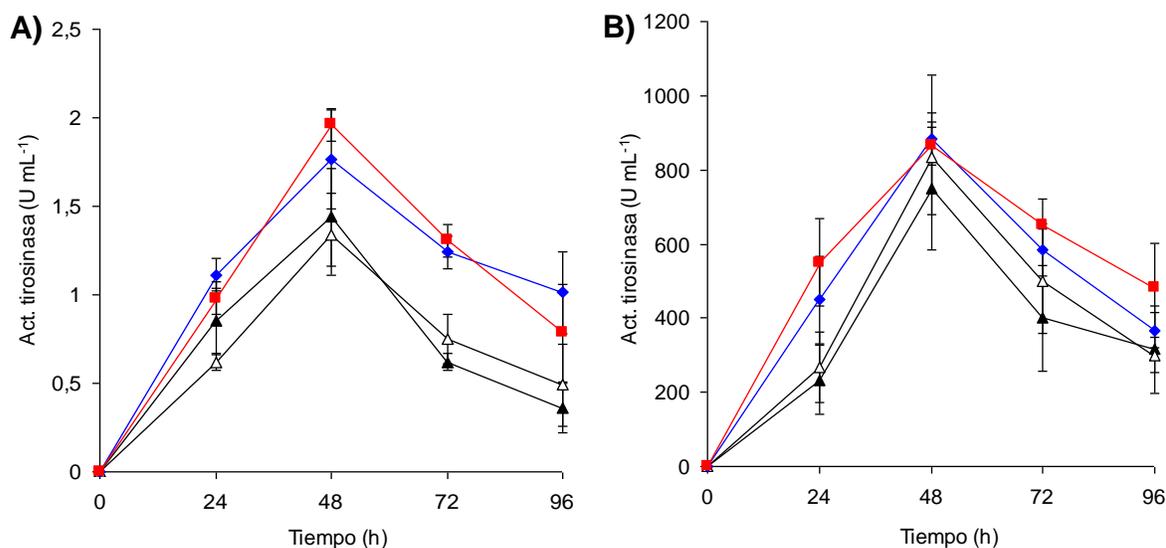


Fig. 51. Determinación de la actividad difenolasa sobre las transformantes silenciadas para la rhizopuspepsina-6 con un fragmento de 455 pb. (A) Sustrato L-dopa y (B) Sustrato TBC. (▲) *A. rouxii*; (Δ) *A. rouxii* + pGpdPki-RNAi; (■) Transformante A455-1; (◆) Transformante A455-2.

Los resultados obtenidos indican que, probablemente la rhizopuspepsina-6 no tiene un efecto directo sobre la actividad tirosinasa. Las transformantes A455-1 y -2 presentan poca actividad proteasa, 3.5 veces menor a la de la cepa parental, y sin embargo no tuvo reflejo en un incremento importante de la actividad tirosinasa.

Al realizar un análisis estadístico de las transformantes silenciadas de rhizopuspepsin-2 (fragmentos 412 y 910 pb) y -6, se encontró que no existen diferencias en la actividad proteasa para las transformantes A455-2 y A412-3, pero sí del resto de las cepas. Mientras que para la actividad tirosinasa se encontró que la cepa denominada A412-3 produce en promedio 102 U mL⁻¹ de actividad monofenolasa, presentando la mayor actividad tirosinasa y por consiguiente diferente del resto de las transformantes, de acuerdo a la prueba Tukey-Kramer. El análisis estadístico se muestra en el anexo 2.

Como experimento adicional, se realizaron ensayos para determinar cualitativamente la actividad proteasa sobre leche descremada y la actividad tirosinasa con tirosina como sustrato en el medio. Los resultados muestran que la cepa parental de *A. rouxii* produce mucha proteasa y poca actividad tirosinasa. La transformante A-455-2

(rhizopuspepsin-6) produjo poca actividad proteasa y prácticamente la misma actividad tirosinasa, comparada con la cepa parental. Las cepas A910-1 y A412-3 (rhizopuspepsin-2), por el contrario, produjeron muy poca actividad proteasa y mucha actividad tirosinasa, con respecto a la cepa control (**Fig. 52**).

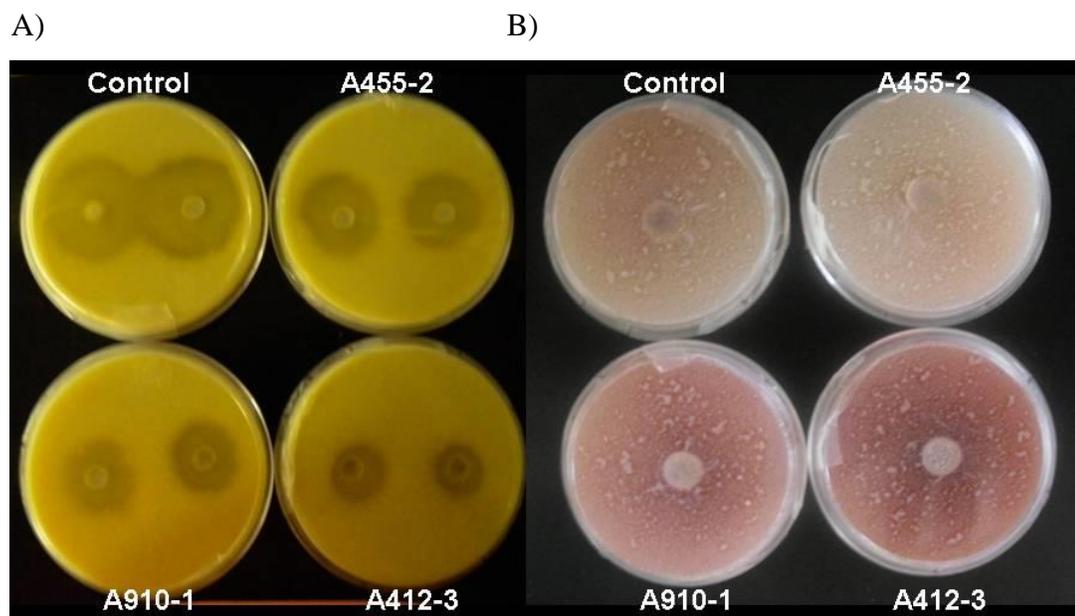


Fig. 52. Ensayos realizados para determinar actividad proteasa y tirosinasa de la cepa silvestre y de las transformantes que mostraron mayor nivel de silenciamiento. La actividad proteasa se determinó con leche descremada (A), mientras que la tirosinasa con L-tirosina como sustrato (B).

7.6 PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA TIROSINASA A PARTIR DE LA CEPA SILENCIADA A412-3.

El extracto enzimático crudo se obtuvo del caldo de cultivo de 20 matraces, libre de biomasa, a las 48 h de cultivo. El caldo se liofilizó y resuspendió en 100 mL de amortiguador de fosfatos (50 mM, pH 7.0), A continuación, se adicionó sulfato de amonio (35-80%) para precipitar las proteínas. Las proteínas precipitadas se resuspendieron en buffer de fosfatos 50 mM pH 7.0 y se dializaron durante 24 h, cambiando durante ese tiempo por lo menos tres veces el amortiguador. Por último la enzima fue parcialmente purificada utilizando dos columnas de cromatografía, una de intercambio aniónico (DEAE-

Sepharosa) y otra de filtración en gel (Sephadex-200). Los pasos de purificación se muestran en la **tabla 9**.

Tabla 9. Pasos de la purificación parcial de la tirosinasa a partir de la transformante A412-3 de *A. rouxii*.

Etapas de purificación	Concentración de proteína (mg mL ⁻¹)	Actividad monofenolasa			Actividad difenolasa		
		Actividad total (U mL ⁻¹)	Actividad específica (U mg proteína ⁻¹)	Factor de purificación (-veces)	Actividad total (U mL ⁻¹)	Actividad específica (U mg proteína ⁻¹)	Factor de purificación (-veces)
Extracto concentrado	1.664	1975	1186	1	2366	1422	1
30-80% (NH ₄) ₂ SO ₄	1.024	1800	1757	1.48	2200	2148	1.5
DEAE-Sepharosa	0.448	1675	3738	3.15	1933	4315	3.0
Sephadex-200	0.064	625	9765	8.22	966	15104	10.6

Las proteínas fueron eluidas de la columna de intercambio aniónico con un gradiente de sales de 0-0,5 M y un flujo de 1 mL min⁻¹, colectándose fracciones de 3 mL. Se obtuvo un pico con actividad tirosinasa en las fracciones 13 a 15. Estas tres fracciones se juntaron (**Fig. 53A**), se concentraron y se aplicaron a la columna de filtración en gel, en la que se colectaron 70 fracciones de 3 mL; la fracción 23 presentó la mayor actividad tirosinasa (**Fig. 53B**). La determinación de la proteína total se realizó leyendo la absorbancia de cada una de las fracciones a 280 nm, mientras que la actividad monofenolasa de la tirosinasa se cuantificó utilizando L-tirosina como sustrato.

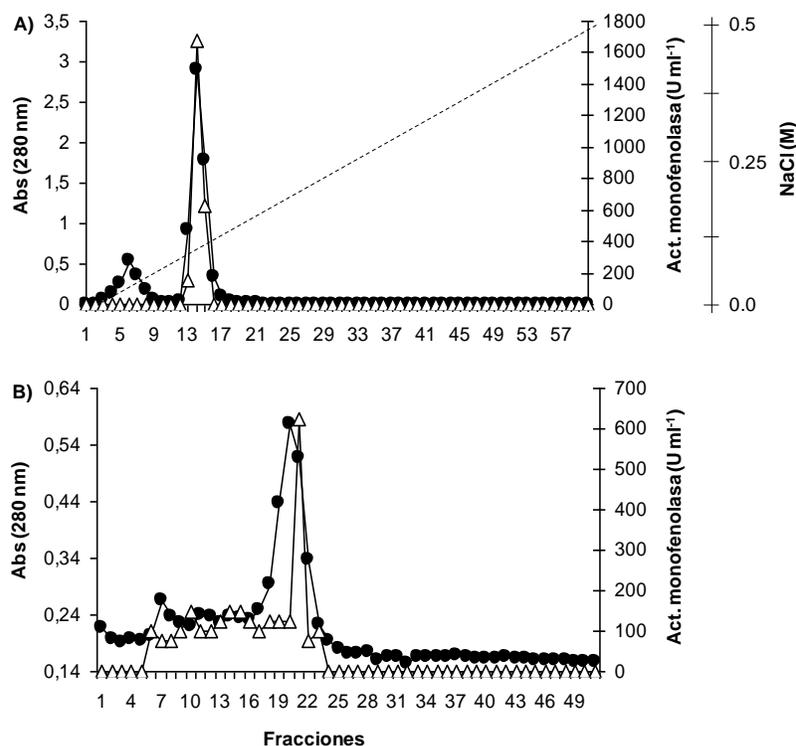


Fig. 53. Cromatogramas obtenidos de (A) columna de intercambio aniónico y (B) columna de filtración en gel de la tirosinasa parcialmente purificada a partir de la transformante A412-3 de *A. rouxii*. (●) Proteína 280 nm, (Δ) Actividad monofenolasa

Los pasos de purificación se comprobaron en un gel de acrilamida al 12%, que fueron teñidos con azul de Coomassie (**Fig. 54**). En el gel se observa que la tirosinasa comercial (control) no está completamente pura, pues al pasarla por la columna de DEAE-Sepharosa muestra tres bandas bien definidas, con tamaños aproximados de 128, 75 y 43 kDa. La fracción 6 de la columna de intercambio aniónico presentó una banda de tamaño similar a la tirosinasa comercial, de aproximadamente 75 kDa. La fracción 14 de esa misma columna presentó una serie de bandas, algunas bien definidas y de tamaño similar a los de la tirosinasa comercial. Cuando las fracciones 13-15 de la columna de intercambio aniónico, se juntaron y se pasaron a través de otra columna de filtración en gel, en la fracción 23 del cromatograma obtenido se mostró un patrón de bandas similares a las bandas obtenidas de la tirosinasa comercial (**Fig. 54**, carril 3), las cuales fueron extraídas del gel para su secuenciación, por electrospray.

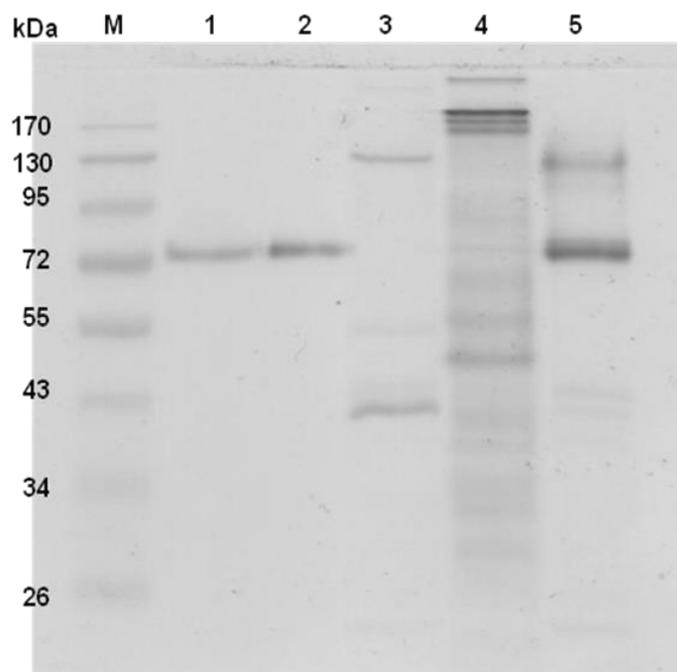


Fig. 54. Gel de acrilamida obtenido de los procesos de purificación de la columna de intercambio aniónico y filtración en gel de la tirosinasa parcialmente purificada a partir de la transformante A412-3 de *A. rouxii*. M) Marcador de peso molecular PageRuler™ prestained Protein Ladder. 1 y 2) Fracción 6 de la columna de intercambio aniónico; 3) Fracción 23 de columna de filtración en gel; 4) Fracción 14 de la columna de intercambio aniónico; 5) Tirosinasa comercial, tras columna de intercambio aniónico.

7.6.1 Obtención de la secuencia de aminoácidos de las proteínas tirosinasa purificadas de la cepa silenciada a 412-3

La secuencia de aminoácidos de cada una de las bandas observadas en el gel se obtuvo mediante espectrometría de masas. Los resultados indicaron que las bandas con tamaño de 43 y 128 kDa, presentaron un 100% de similitud con una tirosinasa y polifenoloxidasas de *Agaricus bisporus*. Mientras que el porcentaje de similitud de la tirosinasa encontrada en *A. rouxii* con otras especies de hongos fue menor (como las de *P. nameko* o *L. edodes*, por ejemplo). A continuación se muestra en la **figura 55**, la secuencia de los péptidos obtenidos.

```

1  MSDKKSLMPL VGIPGEIKNR LNILDFVKND KFFTLYVRAL QVLQARDQSD
51  YSSFFQLGGI HGLPYTEWAK AQPQLHLYKA NYCTHGTVLF PTWHRAYEST
101 WEQTLWEAAG TVAQRFTTSD QAEWIQAAKD LRQPFWDWGY WPNDPDFIGL
151 PDQVIRDKQV EITDYNGTKI EVENPILHYK FHPIEPTFEG DFAQWQTMR
201 YPDVQKQENI EGMIAGIKAA APGFREWTFN MLTKNYTWEL FSNHGAVVGA
251 HANLEMVHN TVHFLIGRDP TLDPLVPGHM GSVPHAAFDP IFWMHHCNVD
301 RLALWQTMN YDVYVSEGMN REATMGLIPG QVLTEDSPLE PFYTKNQDPW
351 QSDDLEDWET LGFSYPDFDP VKGKSKEEKS VYINDWVHKH YGFVTTQTEN
401 PALRLSSSQ RAKSDHETQY ALYDWVIHAT FRYYELNNSF SIIFYFDEGE
451 GCTLESIIGT VDAFRGTTSE NCANCARSQD LIAEGFVHLN YYIGCDIGQH
501 ADHEDDAVPL YEPTRVKEYL KKRKIGCKVV SAEGELTSLV VEIKGAPYYL
551 PVGEARPKLD HEKPIVILDD IHRVN

```

Fig. 55. Secuencias peptídicas obtenidas para la banda de 43 kDa, obtenida a partir de la fracción 23 de la cromatografía de filtración en gel. Letras en negritas y subrayadas indican los aminoácidos encontrados por espectrometría de masas.

Al realizar un análisis más detallado de las regiones de péptidos encontrados con otras tirosinasas de diferentes hongos, se observó que no se logró obtener parte del sitio activo de la proteína, ni de los residuos de histidina característicos de los sitios de unión al cobre CuB. Solo se localizaron las histidinas de uno de los sitios de unión al cobre (CuA), lo cual se observa claramente en parte del alineamiento mostrado en la **figura 56**. Las secuencias de tirosinasas utilizadas para dicho alineamiento fueron las reportadas para *Agaricus bisporus*, *Pholiota nameko*, *Lentinula edodes*, *Pycnoporus sanguineus* y *Neurospora crassa*, las cuales mostraron 100, 38, 37, 33 y 27% de similitud, respectivamente; de acuerdo al análisis realizado con el programa informático BlastP.

Majority	MS---HFVXTGATGGTGG--AAPNRLEINDFVKN-EKFFSLYVQALQVLYQAKDQEDLSSFFQIGGIHGLPYTPWAG-AG	
	10 20 30 40 50 60 70 80	
<i>A. rouxii</i>	MS---DKKSLMPLVGIPE--IKNRINLDFVKN-DKFFTLVVRALQVL--QARDQSDYSSFFQIGGIHGLPYTEWAKAOP	73
<i>A. bisporus</i>	MS-----LIATVGGTGG--VKNRLNIVDFVKN-EKFFTLVVRSELELL--QAKEQHDYSSFFQLAGIHLPLPTEWAKERP	69
<i>L. edodes</i>	MS---HYLVGTGATGGSTGAAAPNRLEINDFVKQ-EDQFSLYIQALQYIYSSKSQDDIDSFFQIGGIHGLPYVPWDG-AG	75
<i>N. crassa</i>	MSTDIKFAITGVPTTPSSNGAVPLRRELRLDQQNPEQFNLYLLGLRD-FQGLDEAKLDSYQVAGIHLMPFKPWAGVPS	79
<i>P. nameko</i>	MS---RVVITGVSG-----TIANRLEINDFVKN-DKFFSLYIQALQVMSSVPPQENVRVFFQIGGIHGLPYTPWDGITG	70
<i>P. sanguineus</i>	MS---HFIVTGPVGGQTEGAPAPNRLEINDFVKN-EEFFSLYVQALDIMYGLK-QEELISFFQIGGIHGLPYVAWS-AG	74
Majority	DXPLDKA--WG--GYCTHGSVLFPTWHRPYVALYEQILQAAAGDVAAKFTVSD--QARWVQAAADLRQPYWDWA-----K	
	90 100 110 120 130 140 150 160	
<i>A. rouxii</i>	QLHLYKA-----NYCTHGTVLFPTWHRAYESTWEQTLWEAAGTVAORFTTSD--QAEWIQAAKDLRQPFWDWGYWNPDP	145
<i>A. bisporus</i>	SMNLYKA-----GYCTHGSVLFPTWHRPYVALYEQILQAAAGDVAAKFTVSD--QAEWIQAAKDLRQPFWDWGYWNPDP	135
<i>L. edodes</i>	NKPVDVDA-WE--GYCTHGSVLFPTWHRPYVALYEQILQAAAGDVAAKFTVSD--QAEWIQAAKDLRQPFWDWGYWNPDP	144
<i>N. crassa</i>	DTDWSQFGSSGFGYCTHSSILFITWHRPYVALYEQALYASVQAVAKFVVEGGLRAKYVAAAKDFRAPYFDWASQPP-K	158
<i>P. nameko</i>	DQPPFDPTQWG--GYCTHGSVLFPTWHRPYVALYEQILHKKVQDIAATYTTSD--KAAWVQAAANLRQPYWDWA-----A	141
<i>P. sanguineus</i>	AD--DPAE-PS--GYCTHGSVLFPTWHRPYVALYEQILHKKYAGEIADKYTV-D--KPRWQKAAADLRQPFWDWA-----K	141
Majority	NTVP-PDEVISLDEVITIDYDGKKISVDNPLLRYPHFIDPSFPEPYSD-A-W---PTTLRHPDSR-NARDNVPLGIAT	
	170 180 190 200 210 220 230 240	
<i>A. rouxii</i>	DFIGLDPQVIRDKOVEITDNGTKIEVENPILHYKHFPLEPTF-E--GDFAW--OTTMYRDPVOK--OENIEGMIAG	216
<i>A. bisporus</i>	ELMP-PDEVIKNEEVNITNYDGKKISVKNPILRYHFHFIDPSF-KPYGDFATW---RTVVRNPDNR---REDIPGLIKK	207
<i>L. edodes</i>	NPVP-PPEVISLDEVITVNSPGKISVNPPLRRYTFHFIDPSFPEPYQS---W---STTLRHPDSR-NARDNVPLGIAT	217
<i>N. crassa</i>	GTLAFP-ESLSSRTIQVVDVKGKTKINNPLRHFTHFVNPSPGDFS--AASRYPSTVRYPNRLTGASRDE--RIAPI	232
<i>P. nameko</i>	NAV-PDQVIVSKVTITGNSNGHKVEVDNPLYHYKHFIDPSFPRPYSE---W---PTTLRQPNSSRNPNATDNVAKLRNV	214
<i>P. sanguineus</i>	NTLP-PPEVISLDEVITITPDGQRTQVDNPLRRYRHFIDPSFPEPYSN---W---PATLRRHPTSDGSAKDNVVDLTTT	214
Majority	LRAAQPIRKTNYLLTRVHTWEAFSNH--TPGDGGSASNSLEAVHDXIHVDVGGG-----GHMGDPSVAADFPIFF	
	250 260 270 280 290 300 310 320	
<i>A. rouxii</i>	TKAAAPGFREWFNMLTKNYTWELFSNH--GAVVGAHA-NSLEMVHNTVHFLIGRDPDLPVPHMGSVPHAAFDPIFF	293
<i>A. bisporus</i>	MRLEEGQIREKTYNMLKFNDAWERFSNH--GISDDQHA-NSLESVHDDIHVMVGYGK-----IEGMDHPFFAADFPIFF	279
<i>L. edodes</i>	LRASAGQLKTKTYNLLTRVHTWPAFNSH--TPDDGGSTSNSLEGIHDSVHVDVGGN-----GQMSDPSVAGFDFPIFF	287
<i>N. crassa</i>	LANELASLRNNSVLLLSYKDFDAFSYNRWDPNTPGDFGSLEDVHNEIHDRGTGN-----GHMSSLEVSADFPLWF	304
<i>P. nameko</i>	LRASQENITSNYTSMLTRVHTWPAFNSH--TVGDGGSTSNSLEAIDHGIHVDVGGG-----GHMGDPVAAADFPIFF	284
<i>P. sanguineus</i>	LKADQPDITTKTYNLLTRVHTWPAFNSH--TPGDGGSNSNSLEAIDHDIHDSVGGG-----GQMGDPSVAGFDFPIFF	284
Majority	LHHCNVDRLLSLWSALNPGVWVTSGPSDEGTGIPPGAVVDKSTPLTPFWDT-QSTFWTS--AXVTDSTLGSYSEPFNG	
	330 340 350 360 370 380 390 400	
<i>A. rouxii</i>	MHHCNVDRLALWQTMNYDVVYSEGMNREATMGLIPGOVLTEDSPLPEFYTK-NODPWOS--DDELDWETLGSYPDFDP	370
<i>A. bisporus</i>	LHHTNVDRLLSLWKAINPDVWVTSGRNRDGTMGIAINAQINSETPLEPFYQS-GDKVWTS--ASLADTARLGSYPDFDK	356
<i>L. edodes</i>	MHHAQVDRLLSLWSALNPRVWITDGPSPGDGTWITPDPVVGKDTDLTPFWNT-QSSYWIS--ANVTDTSKMGYTYPEFNN	364
<i>N. crassa</i>	LHHVNDRLWSIWQDLNPNFSMTPRPAPYSTFVAQEGESQSKSTPLEPFWDKSAANFWTS--EQVKDSITFGYAYPETQK	382
<i>P. nameko</i>	LHHCNVDRLLSLWAAINPGVWVSPGSEDTGFFLPEAPVDVSTPLTPFSNT-ETTFWAS--GGITDTTKLGYTYPEFNG	361
<i>P. sanguineus</i>	LHHCQVDRLLALWSALNPGVWVNSSSSEDTGTYTIPDSTVDQTTALTPFWDT-QSTFWTSFQSAGVSPQFGYSYSEPFNG	363
Majority	LDGGSKEAVKAAIADXVNELYGS-V---F-----P-----V-LAA--V--SG-A-APE-A-----	
	410 420 430 440 450 460 470 480	
<i>A. rouxii</i>	VKGSKEEKSVYINDVWVHKHYGF-V-----P-----V-LAA--V--SG-A-APE-A-----	394
<i>A. bisporus</i>	LVGGTKELIRDAIDDLIDERYGSKP-----P-----V-LAA--V--SG-A-APE-A-----	381
<i>L. edodes</i>	LDMGNEVAVRSIAAQVNKLYGG-----P-----FTKFAAAIQPSSQTADAST-----	409
<i>N. crassa</i>	WKYSSVKEYQAAIRKSVTALYGSNVFANFVENVADRTPALKKPQATGEEKSTVSAHAHAVALSAGAKVAEKVHNVFQH	462
<i>P. nameko</i>	LDLGNQAVKAAIIGNIVNRLYGASVFSGF-----AAATSAIGAGSVASLAADVPLEKAPAPAPEA-----	422
<i>P. sanguineus</i>	INLQDQKAVKDHIAEVVNELYGHMRKTF-----P-----FPQLQAVSVAKQGDVAVTPSVA-----	414

Fig. 56. Parte del alineamiento de aminoácidos obtenidos de la secuenciación de la fenoloxidasa producida por *A. rouxii* (subrayado en negro): Residuo de histidina característico en los sitios de unión a cobre.

Estos resultados permiten confirmar que la fenoloxidasa extracelular producida por *A. rouxii* es una tirosinasa.

VIII. DISCUSIÓN

Las proteasas ácidas son unas de las principales proteínas secretadas por las especies de *Rhizopus*, género filogenéticamente muy cercano a *Amylomyces* (Kito *et al.* 2009). Muchos autores han reportado la purificación y caracterización de proteasas ácidas de *R. microsporus* var *rhizopodiformis*, *R. chinesis*, *R. hangchow*, *R. oryzae*, *Mucor* sp y *Rhizomucor miehei* (Ichishima *et al.*, 1984; Preetha y Boopathy, 1997; Fernández-Lahore *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2005), pero ninguno de estos trabajos han mencionado una posible relación de las proteasas con otras enzimas producidas por los hongos. Algunos trabajos sí han reportado, por otra parte, el efecto de proteasas extracelulares producidas por basidiomicetos y ascomicetos sobre las peroxidasas y fenoloxidasas producidas por dichos hongos (Palmieri *et al.*, 2000; Staszczak *et al.* 2000; Xiaoping *et al.*, 2008; Vishwanatha *et al.*, 2009).

En trabajos previos de nuestro grupo de investigación, se había reportado una tirosinasa involucrada en la degradación de PCF producida por los zygomycetos *A. rouxii* y *R. oryzae* ENHE, la cual incrementaba su actividad al suplementar el medio con tirosina (Tomasini *et al.*, 2001; Montiel *et al.*, 2004; Marcial *et al.*, 2006; León-Santiesteban *et al.*, 2008). En el presente trabajo se confirmó que *A. rouxii* produce una proteasa extracelular ácida secretada al mismo tiempo que la tirosinasa (a las 48 h de cultivo). Los péptidos secuenciados de la proteasa ácida extracelular identificada por LC-MS/MS presentó un 99% de similitud con las asparto proteasas del género *Rhizopus*. Además, la masa molecular de esta proteína extracelular encontrada fue de 40 kDa, la cual está en el intervalo de las asparto proteasas reportadas, de 30-45 kDa.

Las tirosinasas reportadas de *A. rouxii*, *Neurospora*, *Agaricus*, *Pycnoporus*, *Pholiota*, *Trichoderma* (Lerch, 1983; Espin and Wichers, 1999a; Montiel *et al.*, 2004; Halaouli *et al.*, 2005; Kawamura-Konishi *et al.*, 2007; Westerholm-Parvinen *et al.*, 2007) presentan tamaños similares, por lo que probablemente este hecho (además del de utilizar un único procedimiento cromatográfico, como fue el intercambio aniónico, y que las máximas actividades se encontraran en los dos casos a las 48 h de cultivo) influyó considerablemente en los problemas que se presentaron para la purificación parcial de la tirosinasa. Otro dato que apoyaría a esta hipótesis es que algunos reportes han mencionado que las tirosinasas de los hongos pueden oxidar la caseína, lo cual puede deberse a que

estén contaminadas con proteasas (Ichishima *et al.*, 1984; Flurkey *et al.*, 2008; Selinheimo *et al.*, 2009).

El estudio con diferentes inhibidores de proteasas mostró que la mayor inhibición de la actividad fue obtenida con pepstatina A, usando una concentración de 3 mM. Este compuesto es un inhibidor específico para proteasas de tipo ácido, inhibiendo básicamente los dos grupos carboxilo presentes en su centro activo, lo que les hace perder su actividad (Kudryavtseva *et al.*, 2008). Resultados similares han sido reportados por Palmieri *et al.* (2001), Kumar *et al.* (2005) y Kudryavtseva *et al.* (2008) con aspartato proteasas de *A. niger* y *R. oryzae*.

Los resultados obtenidos muestran que la aspartato proteasa de *A. rouxii* tiene un efecto negativo sobre la actividad tirosinasa producida por el mismo hongo, ya que cuando la actividad proteasa fue inhibida en un 73% con pepstatina A, la actividad tirosinasa fue aproximadamente 2 veces más alta que la del control sin inhibidor. Algunos reportes han mencionado que las proteasas participan en la regulación de otras enzimas sintetizadas por un organismo determinado. La activación de enzimas zimógenas de hongos es un paso importante en la regulación de una serie de procesos fisiológicos (Akhmedova, 1994). Por ejemplo, la proteinasa PoS1 de *Pleurotus ostreatus* juega un papel importante en la regulación post-traduccional de las lacasas POXA1b y POXA3, enzimas que forman parte del complejo ligninolítico (Palmieri *et al.*, 2001 ; Kudryavtseva *et al.*, 2008). La incubación de la proteinasa PoS1 junto con la lacasa POXA3 incrementó en un 30% la actividad de esta última, probablemente debido a que la proteólisis que sufre dicha enzima la transforma en una isoforma más activa. Sin embargo, la isoforma POXA1b pierde completamente la actividad en presencia de la proteasa (Palmieri *et al.*, 2001). El rompimiento específico de la lacasa POXA1b se lleva a cabo durante la fase temprana de crecimiento del hongo por las proteasas secretadas en cultivos líquidos. La desaparición de dicha isoforma se correlacionó con la aparición de la actividad proteolítica extracelular (Palmieri *et al.*, 2001). Experimentos adicionales sugirieron que PoS1 no degrada directamente POXA1b, pero es posible que actúe como una vía de inducción, en un mecanismo de cascada que involucra a otras proteasas extracelulares del hongo (Palmieri *et al.*, 2001).

Otra relación similar se observó entre las ligninas peroxidasas y las proteasas extracelulares de *Phanerochaete chrysosporium* (Pascal *et al.*, 1993). En este caso, la

aparición de la actividad proteasa dio lugar a la degradación casi completa de todas las ligninas peroxidasas y, por consiguiente, a la pérdida de su actividad (Dosoretz *et al.*, 1990). En *Trametes versicolor* se demostró que proteasas intracelulares y extracelulares participan en la regulación de las actividades ligninolíticas bajo condiciones de limitación de nutrientes (Staszczak *et al.*, 2000).

También, las tirosinasas producidas por *Aspergillus oryzae* y *Agaricus bisporus* están reguladas por medio de proteasas extracelulares (Ichishima *et al.*, 1984; Espín *et al.*, 1999). Espin *et al.* (1999) reportaron que una tirosinasa de *A. bisporus* es activada por proteasas endógenas, como serin proteasas (tripsina y subtilisina). A esta tirosinasa la llamaron tirosinasa latente y tiene una masa molecular de 67 kDa; después de la activación proteolítica se modificó el tamaño de la enzima y presentó una masa molecular de 43 kDa. La tirosinasa de *N. crassa* también presentó mayor actividad enzimática después de un procesamiento proteolítico (Kupper *et al.*, 1989).

En el presente estudio, se decidió investigar el efecto del silenciamiento del gen que codifica para una aspartato proteasa usando el mecanismo RNA de interferencia. A diferencia de las técnicas de *knockout*, el RNAi no bloquea por completo la expresión de los genes y, por lo tanto, es menos probable que sea letal cuando el gen blanco es esencial (Mouyna *et al.*, 2004). Además, el silenciamiento puede ser usado para la supresión simultánea de una familia de genes enteros, cuando sus secuencia nucleotídicas son muy similares, evitando la compensación entre ellos (Mouyna *et al.*, 2004; Rohr *et al.*, 2004; Nakayashiki *et al.*, 2005b). Por estas razones, el enfoque era particularmente atractivo para *A. rouxii*, debido a que en este grupo de hongos es común la existencia de familias de genes que codifican para las aspartato proteasas. Adicionalmente, el uso de técnicas basadas en el reemplazamiento o disrupción sería complicado, ya que se requiere de un alto porcentaje de recombinación homóloga y *A. rouxii* sólo presenta un 20% de este tipo de recombinación (Skory, 2002 y 2004).

El silenciamiento se llevó a cabo con la construcción del plásmido pGpdPki-RNAi. La principal característica que presenta este vector es la posesión de dos promotores (*Pgpd* y *Ppki*) enfrentados y orientados en sentido contrario, los cuales inician la síntesis de ARNs complementarios que se unirán formando una molécula de dsRNA la cual provocará la posterior degradación del ARN mediante una serie de reacciones enzimáticas. Los genes de

la aspartato proteasa tipo 2 (fragmentos de 412 y 910 pb) y tipo 6 (fragmento de 450 pb) fueron amplificados por PCR y posteriormente ligados al plásmido pGpdPki-RNAi. La integración de dichos cassettes en el genoma de *A. rouxii* causó la reducción de la actividad de las dos aspartato proteasas analizadas. El rango de disminución de la actividad proteasa en las transformantes obtenidas con el gen de la rhizopuspepsina-2 fue del 44 al 88% para el fragmento de 412 pb y del 17 al 37% para el de 910 pb. Mientras que la actividad proteasas de las transformantes obtenidas con el gen de la rhizopuspepsina-6 disminuyó entre el 60 y 77%. La variación en la actividad proteasa producida puede deberse a diferencias en el contexto genómico de la construcción integrada, posiblemente debidas a integración ectópica del plásmido. Se ha reportado el silenciamiento por RNAi de ciertos genes de hongos, como la superóxido dismutasa de *Cryptococcus neoformans* (Liu *et al.*, 2002) y *P. chrysosporium* (Matityahu *et al.*, 2008); en ambos casos, las transformantes obtenidas mostraron diferencias significativas en la expresión de estos genes después del silenciamiento.

Por otro lado, el bajo crecimiento de la transformante A412-3, sugiere que la reducción de la actividad de la rhizopuspepsina-2 alcanzado por el RNAi afectó el desarrollo del hongo. Este mismo comportamiento se presentó al silenciar el gen de la superóxido dismutasa de *P. chrysosporium*, la actividad de la proteína disminuyó en un 70%, con un crecimiento radial muy pobre (Matityahu *et al.*, 2008).

Cuando se analizaron las transformantes que presentaron mayor nivel de silenciamiento de los genes de las proteasas estudiadas, sobre la actividad tirosinasa, se encontró que la rhizopuspepsina-2, independientemente del tamaño de fragmento del gen empleado (412 y/o 910 pb) muestra un efecto positivo al incrementar la actividad monofenolasa entre 3.9 y 2.5 veces. Efecto similar se observó cuando se determinó la actividad difenolasa, con L-Dopa y TBC, como sustrato. Por el contrario, las transformantes obtenidas con el gen de la rhizopuspepsin-6, no mostraron efecto sobre la actividad tirosinasa, ya que las actividades mono y difenolasa determinadas, fueron muy similares a las obtenidas con la cepa silvestre. Wang *et al.* (2008) reportaron la interrupción de proteasas pertenecientes a la familia de las pepsinas de *A. niger* y su efecto sobre la expresión de la proteína heteróloga lacasa. La actividad de esta enzima se incrementó el 21%, el 42% y el 30%, respectivamente, con la interrupción de los genes *pepAa*, *pepAb* y

pepAd, demostrando que estas proteasas extracelulares producidas por el hongo están directamente relacionadas con la regulación de la lacasa. Probablemente lo mismo ocurre en *A. rouxii*, donde la aspartato proteasa 2 parecería regular la actividad tirosinasa (al ser inhibida, se incrementa esta actividad de manera importante), aunque no se conoce si esta enzima degrada completamente la tirosinasa o le provoca un simple procesamiento proteolítico.

Por último, la transformante A412-3 (que fue la que presentó menor actividad proteasa y mayor actividad tirosinasa), se utilizó para hacer la purificación parcial y poder identificar la tirosinasa extracelular producida por *A. rouxii*, resolviendo el problema encontrado anteriormente en la purificación de la enzima.

IX. CONCLUSIONES

En esta sección se puntualizan las observaciones más importantes encontradas en el transcurso de este trabajo, así como la conclusión obtenida y las perspectivas que pueden servir como principio de trabajos posteriores.

9.1 OBSERVACIONES

- Se demostró que *A. rouxii* produce tirosinasa intra y extracelular, cuya actividad se ve afectada de manera negativa por una proteasa de tipo ácido secretada en los mismos tiempos de cultivo (48 h) y que posee una masa molecular similar.
- Se purificó la proteasa extracelular de tipo ácido producida por *A. rouxii* y se identificó como una aspartato proteasa (rhizopuspepsina-2), con un peso molecular de 40 kDa.
- Se obtuvieron transformantes con los genes silenciados de la rhizopuspepsina-2 y -6, y al no producirse la aspartato proteasa fue posible purificar e identificar la tirosinasa.
- La construcción del vector para el silenciamiento por RNAi mediado por fragmentos de dsRNA resultó ser una herramienta molecular eficiente para inhibir la actividad proteasa. Asimismo, se demostró que el mecanismo de silenciamiento es funcional en zigomycetos, algo que no había sido reportado anteriormente.

9.2 CONCLUSIÓN

Se demostró que *A. rouxii* produce una aspartato proteasa extracelular tipo 2 y se observó que al silenciar su gen mediante RNA de interferencia, se incrementa la actividad tirosinasa. Estos resultados indican probablemente, que la proteasa tipo 2 regula de forma negativa a la tirosinasa producida por el mismo hongo.

Empleando la transformante A412-3, que presentó la mayor inhibición de actividad proteasa, se lograron identificar regiones peptídicas de la tirosinasa.

9.3 PERSPECTIVAS

- Es necesario hacer pruebas de resiembra de las cepas transformantes para comprobar su estabilidad, y verificar que sigan manteniendo el silenciamiento de la proteasa ácida.
- Sería de gran interés que las transformantes obtenidas a partir del silenciamiento de la proteasa fueran probadas en fermentaciones líquidas con PCF, para determinar si la degradación de dicho tóxico se incrementa o se realiza en menor tiempo.
- Conociendo la secuencia de proteínas de la tirosinasa producida por *A. rouxii*, se podrían diseñar cebadores para conocer la secuencia nucleotídica del gen mediante fragmentos amplificados por PCR.
- Utilizando la biblioteca genómica construida a partir de *A. rouxii*, se podría rastrear el gen de la tirosinasa a partir de sondas obtenida por PCR.
- Una vez localizado y aislado el gen que codifica para la tirosinasa, sería conveniente realizar una sobreexpresión homóloga de éste, y analizar su efecto sobre la actividad tirosinasa y la degradación de PCF.
- El vector empleado en este trabajo (pGpdPki-RNAi), podrá ser utilizado en el estudio de la función de otros genes que no han sido analizados en este tipo de hongos.

X. BIBLIOGRAFÍA

Abe A., Oda Y., Asano K., Sone T. (2006). The molecular phylogeny of the genus *Rhizopus* based on rDNA sequences. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**: 2387-2393.

Agarwal M., Sahi C., Katiyar-Agarwal S., Agarwal S., Young T., Gallie D.R., Sharma V.M., Ganesan K., Grover A. (2003). Molecular characterization of rice HSP 101: complementation of yeast HSP 104 mutation by disaggregation of protein granules and differential expression in indica and japonica rice types. *Plant Mol. Biol.* **51**: 543-553.

Ahmad I., Zafar S., Ahmad F. (2005). Heavy metal biosorption potential of *Aspergillus* and *Rhizopus* sp. isolated from wastewater treated soil. *J. Appl. Sci. Environ. Mgt.* **9**: 123-126.

Ainsworth A.M. (1995). Technical information sheet No. 11: Isolation techniques from basidiomycetes. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 364-366.

Akhmedova Z.R. (1994). Cellulolytic, xylanolytic and ligninolytic enzymes of the fungus *Pleurotus ostreatus*. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* **30**: 42-48.

Anné J. (1977). Somatic hybridization between *Penicillium* species after induced fusion of their protoplast. *Agricultura.* **25**: 1-117.

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

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

Ausubel C., Brent R., Kingstong R.E., Moore D., Smith J.A., Seidman J.G., Struhl K. (1987). Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates, Brooklyn, Nueva York.

Barett A.J. (1994). Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. *Methods Enzymol.* **244**: 1-15.

Barett A.J. (1995). Proteolytic enzymes: aspartic and metallopeptidases. *Methods Enzymol.* **248**: 183-228.

Bartnicki-Garcia S. (1968). Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* **22**: 87-108.

Bertola N.C., Califano A.N., Bevilacqua A.E., Zaritzky N.E. (2000). Effect of ripening conditions on the texture of Gounda cheese. *Int J. Food Sci. Tech.* **35**: 207-214.

Bockle B., Martínez M.J., Guillén F., Martínez A.T. (1999). Mechanism of peroxidase inactivation in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus pulmonaris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 923-928.

Bojalil L.F., Trujillo A., Cerbon J. (1959). Diferenciación bioquímica de algunas especies de actinomicetes patógenos. *Mycopathologia* **11** (4): 287-296.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **2**: 248-254.

Cameron M.D, Timofeevski S., Aust S.D. (2000). Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **54**: 751-758.

Carneiro J.S., de la Bastide P.Y., Chabot M., Lerch L., Hintz W.E. (2010). Suppression of polygalacturonase gene expression in the phytopathology fungus *Ophiostoma novo-ulmi* by RNA interference. *Fungal Genet. Biol.* **12** (3): 289-298.

Chen C-C., Cho Y.C, Lai C-C., Hsu W-H. (2009). Purification and characterization of a new rhizopuspepsin from *Rhizopus oryzae* NBRC 4749. *J. Agric. Food Chem.* **57**: 6742-6747.

Cho S.J., Roh J.S., Sun W.S., Kim S.H., Park K.D. (2006). *N*-Benzylbenzamides: a new class of potent tyrosinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**: 2682-2684.

Dawley R.M., Flurkey W.H. (2003). Differentiation of tyrosinase and laccase using hexylresorcinol, a tyrosinase inhibitor. *Phytochemistry* **33**: 281-284.

Diniz M.S., Peres I., Castro L., Freitas A.C., Rocha-Santos T.A.P., Costa P.M., Pereira R., Duarte A.C. (2009). Effects of ECF-Kraft pulp mil effluent treated with fungi (*Rhizopus oryzae*) on reproductive steroids and liver CYP1A of exposed goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology*. **18**: 1011-1017.

Dosoretz C.G., Dass S.B., Reddy C.A., Grethlein H.E. (1990). Protease-mediated degradation of lignin peroxidase in liquid cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3429-3434.

Durán N., Esposito E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil. Treatment: a review. *Appl. Catalysis B: Environ.* **28**: 83-99.

Dower W.J., Miller J.F., Ragsdale C.W. (1988). High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16** (13): 6127-6145.

Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel, W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. **411**: 494-498.

Ensuncho L., Alvarez-Cuenca M., Legge R.L. (2005). Removal of aqueous phenol using immobilized enzymes in a bench scale and pilot scale three-phase fluidized bed reactor. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **27**:185-191.

Espín J.C., Morales M., García-Ruiz P.A., Tudela J., García-Cánovas F. (1997). Improvement of a continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of mushroom polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **45**: 1084-1090.

Espín J.C., Wichers H.J., (1999a). Kinetics of activation of latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase by benzyl alcohol. *J. Agric. Food. Chem.* **47**, 3503-3508.

Espín J.C., Leeuwen J.V., Wichers H.J. (1999b). Kinetic study of the activation process of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase by serine proteases *J. Agric. Food Chem.* **47**: 3509-3517.

Espín J.C., Varon R., Fenoll L.G., Gilabert M.A., Garcia-Ruiz P.A., Tudela J., Garcia-Cánovas F. (2000). Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase. *Eur. J. Biochem.* **267**: 1270-1279.

Etoh Y., Shoun H., Origino T., Fujiwara S., Arima K., Beppu T. (1982). Proton magnetic resonance spectroscopy of an essential histidyl residue in a milk-clotting acid protease, *Mucor rennin*. *J. of Biochem.* **91**: 2039-2046.

Fan Y., Flurkey W.H. (2004). Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms. *Phytochemistry* **65**: 671-678.

Fernández Perrino F.J. (1997). Caracterización de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de penicilina: Reacción enzimática catalizada por el producto del último gen (*penDE*) de la ruta de biosíntesis de penicilina. Tesis Doctorado. Universidad de León, España.

Fernández-Lahore H.M., Auday R.M., Fraile E.R., Biscoglio de Jiménez Bonino M., Pripignani L., Machalinski C., Cascone O. (1999). Purification and characterization of an acid proteinase from mesophilic *Mucor* sp. solid-state cultures. *J. Peptide Res.* **53**: 599-605.

Fire A., Xu S.Q., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. **391**: 806-811.

Fitzgerald P.M.D., Mckeever B.M., van Middlesworth J.F., Springer J.P., Heimbach J.C., Chih-Tai Leu., Herber W.K., Dixon R.A.F., Darke P.L. (1990). Crystallographic analysis of a complex between human immunodeficiency virus type 1 protease and acetyl-pepstatina at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **265**: 14209-14219.

Flurkey A., Coosey A., Reddy A., Spoonmore K., Rescigno A., Inlow J., Fluerkey W.H. (2008). Enzyme, protein, carbohydrate, and phenolic contaminants in commercial tyrosinase preparations: Potential problems affecting tyrosinase activity and inhibition studies. *J. Agric Food Chem.* **56**: 4760-4768.

Fox P.F., Law J., McSweeney P.L.H., Wallace J. (1993). Biochemistry of cheese ripening. In: Fox P.F. editor. Cheese Chemistry Physics and Microbiology. Vol. II. London :Chapman & Hall. p: 389-438.

Freitas A.C., Ferreira F., Costa A.M., Pereira R., Antunes S.C., Gonçalves F., Rocha-Santos T.A.B., Diniz M.S., Castro L., Peres I., Duarte A.C. (2009). Biological treatment of the effluent from a bleached kraft pulp mill using basidiomycete and zigomycete fungi. *Sci. Total Environ.* **407**: 3282-3289.

Fukumoto J., Tsuru D., Yamamoto T. (1967). Studies on mold protease. Part I. Purification, crystallization and some enzymatic properties of acid protease of *Rhizopus chinensis*. *Agric. Biol. Chem.* **31**: 710-717.

García-Rico R.O., Martín J.F., Fierro F. (2007). The *pgal* gene of *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 encodes a heterotrimeric G protein alpha subunit that controls growth and development. *Res. Microbiol.* **158**: 437-446.

Girelli A.M., Mattei E., Messina A. (2006). Phenols removal by immobilized tyrosinase reactor in on-line high performance liquid chromatography. *Anal. Chimica Acta* **580**: 271-277.

Graaff L., van den Broeck H., Visser J. (1992). Isolation and characterization of the *Aspergillus niger* pyruvate kinase gene. *Curr. Genet.* **22**: 21-27.

Gray G.L., Hayenga K., Cullen D., Wilson L.J., Norton S. (1986). Primary structure of *Mucor miehei* aspartic protease: evidence for a zymogen intermediate. *Gene.* **48**: 41-53.

Gukasyan G.S. (1999). Effect of lignin on growth and tyrosinase activity of fungi from the genus *Aspergillus*. *Biochemistry.* **64**: 223-227.

Gutiérrez S., Velasco J., Marcos A.T., Fernández F.J., Fierro F., Barredo J.L., Díez B., Martín J.F. (1997). Expression of the *cefG* gene is limiting for cephalosporin biosynthesis in *Acremonium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**: 606-614.

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

Halaouli S., Record E., Casalot L., Hamdi M., Sigoillot J-C., Asther M., Lomascolo. (2006a). Cloning and characterization of a tyrosinase gene from the white-rot fungus

Pycnoporus sanguineus, and overproduction of the recombinant protein in *Aspergillus niger*. *App. Microbiol. Biotechnol.* **70**: 580-589.

Halaouli S., Asther M., Sigoillot J.C., Hamdi M., Lomascolo A. (2006b). Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. *J. Appl. Microbiol.* **100**: 219-232.

Herrera T., Ulloa M. (1998). El reino de los hongos -Micología básica y aplicada-. UNAM y Fondo de Cultura Económica. 2ª. Ed. México. pp: 143-157.

Higuchi T. (1993). Biodegradation mechanism of lignin by white-rot basidiomycetes. *J. Biotechnol.* **30**: 91-107.

Holmes D.S., Quigley M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacteria plasmids. *Anal. Biochem.* **114**: 193-197.

Howell C.R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis.* **87**: 4-10.

Ichishima E., Maeba H., Amikura T., Sakata H. (1984). Multiple forms of protyrosinase from *Aspergillus oryzae* and their mode of activation at pH 3.0. *Biochim. Biophys. Acta.* **786**: 25-31.

Ichishima E., Ojima M., Yamagata Y., Hanzawa S., Nakamura T. (1995). Molecular and enzymatic properties of an aspartic proteinase from *Rhizopus hangchow*. *Phytochemistry.* **38**: 27-30.

Ikasari L., Mitchell D.A. (1996). Leaching and characterization of *Rhizopus oligosporus* acid protease from solid-state fermentation. *Enzyme Microb. Tech.* **19**: 171-175.

Ikehata K., Nicell J.A. (2000). Color and toxicity removal following tyrosinase-catalysed oxidation of phenols. *Biotechnol. Progr.* **16**: 533-540.

Jacobson E.S. (2000). Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**: 708-717.

Jolivet S., Arpin N., Wichers H.J., Pellon G. (1998). *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol. Res.* **102**: 1459-1483.

Kahn V. (1995). Multiple effects of maltol and kojic acid on enzymatic browning. In: Lee, C.Y., Whitaker J.R. (Eds), Enzymatic browning and its prevention, ACS Symposium Series 600. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 277-294.

Kanda K., Sato T., Ishii S., Enei H., Ejiri S. (1996). Purification and properties of tyrosinase isozymes from gill of *Lentinula edodes* fruiting bodies. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**: 1273-1278.

Katan T., Galun E. (1975) A rapid and efficient method for the purification of tyrosinase from *Neurospora*. *Anal. Biochem.* **67**(2): 485-492.

Kawamura-Konishi Y., Tsuji M., Hatana S., Asanuma M., Kakuta D., Kawano T., Mukoyama E.B. (2007). Purification, characterization, and molecular cloning of tyrosinase from *Pholiota nameko*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**: 1752-1760.

Khan K.M., Maharvi G.M., Khan M.T.H., Shaikh A.J., Perveen S., Begum S. (2006). Tetraketones: a new class of tyrosinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **14**: 344-351.

Khan M.T.H., Choudhary M.I., Khan K.M., Rani M., Atta-ur-Rahman. (2005). Structure-activity relationships of tyrosinase inhibitory combinatorial library of 2,5-disubstituted-1,3,4-oxadiazole analogue. *Bioorg. Med. Chem.* **13**: 3385-3395.

Kim G.Y., Shim J., Kang M.S., Moon S.H. (2008). Optimized coverage of gold nanoparticles at tyrosinase electrode for measurement of a pesticide in various water samples. *J. Hazard. Mat.* **165**: 141-147.

Kito H., Abe A., Sujaya I.N., Yuji O., Asano K., Sone T. (2009). Molecular characterization of the relationships among *Amylomyces rouxii*, *Rhizopus oryzae*, and *Rhizopus delemar*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73** (4): 861-864.

Kudryavtseva O.A., Dunaevsky YaE., Kamzolkin O.V., Belozersky M.A. (2008). Fungal proteolytic enzymes: features of the extracellular proteases of xylophilic basidiomycetes. *Microbiol.* **77**(6): 643-653.

Kumar S., Sharma N.S., Saharan M.R., Singh R. (2005). Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. *Process Biochem.* **40**:1701-1705.

Kumar A.G., Nagesh N., Prabhakar T.G., Sekaran G. (2008). Purification of extracellular acid protease and analysis of fermentation metabolites by *Synergistes* sp. utilizing proteinaceous solid waste from tanneries. *Biores. Technol.* **99**: 2364-2372.

Kupper U., Linden M.L., Cao K., Lerch K. (1989). Isolation and characterization of the tyrosinase gene of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **264**: 1720-1728.

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

Lee K.L., Buckley H.R., Campbell C.C. (1975). An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelia and yeast forms of *Candida albicans*. *J. Med. Vet. Mycol.* **13**: 148-153.

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

Lerch K. (1981). Copper monooxygenases: tyrosinase and dopamine-monoxygenase. In: metal ions in biological systems. Vol. 13 ed. Siegel, H. pp.143-186. Marcel Dekker. New York.

Lerch K. (1983). *Neurospora* tyrosinase: structural, spectroscopic and catalytic properties. *Mol. Cell. Biochem.* **52**: 125-138.

Lerch K., Ettinger L. (1972). Purification and characterization of a tyrosinase from *Streptomyces glaucences*. *Eur. J. Biochem.* **31**: 427-437.

Li J., Chi Z., Liu Z., Yue L., Peng Y., Wang L. (2009). Cloning and characterization of a novel aspartic protease gene from marine-derived *Metschnikowia reukaufii* and its expression in *E. coli*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **159** (1): 119-132.

Lindberg R.A., Eirich L.D., Price J.S., Wolfenbarger L., Drucker H. (1981). Alkaline protease from *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **256**: 811-814.

Liu H., Cottrell T.R., Pierini L.M., Goldman W.E., Doering T.L. (2002). RNA interference in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Genetics* **160**: 463-470.

Marcial J., Barrios-González J., Tomasini A. (2006). Effect of medium composition on pentachlorophenol removal by *Amylomyces rouxii* in solid-state culture. *Process Biochem.* **41**(2): 496-500.

Marín-Zamora M.E., Rojas-Melgarejo F., García-Cánovas F., García-Ruiz P.A. (2006). Direct immobilization of tyrosinase enzyme from natural mushrooms (*Agaricus bisporus*) on D-sorbitol cinnamic ester. *J. Biotechnol.* **126**: 295-303.

Martínez M.V., Whitaker J.R. (1995). The biochemistry and control of enzyme browning. *Trends Food Sci. Tech.* **6**: 195-200.

Matityahu A., Hadar Y., Dosoretz C.G., Belinky P.A. (2008). Gene silencing by RNA interference in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74** (17): 5359-5365.

Mayer A.M. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. *Phytochemistry.* **67**: 2318-2331.

Mazzocco F., Pefferi P.G. (1976). An improvement of the spectrophotometric method for the determination of tyrosinase catecholase activity by hydrazone. *Anal. Biochem.* **72**: 643-647.

Miller B-L., Miller K.Y., Roberti K.A., Timberlake W.E. (1972). Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York. pp. 352-355.

Montiel A.M., Fernández F.J., Marcial J., Soriano J., Barrios-González J., Tomasini A. (2004). A fungal phenoloxidase (tyrosinase) involved in pentachlorophenol degradation. *Biotechnol. Lett.* **26**: 1353-1357.

Montiel González A.M. (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 peroxidasa. Tesis Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Mouyna I., Henry C., Doering T.L., Latge J.P. (2004). Gene silencing with RNA interference in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **237**: 317-324.

Nagarathnamma R., Bajpai P. (1999). Decolorization and detoxification of extraction-stage effluent from chloride bleaching of kraft pulp by *Rhizopus oryzae*. *Appl. Envir. Microbiol.* **65**: 1078-1082.

Nakamura M., Sho S., Ogura Y. (1996). On the purification and properties of mushroom tyrosinase. *J. Biochem.* **59**: 481-486.

Nakamura M., Nakajima T., Ohba Y., Yamauchi S., Lee B.R., Ichishima E. (2000). Identification of copper ligands in *Aspergillus oryzae* tyrosinase by site-directed mutagenesis. *Biochem. J.* **360**: 537-545.

Nakayashiki H. (2005a). RNA silencing in fungi: mechanisms and applications. *FEBS Lett.* **579**: 5950-5957.

Nakayashiki H., Hanada S., Nguyen B.Q., Kadotani N., Tosa Y., Mayama S. (2005b). RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycetes fungi. *Fungal Genet. Biol.* **42**: 275-283.

Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in *trans*. *Plant Cell* **2**: 279-289.

Neuman E.M., Rosenheck K. (1972). Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *J. Membrane Biol.* **10**: 279-290.

Neuman E.M., Schaefer-Riddler Y.W., Hofschneider P.H. (1982). Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation. *EMBO J.* **1**: 841-845.

Ohnuki T., Etoh Y., Beppu T. (1982). Intraspecific and interspecific hybridization of *Mucor pusillus* and *M. miehei* by protoplast fusion. *Agric. Biol. Chem.* **46** (2): 451-458.

Palmieri G., Giardina P., Bianco C., Fontanella B., Sannia G. (2000). Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 920-924.

Palmieri G., Bianco C., Cennamo G., Giardina P., Marino G., Monti M., Sannia G. (2001) Purification, characterization, and functional role of a novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2754-2759.

Pascal B., Michele A, Marcel A. (1993). Influence of primary and secondary proteases produced by free or immobilized cells of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* on lignin peroxidase activity. *J. Biotechnol.* **30**: 271-282.

Pérez de los Santos A.I.M. (2009). Contribución al estudio de tirosinasas y proteasas producidas por *Amylomyces rouxii*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Phadarate S.U., Srinivasan M.C., Deshpande V.V. (1993). High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* with a distinctly different structure than the serine protease subtilisin Calsberg. *Arch. Microbiol.* **166**: 414-417.

Ping L.H., Jin B., Lant P. (2005). Direct fermentation of potato starch wastewater to lactic acid of *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **27**: 229-238.

Preetha S., Boopathy R. (1997). Purification and characterization of a milk clotting protease from *Rhizomucor miehei*. *World J. Microbiol. Biotech.* **13**:573-578.

Qiu L., Chen Q.X., Wang Q., Huang H., Song K.K. (2005). Irreversible inhibitory kinetics of 3,5-dihydroxyphenyl decanoato on mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase. *Bioorg. Med. Chem.* **13**: 6206-6211.

Rabinovich M.L., Boloboba A.V., Vasil'chenko L.G. (2004). Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: a review. *Appl. Biochem. Microbiol.* **40**: 5-23.

Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 597-635.

Rast D.M., Baumgartner D., Mayer C., Hollenstein G.O. (2003). Cell wall-associated enzymes in fungi. *Phytochemistry.* **64**: 339-366.

Robb D.A., Guttridge S. (1981). The polypeptide composition of two fungal tyrosinase. *Phytochemistry* **20**: 1481-1485.

Rodriguez-López J.N., Escribano J., García-Cánovas F. (1994). A continuous spectrophotometric method for determination of monophenolase activity of tyrosinase using 3-methyl-2-benzothiazolinone hidrazone. *Anal. Biochem.* **216**: 2005-2010.

Rohr J., Sarkar N., Balenger S., Jeong B.R., Cerutti H. (2004) Tandem inverted repeat system for selection of effective transgenic RNAi strains in *Chlamydomonas*. *Plant J.* **40**: 611-621.

Romano N., Macino G. (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol. Microbiol.* **6**: 3343-3353.

Sambrook J., Russell D.W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.

Sánchez-Ferrer A., Rodríguez-López J.N., García-Cánovas F., García-Carmona F. (1995). Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta.* **1247**: 1-11.

Sassoon J., Mooibroek H. (2001). A system of categorizing enzyme-cell wall associations in *Agaricus bisporus*, using operational criteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**: 613-622.

Sato T., Kanda K., Okawa K., Takahashi M., Watanabe H., Hirano T., Yaegashi K., Sakamoto Y., Uchimiya H. (2009). The tyrosinase-encoding gene of *Lentinula edodes*, *letyr*, is abundantly expressed in the gills of the fruit-body during post-harvest preservation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**: 1042-1047.

Schoen C., Reichard U., Monod M., Kratzin H.D., Ruchel R. (2002). Molecular cloning of an extracellular aspartic proteinase from *Rhizopus microsporus* and evidence for its expression during infection. *Med. Mycol.* **40**: 61-71.

Skory C.D. (2002). Homologous recombination and double-strand break repair in the transformation of *Rhizopus oryzae*. *Mol. Genetic Genomics.* **268**: 397-406.

Skory C.D. (2004). Repair of plasmid DNA used for transformation of *Rhizopus oryzae* by gene conversion. *Curr. Genet.* **45**: 302-310.

Selinheimo E., Saloheimo M., Ahola E., Westerholm-Parvinen A., Kalkkinen N., Buchert 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.

Selinheimo E., Gasparetti C., Mattinen M.L., Steffensen C.L., Buchert J., Kruus K. (2009). Comparison of substrate specificity of tyrosinase from *Trichoderma reesei* and *Agaricus bisporus*. *Enzyme Microb. Technol.* **44**: 1-10.

Seo S.Y., Sharma V.K., Sharma N. (2003). Mushroom tyrosinase: recent prospect. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 2837-2853.

Sielecki A.R., Fujinaga M., Read R.J., James M.N.G. (1991). Refined structure of porcine pepsinogen at 1.8Å resolution. *J. Mol. Biol.* **219**: 671-692.

Soler-Rivas C., Moller A.C., Arpin N., Olivier J.M., Wichers H.J. (2000). Induction of tyrosinase mRNA in *Agaricus bisporus* upon treatment with a tolaasin preparation from *Pseudomonas tolaasii*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **58**: 95-99.

Solomon E.I., Sundaram U.M., Machonkin T.E. (1996). Multicopper oxidase and oxigenases. *Chem. Rev.* **96**: 2563-2605.

Staszczak M., Zdunek E., Leonowics A. (2000). Studies on the role of proteases in the withe-rot fungus *Trametes versicolor*: effect of PMSF and chloroquine on ligninolytic enzyme activity. *J. Basic. Microbiol.* **40**: 51-36.

Storms R., Zheng Y., Li H., Sillaots S., Martinez-Perez A., Tsang A. (2005). Plasmid vectors for protein production, gene expression and molecular manipulations in *Aspergillus niger*. *Plasmid.* **35**: 191-204.

Suárez M.B., Sanz L., Chamorro M.I, Rey M., González F.J., Llobell A., Monte E. (2005). Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum* identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease. *Fungal Genetic Biol.* **42**: 924-934.

Tomasini A., Villareal-Arellanos H.R., Barrios-González J. (1996). Resistencia de una cepa de *Rhizopus* sp. al crecer en medios conteniendo pentaclorofenol. *Avances Ing. Quim.* **6**: 36-40.

Tomasini A., Flores V., Cortés D., Barrios-González J. (2001). An isolate of *Rhizopus nigricans* capable of tolerating and removing pentachlorophenol. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 201-205.

Tomsovsky M., Homolka L. (2004). Tyrosinase activity discovered in *Trametes* spp. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 529-530.

Tonouchi N., Shoun H., Uozumi T., Beppu T. (1986). Cloning and sequencing of a gene for *Mucor rennin* an aspartate protease from *Mucor posillus*. *Nucleic Acids Res.* **14**: 7557-7569.

Tremacoldi C.R., Watanabe N.K., Carmona E.C. (2004). Production of extracellular acid proteases by *Aspergillus clavatus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 639-642.

Villarreal H.R. (1990). Aislamiento y selección de hongos filamentosos capaces de degradar clorofenoles. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Tamaulipas.

Vishwanatha K.S., Appu Rao A.G., Singh S.A. (2009). Characterization of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Food Chem.* **114**: 402-407.

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

Wang Y., Xue W., Sims A.H., Zhao C., Wang A., Tang G., Qin J., Wang H. (2008). Isolation of four pepsin-like protease genes from *Aspergillus niger* and analysis of the effect of disruptions on heterologous laccase expression. *Fungal Genetic Biol.* **45** (1): 17-27.

Watanabe T., Oda Y. (2008). Comparison of sucrose-hydrolyzing enzymes produced by *Rhizopus oryzae* and *Amylomyces rouxii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**(12): 3167-3173.

Westerholm-Parvinen A., Selinheimo E., Boer H., Kalkkinen N., Mattinen M., Saloheimo M. (2007). Expression of the *Trichoderma reesei* tyrosinase 2 in *Pichia pastori*: isotopic labeling and physicochemical characterization. *Protein Expression Purification*. **55**:147-58.

Wichers H.J., Gerristein Y.A.M., Chapelon C.G.J. (1996). Tyrosinase isoforms from the fruitbodies of *Agaricus bisporus*. *Phytochemistry*. **43**: 333-337.

Xiaoping X., Xianghua W., Yanan B., Yi Q. (2008). Effects of culture conditions on ligninolytic enzymes and protease production by *Phanerochaete chrysosporium* in air. *J. Environ. Sci.* **20**: 94-100.

Yamaguchi T., Yashita Y., Takeda I., Kiso H. (1983). Enzymes in green asparagus kiwi fruit and mait, occurrence a partial characterization. *Agric. Biol. Chem.* **46** (8): 1983-1986.

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

Zhu X., Gibbons J., Garcia-Rivera J., Casadevall A., Williamson P.R. (2001). Lacase of *Cryptococcus neoformans* is a cell-wall associated virulence factor. *Infect. Immun.* **69**: 5589-5596.

ANEXO 1

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Soluciones:

1. Sol. Acrilamida/Bis 30 %

30 g de acrilamida, 0.8 g de bisacrilamida y aforar a 100 ml de H₂O MilliQ.

2. Buffer Tris-HCL 8.8

18.2 g ajustar pH y aforar a 100 ml (después adicionar 2 g de SDS).

3. Buffer Tris-HCL 6.8

6.05 g ajustar pH y aforar a 100 ml (después se le adicionan 0.4 g de SDS).

4. Buffer tanque 10x (concentrado)

15 g Tris-base, 70 g glicina, 5 g SDS y aforar a 500 ml (se disuelven los primeros dos reactivos y al final se le agrega el SDS).

Buffer tanque 1x (de corrida)

60 ml de buffer tanque 10x y aforar 600 ml

5. Buffer de muestra

1.52 ml de buffer Tris-HCl pH 6.8

3.4 ml glycerol

1.25 mg de azul de bromofenol

0.25 g de SDS

***Para hacer geles desnaturalizantes se les adiciona β -mercaptoetanol.**

6. Persulfato de Amonio 10% (prepararlo al momento de realizar el gel)

7. TEMED (Sigma)

GEL DE SEPARACIÓN 12 % (Vol. 10 ml)

3.4 ml H₂O MilliQ

4.0 ml acrilamida 30 %

2.5 ml Tris-HCl pH 8.8

Sonicar mezcla para desgasificar (5 min).

50 μ l de persulfato de Amonio 10% (p/v)

5 μ l de TEMED

- Adicionar el gel de separación a la cámara una vez adicionado el persulfato y el TEMED, por que se solidifica rápidamente.
- Una vez colocado en la cámara adicionar 2-propanol (100 μ l) para que el gel quede uniforme.

- Dejar solidificar el gel aproximadamente 40 min, transcurrido el tiempo retirar el 2-propanol adicionado y lavar con H₂O MilliQ, para posteriormente colocar el gel de empaque.

GEL DE EMPAQUE 4 % (Vol. 10 ml)

6.1 ml H₂O MilliQ
1.3 ml acrilamida 30 %
2.5 ml Tris-HCl pH 8.8
Sonicar esta mezcla para desgasificar (5 min).
50 µl de Persulfato de Amonio 10%
10 µl de TEMED

PREPARACIÓN DE MUESTRAS

5 µl de buffer de muestra
15 µl de muestra a correr

Tinción de geles de poliacrilamida**Tinción de comassie**

Una vez realizada la corrida de los geles, la tinción con el colorante de azul de comassie se llevó a cabo mediante el siguiente procedimiento:

1. Lavar el gel durante 30 min con agua destilada con agitación lenta, para quitar el exceso de SDS.
2. Adicionar la solución de azul de Comassie (45% metanol; 45% ác. acético; azul de bromofenol) e incubar el gel durante 25 min en agitación lenta.
3. Retirar el colorante y lavar durante 30 min con agua destilada.
4. Lavar el gel continuamente con la solución decolorante (10% metanol; 10% ác. acético) hasta eliminar el exceso de colorante y visualización de las banda.

Tinción en plata

Para llevar a cabo la técnica de tinción en plata es necesario utilizar durante todo el proceso agua desionizada, ya que de lo contrario la tinción de los geles no se será la correcta debido al alto contenido de sales presentes en el agua destilada. El procedimiento seguido para la tinción fue el siguiente:

1. Los geles de electroforesis se sumergen en la solución fijadora de metanol al 40% y formaldehído (0.5 ml de formaldehído por litro de solución) durante 10 a con agitación lenta.
2. Desechar la solución fijadora y se lavan 2 veces con H₂O MilliQ, durante 5 min cada vez, con agitación suave.
3. Después del lavado, los geles se sumergen en una solución de tiosulfato de sodio (0.2 g L⁻¹) durante 1 minuto
4. Eliminar la solución de tiosulfato y se lavan 2 veces con el gel con H₂O MilliQ, durante 20 min cada vez
5. Se retira el agua y se sumerge el gel en la solución de nitrato de plata al 0.1 % durante 10 minutos
6. Eliminar la solución de plata y a continuación lavar el gel con H₂O MilliQ, para posteriormente colocarlo en la solución “reveladora” (tiosulfato de sodio 0.0004% -4 mg L⁻¹; Na₂CO₃ 3% y 0.5 mL de formaldehído/L) y agitar hasta la formación de bandas.
7. Una vez formadas las bandas se detiene la reacción adicionando una solución de ácido cítrico 2.3 M en una proporción de 5 mL por cada 100 mL de la solución “reveladora”.

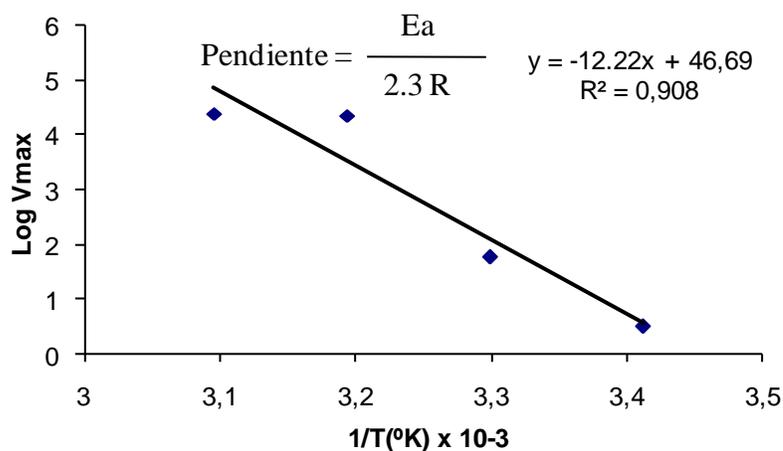
ANEXO 2

Determinación de la energía de activación de la aspartato proteasa purificada.

El mejor método para obtener la E_a es representar $\log V_{max}$ frente a $1/T$ donde T viene en °K. Los datos se clasifican a continuación:

T (°C)	°K	1/T(°K)	V_{max}	$\log v_{max}$
20	293	3,412	1,666	0,510
37	303	3,300	5,8	1,757
40	313	3,194	77,533	4,350
50	323	3,095	80,266	4,385

La energía de activación, E_a , para una reacción puede detrmnarse midiendo la constante de velocidad a diferentes temperaturas y representando $\log V_{max}$ frente a $1/T$.



La pendiente de la representación de Arrhenius, permite determinar un valor de energía de activación de la reacción de la proteasa de $55.82 \text{ kcal mol}^{-1}$.

ANEXO 3

Análisis estadístico realizado para las transformantes silenciadas de la rhizopuspepsina-2 con un fragmento de 412 pb.

Analysis of Variance Report

Tests of Assumptions Section

Assumption	Test Value	Prob Level	Decision (0.05)
Skewness Normality of Residuals	0.3738	0.708537	Accept
Kurtosis Normality of Residuals	0.5847	0.558726	Accept
Omnibus Normality of Residuals	0.4817	0.785976	Accept
Modified-Levene Equal-Variance Test	0.7524	0.617976	Accept

Expected Mean Squares Section

Source	Term	DF	Term Fixed?	Denominator Term	Expected Mean Square
A: CEPAS		6	Yes	S(A)	S+sA
S(A)		14	No		S(A)

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: CEPAS	6	14936.05	2489.342	93.83	0.000000*	1.000000
S(A)	14	371.4286	26.53061			
Total (Adjusted)	20	15307.48				
Total	21					

* Term significant at alpha = 0.05

Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on Ranks

Hypotheses

Ho: All medians are equal.

Ha: At least two medians are different.

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: TIROSINASA
Term A: CEPAS

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=14 MSE=26.53061 Critical Value=4.828989

Group	Count	Mean	Different From Groups
<i>A. rouxii</i>	3	25.71428	A412-4, A412-2, A412-5, A412-1, A412-3
<i>A. rouxii</i> + pGpdPki-RNAi	3	31.42857	A412-4, A412-2, A412-5, A412-1, A412-3
A412-4	3	62.38095	<i>A. rouxii</i> , <i>A. rouxii</i> + pGpdPki-RNAi, A412-5 A412-1, A412-3
A412-2	3	74.7619	<i>A. rouxii</i> , <i>A. rouxii</i> + pGpdPki-RNAi, A412-3
A412-5	3	82.38095	<i>A. rouxii</i> , <i>A. rouxii</i> + pGpdPki-RNAi, A412-4 A412-3
A412-1	3	87.14286	<i>A. rouxii</i> , <i>A. rouxii</i> + pGpdPki-RNAi, A412-4 A412-3
A412-3	3	102.8571	<i>A. rouxii</i> , <i>A. rouxii</i> + pGpdPki-RNAi, A412-4 A412-2, A412-5, A412-1

Análisis estadísticos de actividad proteasa para las cepas con silenciamiento de la aspartato proteasa tipo 2 (fragmentos 412 y 910 pb).

Analysis of Variance Report**Tests of Assumptions Section**

Assumption	Test Value	Prob Level	Decision (0.05)
Skewness Normality of Residuals	0.0552	0.956014	Accept
Kurtosis Normality of Residuals	-1.0649	0.286935	Accept
Omnibus Normality of Residuals	1.1370	0.566377	Accept
Modified-Levene Equal-Variance Test	0.3018	0.870246	Accept

Expected Mean Squares Section

Source	DF	Term Fixed?	Denominator Term	Expected Mean Square
A: Cepas	4	Yes	S(A)	S+sA
S(A)	10	No		S(A)

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Cepas	4	99874.84	24968.71	148.36	0.000000*	1.000000
S(A)	10	1682.96	168.296			
Total (Adjusted)	14	101557.8				
Total	15					

* Term significant at alpha = 0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: Act__Proteasa
Term A: Cepas

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=10 MSE=168.296 Critical Value=4.654325

Group	Count	Mean	Different From Groups
A412-3	3	47.2	A910-1, <i>A. rouxii</i> + pGpdPki-RNAi, <i>A. rouxii</i>
A455-2	3	54.8	A910-1, <i>A. rouxii</i> + pGpdPki-RNAi, <i>A. rouxii</i>
A910-1	3	161.0667	A412-3, A455-2, <i>A. rouxii</i> + pGpdPki-RNAi <i>A. rouxii</i>
<i>A. rouxii</i> + pGpdPki-RNAi	3	223.1333	A412-3, A455-2, A910-1

A.rouxii

3

241.0667

A412-3, A455-2, A910-1

Análisis estadísticos de actividad tirosinasa para las cepas con silenciamiento de la aspartato proteasa tipo 2 (fragmentos 412 y 910 pb).

Analysis of Variance Report

Tests of Assumptions Section

Assumption	Test Value	Prob Level	Decision (0.05)
Skewness Normality of Residuals	-0.5777	0.563446	Accept
Kurtosis Normality of Residuals	-0.1292	0.897220	Accept
Omnibus Normality of Residuals	0.3505	0.839265	Accept
Modified-Levene Equal-Variance Test	0.4571	0.765657	Accept

Expected Mean Squares Section

Source	DF	Term Fixed?	Denominator Term	Expected Mean Square
A: Cepas	4	Yes	S(A)	S+sA
S(A)	10	No		S(A)

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Cepas	4	11936.05	2984.014	277.63	0.000000*	1.000000
S(A)	10	107.483	10.7483			
Total (Adjusted)	14	12043.54				
Total	15					

* Term significant at alpha = 0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: ACT__TIROSINASA

Term A: Cepas

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=10 MSE=10.7483 Critical Value=4.654325

Group	Count	Mean	Different From Groups
A. rouxii	3	25.71428	A412-2, A910-1, A412-3
A.rouxii + pGpdPki-RNAi	3	31.42857	A412-2, A910-1, A412-3
A412-2	3	41.42857	A. rouxii, A.rouxii + pGpdPki-RNAi, A910-1, A412-3
A910-1	3	65.2381	A. rouxii, A.rouxii + pGpdPki-RNAi, A412-2, A412-3
A412-3	3	102.8571	A. rouxii, A.rouxii + pGpdPki-RNAi, A412-2, A910-1



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00091
Matrícula: 206180541

IDENTIFICACION DE UNA ASPARTATO PROTEASA PRODUCIDA POR *Amylomyces rouxii*, SILENCIAMIENTO DEL GEN QUE LA CODIFICA Y EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD TIROSINASA.

En México, D.F., se presentaron a las 12:00 horas del día 6 del mes de junio del año 2011 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL
DR. GERARDO DIAZ GODINEZ
DRA. ALBA MONICA MONTIEL GONZALEZ
DR. FRANCISCO FIERRO FIERRO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA
DE: JAIME MARCIAL QUINO

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

Aprobar

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

JAIME MARCIAL QUINO
ALUMNO

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA SASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. RUBEN ROMAN RAMOS

PRESIDENTE

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

VOCAL

DR. GERARDO DIAZ GODINEZ

VOCAL

DRA. ALBA MONICA MONTIEL GONZALEZ

SECRETARIO

DR. FRANCISCO FIERRO FIERRO