

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

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

**“Contribución al estudio bioquímico del
zigomiceto Ñ”**

IDONEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS
Que para obtener el grado de
Especialización en Biotecnología.

PRESENTA

I.B.I Héctor Hugo León Santiesteban.

ASESORA: Dra. Araceli Tomasini Campocosio.

Enero 2008.

DEDICATORIA

A MIS PADRES.

Martha Alicia Santiesteban Mesa y José Guillermo León Lara.

Por todos los sacrificios que han hecho para que yo pueda realizar mis metas y por todo el amor que siempre me han brindado.

A MIS ABUELOS.

Margarita Lara Machuca, Rosenda León Contreras y Ardelio León Contreras.

Por su apoyo incondicional, por su comprensión, por su invaluable amor, por impulsarme a seguir adelante en la vida y principalmente, **por nunca dejar de creer en mí.**

A MIS HERMANOS.

Ana Laura León Santiesteban y Guillermo León Santiesteban.

Por brindarme innumerables horas de felicidad cuando más lo necesitaba.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la doctora Araceli Tomasini Campocosio, por asesorar esta tesis, compartir su conocimiento conmigo y por confiar en mí.

Al doctor Francisco José Fernández Perrino, por la asesoría en la parte de Biología Molecular de esta tesis.

Al doctor Octavio Loera Corral, por su disposición e invaluable aportaciones en la revisión de este trabajo.

A Tania, Maura, Roxana, Sandra, Jesús y Jaime, por su amistad y por todos los consejos que me han dado desde el momento en que llegué al laboratorio.

RESUMEN

Con el paso del tiempo el hombre ha buscado la manera de satisfacer ciertas necesidades, creando productos a partir de compuestos químicos sintéticos que no se encontraban normalmente en la naturaleza, los llamados xenobióticos. Los compuestos xenobióticos también pueden formarse eventualmente durante algunos procesos industriales y son eliminados al ambiente como desechos. En los últimos años el uso indiscriminado de xenobióticos ha causado la contaminación del medio ambiente, debido a que muchos de estos xenobióticos presentan propiedades tóxicas para muchos organismos, incluyendo al hombre; de ahí la necesidad de eliminarlos. Uno de los métodos más eficientes para la eliminación de los compuestos xenobióticos ha sido la degradación con microorganismos que cuenten con sistemas enzimáticos capaces de degradar este tipo de tóxicos. Entre los xenobióticos más recalcitrantes y tóxicos se encuentra el pentaclorofenol (PCF). El PCF pertenece a la familia de los clorofenoles, fue el primer producto usado como conservador de maderas, también ha sido utilizado como agente bactericida, fungicida y alguicida e insecticida y se forma en los efluentes de la industria de la pulpa y el papel. Se han encontrados hongos pertenecientes a la familia de los basidiomicetos capaces de degradar compuestos fenólicos, gracias a que tienen sistemas enzimáticos constituidos por peroxidasas (MnP, LiP, VP) y fenoloxidasas (lacasas) extracelulares, mostrando rendimientos altos de degradación pero muy bajas velocidades de crecimiento. Sin embargo, se han encontrado otro tipo de hongos filamentosos capaces de degradar compuestos fenólicos, con velocidades de crecimiento mayores a los basidiomicetos, estos hongos pertenecen a la familia de los zigomicetos. En los zigomicetos los principales complejos enzimáticos responsables de la degradación de los compuestos fenólicos son las fenoloxidasas (tirosinasa y lacasa) y no presentan actividades de peroxidasas. Podría pensarse, por lo tanto, que un zigomiceto que presentara actividad enzimática extracelular de peroxidasas podría ser más eficiente en la degradación de compuestos fenólicos; como el PCF.

En este trabajo se utilizó a un zigomiceto aislado de un efluente de un aserradero de Puebla, que podía tolerar y degradar del 80 al 90% PCF inicial (12.5 mg ml^{-1} , concentración inicial de PCF) en las primeras 48 horas. A este zigomiceto se le nombró como “Ñ”. Pruebas iniciales de tipo cualitativas mostraron que el zigomiceto Ñ mostraba actividad enzimática de tirosinasa y LiP extracelular.

Se identificó molecularmente al zigomiceto Ñ como *Rhizopus oryzae ENHE*. Se demostró mediante fermentaciones sumergidas en medio sintético Merlin-Norkrans (modificado), que el PCF tiene un efecto tóxico en el crecimiento de *R. oryzae ENHE*, igualmente el PCF tiene un efecto negativo en la actividad de tirosinasa extracelular, disminuyendo su actividad en 3.33 veces y un efecto nulo en la actividad de tirosinasa intracelular. También se demostró que la Tyr induce el crecimiento de *R. oryzae ENHE* en un 11% a las 24 h en los cultivos con 0.05 g L^{-1} Tyr, se incrementó la actividad de tirosinasa extracelular alrededor de 14% a las 48 h de cultivo con Tyr y se aumentó 1.37 veces la actividad de tirosinasa intracelular en los cultivos con 0.05 g L^{-1} Tyr en las primera 24 h. Por último, se demostró que *R. oryzae ENHE* tiene actividad enzimática de LiP y se observó que el PCF induce la actividad de LiP. No se encontró actividad de MnP.

ÍNDICE.

CAPITULO.

	PÁGINA
<i>INTRODUCCIÓN.</i>	
Generalidades o marco teórico.	1
Clorofenoles.	1
Efectos tóxicos del PCF.	2
Degradación del PCF.	2
<i>ANTECEDENTES.</i>	6
<i>HIPÒTESIS Y OBJETIVOS.</i>	7
<i>MATERIALES Y METODOS.</i>	
Microorganismo.	8
Propagación del <i>zigomiceto</i> Ñ.	8
Suspensión de esporas.	8
Conservación del <i>zigomiceto</i> Ñ.	8
Extracción del ADN del <i>zigomiceto</i> Ñ.	8
Electroforesis de ADN en geles de agarosa.	11
Identificación molecular del <i>zigomiceto</i> Ñ.	12
Reacción en cadena de la ADN polimeraza (PCR).	13
Purificación de la Banda de ADN.	16
Fermentación sumergida.	17
Cinética de degradación de PCF.	17
<i>TECNICAS ANÁLITICAS.</i>	
Crecimiento.	18
Extracción del PCF.	18
Cuantificación del PCF residual.	19
Cuantificación de la actividad enzimática intra y extra celular.	19
Determinación de proteína soluble.	23
<i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</i>	
Identificación molecular del <i>zigomiceto</i> Ñ.	25
Efecto del PCF en el crecimiento y en la actividad de Tirosinasa.	26
Efecto de la Tirosina (Tyr) en el crecimiento y en la actividad de Tirosinasa.	30
Actividad enzimática de peroxidasas extracelulares.	33
Relación de la LiP en la degradación del PCF.	35
<i>CONCLUSIONES.</i>	37

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

38

ANEXO.

42

INTRODUCCIÓN.

GENERALIDADES O MARCO TEÓRICO.

En los últimos años se han desechado fenoles y compuestos derivados de éste al medio ambiente de forma descontrolada. Algunos clorofenoles son xenobióticos, es decir no existen naturalmente, han sido creados por el hombre para algún uso específico, por ejemplo como pesticidas, o bien son desechos de procesos industriales, como en los efluentes de la industria de la pulpa y el papel. La mayoría de estos compuestos fenólicos son tóxicos para diversos sistemas biológicos. Por lo tanto, los investigadores han estudiado microorganismos que los degraden.

COLOROFENOL.

Dentro de la familia de los clorofenoles se encuentra el pentaclorofenol (PCF, Figura 1); que fue el primer producto usado en los años 30's como conservador de maderas y ha sido utilizado por muchos años como agente fungicida, bactericida, alguicida e insecticida (Crosby, 1981). El uso indiscriminado del PCF ha causado la contaminación de suelos, mantos acuíferos y aguas subterráneas (Takashi et al., 2004.); que pueden llevar este tóxico a contaminar flora y fauna del medio, así como al hombre. Su degradación es difícil ya que este compuesto tiene en su estructura un anillo aromático estable y alto contenido en cloro (Xiao-yun et al., 2006).

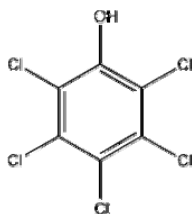


Figura 1. Molécula del pentaclorofenol (PCF).

EFFECTOS TÓXICOS DEL PCF.

El PCF es considerado como uno de los contaminantes de mayor prioridad en algunos países (Arcand et al., 1995) y es calificado por el USEPA como un probable cancerígeno humano (Karamanev et al., 1997). La característica hidrofóbica que presenta el PCF le permite atravesar la membrana plasmática y penetrar a las células. Existen evidencias de que el mecanismo tóxico de este compuesto se ejerce al desacoplar la fosforilación oxidativa en las mitocondrias (Igisu et al., 1993). También provoca otras alteraciones de las membranas como son la disminución en los niveles de ciertos fosfolípidos, cambios en la permeabilidad a los iones H^+ y pérdida de la resistencia eléctrica.

En exposición accidental al PCF, en bajos niveles, produce quemaduras en la piel e irritación en la nariz y garganta (Crosby, 1981). El pentaclorofenol se absorbe bien a través de la piel, el pulmón y el tracto gastrointestinal. En animales la dosis letal (DL_{50}) dérmica es de la misma magnitud que la oral. En exposiciones agudas, es rápidamente excretada, principalmente en la orina, como PCF inalterado y como PCF glucurónico. En exposiciones crónicas, se ha informado que su vida media de eliminación ha sido muy prolongada, de hasta 20 días. El PCF es ampliamente distribuido a otros tejidos del cuerpo, incluyendo riñones, corazón, y glándulas suprarrenales (Marcial et al., 2002).

DEGRADACIÓN DE PCF.

El método biológico para la degradación del PCF ha sido ampliamente estudiado, pueden emplearse plantas, bacteria y hongos. Los hongos son capaces de degradar compuestos aromáticos y algunos compuestos xenobióticos tóxicos, los más estudiados han sido los basidiomicetos que son capaces de degradar compuestos aromáticos tóxicos, como el PCF entre los cuales encontramos a el *Phanerochaete crhysosporium*, *Lentinus*, *Pleurotus*, y *Trametes*, (Reddy et al., 1995; Okeke et al., 1996; Fahr et al., 1999), siendo el más estudiado el *Phanerochaete crhysosporium* (Reddy et al., 1995). Se observó que estos hongos pueden degradar a la lignina, el polímero aromático más abundante en la

naturaleza; esta lignina puede ser despolimerizada y mineralizada eficientemente por basidiomicetos, principalmente los de pudrición blanca (Papinutti y Forchiassin., 2003).

Las oxidasas (lacasa (E.C:1.10.3.2)) y peroxidasas extracelulares tienen un papel principal en la degradación de la lignina (Ha et al., 2001). Las principales peroxidasas encontradas en basidiomicetos son: Lignina peroxidasa (LiP) (E.C:1.11.1.14), Manganese peroxidasa o manganese dependiente de peroxidasa (MnP) (E.C:1.13.1.13) y peroxidasa versátil (VP).

Entre los basidiomicetos más estudiados productores de peroxidasas extracelulares se encuentra *Phanerochaete chrysosporium* (Aitken e Irvin, 1989; Lisov et al., 2007) que tiene la capacidad de degradar clorofenoles (Durán et al., 2002), colorantes tipo azo (Christian et al., 2005), compuestos aromáticos policíclicos (Rothschild et al., 2002), por mencionar algunos. La oxidación se da en gran parte debido a la poca especificidad que tienen estas enzimas por los sustratos, se ha encontrado que no necesariamente LiP y MnP tienen que expresarse al mismo tiempo, la expresión enzimática depende principalmente de la composición del medio por ejemplo por la limitación de nitrógeno, (Lin y Wang, 1990) y puede variar dependiendo del basidiomiceto (Ha et al., 2001).

Desde los años 80's la idea de utilizar peroxidasas y lacasas para la oxidación y degradación de xenobióticos se ha llevado a cabo teniendo dos formas potenciales de detoxificar las aguas: 1) Después de la oxidación de los compuestos fenólicos, estos forman radicales que pueden polimerizarse formando polímeros no solubles que pueden ser removidos por filtración o precipitación (Kauffmann et al., 1999). 2) Los compuestos fenólicos son oxidados por una serie de pasos enzimáticos hasta posiblemente su mineralización (Rabinovich et al., 2004).

La degradación del PCF no ha sido exclusiva de los basidiomicetos se han encontrado otro tipo de hongos filamentosos pertenecientes a los zigomicetos capaces de degradar PCF. En algunos casos la ventaja de estos hongos radica en una mayor velocidad de crecimiento por lo tanto el proceso de degradación puede ser más corto y por ende más económico. Se ha visto también que los zigomicetos

degradan compuestos aromáticos debido a sus sistemas enzimáticos constituido principalmente de fenoloxidasas (Tomasini et al., 1996), entre la que destaca la tirosinasa. *Amylomyces rouxii* es uno de los zigomicetos capaces de degradar el PCF en primera instancia por medio de tirosinasa (Montiel et al., 2004), degrada el 86% del PCF inicial (12.5 mg L^{-1}) en 96 h.

La tirosinasa (Tyros) (monofenol, o-difenol-oxígeno oxidoreductasa; polifenol oxidasa; EC1.14.18.1) cataliza dos reacciones dependientes de oxígeno las cuales ocurren consecutivamente: La *o*-hidroxilación de monofenol a *o*-difenol, actividad cresolasa o monofenolasa, y la subsiguiente oxidación de *o*-difenol a *o*-quinona, actividad catecolasa o difenolasa, (Figura 2). (Durán et al., 2002, Boshoff et al., 2003, Haghbeen y Tan., 2003). El sitio activo de la tirosinasa consta de un par de complejos bi-nucleares de cobre y tres estados ‘met’ (Em), ‘deoxy’ (Ed), y ‘oxi’ (Eo)

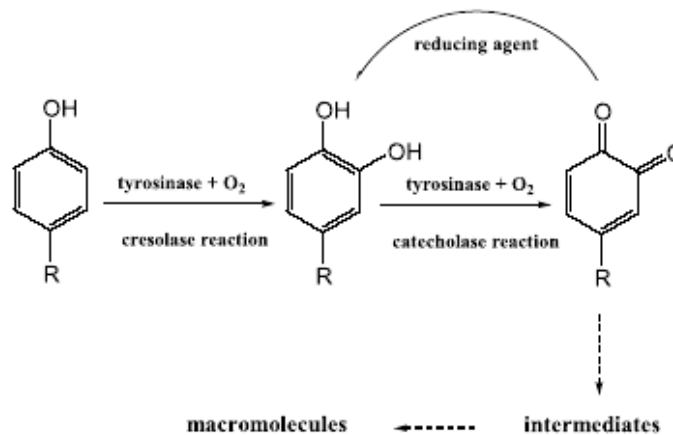


Figura 2. Reacción catalizada por fenol oxidasa (Haghbeena y Tan., 2003)

La producción de melanina es la principal responsable de color de epidermis en humanos y mamíferos. La síntesis de melanina comienza con la conversión del aminoácido L-tirosina a 3,4-dihidroxifenilalanina (L-dopa) y la subsiguiente oxidación de la L-dopa a dopaquinona por la acción de tirosinasa (Figura 3), (Ohguchi et al., 2003).

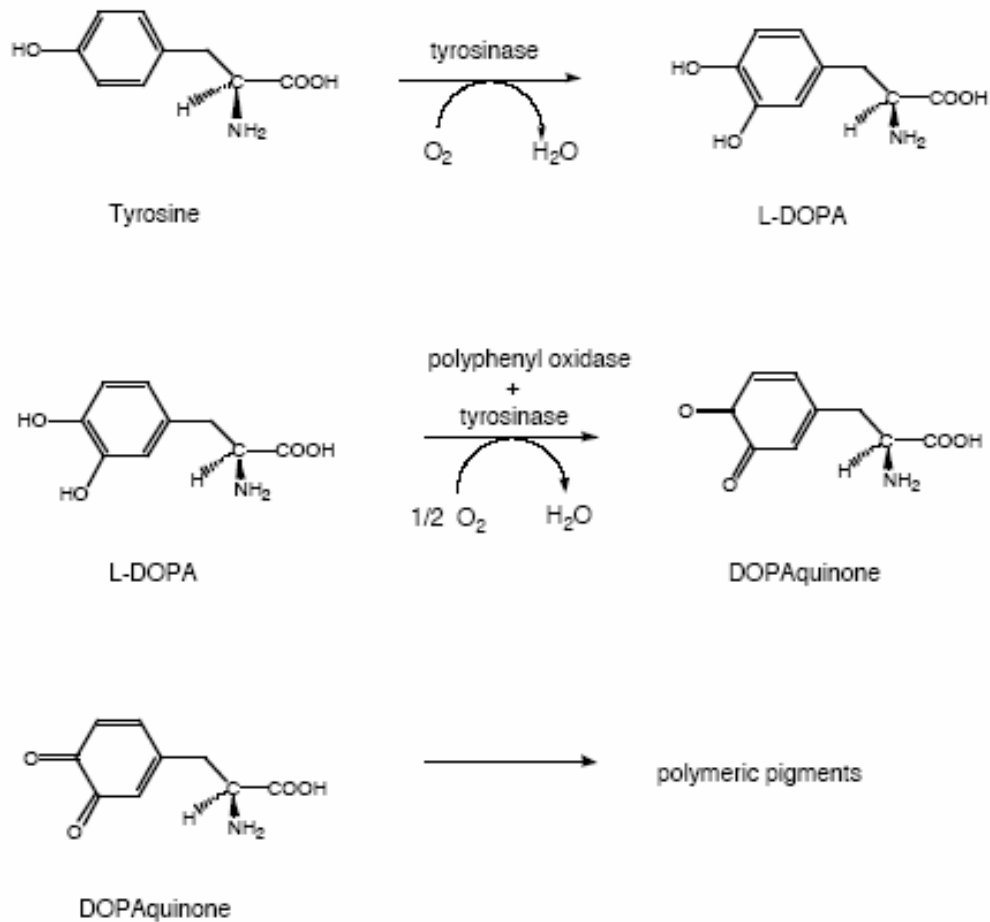


Figura 3. Conversi3n de L-tirosina a pigmentos biol3gicos catalizada por tirosinasa (Rodrquez. y Flurkey, 1992.)

La tirosinasa tambi3n es responsable de catalizar la oxidaci3n de compuestos fen3licos a sus correspondientes quinonas y provocar el oscurecimiento de frutas y vegetales; cambiando el color y sabor (Yu., 2003).

En estudios recientes se ha encontrado la posibilidad de tratar aguas contaminadas con compuestos fen3licos con tirosinasa provenientes de microorganismos. Los compuestos fen3licos son oxidados a quinonas las cuales al ser muy reactivas forman radicales fen3licos que se polimerizan f3cilmente (Lee et al., 1996); eliminando la contaminaci3n por precipitaci3n o filtraci3n de pol3meros arom3ticos de alto peso molecular.

ANTECEDENTES.

En el laboratorio de ingeniería genética y metabolismo secundario se aislaron aproximadamente 20 cepas de hongos filamentosos a partir de suelo de un aserradero de Puebla. De estas cepas se seleccionó un zigomiceto, nombrado como “Ñ” que demostró capacidad para tolerar y crecer en concentraciones iniciales de PCF de hasta 100 mg L^{-1} (Bernal, 2005). Los estudios realizados por León-Santiesteban, (2006) demostraron que el *zigomiceto* Ñ puede degradar en las primeras 48h de fermentación el 90.6% del PCF presente en el medio, conteniendo $12.5 \text{ mg PCF ml}^{-1}$ inicial, obteniéndose así una tasa de degradación de $0.34 \text{ mg PCF (mg biomasa h)}^{-1}$. Esto estudios se realizaron con medio Merlin-Norkrans modificado y diluido a la mitad (León-Santiesteban, 2006). Se demostró que en el medio diluido se obtiene una degradación del PCF más rápida y eficiente en comparación con los estudios de degradación de PCF realizados con medio Merlin-Norkrans sin diluir (Bernal, 2005), donde se demostró que esta cepa degrada el 80.6% de PCF presente en el medio ($12.5 \text{ mg PCF ml}^{-1}$ inicial) a las 72h, con una tasa de degradación del $0.14 \text{ mg PCF (mg biomasa h)}^{-1}$.

También se determinó cualitativamente la presencia de actividad enzimática extracelular de peroxidasas (Manganeso y Lignina) y de fenoloxidasas (Lacasas y tirosinasas) producidas por el *zigomiceto* Ñ. Las pruebas dieron resultado positivo para Lignina peroxidasa (LiP) y para tirosinasa. La actividad de lacasa no se observó con la prueba empleada. Por lo que se sugiere montar otra técnica cualitativa para confirmar si efectivamente el *zigomiceto* Ñ produce o no lacasa extracelular.

HIPOTESIS.

El *zigomiceto Ñ* produce mayor actividad de fenoloxidasas y peroxidasas extracelulares que intracelulares.

OBJETIVO GENERAL.

Identificar al *zigomiceto Ñ* y comparar las actividades intra y extracelulares de peroxidasas y tirosinasa.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- ✓ Identificar al *zigomiceto Ñ*, por técnicas moleculares.
- ✓ Cuantificar la actividad intra y extracelulares de la(s) fenoloxidasa(s) producidas por el *zigomiceto Ñ*.
- ✓ Cuantificar la actividad extracelular de lignina peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP) producida por el *zigomiceto Ñ*.

METODOLOGÍA.

MICROORGANISMO.

La cepa del *zigomiceto* Ñ, fue aislada de suelos contaminados de un aserradero en Puebla.

PROPAGACIÓN DEL *zigomiceto* Ñ.

La cepa se propagó en agar PDA (Agar Dextrosa y Papa) 39 g L⁻¹. Se colocaron 40 ml de PDA en matraces Erlenmeyer de 250 ml, los cuales se inocularon con 0.5 ml de suspensión de esporas de *zigomiceto* Ñ y se incubó a 30°C hasta su esporulación (3 a 4 días).

SUSPENSIÓN DE ESPORAS.

A los matraces ya esporulados se les añadió una solución de tween 80 al 1% en agua estéril, se les sometió a agitación suave y lenta con una barra magnética el tiempo necesario para suspender la mayoría de las esporas.

CONSERVACIÓN DE *zigomiceto* Ñ.

La suspensión concentrada de esporas se guardó en viales de 1.5 ml con glicerol al 40% y se mantuvieron en congelación a -20°C.

EXTRACCIÓN DE ADN DEL *zigomiceto* Ñ.

Este procedimiento se inició desde el crecimiento del hongo para obtener micelio. La extracción del ADN se hizo de acuerdo a la metodología de Fernández (1997).

Se inocularon 250 ml de medio PMY con 1×10^6 esporas del *zigomiceto* \tilde{N} ml^{-1} y se incubaron durante 48 h a 30°C y 200 rpm. Después del crecimiento del micelio, se filtró el medio a través de tela Nyltal estéril. El micelio obtenido después del filtrado se lavó con 250 ml de solución fisiológica (NaCl estéril al 0.9%) y posteriormente con 250 ml de tampón A.

MEDIO PMY.

Para un litro de medio se adicionó: 40g de glucosa, 3g de NaNO_3 , 2g de extracto de malta, 0.2g de KCl, 0.5g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.01g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Se ajustó el pH a 6.0.

TAMPÓN A: EDTA 100 mM pH 8.0, NaCl 150 mM y Tris-HCl 50 mM pH 8.0

Después del lavado, se eliminó la humedad del micelio con papel filtro estéril. Ya retirada la humedad se colocó el micelio seco en una caja Petri desechable estéril, se refrigeró a -80°C hasta conseguir la congelación total.

Una vez congelado el micelio, se liofilizó para eliminar humedad. El micelio después de liofilizado se pulverizó en un mortero estéril. El polvo obtenido se guardó en tubos Eppendorf de 1.5 ml hasta un volumen de 0.5 ml del tubo (aproximadamente 100 mg de micelio pulverizado), conservándose a -20°C hasta su uso.

Para la extracción de ADN se agregó a los tubos con polvo de micelio 0.5 ml de tampón de ruptura I, se homogenizó la muestra y posteriormente se añadió 0.5 ml de fenol neutro y 0.5 ml de CIA. Se mezclaron con suavidad, y se incubaron a 50°C durante 20 minutos. A los diez minutos de incubación se mezcló con suavidad de nuevo la mezcla.

TAMPÓN DE RUPTURA I: EDTA 100 mM pH 8.0, SDS al 1% (p/v) y Tris-HCl 0.2M. Se ajustó el pH a 8.2 con HCl.

FENOL ÁCIDO.

Se mezclaron 500 ml de fenol sólido con 500 ml de H₂O_d, se agitó y se dejó reposar 24 horas en un frasco ámbar a 4°C, posteriormente se retiró la fase superior acuosa.

FENOL NEUTRO.

Se mezclaron 4 volúmenes de fenol ácido con un volumen de Tris-HCl 1M pH 8.0. Se mantuvo la mezcla en reposo hasta que se separó la fase acuosa de la fase fenólica. Los lavados con Tris-HCl 1M pH 8.0 se realizaron hasta obtener un pH cercano a 7.0. Este fenol se conservó a 4°C en recipientes protegidos de la luz.

CIA: Por cada 24 volúmenes de cloroformo se puso 1 volumen de alcohol isoamílico.

Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de la centrifugación se formaron dos fases, una acuosa (superior) y una fenólica (inferior). Se recuperó la fase acuosa para ser desproteinizada mediante extracciones sucesivas con fenol-CIA hasta que se obtuvo una fase limpia (se necesitan de 6 a 7 extracciones). Posteriormente se hizo una nueva extracción con CIA al mismo volumen de la fase acuosa, se mezcló, centrifugó y se extrajo la fase acuosa, que se colocó en un tubo Eppendorf nuevo y estéril. A la fase acuosa recuperada se agregaron 0.7 volúmenes de isopropanol y se incubó a 4°C durante 1 día. Después de este tiempo se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se tiró el sobrenadante y al precipitado se le agregó 1 ml de etanol al 70% (v/v). Finalmente se mezcló y centrifugó el precipitado con el etanol a 14,000 rpm durante 5 minutos, se tiró el sobrenadante y se dejó secar el precipitado. Al precipitado seco se le agregó 20 µL de TE y se conservó a -20°C.

Fenol-CIA: Se mezclaron volúmenes iguales de fenol neutro y de CIA

TE: EDTA 1mM (pH 8.0) y Tris-HCl 10 mM (pH 8.0)

ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA.

La electroforesis es una técnica analítica de separación de macromoléculas. La separación tiene lugar debido a la diferente movilidad que presentan las macromoléculas cargadas cuando son sometidas a la influencia de un campo eléctrico. Los ácidos nucleicos son macromoléculas cargadas negativamente, debido a la presencia de grupos fosfato en su estructura por lo que migraran a través de un gel hacia el polo positivo cuando se establece una corriente eléctrica.

Se emplearon geles de agarosa (Promega), en concentraciones de entre el 0.3 y el 2 % (p/v), disueltas en tampón TEA 50x por calentamiento en microondas y vertidas para su gelificación en cámaras del tamaño adecuado. La concentración de agarosa utilizada depende del tamaño del fragmento de ADN a separar y se describen en la siguiente tabla:

CONCENTRACIÓN DE AGAROSA (%)	TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS DE ADN SEPARADOS
0.3	5-60 kpb
0.5	1-30 kpb
0.7	0.8-12 kpb
1.0	0.5-10 kpb
1.2	0.4-7 kpb
1.5	0.2-3 kpb
2.0	0.05-2 kpb

TEA 50x: 57.1 ml de ácido acético glaciar, 100 ml de EDTA 0.5 M (pH 8.0), 242 g de Tris base y H₂O hasta completar un litro.

Las muestras de ADN se mezclaron con agua destilada estéril (para ajustar el volumen final a 20 µL) y un décimo del volumen final de tampón de carga concentrado. Los volúmenes de ADN, tampón de carga y H₂O fueron:

MUESTRA	H ₂ OD	ADN	TAMPÓN DE CARGA 6X	VOLUMEN FINAL
<i>Ñ</i>	15 µL	3 µL	2 µL	20 µL
<i>Marcador</i>	13 µL	5 µL	2 µL	20 µL

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 esterilizó durante 20 minutos.

Las muestras de ADN preparadas se calentaron durante 10 minutos a 65°C, enfriándose posteriormente en baño de hielo y agua durante 3 minutos. Las muestras de ADN fueron cargadas en los pocillos del gel y la electroforesis se llevó acabo en tampón TEA mediante la aplicación de una diferencia de potencial de entre 1 y 5 voltios cm⁻¹. El ADN se tiñó con una solución de bromuro de etidio (BrEt) en una concentración final de 0.5 µg ml⁻¹.

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

El bromuro se intercala en la doble cadena del ADN y emite fluorescencia tras iluminarse el gel con luz ultravioleta, utilizando un equipo de foto-documentación Gel Doc II (Bio-Rad).

Se utilizó ADN del fago λ digerido con la enzima λEcoRI como marcador.

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL *zigomiceto Ñ*.

Para la identificación molecular del *zigomiceto Ñ* se amplificaron los genes ribosomales y sus espacios transcritos internos (ITS) (Carvalho., 2005); ya que estas regiones tienen una organización conservadora en el genoma de todos los eucariontes, tiene un gran número de copias (lo que facilita su amplificación) y tiene regiones muy conservadas en los genes: 18S, 5.8S y 28S (Kenneth et al., 1998)

(Figura 4) que están separadas por secuencias divergentes, muy variables, polimorfitas en longitud y en secuencia, por lo tanto, son muy informativas y representan una huella genómica para cada hongo.

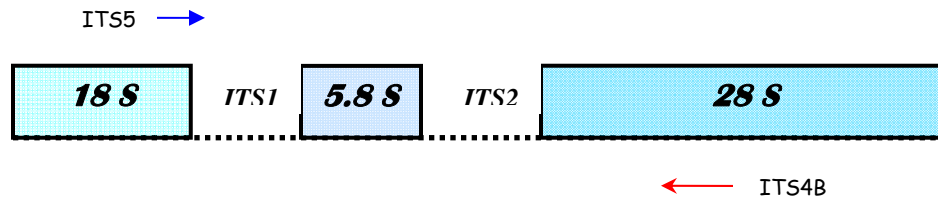


Figura 4. Esquema de la región del ADN para los genes del rRNA que fueron amplificados por PCR para la identificación del *zigomiceto* *Ñ*. Los genes codificantes del rRNA se representan dentro de los rectángulos y las zonas en blanco representan las regiones de los espacios transgénicos internos. Las flechas simbolizan la localización y los cebadores utilizados para la amplificación.

Se ha demostrado que la variabilidad en la secuencia observada en las dos regiones ITS de los genes ribosomales que separan la pequeña subunidad ribosomal 5.8S, han sido determinantes para distinguir un hongo de otro. Esta zona, para hongos tiene un tamaño de 650 a 900 pb (incluye al gen 5.8S) (Rodríguez-Tovar et al., 2004). La secuencia obtenida del gen ITS, se puede buscar en el banco de genes (GenBank), o en la base de datos de nucleótidos del EMPL (European Molecular Biology Laboratory) con el fin de identificar a hongos dentro de una especie o al menos en un grupo de especies (Rodríguez-Tovar et al., 2004).

REACCIÓN EN CADENA DE LA ADN POLIMERASA (PCR).

Esta técnica se basa en la separación de ambas hebras de ADN, la posterior unión de pequeños fragmentos (denominados *primers*) y la extensión de estos fragmentos usando de molde el ADN de la muestra. Así se obtienen dos copias idénticas por cada molécula en cada ciclo de reacción. Para llevar a cabo esta reacción se requiere de una enzima polimerasa que sea capaz de soportar la alta temperatura del proceso de desnaturalización. Esta enzima es una ADN-polimerasa especial obtenida de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*.

La mezcla de reacción se somete a ciclos sucesivos, cada uno correspondiente a una fase de desnaturalización, una de hibridación o alineación y una de elongación.

1. **Desnaturalización:** La desnaturalización permite la separación de las dos hebras del ADN, mediante el calentamiento a una temperatura elevada (92-96°C), que debe ser superior a la temperatura de fusión de la región del ADN que se requiere amplificar.

2. **Hibridación de los cebadores:** Permite, mediante la disminución de temperatura (37 a 67° C), la reacción de las hebras sencillas tras la desnaturalización térmica. Se requiere un enfriamiento rápido por debajo de la temperatura de fusión del ADN, de forma que permita la hibridación de las hebras sencillas del ADN con los oligonucleotidos cebadores. Los cebadores o *primers* (oligonucleotidos sintéticos) tienen secuencias complementarias, respectivamente, a los dos extremos 3' de la región del ADN diana, uno en cada hebra. La distancia entre ellos en el conjunto ADN-cebadores determinará la longitud de la secuencia de ADN amplificada.

3. **Elongación (o replicación) a partir de los cebadores:** Esta es la etapa de amplificación de las hebras sencillas de ADN por una ADN polimerasa termoestable a partir de los cebadores (72 a 75°C). La enzima más empleada se llama *Taq* polimerasa, por proceder de la bacteria *Thermus aquaticus*, que vive en manantiales de agua caliente. El sustrato para la síntesis de las innumerables copias del ADN son los cuatro dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), que deben ir acompañados de Mg^{2+} como cofactor.

En la técnica de reacción en cadena de ADN polimerasa cada conjunto de estos tres pasos (desnaturalización, hibridación, replicación) constituye un ciclo (Figura 5).

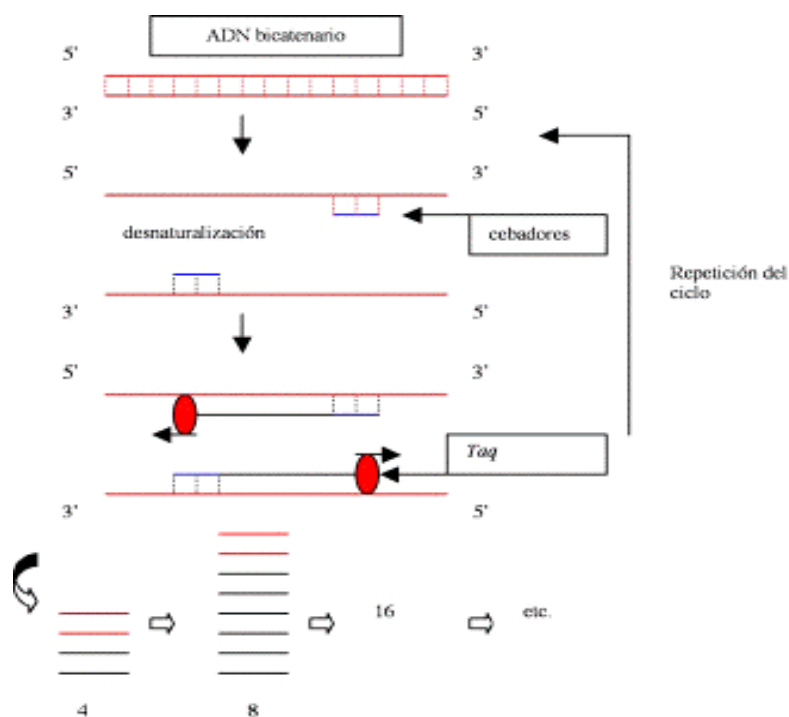


Figura 5. Esquema de la reacción en cadena de ADN polimerasa.

A medida que aumenta el número de ciclos el producto de la elongación pasa a ser la molécula diana a las que debe unirse perfectamente las moléculas del cebador presentes en la mezcla, conduciendo a una acumulación teórica del producto.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

Se prepararon en tubos Eppendorf de 200 μL la siguiente mezcla de reacción, en un baño de hielo y agua:

	CONCENTRACIÓN INICIAL (SOLUCIÓN STOCK)	CONCENTRACIÓN FINAL	MASTER MIX	VOLUMEN DE REACCIÓN		
ADN molde	-----	-----	-----	1 μL^*	1 μL^\dagger	1 μL^\ddagger
ADN polimerasa	50 unidades μL^{-1}	2.5 unidades μL^{-1}	2 μL	0.5 μL	0.5 μL	0.5 μL
Buffer	10x	1x	20 μL	5 μL	5 μL	5 μL
Mg₂Cl	50 mM	2.5 mM	10 μL	2.5 μL	2.5 μL	2.5 μL
dNTPs	10 mM	200 μM	4 μL	1 μL	1 μL	1 μL
Cebador ITS4b	20 μM	1 μM	10 μL	2.5 μL	2.5 μL	2.5 μL
Cebador ITS5	20 μM	1 μM	10 μL	2.5 μL	2.5 μL	2.5 μL
dH₂O	-----	-----	140 μL	35 μL	35 μL	35 μL
Volumen final	-----	-----	196 μL	50 μL	50 μL	50 μL

*Dilución del ADN 1/100 (1 μL de ADN en 99 μL de dH₂O).

†Dilución del ADN 1/50 (1 μL de ADN en 50 μL de dH₂O).

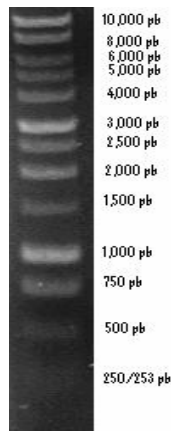
‡ADN concentrado.

A las mezclas de reacción ya preparadas se les sometió primero a 1 ciclo a 94°C durante 2 minutos, posteriormente se les sometió a 30 ciclos como se describen a continuación:

1. **Desnaturalización:** 94°C → 45 segundos.
2. **Hibridación:** 55°C → 45 segundos.
3. **Elongación:** 72°C → 45 segundos.

Después de los 30 ciclos descritos anteriormente; se realizó un ciclo más de 5 minutos a 72°C y por último un ciclo de 3 minutos a 4°C.

Para ver el segmento de banda codificado se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7%, con un marcador comercial 1 kb ADN Ladder (Promega) de 250 a 10,000 pares de bases, como el que se muestra en la siguiente figura:



PURIFICACIÓN DE BANDA DE ADN.

La purificación de ADN se realizó con el kit Wizard[®] SV and PCR Clean-Up System de Promega.

FERMENTACIÓN SUMERGIDA.

Se preparó medio sintético Merlin-Norkrans modificado. Se adicionaron 50 ml de medio Merlin-Norkrans (modificado) estéril a matraces Erlenmeyer de 250 ml previamente esterilizados y se inocularon con 1×10^6 esporas ml^{-1} . Los matraces inoculados se mantuvieron en incubación a 30°C con agitación de 200 rpm. Después de las primeras 24 horas de incubación se adicionó PCF a una concentración inicial de 12.5 mg L^{-1} . Paralelamente se prepararon cultivos control, libres de PCF.

MEDIO MERLIN-NORKRANS (MODIFICADO)

Composición del medio Merlin-Norkrans en g L^{-1} : 10g de glucosa, 2g de extracto de Malta, 1g de extracto de levadura, 0.5g de KH_2PO_4 , 0.15g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.5g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Se adicionó al medio una solución buffer de citratos (pH 5.5) (Bernal, 2005). Para un litro de medio es necesario 500 ml de H_2O y 500 ml de buffer de citratos (pH 5.5) (relación 50:50).

SOLUCIÓN BUFFER DE CITRATOS (pH 5.3-5.8)

Solución A: ácido cítrico monohidratado 0.1M

Solución B: Citratos de sodio 0.1M

Para llegar a pH 5.3-5.8 se adicionaron 13.7 ml de la solución A, 36.3 ml de la solución de B, y se aforó a 100 ml con agua destilada

CINETICA DE DEGRADACIÓN DE PCF.

La cinética de degradación de PCF se realizó en una a la fermentación sumergida. Se tomaron muestras cada 24 horas hasta las 72 horas. A las muestras obtenidas se les determinó: pH, biomasa, se cuantificó PCF residual y se tomaron extractos libres de biomasa (medio de cultivo) y extractos de biomasa para la determinación de las actividades enzimáticas.

TECNICAS ANÁLITICAS.

CRECIMIENTO

Cada muestra se filtró al vacío para separar el medio de cultivo del micelio (biomasa). El medio de cultivo se consideró como extracto libre de biomasa. La biomasa se secó a 75°C durante 24 horas, por diferencia de peso se cuantificó el peso seco de la biomasa.

EXTRACCIÓN DE PCF

EXTRACTO LIBRE DE BIOMASA (DIRECTO)

Se tomaron 40 ml de medio de cultivo, libre de biomasa, se le ajustó el pH a 7.0 y este extracto de utilizó para determinar el PCF residual que queda en el medio de cultivo.

EXTRACTO DE BIOMASA

El micelio recuperado se resuspendió en 25 ml de una solución buffer de carbonatos pH 10.6, se sonicó en un Sonicador Branson Ultrasonics 1210 durante 25 minutos para los tiempos 0, 24, 48 horas y 90 minutos para las 72 horas. El micelio sonicado se volvió a filtrar al vacío. Al extracto sonicado, libre de biomasa, se le ajustó el pH a 7.0 y se utilizó para determinar el PCF residual adherido a la pared celular de *zigomiceto* Ñ.

SOLUCIÓN BUFFER DE CARBONATOS (pH 10.6)

Solución I: Carbonato de sodio anhidro 0.2M

Solución II: Bicarbonato de sodio 0.2M

Para llegar a un pH 10.6 se adicionaron 42.5 ml de solución I, 7.5 ml de solución II y se aforó a 200 ml con agua destilada.

CUANTIFICACIÓN DE PCF RESIDUAL

Para la determinación cuantitativa de PCF residual se centrifugaron durante 15 minutos los extractos directos y libres de biomasa a 1400 rpm. Los extractos se filtraron en una membrana de 0.22 μ m de tamaño de poro y se inyectaron al HPLC. Se utilizó una columna C-18 en fase reversa, μ -Bondapack WATERS empacada con Rusil C-18 (18nm), el PCF se separó en la columna con una solución de 1% de ácido acético en agua milliQ y una solución de 1% de ácido acético en acetonitrilo (75:25) con un flujo de 1.5 ml min⁻¹. El PCF fue detectado por UV, en un Detector de UV 996 WATERS, a 240nm y los resultados obtenidos fueron analizados por computadora empleando el paquete Millenium-WATERS.

CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA INTRA Y EXTRACELULAR

EXTRACTO LIBRE DE BIOMASA (DIRECTO)

Se tomaron 5 ml de medio de cultivo, libre de biomasa, de las muestras problema y se llevaron a una concentración de 0.1mM de PMSF (phenylmethanesulphonyl fluoride) con una solución Stock de 100 mM y se mantuvieron dentro de un baño de hielo (0-5°C). Esta fracción su utilizó para determinar las actividades enzimáticas extracelulares.

OBTENCIÓN DE ENZIMAS INTRACELULARES

El micelio recuperado después de filtrar el medio de cultivo se resuspendió en 5 ml de buffer de fosfato de sodio 0.1M (pH 6.8) con 0.65M Sorbitol y 1mM de PMSF (Halaouli et al., 2005), manteniéndose en un baño de hielo (0-5°C). El micelio resuspendido se rompió con un Potter

(Homogenizador), posteriormente el micelio roto se centrifugó a 7500 rpm por 1.5 horas. El sobrenadante obtenido, libre de micelio, fue el extracto intracelular.

SOLUCIÓN BUFFER DE FOSFATO DE SODIO 0.1M (pH 6.8)

Solución a: Fosfato de sodio monobásico 0.1M

Solución b: Fosfato de sodio bibásico 0.1M

Para llegar a un pH 6.8 se adicionaron 51 ml de solución a, 49 ml de solución b y se aforó a 100 ml.

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD MONOFENOLÁSICA (TIROSINASA).

Después de obtener los extractos extracelulares e intracelulares se determinó la actividad de tirosinasa (monofenolasa) con el método espectrofotométrico de hidrazona de Besthorn (Mazzocco and Pefferri, 1976). Este método se basa en la condensación de la hidrazona de Besthorn con la quinona obtenida por la oxidación enzimática de pirocatecol.

La curva de calibración se obtuvo por la oxidación del fenol 0.5M con diferentes concentraciones molares de I_2 (1×10^{-4} hasta $12 \times 10^{-3}M$) en presencia de la hidrazona de Besthorn (MBTH) a pH 4.2 (solución buffer de fosfato-cítrico 0.4M). Finalmente después de un minuto de reacción, ésta se detuvo con ácido sulfúrico al 5% y acetona, midiéndose la absorbancia en un espectrofotómetro a 459nm. El volumen de reacción fue de 1.5 ml y el volumen final fue de 3.25 ml.

Los volúmenes usados para realizar la curva fueron:

REACTIVO	BLANCO (ml)	MUESTRA (ml)
Fenol 0.5 M	0.25	0.25
Buffer fosfato-cítrico pH 4.2	0.75	0.75
MBTH	0.25	0.25
I ₂ (1x10 ⁻⁴ hasta 12x10 ⁻³ M)	0.25	0.25*
H ₂ SO ₄ 5%	0.25	0.25
Acetona	1.5	1.5

*Volumen del extracto directo (actividad extracelular) o volumen del extracto de biomasa (actividad intracelular)

Con el fin de perfeccionar el método empleado por Mazzocco and Pefferri (1976) se utilizó fenol como sustrato para la reacción enzimática, en lugar de catecol. Cada dilución se realizó por triplicado (Anexo).

SOLUCIÓN BUFFER FOSFATO-CITRATO 0.1M (pH 4.2).

Solución C: Ácido cítrico monohidratado 0.1M

Solución D: Fosfato de sodio dibásico 0.2M

Para llegar a un pH 4.2 se adicionaron 29.4 ml de solución C, 20.6 ml de solución D y se aforó a 100 ml con agua destilada.

INCREMENTO DE LA ACTIVIDAD MONOFENOLASA DE TIROSINASA CON TIROSINA DISUELTA EN EL MEDIO.

Se diluyó en el medio Merlin-Norkrans diferentes concentraciones de tirosina (Tyr) con el fin de observar el posible incremento de la actividad monofenolasa de tirosinasa por este aminoácido, debido a que se cree que actúa como un potenciador de la tirosinasa. Las concentraciones de Tyr fueron: 0.025, 0.05 y 0.1 g L⁻¹. Se utilizó como control el medio de cultivo sin Tyr.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXTRACELULARES DE LIGNINA PEROXIDASA (LiP).

La actividad de lignina peroxidasa (LiP) se evaluó por espectrofotometría UV a 310 nm (Maganhotto et al., 2005), mediante la detección del veratraldehído ($\epsilon_{310}^{\text{TM}}=9300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) producido

durante la oxidación del alcohol veratrílico (Figura 6). La mezcla de reacción contenía 375 μL de buffer de tartato de sodio 0.33M (pH 3.0); 125 μL de alcohol veratrílico 4mM; 50 μL de peróxido de hidrogeno 10 mM; 450 μL de H_2O y 250 μL de extracto directo, para tener un volumen final de 1250 μL .

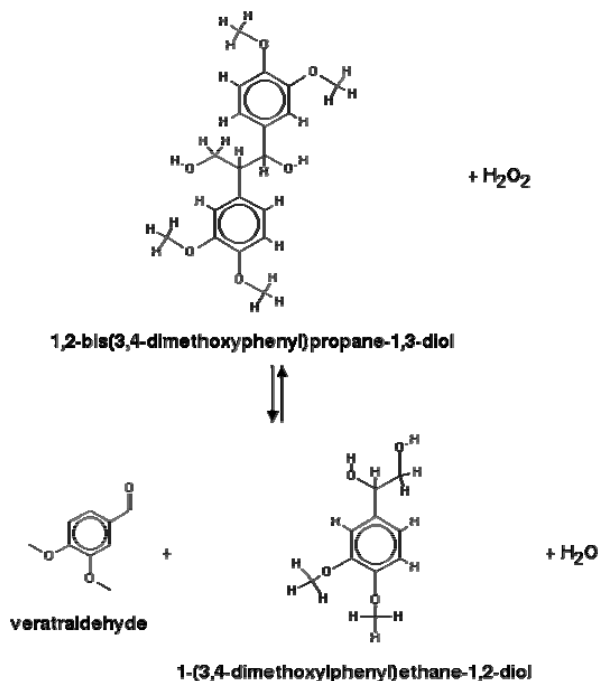


Figura 6. Oxidación del alcohol veratrílico por LiP produciendo veratraldehído.

SOLUCIÓN BUFFER DE TARTATO DE SODIO 0.33M (pH 3.0).

Para llegar a un pH 4.2 se adicionaron 3.911g de tártato de sodio, 2.401g de ácido tartárico y se aforó a 100 ml con agua destilada.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE MANGANESO PEROXIDASA (MnP).

Se midió la actividad enzimática de manganeso peroxidasa a 610 nm ($\epsilon_{610}^{\text{TM}}=4460 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) usando la metodología descrita por Kuwahara et al., (1987). La mezcla de reacción contenía: 500 μL de extracto directo; 100 μL de rojo de fenol al 0.01 %; 100 μL de lactato de sodio 250mM; 200 μL de albúmina bovina 0.5 %; 50 μL de sulfato de magnesio 2mM y 50 μL de peroxido de hidrógeno preparado en buffer succinato de sodio 20mM (pH 4.0).

Las reacciones de lignina y manganeso peroxidasa se mantuvieron en incubación a 30 °C durante 5 minutos y se interrumpieron la reacciones con adición 40 μ L de NaOH 2N.

SOLUCIÓN BUFFER DE SUCCINATO DE SODIO 20mM (pH 4.0).

Solución E: Ácido succinico 0.2M

Solución F: NaOH 0.2M

Para llegar a un pH 4.0 se adicionaron 25 ml de solución E, 10 ml de solución F y se aforó a 100 ml con agua destilada.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE

A los extractos extracelulares e intracelulares se les cuantificó la proteína soluble por medio del microensayo de Bradford (Bradford, 1976). El método de Bradford se basa en la unión no covalente del Azul de Coomassie a las proteínas. El azul de Coomassie es un compuesto que presenta diferentes espectros de absorción según el estado de protonación en el que se encuentra: la forma catiónica es de color rojo-marrón (máximo de absorbancia a 470 nm), la neutra es verde (máximo a 650 nm) y la aniónica es azul (máximo a 595 nm).

La presencia de proteínas favorece el desplazamiento del equilibrio hacia la forma aniónica debido a la interacción de los grupos sulfónicos del Coomassie con los grupos catiónicos y las cadenas laterales de algunos residuos de aminoácidos de las proteínas (principalmente Arg y Lys), produciéndose entonces la coloración azul que puede medirse a $\lambda = 595$ nm.

La curva de calibración se realizó con diferentes concentraciones de seroalbúmina bovina, partiendo de una solución Stock de 100 μ g ml^{-1} . Las concentraciones de seroalbúmina y los volúmenes de dilución fueron:

CONCENTRACIÓN FINAL DE PROTEÍNA SEROALBÚMINA BOVINA ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	VOLUMEN DE SOLUCIÓN STOCK DE SEROALBÚMINA BOVINA (μL)	AGUA DESIONIZADA (μL)	VOLUMEN DE ANÁLISIS (μL)
0	0	800	800
2	20	780	800
4	40	760	800
6	60	740	800
8	80	720	800
10	100	700	800
12	120	680	800

Cada dilución se realizó por triplicado. A cada tubo de las diluciones se le adicionaron 200 μL del reactivo de Bradford (Bio-Rad), se homogenizaron con un vórtex y se dejaron reposar durante 5 minutos. Después de terminado el tiempo de reposo se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro a 595 nm.

Con las absorbancias obtenidas y las concentraciones de seroalbúmina bovina de la curva de calibración se pudo obtener los parámetros de la ecuación de la recta

$$y = mx + b$$

Donde:

y = Absorbancia

x = Concentración de proteína ($\mu\text{g ml}^{-1}$)

b = Ordenada al origen

m = Pendiente de la recta.

Para la determinación de proteína soluble de los extractos directos se agregaron 40 μL del extracto libre de biomasa y se diluyeron en 760 μL de agua desionizada en tubos de ensayo de 5 ml de capacidad adicionándoles 200 μL del reactivo de Bradford. Posteriormente, se agitaron los tubos en un vórtex y se dejaron reposar por 5 minutos para después medir su absorbancia a 595nm. La determinación proteína total en los extractos intracelulares se realizó de manera semejante a la descrita anteriormente, salvo que, en éste caso se tomaron solamente 10 μL de éstos extractos y se diluyeron en 790 μL de agua desionizada (Anexo).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL *zigomiceto* Ñ.

1.1 EXTRACCIÓN DE ADN DEL *zigomiceto* Ñ

Se realizó como se describió en el apartado de metodología. En la figura 1 se muestra una imagen del gel que contiene el ADN total del *zigomiceto* Ñ, junto con marcador molecular λ EcoRI.

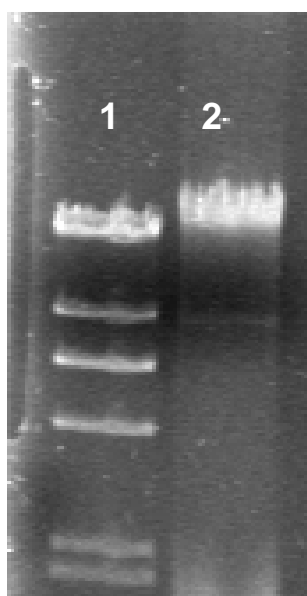


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa 0.7 % del ADN total del *zigomiceto* Ñ. (1) Marcador de peso molecular λ EcoRI y (2) ADN total *zigomiceto* Ñ.

Después de la extracción de ADN total del *zigomiceto* Ñ, éste se conservó a -20°C , disuelto en TE.

1.2 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LA SECUENCIA ITS DEL rADN DEL *zigomiceto* Ñ.

Las secuencias ITS se obtuvieron como se describió en el apartado de metodología. La figura 2 muestra el gel de agarosa al 0.7% con los fragmentos de los productos del PCR, se obtuvo un fragmento de aproximadamente 700 pb, según el marcador ADN Ladder 1kb.

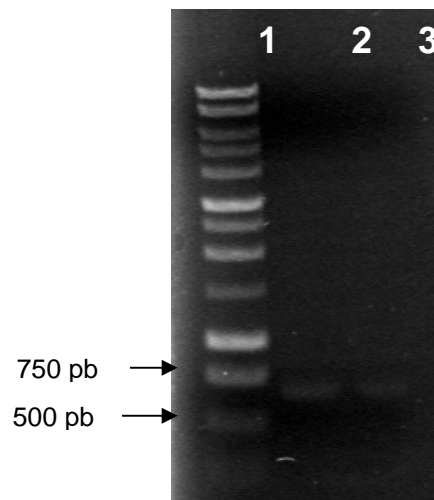


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % con los productos del PCR del rADN del *zigomiceto* Ñ con los primer ITS4B e ITS5 para la amplificación de las secuencias ITS que flanquean a los genes ribosomales. (1) Marcador de tamaño 1kb ADN Ladder. (2) ADN de Ñ (concentrado). (3) Dilución 1/50 del ADN total de Ñ.

1.3 PURIFICACIÓN DE BANDA DE ADN PARA LA SECUENCIACIÓN.

Se cortó la banda de aproximadamente 700 pb. Posteriormente se hizo la purificación con el kit Wizard[®] (SV and PCR Clean-Up System de Promega). Una vez purificada la banda de ADN, se mandó secuenciar en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Autónoma Metropolitana campus Iztapalapa.

1.4 SECUENCIACIÓN DEL ADN DEL *zigomiceto* Ñ.

El *zigomiceto* Ñ fue identificado molecularmente como *Rhizopus oryzae* **ENHE**, con una identidad de 100% en 604 nucleótidos.

2. EFECTO DEL PCF EN EL CRECIMIENTO Y EN LA ACTIVIDAD DE TIROSINASA.

2.1. Crecimiento.

En el gráfico 1 se muestra el perfil de crecimiento de *R. oryzae* **ENHE** en medio Merlin-Norkrans (modificado) con 12.5 mg L⁻¹ de PCF; adicionándolo a las 24 h de fermentación, después de germinadas las esporas. Se tomó como control el crecimiento de *R. oryzae* **ENHE** en Merlin-Norkrans (modificado) pero sin PCF.

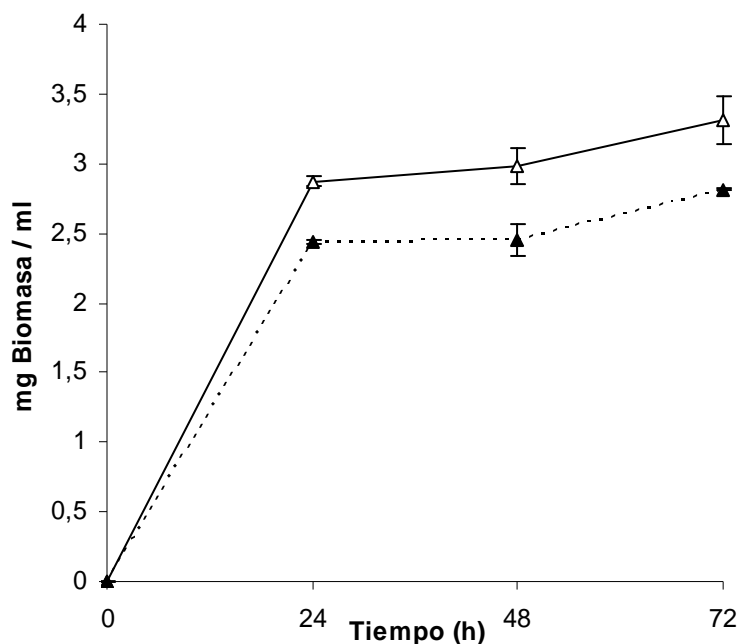


Gráfico 1. Cinética de crecimiento de *R. oryzae ENHE* en medio Melin-Norkrans (modificado) con y sin PCF. (Δ) Control sin PCF, (\blacktriangle) con PCF.

La máxima producción de biomasa fue de 2.87 mg ml^{-1} en el control y de 2.44 mg ml^{-1} en el cultivo con PCF, a las 24 h. Mostrando 1.17 veces mayor crecimiento en el cultivo control en comparación con el cultivo con PCF. Resultados parecidos a los obtenidos con *A. rouxii* (Tomasini et al., 2001) en donde se observaba que el PCF tiene un efecto tóxico sobre el crecimiento. La tabla 1 resume los resultados obtenidos.

Tabla 1. Biomasa de *R. oryzae ENHE* cuantificada por peso seco en mg ml^{-1} con y sin PCF (control).

Tiempo (h)	Biomasa (mg ml^{-1})	
	CONTROL (sin PCF)	Con $12.5 \text{ mg PCF L}^{-1}$
0	0	0
24	2.87	2.44
48	2.98	2.45
72	3.31	2.82

2.2 Actividad específica de tirosinasa extracelular e intracelular.

Las actividades específica de *R. oryzae ENHE* se calcularon relacionando la actividad volumétrica de tirosinasa de los extractos control (sin PCF) y los extractos directos (con PCF) con la cantidad total de proteína soluble obtenida y se definió a lo largo del tiempo.

2.2.1 Actividad específica de tirosinasa extracelular.

La cinética de actividad extracelular que se obtuvo se muestra en el gráfico 2.

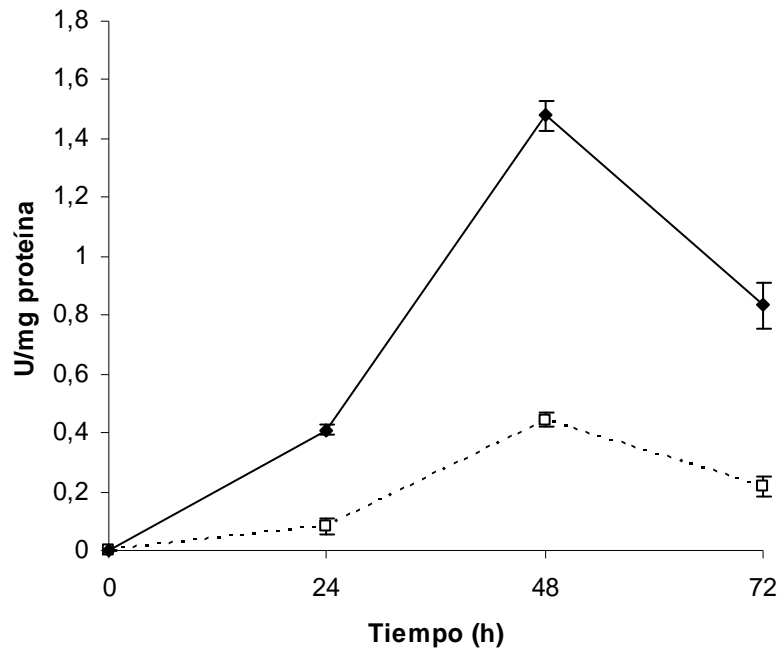


Gráfico 2. Cinética de actividad específica de tirosinasa extracelular producida por *R. oryzae ENHE* en medio sintético Merlin-Norkrans (modificado) con y sin PCF. (◆) Control sin PCF, (□) con PCF.

En el gráfico 2 se puede observar que la actividad de tirosinasa extracelular disminuyó después de agregar el PCF en el medio de cultivo (24 h). La mayor actividad de tirosinasa extracelular se presentó a las 48 h en los cultivos control y con PCF (Tabla 2). Se observó 3.33 veces más actividad de tirosinasa extracelular en los cultivos control en comparación a los cultivos con PCF, a las 48 h. Posteriormente la actividad de tirosinasa extracelular disminuyó en presencia y ausencia del PCF. Con base en estos resultados se demuestra que la actividad máxima de tirosinasa extracelular se presenta a las 48 h cultivo con y sin PCF. Para *R. oryzae ENHE* el estrés producido por el PCF afecta negativamente la actividad de tirosinasa extracelular; caso contrario a lo reportado por Montiel et al., (2004) quienes mostraron que la actividad de tirosinasa extracelular se ve inducida por el PCF.

Tabla 2. Valores de la cinética de actividad de tirosinasa extracelular producida por *R. oryzae ENHE* en el medio Merlin-Norkrans (Modificado) con y sin PCF.

TIEMPO (h)	CONTROL		Con PCF	
	U mg ⁻¹ proteína	Desv star	U mg ⁻¹ proteína	Desv star
0	0	0	0	0
24	0.410	0.015	0.081	0.025
48	1.479	0.052	0.444	0.024
72	0.834	0.079	0.215	0.035

2.2.2 Actividad específica de tirosinasa intracelular.

Para determinar la actividad de tirosinasa intracelular se recuperó el micelio de *R. oryzae ENHE* después de filtrar al vacío el medio de cultivo. Se resuspendió 500 mg de micelio en peso húmedo (excepto a las 48 horas con PCF, ya que *R. oryzae ENHE* no alcanzó a producir 500 mg de micelio en peso húmedo, por lo que, solo se tomó 250 mg de micelio en peso húmedo) en 5 ml de de buffer de fosfato de sodio 0.1M (pH 6.8) con 0.65M Sorbitol y 1mM de PMSF.

La cinética que se obtuvo se muestra en el gráfico 3.

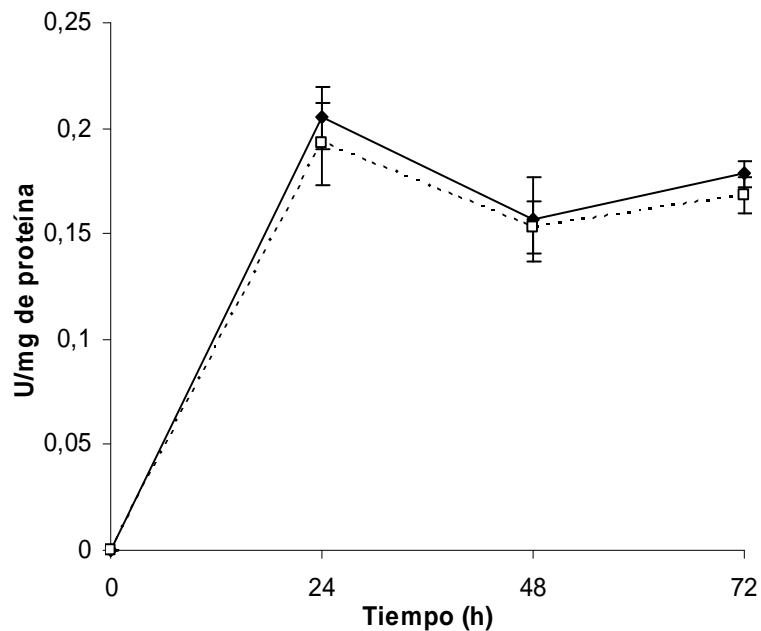


Gráfico 3. Cinética de actividad específica de tirosinasa intracelular producida por *R. oryzae ENHE* en medio Merlin-Norkrans (modificado) con y sin PCF. (◆)Control sin PCF, (□) con PCF.

El gráfico 3 muestra que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la actividad de tirosinasa intracelular en los cultivos control y con PCF. La mayor actividad intracelular se presentó a las 24 h y fue de 0.205 ± 0.015 U mg⁻¹. Los resultados se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Valores de la cinética de actividad de tirosinasa intracelular producida por *R. oryzae ENHE* en el medio Merlin-Norkrans (modificado) con y sin PCF.

TIEMPO (h)	CONTROL (sin PCF)		Con PCF	
	U mg ⁻¹ proteína	Desv star	U mg ⁻¹ proteína	Desv star
0	0	0	0	0
24	0.205	0.015	0.193	0.020
48	0.157	0.020	0.153	0.013
72	0.178	0.006	0.168	0.008

3. EFECTO DE LA TIROSINA (Tyr) EN EL CRECIMIENTO Y EN LA ACTIVIDAD DE TIROSINASA

3.1 Crecimiento.

En el gráfico 4 se muestra la producción de biomasa obtenida de los cultivos de *R. oryzae ENHE* con 0.1 y 0.05 g Tyr L⁻¹ en el medio Merlin-Norkrans (modificado) y como control la biomasa de *R. oryzae ENHE* si el efecto de la Tyr.

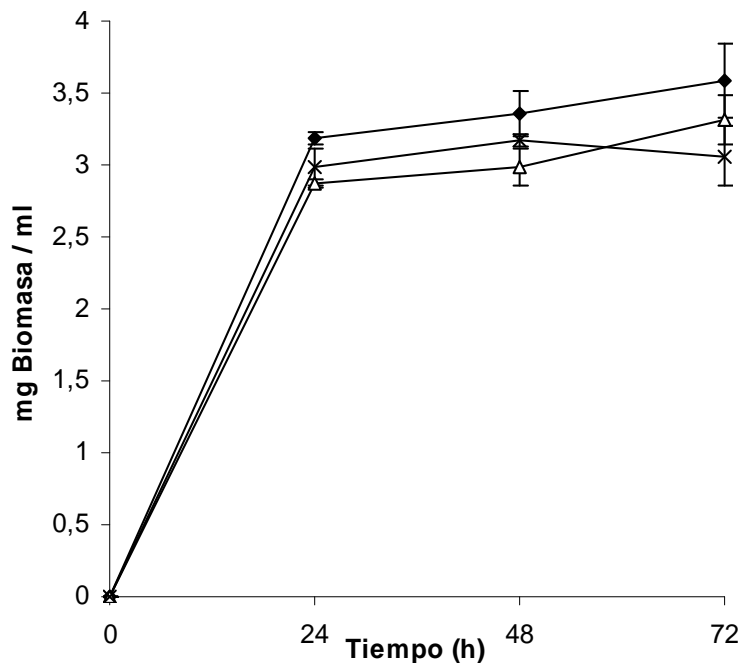


Gráfico 4. Cinética de crecimiento de *R. oryzae ENHE* en medio Melin-Norkrans (modificado) con diferentes concentraciones de Tyr en el medio de cultivo. (Δ)Control sin Tyr, (◆) 0.05 y (×) 0.1 g tyr L⁻¹.

Del gráfico 4 se observa que la biomasa producida a las 24 h en los cultivos control y con 0.1 g L⁻¹ de Tyr es muy similar, no hay diferencias significativas. Sin embargo, existe un aumento estadísticamente

significativo en el crecimiento del 11% para los cultivos con 0.05 g L⁻¹ de Tyr en comparación con el cultivo control (tabla 4). El incremento del crecimiento de *R. oryzae ENHE* en presencia del Tyr, es debido probablemente a que el aminoácido está actuando como factor de crecimiento para el zigomiceto, provocando un aumento en la actividad metabólica del hongo, que tienen como consecuencia un incremento en la producción de biomasa.

Tabla 4 . Biomasa de *R. oryzae ENHE* cuantificada por peso seco en mg ml⁻¹ con diferentes concentraciones de Tyr en el medio de cultivo.

Tiempo (h)	Biomasa (mg ml ⁻¹)		
	CONTROL (sin Tyr)	0.05 g Tyr L ⁻¹	0.1 g Tyr L ⁻¹
0	0	0	0
24	2.87	3.19	2.99
48	2.98	3.36	3.17
72	3.31	3.58	3.06

3.2 Actividad específica de tirosinasa extracelular e intracelular.

3.2.1 Actividad específica de tirosinasa extracelular.

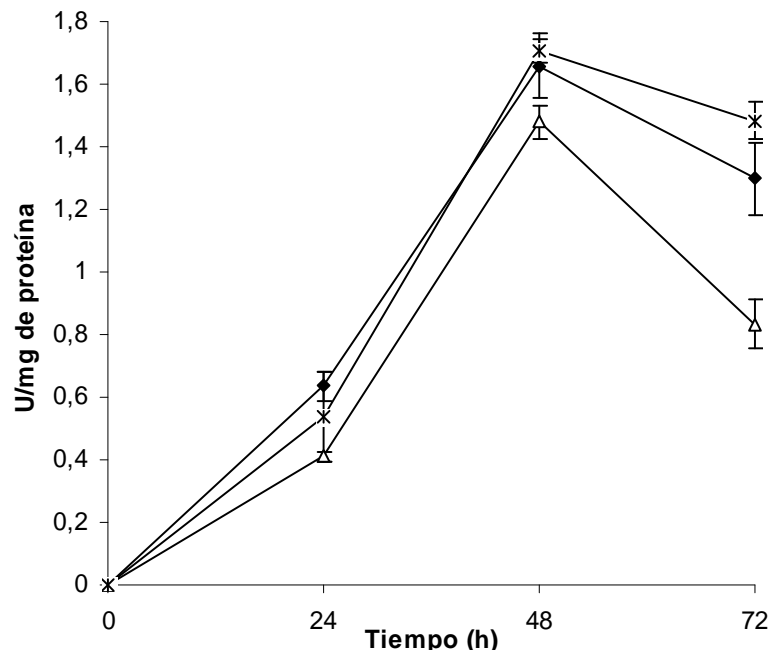


Gráfico 5. Cinética de actividad específica de tirosinasa extracelular producida por *R. oryzae ENHE* en medio Merlin-Norkrans (modificado) con Tyr. (Δ) Control sin Tyr, (◆) 0.05 y (×) 0.1 g tyr L⁻¹.

Del gráfico 5 se puede observar que la Tyr tiene un efecto positivo en la actividad de tirosinasa extracelular; incrementando la actividad en todos los tiempos de muestreo. La máxima actividad de

tirosinasa extracelular producida por *R. oryzae ENHE* se obtuvo a las 48 h de cultivo; en este periodo no existe una diferencia estadísticamente significativa de la actividad de tirosinasa en los cultivos con 0.1 y 0.05 g Tyr L⁻¹, sin embargo, se incrementa la actividad de tirosinasa en estos cultivos alrededor de un 14% de la actividad en comparación con los cultivos control. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Valores de la cinética de actividad de tirosinasa extracelular de *R. oryzae ENHE* con 0.1 y 0.05 g L⁻¹ Tyr en medio Merlin-Norkrans (modificado) y como control el medio de cultivo sin Tyr.

TIEMPO (h)	CONTROL (sin Tyr)		Con 0.1 g Tyr L ⁻¹		Con 0.05 Tyr g L ⁻¹	
	U mg ⁻¹ proteína	Desv star	U mg ⁻¹ proteína	Desv star	U mg ⁻¹ proteína	Desv star
0	0	0	0	0	0	0
24	0.410	0.015	0.538	0.144	0.635	0.046
48	1.479	0.052	1.707	0.037	1.659	0.105
72	0.834	0.079	1.483	0.059	1.299	0.115

3.2.2 Actividad específica de tirosinasa intracelular.

El gráfico 6 muestra la actividad de tirosinasa intracelular de los extractos de biomasa de *R. oryzae ENHE* con 0.1 y 0.05 g L⁻¹ de Try en medio Merlin-Norkrans (modificado) y como control, los extractos de biomasa de cultivos sin Tyr.

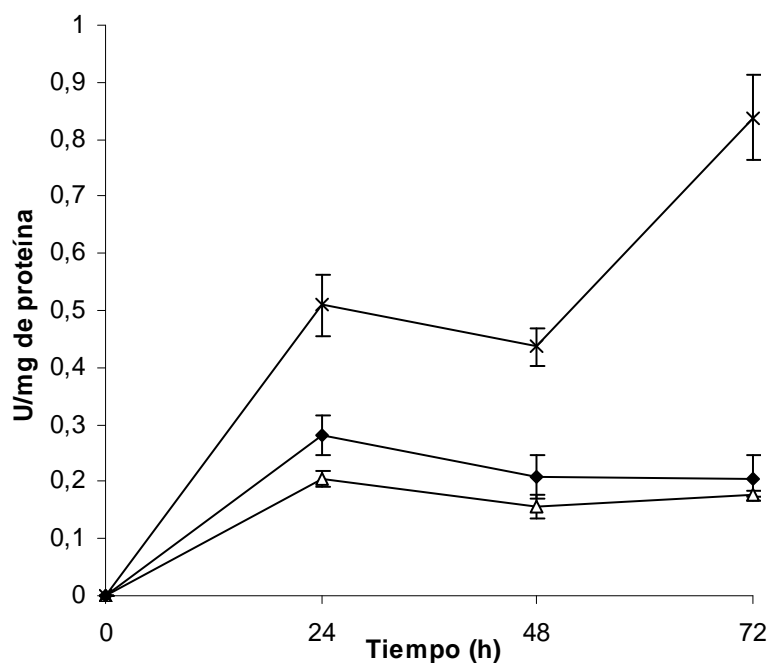


Gráfico 6. Cinética de actividad específica de tirosinasa intracelular producida por *R. oryzae ENHE* en medio Merlin-Norkrans (modificado) con Tyr. (Δ) Control sin Tyr, (◆) 0.05 y (×) 0.1 g Tyr L⁻¹.

En el gráfico 6 se observa que la Tyr también tiene un efecto positivo en la actividad de tirosinasa intracelular. La máxima actividad de tirosinasa con 0.05 g L⁻¹ Tyr en el medio se presentó a las 24 h, esta actividad es 1.37 veces mayor que la actividad de los cultivos control. La mayor actividad de tirosinasa con 0.1 g L⁻¹ Tyr en el medio se presentó a las 72 h, siendo 4.71 veces mayor que la actividad de los cultivos control. Los resultados se resumen en la tabla 6.

Al parecer con concentraciones relativamente grandes (0.1 g L⁻¹) de Tyr en el medio de cultivo se incrementa la actividad de tirosinasa intracelular de *R. oryzae ENHE*. Mientras que en la actividad de tirosinasa extracelular no se observa incremento en la actividad, ya que la actividad máxima con 0.1 g L⁻¹ Tyr no es estadísticamente diferente a la actividad de tirosinasa obtenida con 0.05 g L⁻¹ Tyr, por lo que se consideran iguales; esto indica que el incremento en la actividad de tirosinasa extracelular no es tan sensible al incremento en la concentraciones de Tyr, como lo presenta la actividad intracelular.

Tabla 6. Valores de la cinética de actividad de tirosinasa intracelular producida por *R. oryzae ENHE* con 0.1 y 0.05 g L⁻¹ de Tyr en Merlin-Norkrans (modificado) y como control el medio de cultivo sin Tyr.

TIEMPO (h)	CONTROL (sin Tyr)		Con 0.1 g Tyr L ⁻¹		Con 0.05 Tyr g L ⁻¹	
	U mg ⁻¹ proteína	Desv star	U mg ⁻¹ proteína	Desv star	U mg ⁻¹ proteína	Desv star
0	0	0	0	0	0	0
24	0.205	0.015	0.510	0.054	0.281	0.035
48	0.157	0.020	0.437	0.033	0.208	0.038
72	0.178	0.006	0.838	0.075	0.206	0.039

4. ACTIVIDA ENZIMATICA DE PEROXIDASAS EXTRACELULAR.

4.1 Actividad de Manganeso peróxidasa (MnP).

Para determinar la presencia de MnP producida por *R. oryzae ENHE* se realizaron tres fermentaciones con la metodología ya mencionada, donde cada tiempo se hizo por triplicado. Los resultados obtenidos mostraron que *R. oryzae ENHE* no presenta actividad de MnP ya que no se logró obtener datos de absorbancia positiva que mostraran la actividad.

4.2 Actividad de Lignina peróxidasa (LiP).

Para determinar la actividad enzimática volumétrica de lignina y manganeso peróxidasa en *R. oryzae* *ENHE* se utilizó la siguiente formula:

$$U / ml = \frac{V}{v \times e \times d \times \Delta A \text{ min}^{-1}}$$

Donde:

V = Volumen total de reacción (ml).

v = Volumen de extracto enzimático (ml).

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

d = Diámetro de la cubeta (cm).

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

Para calcular las actividades específicas de LiP en *R. oryzae* *ENHE*, solo se dividió la actividad volumétrica entre la proteína soluble extracelular (mg ml^{-1}) cuantificada por el método microenzayo de Bradford (Bradford, 1976).

En el gráfico 7 se muestra la actividad específica de LiP con y sin PCF de *R. oryzae* *ENHE* en medio Merlin-Norkrans (modificado). Se tomó como control a los cultivos control sin PCF.

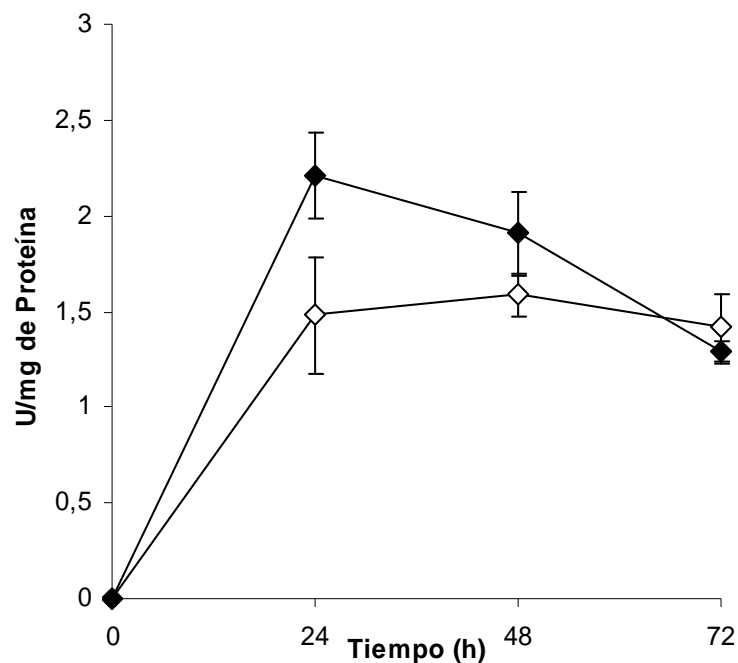


Gráfico 7. Cinética de actividad específica de LiP producida por *R. oryzae* *ENHE* en medio sintético Merlin-Norkrans (modificado). LiP control (∇) y LiP con PCF (\blacklozenge)

Se observa en el gráfico 7 que la máxima actividad de LiP se obtuvo a las 24 h en los cultivos con PCF, presentando 1.5 veces más actividad de LiP que los cultivos control. Estos resultados indican que la actividad de LiP en *R. oryzae ENHE* es inducida en presencia del PCF, como ocurre con *P. chrysosporium*, donde se demostró que la actividad de LiP se ve inducida en presencia del PCF (Cortés et al., 2001). Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 7.

Tabla 7. Valores de la actividad de LiP por *Rhizopus oryzae ENHE* con y sin PCF.

TIEMPO (h)	CONTROL (sin PCF)		Con PCF	
	U mg ⁻¹ proteína	Desv star	U mg ⁻¹ proteína	Desv star
24	1.48	0.30	2.21	0.23
48	1.59	0.11	1.91	0.22
72	1.41	0.17	1.29	0.05

4.3 RELACIÓN DE LiP EN LA DEGRADACIÓN DEL PCF.

El incremento de actividad de peroxidasas por el PCF se ha reportado en diversos trabajos (Tien y Kirk, 1988; Lin y Wang, 1990) en el basidiomiceto *P. chrysosporium* bajo condiciones de limitación de nitrógeno. En este hongo de pudrición blanca la principal peroxidasa identificada en la degradación del PCF fue MnP debido a que en el medio de cultivo fue limitado en nitrógeno. Belinky et al., (2006) mostraron que independientemente de la limitación de nitrógeno en el medio de cultivo, la adición de Mn²⁺ y la reducción de oxígeno disuelto en el medio favorecen a la actividad de MnP; los mismos investigadores mostraron que en *P. chrysosporium* la presencia de oxígeno por agitación y la disminución de Mn²⁺ en el medio inducen la actividad de LiP. Sin embargo, Rothschild et al., (2002) demostraron que para el basidiomiceto *Irpex lacteus (Polyborus tulipiferae)* la actividad de LiP se veía favorecida por la presencia de nitrógeno en el medio de cultivo, a demás de oxígeno disuelto.

En este trabajó se demostró que *R. oryzae ENHE* presentó actividad de LiP, siendo uno de los pocos trabajos que reportan que un zigomiceto produce peroxidasas, ya que la mayor parte de los reportes mencionan la producción de peroxidasas por basidiomicetos. Se tendrán que hacer estudios con el fin

de determinar si la actividad de LiP producida por *R. oryzae ENHE* también es inducida en medios con limitación en nitrógeno.

En el gráfico 8 se muestra la cinética actividad de LiP producida por *R. oryzae ENHE* en medio de cultivo Melin-Norkrans (modificado) con 12.5 mg PCF L⁻¹ adicionado a las 24 h de cultivo. Así como la cinética de remoción del PCF. Se observa el PCF fue eliminado entre 90 y 100% en las primeras 24 h. Al momento en que se adicionó el PCF se determinó la máxima actividad de LiP. Falta hacer experimentos para determinar si hay una relación entre actividad de LiP y remoción de PCF y también estudiar la relación entre actividad de tirosinasa extracelular con respecto a la remoción de PCF. Sin embargo, es posible que la rápida degradación del PCF por *R. oryzae ENHE* se deba a la acción conjunta de LiP y Tirosinasa; y probablemente la LiP sea de las principales enzimas encargada de la degradación PCF, ya que con hongos que solo producen tirosinasa, como *A. rouxii*, la degradación es menor.

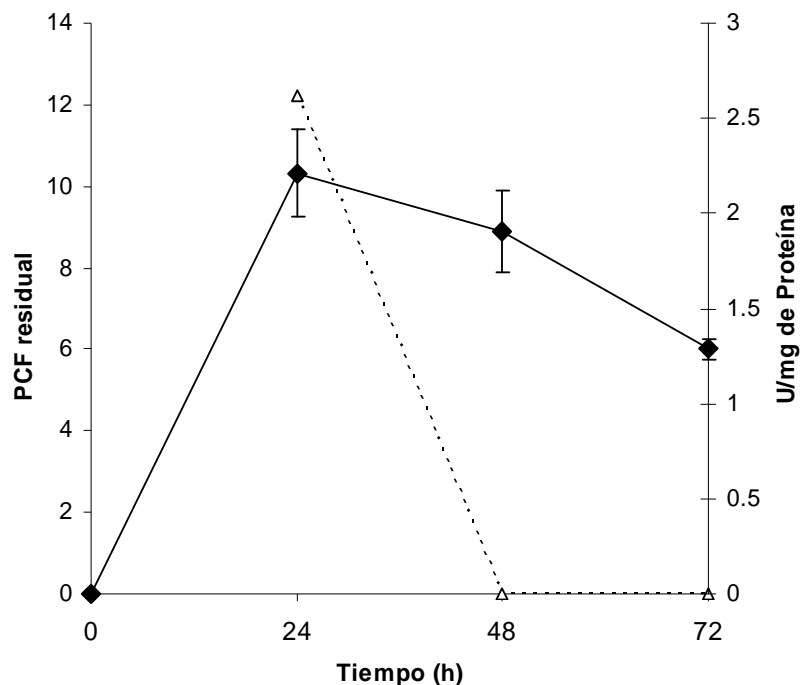


Gráfico 8. Cinética de actividad de LiP y remoción de PCF por *R. oryzae ENHE* en medio Melin-Norkrans (modificado) adicionado con 12.5 mg PCF L⁻¹. LiP con PCF (◆) y (Δ) PCF residual.

CONCLUSIONES.

- Se identifico al *zigomiceto* Ñ como *R. oryzae ENHE*.
- El PCF no tiene ningún efecto sobre la actividad de Tirosinasa intracelular y extracelular de *R. oryzae ENHE*.
- La Tyr induce el crecimiento de *R. oryzae ENHE* debido probablemente a que este actuando como factor de crecimiento.
- La Tyr incrementa significativamente la actividad de Tirosinasa extracelular e intracelular producida por *R. oryzae ENHE*
- *R. oryzae ENHE* tiene actividad enzimática de LiP, y esta actividad se incrementa por la presencia del PCF.
- *R. oryzae ENHE* es más eficiente que *Amylomyces rouxii*, que remueve el 85% del PCF inicial (12.5 mg ml^{-1}) en 96 h, mientras que *R. oryzae ENHE* lo remueve en 48 h.

BIBLIOGRAFÍA.

- Aitken, M. D., Irvine, R. L. Stability testing of ligninase and Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology and Bioengineering*. 34: 1251-1260. 1989.
- Arcand, Y., Hawari, J. and Guiot, S. R. Solubility of pentachlorophenol in aqueous solution: The pH effect. *Wat. Res.* (29) 1: 131-136. 1995.
- Belinhy Paula A., Nufar Flikshtein, Carlos G. Dosoretz., 2006. Induction of lignin peroxidase via reactive oxygen species in manganese-deficient cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme and Microbial Technology*. 39: 222-228.
- Bernal RM, Tomasini A (2005) Selección de hongos filamentosos capaces de degradar pentaclorofenol. XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Mérida, Yucatán, México
- Boshoff A, M.H. Burton, S.G. Burton., 2003. Optimization of Catechol Production by Membrane-Immobilized Polyphenol Oxidase: A modeling Approach. *Biotechnology and Bioengineering*. 83 (1) 1, 1-7.
- Bradford Marion M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.
- Carvalho C.M., Rocha A., M.L.F. Estevinho and Choupina., 2005. Identification of honey yeast species bases on RFLP analysis of the its region. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 5(001):11-17.
- Christian Viral, Shrivastava Rohit, Shukla Dharmendra, Modi Hasmukh, Bharkumar Rajiv Manuel Vyas., 2005. Mediator role of veratryl alcohol in the lignin peroxidase-catalyzed oxidative decolorization of Remazol Brilliant Blue R. *Enzyme and Microbial Technology*. 36: 327–332
- Cortés DV, Bernal R, Tomasini A. 2001. Efecto de las condiciones de cultivo sumergido en la degradación de pentaclorofenol por *Rhizopus nigricans*. *Inf. Tecnol.* **12**: 75-80.
- Crosby D.G 1981. Environmental Chemistry of pentachlorophenol. *Pere Appl. Chem* 35: 1051-1080.

- Durán Nelson, Maria A. Rosa, Alessandro D'Annibale, Liliana Gianfrendra., 2002. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports. *Enzyme and Microbial Technology*. 31:907-931.
- Fahr, K., Wetzstein, H.G., Gry, R. & Schlosser, D. 1999 Degradation of 2,4-dichlorophenol and pentachlorophenol by two brown rot fungi. *FEMS Microbiology Letters* 175, 127-132.
- Fernández Perrino, F. J. (1997). Caracterización de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de penicilina: Reacción enzimática catalizada por el producto del último gen (*pen DE*) de la ruta de biosíntesis de penicilina. *Tesis doctoral*.
- Ha H.-C., Honda Y., Watanabe T., Kuwahara M., 2001. Production of manganese peroxidase by pellet culture of the lignin-degrading basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 55: 704-711.
- Haghbeen Kamahldin and Eng Wue Tan., 2003. Direct spectrophotometric assay of monooxygenase and oxidase activities of mushroom tyrosinase in the presence of synthetic and natural substrates. *Analytical Biochemistry*. 312:23-32.
- Halaouli S, Asther Mi., Kruus K, Guo L, Hamdi M, Sigoillot J.-C, M. Asther and A. Lomascolo., 2005. Characterization of a new tyrosinase from *Pycnoporus* species with high potential for food technological applications. *Journal of Applied Microbiology*. 98:332-343.
- Igisu, H., Hamasaki, N. And Ikeda, M. 1993. Short Communications, Highly cooperative inhibition of acetylcholinesterase by pentachlorophenol in human erythrocytes. *Biochemical Pharmacology*. 46: 1, 175 – 177.
- Karamanev, G. D., Chvarie, C. End Samson, R. 1997. Soil Immobilization: New concept for Biotreatment of soil contaminants. *Biotech. Bioeng*. 57: 4, 471- 476.
- Kauffmann C, B:R: Petersen, Morten J. Bejerrum., 1999. Enzymatic removal of phenols aqueous solutions by *Comprinus cinereus* peroxidase and hydrogen peroxidase. *Journal of Biotechnology*. 73: 71-74.
- Kenneth W. Cullings and Detlev R. Vogler., 1998. A 5.8S nuclear ribosomal RNA gene sequence database: applications to ecology and evolution. *Molecular Ecology*. 7:919-923.
- Kuwahara M, Glenn JK, Morgan MA, Gold MH., 1987. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett*. 169: 247-250.
- Lee Seung-Goo, Hong Seung-Pyo, and sung Moon-Hee., 1996. Removal and bioconversion of phenol in wastewater by a thermostable β -tyrosinase. 19:374-377.

- León-Santiesteban HH 2006 “Estudio bioquímico de un hongo filamentoso capaz de degradar pentaclorofenol” Reporte de Servicio Social realizado en el Laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolismo Secundario.
- Lin Jian-Er and Wang Henry Y., 1990. Degradation Kinetics of Pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology and Bioengineering*. 35: 1125-1134.
- Lisov, A. V.; A. A. Leontievsky, and L. A. Golovleva (2007) Hybrid Mn-Peroxidases from Basidiomycetes. *Applied Biochemistry and Microbiology*, Vol. 43, No. 5, pp. 536–543.
- Maganhotto de Souza Silva C.M, Itamar Soares de Melo, Plablo Roberto de Oliveira., 2005. Ligninolytic enzyme production by *Ganoderma spp*. *Enzyme ang Microbial Technology*. 37: 324-329.
- Marcial Quino Jaime “Evaluación del efecto de la tirosina en la degradación de pentaclorofenol por *Rhizopus nigricans* en cultivo sumergido”.. Licenciatura en Biología. Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Examen de grado presentado el 25 de septiembre de 2002.
- Mazzocco Fabio and Pifferi Pier Giorgio., 1976. An Improvement of the spectrophotometric Method for the determination of Tyrosinase Catecholase Activity by Besthorn’s Hydrazone. *Analytical Biochemistry*. 72: 643-647.
- Montiel A.M, F.J Fernández, J. Marcial, J. Soriano, J.Barrios-González & A.tomasini. 2004. A fangal phenoloxidase (tyrosinase) involved in pentachlorophenol degradation. *Biotechnology Letters*. 26:1353-1357.
- Ohguchi Kenji, Tanaka Toshiyuki, Kido Tadashi, Baba Kimiye, Linuma Munekazu, Matsumoto Kenji, Akao Yukihiro, and Nozawa Yoshinori., 2003. Effects of hydroxystilbene derivates on tyrosinase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 307:861-863.
- Okeke, B. C., Smith, J.E., Paterson, A & Watson-Craik, I.A. 1996 Influence of environmental parameters on pentachlorophenol biotransformation in soil by *Lentinula edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45, 263-266.
- Papinutti V.L, Forchiassin Flavia., 2003. Optimization of manganese peroxidase and laccase production in the South American fungus *Fomes sclerodermeus* (Lév.) Cke. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 30: 536-541.
- Rabinovich M. L., A. V. Bolobova, and L. G. Vasil’chenko., 2004. Fungal Decomposition of Natural Aromatic Structures and Xenobiotics. *Applied Biochemistry and Microbiology* Vol. 40(1):1–17.

- Reddy C. Adinarayana, 1995. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Current Opinion in Biotechnology*: 6, 320-328.
- Rodríguez-Tovar A, Xoconostle-Cásarez B, Valdez M., 2004. Molecular Ecology of ectomycorrhizal fungi. *Rev. Fitotc.Mex.* Vol 27(3): 267-278.
- Rodriguez, M. O. and Flurkey, W. H. A., 1992 .Biochemistry Project to Study Mushroom Tyrosinase. *J. Chem. Ed.* 69(9) 767-769.
- Rothschild Nathan, Cenek Novotný, Václav Sasek, Carlos G. Dosoretz., 2002. Ligninolytic enzymes of the fungus *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*): isolation and characterization of lignin peroxidase. *Enzyme and Microbial Technology*. 31: 627-633.
- Takashi Nakamura, Takayuki Motoyama, Shuichi Hirono, Isamu Yamaguchi., 2004. Identification, characterization, and site-directed mutagenesis of recombinant pentachlorophenol 4-monooxygenase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1700:151-159.
- Tien M, Kirk TK., 1988. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* *In* *Methods in Enzymology*, p. 238-249.
- Tomasini A, H. R. Villareal-Arellano y J. Barrios-González., 1996. Resistencia de una cepa de *R. oryzae* *ENHE* Al crecer en medios conteniendo pentaclorofenol. *Avances en Ingeniería Química*. 6(1):36-40.
- Tomasini A, Verónica Flores, Diana Cortés and Javier Barrios-González., 2001. An isolate of *Rhizopus nigricans* capable of tolerating and removing pentachlorophenol. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 17:201-205.
- Xiao-yun Jiang, Guang-ming Zeng, Dan-lian Huang, Yang Chen, Fang Liu, Guo-he Huang., 2006. Remediation of pentachlorophenol-contaminated soil by composting with immobilized *Phanerochate chrysosporium*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 22:909-913.
- Yu Liangli., 2003. Inhibitory effects of (S)-and (R)-6Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic Acids on Tyrosinase Activity. *J. Agric. Food Chem.* 51:2344-2347.

ANEXO.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE POR EL MÉTODO DE MICRO-ENZAYO DE BRADFORD.

Se realizó la curva de calibración, utilizando diferentes concentraciones de seroalbúmina bovina.

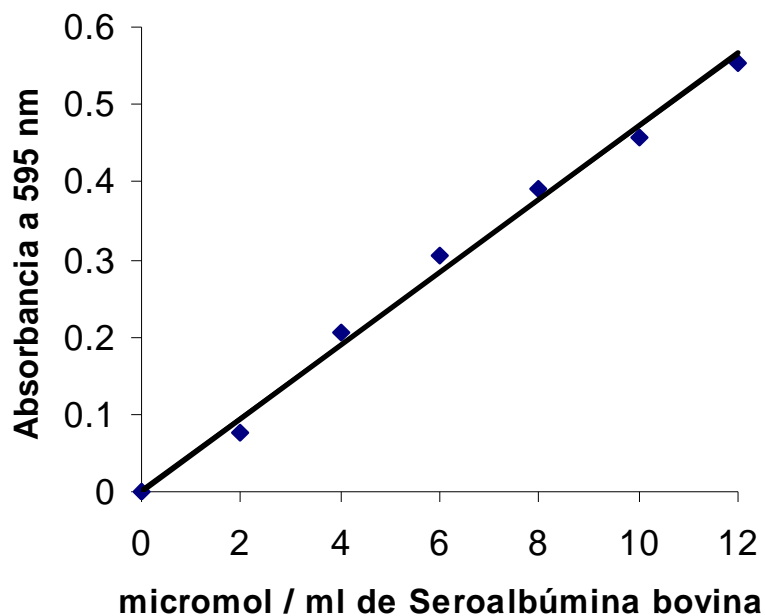


Gráfico A. Curva de calibración para el micro-ensayo de Bradford con un rango de concentraciones de 0 a 12 µg ml⁻¹ de Seroalbúmina bovina.

Del gráfico se obtuvo la siguiente ecuación de la recta:

$$y = 47.158x$$

Con una r^2 de 0.99

Donde:

y = Absorbancia

x = Concentración de proteína (mg ml⁻¹)

CURVA PATRON PARA LA DETERMINACIÓN DE TIROSINASA POR EL METODO DE HIDRASONA DE BESTHORN.

La curva patrón para la determinación de tirosinasa se realizó a diferentes concentraciones molares de I_2 (1×10^{-4} hasta $12 \times 10^{-3} M$), el sustrato fue fenol 0.5 M y el agente cromóforo utilizado fue MBTH. La curva obtenida se muestra en el gráfico B.

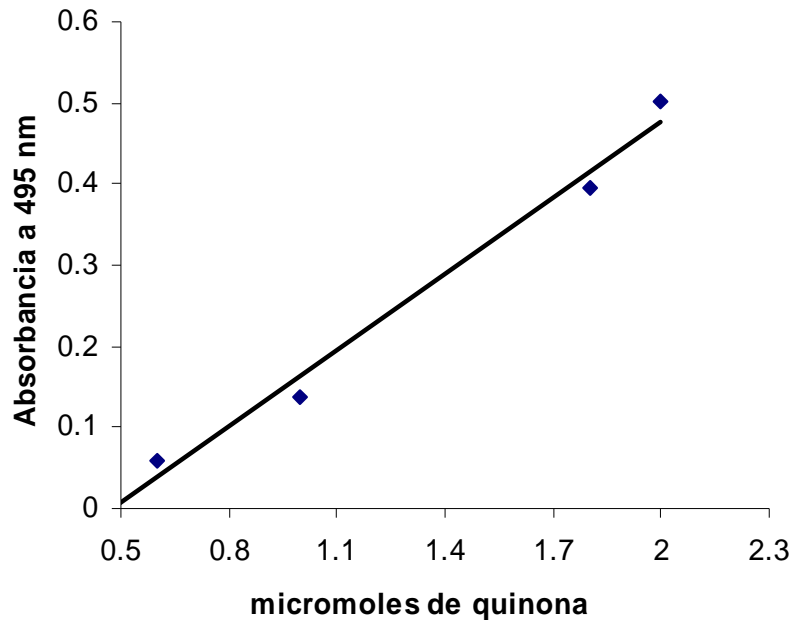


Gráfico B. Curva de calibración para el método de Hidrasona de Besthorn. Cada punto en la curva se realizó por triplicado.

De la curva estándar se obtuvo la ecuación:

$$y = 0.314x - 0.1509$$

Con una r^2 de 0.98

Donde:

y = Absorbancia a 495 nm.

x = Concentración de la enzima.

Si consideramos que la absorbancia a 495 nm para 1 μmol de enzima es 0.314 en 1 minuto, se puede saber la concentración de las muestras en un minuto realizando la siguiente ecuación:

$$x = \frac{(y)(1\mu mol)}{0.314}$$

Donde x es igual a las **unidades de actividad**. La **unidad de actividad (U)** se definió como la cantidad de enzima que produjo un μmol de quinona por minuto.