

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO



EXTRACCIÓN DE TIROSINASA EN MACROMICETOS DEL GENERO *Lactarius* DE
LA REGIÓN DE BAJA CALIFORNIA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIOINGENIERO

PRESENTA

NADIA GUADALUPE RUBIO PÉREZ

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. JUNIO DEL 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

EXTRACCIÓN DE TIROSINASA EN MACROMICETOS DEL GÉNERO *Lactarius* DE
LA REGIÓN DE BAJA CALIFORNIA

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIOINGENIERO
PRESENTA

NADIA GUADALUPE RUBIO PÉREZ

Aprobada por:



Dra. Graciela Guerra Rivas

Directora de tesis



Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez

Sinodal



M.C. Dante Alberto Magdaleno Moncayo

Sinodal

RESUMEN de la tesis de Nadia Guadalupe Rubio Pérez, la cual presenta para la obtención del grado de BIOINGENIERO. Ensenada, Baja California, México. Junio de 2014.

EXTRACCIÓN DE TIROSINASA EN MACROMICETOS DEL GÉNERO *Lactarius* DE
LA REGIÓN DE BAJA CALIFORNIA

Resumen aprobado por:



Dra. Graciela Guerra Rivas

Directora de tesis

RESUMEN

Los mecanismos enzimáticos involucran reacciones químicas basadas en una catálisis biológica. Entre las enzimas, podemos mencionar un grupo de fenoloxidasas que catalizan la transformación de un gran número de compuestos aromáticos fenólicos, conocidas genéricamente como tirosinasas. La tirosinasa es una enzima que contiene cobre encargada de catalizar pasos secuenciales de oxidación con diferentes sustratos fenólicos. Aunque las tirosinasas están ampliamente distribuidas en microorganismos, plantas y animales, la mayor parte del interés que se tiene actualmente para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas, se ha centrado en el uso de tirosinasas obtenidos de hongos, siendo éstas ampliamente estudiadas hasta hoy. Dentro de estas aplicaciones podemos mencionar su uso en la industria alimenticia, farmacéutica y ambiental. Sin embargo, se ha observado que se le ha dado relativamente poca atención a la producción y purificación de tirosinasas de hongos y a una evaluación realista de su potencial biotecnológico. El objetivo principal de este trabajo es el de obtener nuevas fuentes para la extracción de tirosinasas de hongos, verificando su actividad como biocatalizador en procesos que requieran la actividad de polifenoloxidasas. Así mismo se intenta dar a conocer el potencial biotecnológico que ofrece la región de Baja California y de la cual se pueden obtener grandes beneficios. Para este fin se aplicó un método de purificación de dicha enzima a partir de una especie de macromiceto del género *Lactarius* colectado en la región de Baja California, el cual fue identificado por medio de microscopía. Para cumplir dicho objetivo se utilizó una muestra congelada a -80°C del hongo. Se colocó en un buffer Tris-HCl (50Mm, pH 5.8) para posteriormente homogenizar. Del producto resultante se separó el sobrenadante y se sometió a una precipitación salina utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. El precipitado se disolvió en una solución buffer y se aplicó a una columna DEAE-C de intercambio iónico. En cada una de las etapas de purificación se verificó la presencia de la actividad de tirosinasa midiendo su reacción sobre ácido cafeico a 311 nm. A lo largo de la metodología diseñada para el aislamiento y purificación de la actividad de tirosinasa se obtuvo un aumento progresivo de la actividad enzimática, lo que sugiere un incremento en el grado de pureza de la enzima. En la actividad, se observó un

funcionamiento más eficaz a medida que se avanzaba la purificación, reduciéndose el tiempo de degradación del sustrato y llegando hasta una desaparición total del mismo en la última fracción obtenida. En cuanto a la concentración proteica en las fracciones, se observó que disminuyó conforme se avanzó en el aislamiento y purificación de la enzima. Con los resultados obtenidos a lo largo de esta investigación se demuestra que esta especie de hongos perteneciente al género *Lactarius* presenta actividad de tirosinasa y con lo cual, Baja California aporta una nueva fuente de obtención de biocatalizadores con actividad de polifenoloxidasas.

TABLA DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Aplicaciones de tirosinasas extraídas de hongos.....	5
II. ANTECEDENTES	8
III. OBJETIVOS	13
1. Objetivo general.....	13
2. Objetivos específicos	13
IV. HIPÓTESIS	14
V. JUSTIFICACIÓN	14
VI. METODOLOGÍA	15
1. Colecta de la materia prima	16
2. Preparación del homogenado.....	17
3. Precipitación de proteínas con sulfato de amonio.....	17
4. Diálisis y filtrado de la muestra.....	18
5. Cromatografía de intercambio iónico.....	21
6. Ensayo enzimático para tirosinasa	23
VII. RESULTADOS.....	24
1. Determinación de proteínas por método de Lowry	25
2. Colecta de fracciones en columna de Intercambio Iónico.....	26

3.	Ensayos enzimáticos realizados en cada una de las muestras obtenidas durante la purificación.....	27
4.	Curvas de actividad enzimática.....	28
5.	Manejo de datos	31
VIII.	DISCUSIÓN.....	34
IX.	CONCLUSIONES.....	40
X.	RECOMENDACIONES	41
XI.	BIBLIOGRAFÍA.....	42

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Concentración de proteínas y absorbancias obtenidas en las diferentes etapas de purificación de la enzima ($\mu\text{g/ml}$).....	25
2	Actividad enzimática obtenida en el homogenado de la muestra en Tris-HCl 50 mM pH 5.8.....	27
3	Actividad enzimática obtenida en el sobrenadante de la muestra en Tris-HCl 50 mM pH 5.8.....	27
4	Actividad enzimática obtenida después de la precipitación por sales de la muestra en Tris-HCl 50 mM pH 5.8.....	27
5	Actividad enzimática obtenida después de la diálisis de la muestra en Tris-HCl 50 mM pH 5.8.....	28
6	Actividad enzimática obtenida después de correr la muestra por la columna DEAE-C.....	28
7	Datos resumidos. Donde se presentan los principales resultados de cada una de las etapas de la purificación de la enzima tirosinasa.....	31

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica		Página
3	Variaciones en el volumen total de la muestra (ml). Donde se puede observar una variación significativa en los volúmenes finales de cada una de las etapas de la purificación.....	31
4	Cantidad total de proteínas ($\mu\text{g/ml}$) presente en cada una de las muestras en las diferentes etapas de purificación. Donde se logra observar una disminución gradual y relevante de la misma.....	32
5	$\Delta A/\text{min}$ obtenidos durante los ensayos enzimáticos de cada una de las muestras obtenidas en las diferentes etapas de la purificación. Donde se observa una buena actividad enzimática, con excepción de la muestra de la diálisis, ya que se logra ver una disminución significativa en su actividad.....	32
6	Coeficiente de correlación entre el tiempo y la absorbancia máxima obtenido durante los ensayos enzimáticos de cada una de las muestras.....	33
7	Valores de $\Delta A/\text{min}$ por nanogramos de proteína. Donde se observa el progreso en la purificación de la enzima durante cada una de las etapas de extracción, pero de igual manera se observa la pérdida de actividad o inhibición de la actividad durante la etapa de diálisis.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Actividades "cresolasa" y "catecolasa" llevadas a cabo por la enzima tirosinasa (Tomado de Haghbeen, 2003).....	3
2	Metodología empleada para la extracción de tirosina fúngica durante esta investigación (Basado en Haghbeen <i>et al.</i> , 2003).....	15
3	Escena típica en El Salto de Santa Rosa, donde se puede observar la extensa vegetación. En este lugar se colectaron los hongos utilizados en este trabajo para la extracción de la enzima tirosinasa.....	16
4	Muestra del hongo congelado antes de realizar el homogenado.....	17
5	Precipitación de proteínas por medio de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, en donde se aprecia la conglomeración de proteínas ocasionado por el fenómeno de salting-in y salting-out.....	18
6	Muestra obtenida de la precipitación salina colocada en membrana para diálisis con un MWCO de 12 000 – 14 000 Daltons.....	19

7	Reacción de doble reemplazo producida entre el nitrato de plata (AgNO_3) y el cloruro de sodio (NaCl) presente en la muestra. Generando como producto cloruro de plata (AgCl).....	20
8	Disminución gradual de pigmentos presentes en la muestra. Se observa que la filtración al vacío elimina moléculas que puedan interferir en los pasos siguientes de la purificación enzimática.....	21
9	Muestra cargada en la columna de intercambio iónico DEAE-C (DE-52).....	21
10	Colecta de fracciones de la columna de intercambio iónico....	22
11	Curva de calibración para determinar la concentración proteica por medio de Lowry. Se incluye ecuación de regresión lineal y coeficiente de correlación.....	24
12	Espectro de elución de las fracciones recolectadas en la columna de intercambio iónico.....	26
13	Curva de actividad obtenida del homogenado de la muestra.....	29

14	Curva de actividad obtenida del sobrenadante del homogenado de la muestra.....	29
15	Curva de actividad obtenida después de la precipitación por sales de la muestra.....	30
16	Curva de actividad obtenida después de la diálisis de la muestra.....	30
17	Curva de actividad obtenida tras la columna de intercambio iónico DEAE-C.....	30

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente existe un gran interés en el desarrollo de tecnologías que ayuden a reducir el impacto ambiental ocasionado por la industria, la agricultura, la población y la actividad comercial. Un ejemplo de estas aplicaciones son los procesos alternativos llevados a cabo en el tratamiento de aguas residuales, en los cuales, muchos mecanismos de transformación pueden estar involucrados. La mayoría de estos mecanismos se pueden clasificar, según su naturaleza, en químicos o biológicos.

Los mecanismos enzimáticos involucran reacciones químicas basadas en una catálisis biológica. Como ya es sabido, las enzimas son los catalizadores biológicos encargados de regular las reacciones químicas llevadas a cabo en la célula, ya sea que ésta se encuentre en plantas, animales, hongos o microorganismos. El uso de enzimas aisladas en procesos de transformación presenta ciertas ventajas, como los son: poseen una especificidad más alta, su actividad puede ser estandarizada, son más fáciles de manejar y de almacenar y la concentración de enzima no depende del crecimiento celular. Todo esto hace que el uso de enzimas aisladas sea preferible al uso de organismos que contengan dicha enzima (Nicell, 2001).

Actualmente se está llevando a cabo una amplia variedad de proyectos de investigación dedicados a evaluar las posibilidades que ofrecen las enzimas al ser utilizadas en aplicaciones biotecnológicas y ambientales. Es importante

mencionar que el uso eficaz de enzimas para estos propósitos, puede verse obstaculizado por las propiedades que presentan estas moléculas proteicas, tales como su falta de capacidad para reutilizarse, su alta sensibilidad a agentes desnaturalizantes y susceptibilidad a la presencia de efectos tóxicos. Muchas de estas limitaciones pueden ser eliminadas mediante la inmovilización de las enzimas a cierto tipo de matrices. Esto ha demostrado ser más ventajoso para la catálisis que la utilización de enzimas libres (Durán, 2002). Además, se ha logrado observar que el uso de enzimas y células inmovilizadas va en aumento gracias a los avances en las técnicas de inmovilización.

Las fenoloxidasas son un grupo de enzimas que catalizan la transformación de un gran número de compuestos aromáticos fenólicos, y son conocidas genéricamente como tirosinasas.

La tirosinasa es una enzima que contiene cobre encargada de catalizar pasos secuenciales de oxidación con diferentes sustratos fenólicos. En la primera reacción, a menudo referido como el de “monooxigenasa” o “actividad cresolasa”, un grupo hidroxilo se introduce en la posición orto del anillo aromático, mientras que en la segunda reacción, a menudo referido como el de “difenolasa” o “actividad catecolasa”, el compuesto o-dihidroxi, producido en la primera reacción, se oxida a una o-quinona (Haghbeen, 2003). La o-quinona, a su vez, toma parte en una serie de productos químicos y otras reacciones enzimáticas para finalmente, polimerizar en una macromolécula. Estas

actividades se pueden utilizar como la base para varias aplicaciones biotecnológicas (Figura 1).

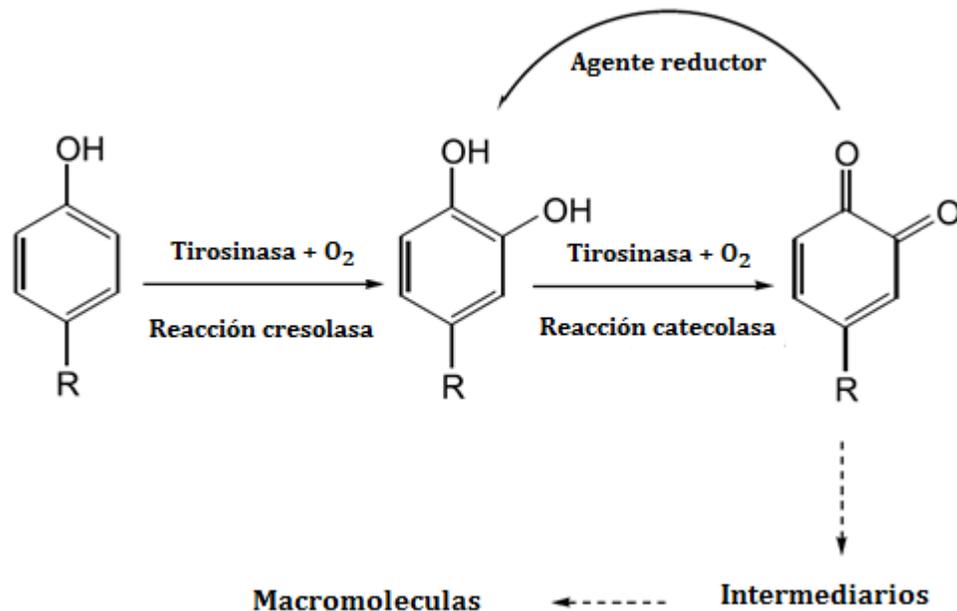


Figura 1. Actividades "cresolasa" y "catecolasa" llevadas a cabo por la enzima tirosinasa (Tomado de Haghbeen, 2003)

La primera estructura cristalina de tirosinasa fue obtenida de *Streptomyces castaneoglobisporus* y fue publicada en 2006. Para 2011 se dieron a conocer las estructuras tridimensionales de esta enzima extraídas tanto de la bacteria *Bacillus megaterium* como del hongo *Agaricus bisporus*. Recientes investigaciones revelaron una similitud entre las secuencias obtenidas de las tirosinasas bacterianas y fúngicas, las cuales no se encuentran presentes en la enzima obtenida de plantas.

Aunque las tirosinasas están ampliamente distribuidas en microorganismos, plantas y animales, la mayor parte del interés que se tiene actualmente para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas, se ha centrado en el uso de tirosinasas obtenidos de hongos. Es por esto que diferentes aspectos de tirosinasa de hongos han sido ampliamente revisados hasta hoy, tales como sus características bioquímicas, su papel en el metabolismo del organismo productor y algunas de sus potenciales aplicaciones biotecnológicas (Seo, 2003). Sin embargo, se ha observado que se le ha dado poca atención a la producción y purificación de tirosinasas de hongos y una evaluación realista de su potencial biotecnológico.

En hongos, la acción de la tirosinasa está asociada con la producción de melanina, la cual actúa como un mecanismo de defensa frente a momentos de estrés, tal como radiación UV, radicales libres, rayos gama, deshidratación y temperaturas extremas, además de que interviene como soporte en la pared celular en presencia de enzimas hidrolíticas (Duarte, 2012).

Las especies del género *Lactarius* presentan un nivel de aclimatación muy elevado, por lo que estas especies se encuentran localizadas en diversas zonas a nivel mundial. Muestran características muy particulares como lo son la segregación de latex, carne o tejido quebradizo y poseen setas de sombreros convexos que se deforman con el paso del tiempo. Actualmente se conocen los beneficios que los hongos otorgan a los árboles, además de las propiedades culinarias que ofrecen algunas especies de este género. Sin

embargo no se ha logrado encontrar información sobre estudios enfocados en su potencial biotecnológico, lo que nos dice que estos macromicetos han sido muy poco o nada estudiados para ser utilizados dentro de este campo.

1. Aplicaciones de tirosinasas extraídas de hongos

Los estudios iniciales sobre tirosinasas estaban motivados por el deseo de entender y prevenir el pardeamiento enzimático que se produce en presencia del aire sobre las setas, frutas o verduras que se cortan o magullan. Este fenómeno está íntimamente ligado a la acción de la tirosinasa y causa graves pérdidas económicas en la industria alimenticia. Recientemente, la atención se ha trasladado hacia las aplicaciones biotecnológicas y ambientales de tirosinasas, y las tirosinasas fúngicas han sido comúnmente elegidos para estos estudios.

Las aplicaciones más importantes y recientemente investigadas son: la biosíntesis de plásticos, antioxidantes, tintes, productos agroquímicos y farmacéuticos. Por ejemplo, en la industria farmacéutica se encuentra la producción de L-DOPA, el primer producto obtenido de la reacción de tirosinasa con tirosina. Este compuesto presenta un alto valor económico, ya que es el principal medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Faccio *et al.*, 2012). También destaca el uso de tirosinasa en el

ámbito ambiental con la detección y cuantificación de compuestos fenólicos mediante el uso de biosensores y la eliminación de compuestos fenólicos en aguas residuales. Mientras que dentro de la industria alimenticia se puede mencionar la producción de redes de proteínas reticuladas capaz de modificar la estructura de los alimentos. A diferencia de los agentes de reticulación tradicionales, las tirosinasas se caracterizan por tener una alta especificidad en la reacción que catalizan y, además, utilizan componentes propios de los alimentos, como las proteínas para llevar a cabo su función por lo que no requieren la adición de cualquier sustancia o aditivo alimenticio. Y recientemente se ha sugerido una aplicación de la tirosinasa dentro de la alimentación animal. El objetivo es la mejora del valor nutricional de los alimentos, y se ha visto que las tirosinasas fúngicas han sido capaces de aumentar la biodisponibilidad de hierro a partir de preparaciones a base de habas de fitasa tratada (Otávio, 2007 y Faccio, 2012).

La mayoría de las aplicaciones sugeridas actualmente para tirosinasas han sido probadas utilizando la enzima comercial obtenida de hongos.

Las tirosinasas han sido utilizadas tanto en forma libres como inmovilizadas y reticuladas. Con la inmovilización se logra un incremento en su estabilidad y se facilita su reúso. Las investigaciones realizadas recientemente se han enfocado en la inmovilización de tirosinasas utilizando soportes sólidos tal como sílice y perlas magnéticas así como adición en capas autoadhesivas de agarosa de origen vegetal y goma guar. También se han realizado estudios

utilizando revestidos de arcilla con hidróxido de aluminio y en éste se logró observar que la actividad específica de tirosinasa incrementó pero la estabilidad en la temperatura se vio afectada. Para la producción de L-DOPA, la tirosinasa de hongos fue inmovilizada utilizando glutaraldehído en nylon modificado químicamente, en aluminosilicato de sodio y en aluminosilicato de calcio, y dos formas modificadas de zeolita (Faccio, 2012).

II. ANTECEDENTES

Hasta la fecha, se han realizado diversos trabajos de investigación dedicados a hacer notar el posible uso de las tirosinasas en una gran variedad de aplicaciones. Durán *et al.* (2002) reportan diferentes esfuerzos de investigación destinados a la inmovilización de lacasas y tirosinasas para diversas aplicaciones. Entre ellas se incluyen fines sintéticos y analíticos, biorremediación de suelos contaminados, tratamiento de aguas residuales y la estabilización de bebidas y vinos. En particular, se ha enfatizado que el tratamiento de aguas residuales y la estabilización de bebidas y vinos parecen ser usos muy prometedores de estas enzimas. Estos autores también hacen mención del uso de biosensores basados en tirosinasas, y resaltan que el desarrollo de estos biosensores utilizados para controlar una amplia gama de compuestos, parece estar en una etapa de madurez de la tecnología. De hecho, varios sistemas de biosensores basados en oxidasas con cobre permiten una alta selectividad y sensibilidad con reducidos tiempos de ensayo y muestran una buena estabilidad con el tiempo (Durán *et al.* (2002)).

Como se mencionó anteriormente, las tirosinasas se encuentran distribuidas en plantas, animales, microorganismos y hongos, por lo que se han llevado a cabo diferentes métodos de extracción de esta enzima utilizando esta variedad de fuentes. Yamauchi K. *et al.* (2011) estudiaron la actividad inhibidora de la tirosinasa de los extractos del hongo *A. cathartica*, examinaron

su bioactividad y lograron identificar nuevos y potentes compuestos activos. En otro estudio, llevado a cabo por Dolashki A. *et al.* (2009) se utilizó la bacteria *Streptomyces albus* como fuente de extracción. Sin embargo, hasta la fecha, se considera que las tirosinasas extraídas de hongos continúan siendo la mejor opción.

Halaouli S. *et al.* (2006) mencionan que las tirosinasas extraídas de hongos caen en un campo de investigación aplicable y prometedor, debido a su enorme importancia en la industria alimenticia, farmacéutica y medioambiental.

Wada *et al.* (1993) desarrollaron un método enzimático para remover fenoles de aguas residuales industriales utilizando tirosinasas de hongos libres e inmovilizadas, logrando demostrar que los fenoles presentes en la solución acuosa son removidos después del tratamiento. En el caso de las tirosinasas libres las muestras presentaron un cambio de color, de claro a café oscuro, los cuales fueron removidos con ayuda de quitina y quitosano, observándose que la velocidad de reducción de fenoles era acelerada con la presencia de quitosano. En el caso de las tirosinasas inmovilizadas, observaron que el 100% de los fenoles fueron removidos después de 2 horas y la actividad disminuía un poco más después de 10 repeticiones.

Hasta la última década, los estudios sobre tirosinasas de hongos, sobre todo de la seta comestible *Agaricus bisporus*, fueron motivados esencialmente por el fenómeno de pardeamiento enzimático durante el desarrollo y

almacenamiento de las cosechas. Hoy en día, un creciente interés está dedicado al potencial de tirosinasas fúngicas en aplicaciones biotecnológicas y ambientales. En primera instancia, se observó la capacidad de las tirosinasas para convertir monofenoles en difenoles, lo que motivó a la realización de estudios sobre la producción de o-difenoles como antioxidantes, y con propiedades beneficiosas como aditivos alimenticios o medicamentos farmacéuticos. Recientemente, las tirosinasas purificadas de *Agaricus bisporus* y *Pycnoporus sanguineus* han demostrado eficacia en la biosíntesis de hidroxitirosol a partir de p-tirosol (2 - (4-hidroxifenil) etanol), un monofenol encontrado en subproductos agroindustriales. Este tipo de bioconversión enzimática puede constituir una alternativa a la síntesis química cuando los compuestos naturales son necesarios, y también se ha investigado para la biosíntesis de medicamentos útiles, tales como la L-DOPA implicados en el tratamiento de las enfermedades de Parkinson y de miocardio. La producción de L-DOPA se ha logrado, utilizando L-tirosina como sustrato y tirosinasas como biocatalizadores (Halaouli, 2006; Duarte, 2012).

Otro uso que se le añade a las tirosinasas extraídas de *A. bisporus* es el injerto enzimático de restos fenólicos o proteínas en quitosano, un biopolímero, que se obtiene principalmente a partir de desechos de alimentos. La tirosinasa de *A. bisporus* cataliza la oxidación de fenoles a o-quinonas electrofílicas que son capaces de unirse libremente y de forma covalente con los grupos amino nucleófilos de quitosano. Estos compuestos de quitosano modificado,

proporcionan una manera segura para agrandar polímeros ambientalmente amigables con propiedades viscoelásticas, tales como hidrogeles para sustitutos de la piel, adhesivos, y matrices para la administración de fármacos y para la ingeniería de tejidos. También, la tirosinasa de *A. bisporus* demostró inducir una rápida gelificación de polietilenglicol conjugado con L-DOPA para formar hidrogeles (Halaouli, 2006; Lantto, 2007).

Existen numerosos métodos para la extracción y purificación de tirosinasas de diferentes fuentes, pero en lo que concierne a los métodos para la extracción y purificación de tirosinasas de hongos sólo hay unos pocos en la literatura (Haghbeen, 2004). Haghbeen K. *et al.* (2004) desarrollaron un método simple para la purificación de la tirosinasa de hongos comestibles (*Agaricus bispora*). En este trabajo, la forma liofilizada de la tirosinasa purificada tenía un grado de purificación de 104, mostrando una fuerte actividad de cresolasa y catecolasa comparada con la tirosinasa comercial (Sigma™). Durante el desarrollo del método, se mencionan diversas problemáticas que tuvieron que ser resueltas, entre ellas la formación de melaninas. La separación de las melaninas no deseadas del contenido de proteína del extracto es la primera, o probablemente la tarea más importante durante la purificación de las tirosinasas fúngicas. Sin embargo, estos autores demostraron que es posible librarse, tanto de contaminantes fenólicos como de melaninas, mediante cromatografía de intercambio iónico.

Para el estudio de la actividad de tirosinasa se han llevado a cabo numerosos estudios, entre éstos se encuentran los métodos manométricos, radiométricos, electroquímicos, oximétricos y técnicas espectrofotométricas igualmente empleadas para este fin (Haghbeen, 2003). Sin embargo, las técnicas espectrofotométricas, utilizadas para la detección de la actividad de tirosinasa, han atraído más la atención, principalmente, porque es sensible y económica, además de que permite estudiar el transcurso de la reacción de manera continua (Mayer, 1966). En cuanto a los sustratos utilizados para la realización de los ensayos enzimáticos para tirosinasa se enlistan como los más comunes: L-tirosina, ácido cafeico, L-DOPA y ácido p-cumárico.

III. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Obtención de tirosinasa a partir de una especie de macromiceto del género *Lactarius* colectado en **Baja California**.

2. Objetivos específicos

Estandarizar el método analítico para el monitoreo de actividad de polifenoloxidasas.

Obtener extractos y fracciones bioquímicas a partir de un hongo colectado en la región.

Evaluar la actividad enzimática de polifenoloxidasas en las fracciones bioquímicas obtenidas.

Obtener tirosinasa a partir de la fracción con mayor actividad de polifenoloxidasas.

Caracterizar a la especie de hongo utilizada como materia prima.

IV. HIPÓTESIS

Existe actividad de tirosinasa en especies de hongos recolectados en la región de Baja California.

V. JUSTIFICACIÓN

Hoy en día, la biotecnología es un tema que está causando revuelo a nivel mundial, ya que presenta campos de investigación que proponen el desarrollo de diversas aplicaciones con un futuro interesante y prometedor. Dentro de estas posibles aplicaciones, podemos mencionar el uso de biocatalizadores como las tirosinasas, las cuales son de sumo interés debido a su enorme importancia en la industria alimenticia, farmacéutica y ambiental. Sin embargo, se ha observado que se le ha dado relativamente poca atención a la producción y purificación de tirosinasas de hongos y a una evaluación realista de su potencial biotecnológico.

En este trabajo se pretende encontrar nuevas fuentes para la extracción de tirosinasas de hongos, verificando su actividad como biocatalizador en procesos que requieran la actividad de polifenoloxidasas. Así mismo se intenta dar a conocer el potencial biotecnológico que ofrece la región de Baja California y del cual se pueden obtener grandes beneficios.

VI. METODOLOGÍA

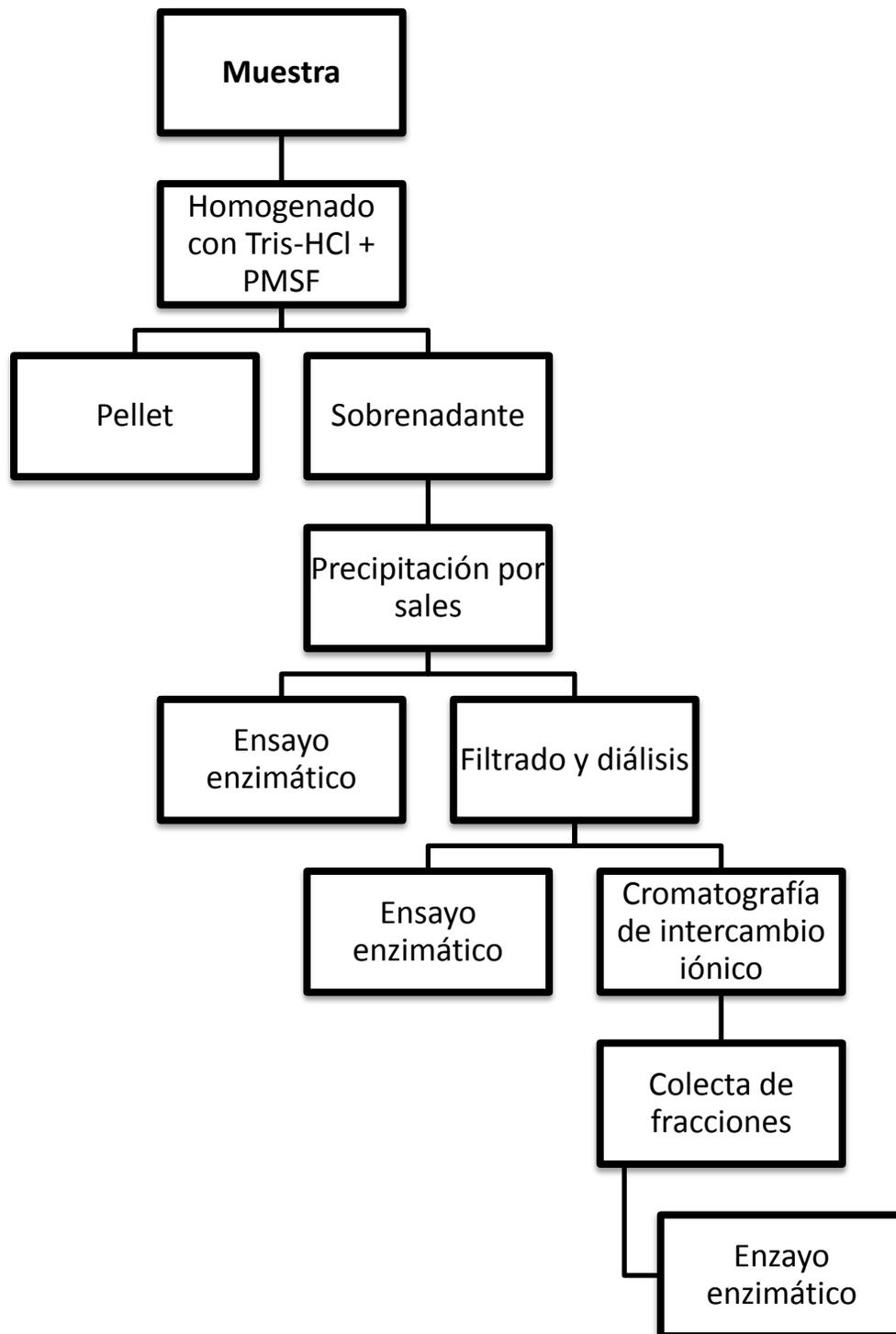


Figura 2. Metodología empleada para la extracción de tirosina fúngica durante esta investigación (Basado en Haghbeen *et al.*, 2003)

1. Colecta de la materia prima

Los hongos fueron colectados en el parque de El Salto de Santa Rosa ubicado en el municipio de Ensenada del Estado de Baja California, México y se encuentra en las coordenadas GPS: longitud (dec): *-116.775278*, latitud (dec): *32.036111*. La localidad se encuentra a una mediana altura de 220 metros sobre el nivel del mar (<http://www.nuestro-mexico.com/>). El lugar presenta humedad y desechos orgánicos en el suelo, lo que favorece el crecimiento de los mismos (Figura 3). Una vez colectados fueron enjuagados con agua destilada y almacenados a -80°C hasta su uso.



Figura 3. Escena típica en El Salto de Santa Rosa, donde se puede observar la extensa vegetación. En este lugar se colectaron los hongos utilizados en este trabajo para la extracción de la enzima tirosinasa

2. Preparación del homogenado

Se tomaron 20 g del hongo congelado y se homogenizaron en 30 ml de buffer Tris-HCl (50 mM, pH 5.8) conteniendo 1 mM de PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo, PMSF del inglés phenylmethylsulfonyl fluoride) con ayuda de un homogeneizador automático (Polytron PT 2100). La suspensión se centrifugó a 13,500xg durante 30 min a 4°C. Se separó el sobrenadante y se sometió a precipitación con sulfato de amonio.



Figura 4. Muestra del hongo congelado antes de realizar el homogenado

3. Precipitación de proteínas con sulfato de amonio

Se añadió sulfato de amonio en polvo al sobrenadante obtenido de la etapa anterior para hacer una solución saturada al 35%. La solución resultante

se agitó en un cubo de hielo durante 30 min. A continuación, se centrifugó durante 30 min a 1,500xg a 4°C. Se añadió sulfato amónico al sobrenadante obtenido para hacer una solución saturada al 70%. La solución se dejó en agitación en hielo durante 2 h. Posteriormente se centrifugó durante 30 min a 1,500xg a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se disolvió el precipitado resultante en Tris-HCl (50 mM, pH 5.8).



Figura 5. Precipitación de proteínas por medio de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, en donde se aprecia la conglomeración de proteínas ocasionado por el fenómeno de salting-in y salting-out

4. Diálisis y filtrado de la muestra

Con el propósito de desalar la solución de proteína obtenida de la etapa anterior, se llevó a cabo diálisis contra Tris-HCl (50 mM, pH 6.8) a 4°C durante toda la noche. Para esto se utilizó una membrana con un MWCO de 12 000 – 14 000 Daltons de Spectrum, VWR Scientific.

La muestra se mantuvo en agitación constante a 4°C hasta que se eliminaron los restos de sales provenientes de la precipitación con sulfato de amonio. Se utilizó una solución de nitrato de plata (AgNO_3), la cual, en presencia de cloruro de sodio (NaCl), lleva a cabo una reacción de doble reemplazo, generando con esto nitrato de cloro (ClNO_3) y cloruro de plata (AgCl). El cloruro de plata no es soluble en agua lo que lleva a su precipitación y provocando que la muestra de agua destilada se vuelva turbia (Figura 7).

Una vez que se eliminaron los restos de sales, la muestra fue filtrada con la finalidad de retirar el exceso de pigmentos y con esto facilitar el paso posterior de la purificación. La muestra proteica fue filtrada con ayuda de una bomba de vacío manteniendo una temperatura de 4°C y tomando en consideración todos los aspectos para evitar la degradación de la molécula enzimática.



Figura 6. Muestra obtenida de la precipitación salina colocada en membrana para diálisis con un MWCO de 12 000 – 14 000 Daltons

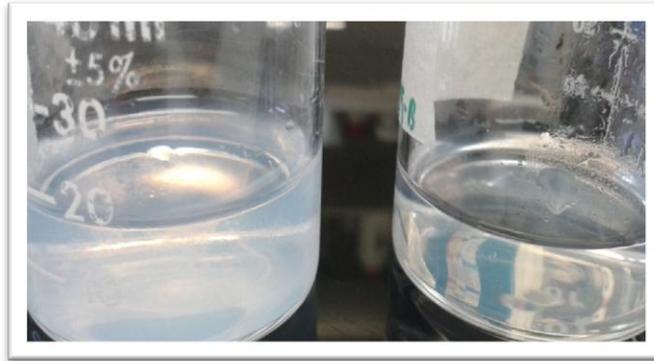


Figura 7. Reacción de doble reemplazo producida entre el nitrato de plata (AgNO_3) y el cloruro de sodio (NaCl) presente en la muestra. Generando como producto cloruro de plata (AgCl)



Figura 8. Disminución gradual de pigmentos presentes en la muestra. Se observa que la filtración al vacío elimina moléculas que puedan interferir en los pasos siguientes de la purificación enzimática

5. Cromatografía de intercambio iónico

La solución de proteína dializada y filtrada de la etapa anterior se cargó en una columna de intercambio iónico DEAE-C (DE-52) utilizando buffer Tris-HCl (50 mM, pH 6.8) (Figura 9). Después, las proteínas fueron eluidas de la columna usando una solución de NaCl y recolectadas en un total de 15 fracciones con un volumen de 1.5 mL cada una, todo esto con ayuda de un colector de fracciones automático (Figura 10). La concentración proteica se cuantificó por medio del método de Lowry mientras que la calidad de la tirosinasa purificada se evaluó mediante los ensayos de actividad enzimática.



Figura 9. Muestra cargada en la columna de intercambio iónico DEAE-C (DE-52)

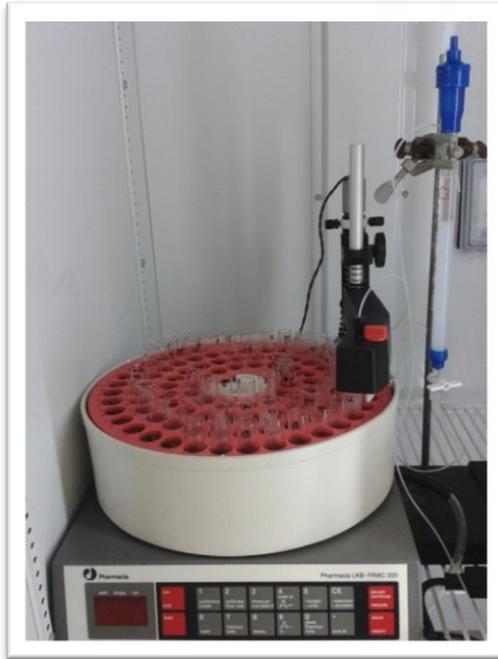


Figura 10. Colecta de fracciones de la columna de intercambio iónico

6. Ensayo enzimático para tirosinasa

La reacción enzimática se llevó a cabo en buffer de fosfatos PBS (10 mM) a pH 6.8 y temperatura constante de $20 \pm 0.1^\circ\text{C}$. El volumen final de todas las mezclas de reacción fue de 1.2 ml. La tirosinasa recién preparada se utilizó para la actividad de catecolasa utilizando ácido cafeico como sustrato. La velocidad de la reacción enzimática de la tirosinasa extraída del hongo se determinó por medio de espectrofotometría, como se ha descrito previamente (Haghbeen y Tan, 2003).

Este ensayo fue realizado según lo descrito por Duckworth y Coleman, (1970).

VII. RESULTADOS

Para llevar a cabo la purificación de la enzima se inició la metodología con 20 gramos del hongo en 30 mL de buffer Tris-HCl 50mM a pH 5.8. Previamente se realizó una curva de calibración por el método de Lowry para con esto lograr cuantificar la concentración de proteínas encontradas en las diferentes etapas del proceso.

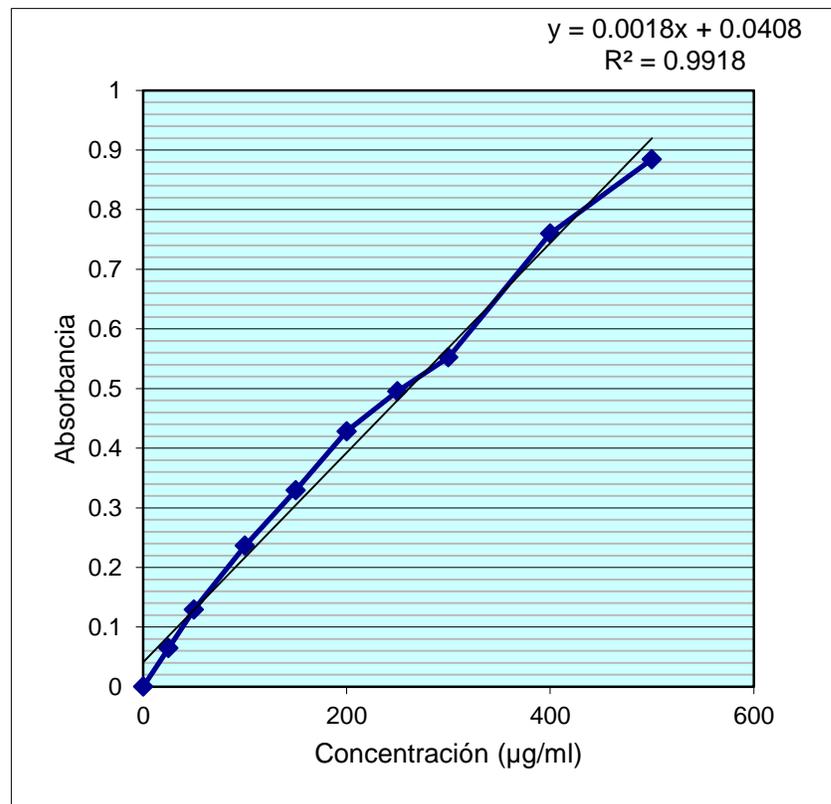


Figura 11. Curva de calibración para determinar la concentración proteica por medio de Lowry. Se incluye ecuación de regresión lineal y coeficiente de correlación

1. Determinación de proteínas por método de Lowry

Tabla 1. Concentración de proteínas y absorbancias obtenidas en las diferentes etapas de purificación de la enzima ($\mu\text{g/ml}$)

Muestra	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs prom	[C]	[C] Total
Homogenado	0.127	0.140	0.168	0.145	57.889	115.778
Sobrenadante	0.104	0.101	0.094	0.099	32.704	65.407
Residuo después de precipitación salina	0.056	0.053	0.055	0.055	7.704	15.407
Residuo después de columna DEAE-C	0.048	0.052	0.047	0.049	4.556	9.111

Para interpolar los datos en la curva de calibración se tomaron 0.05 mL de cada una de las muestras y se utilizó un factor de dilución igual a 2, con esto se logró calcular la concentración [C] total.

En la tabla 1 se puede observar cómo se fue reduciendo la concentración de proteínas conforme se avanzó en la purificación de la muestra.

Al final se obtuvieron 9.11 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas, lo que representa el 7.9 % de la cantidad inicial de proteínas.

2. Colecta de fracciones en columna de Intercambio Iónico

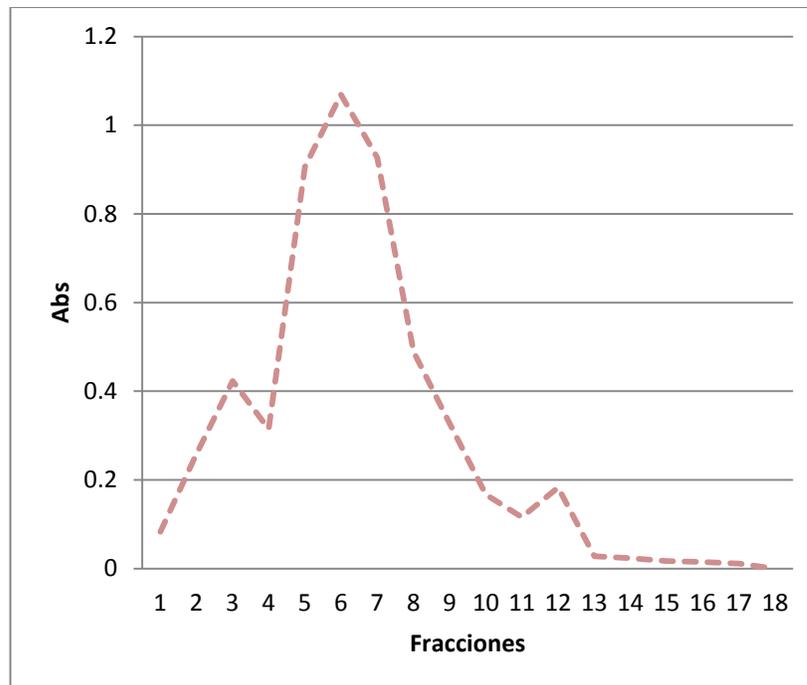


Figura 12. Espectro de elución de las fracciones recolectadas en la columna de intercambio iónico

Se colectaron un total de 20 fracciones con un volumen de 1.5 mL cada una y se leyeron a 280 nm para determinar aquellas que contenían material proteico y posteriormente determinar la actividad enzimática en aquellas con las absorbancias más elevadas.

Las fracciones 6, 7 y 8 son las que presentaron actividad en los ensayos enzimáticos (Ver tabla 3, en ensayos enzimáticos).

3. Ensayos enzimáticos realizados en cada una de las muestras obtenidas durante la purificación

A continuación se muestran los resultados obtenidos durante los ensayos enzimáticos llevados a cabo en las diferentes etapas de la purificación enzimática.

Tabla 2. Actividad enzimática obtenida en el homogenado de la muestra en Tris-HCl 50 mM pH 5.8

Muestra: Homogenado			Sustrato: ácido cafeico 100 μ M			
Repetición	Abs inicial	Abs final	Δ A/min	CRF	Abs max	Tiempo
1	1.184	0.806	0.182	0.798	1.677	4:00 min
2	0.984	0.689	0.173	0.715	1.523	4:00 min
3	1.056	0.752	0.159	0.741	1.603	4:00 min

Tabla 3. Actividad enzimática obtenida en el sobrenadante de la muestra en Tris-HCl 50 mM pH 5.8

Muestra: Sobrenadante			Sustrato: ácido cafeico 100 μ M			
Repetición	Abs inicial	Abs final	Δ A/min	CRF	Abs max	Tiempo
1	1.053	0.776	0.382	0.894	1.071	1:00 min
2	1.102	0.698	0.415	0.898	1.098	1:00 min

Tabla 4. Actividad enzimática obtenida después de la precipitación por sales de la muestra en Tris-HCl 50 mM pH 5.8

Muestra: Precipitación por sales			Sustrato: ácido cafeico 100 μ M			
Repetición	Abs inicial	Abs final	Δ A/min	CRF	Abs max	Tiempo
1	1.015	0.66	0.391	0.817	1.028	1:00 min
2	0.997	0.596	0.378	0.836	0.984	1:00 min

Tabla 5. Actividad enzimática obtenida después de la diálisis de la muestra en Tris-HCl 50 mM pH 5.8

Muestra: Diálisis			Sustrato: ácido cafeico 100 μ M			
Repetición	Abs inicial	Abs final	$\Delta A/\text{min}$	CRF	Abs max	Tiempo
1	0.886	0.745	0.1	0.65	0.898	1:00 min
2	0.832	0.649	0.1	0.58	0.845	1:00 min

Tabla 6. Actividad enzimática obtenida después de correr la muestra por la columna DEAE-C

Muestra: Columna DEAE-C			Sustrato: ácido cafeico 50 μ M			
Repetición	Abs inicial	Abs final	$\Delta A/\text{min}$	CRF	Abs max	Tiempo
1	0.213	0	0.363	0.816	0.213	0:30 min
2	0.235	0	0.385	0.781	0.235	0:30 min

Para los ensayos se utilizaron: 200 μ L de sustrato, 800 μ L de buffer de fosfatos 0.01 M pH 6.8 y 200 μ L de la enzima. Esto se leyó a 311 nm durante 4, 1 ó 0.5 min dependiendo del grado de purificación.

4. Curvas de actividad enzimática

A continuación se muestran las curvas de actividad obtenidas durante el ensayo enzimático utilizando diferentes muestras de acuerdo al grado de purificación. El sustrato utilizado para la preparación del cocktail enzimático fue el ácido cafeico.

Se logra observar cómo es que la velocidad de la actividad enzimática incrementa de acuerdo al grado de purificación de la muestra.

Al inicio de los ensayos enzimáticos (Figura 14) se observa como la actividad de la enzima se encuentra detenida durante los primeros 20 segundos y muestra bastantes irregularidades hasta que su función se vuelve nula. Sin embargo, conforme se avanza en la purificación se logra un funcionamiento mucho más eficaz, reduciéndose el tiempo de degradación del sustrato y llegando hasta una reducción total del mismo.

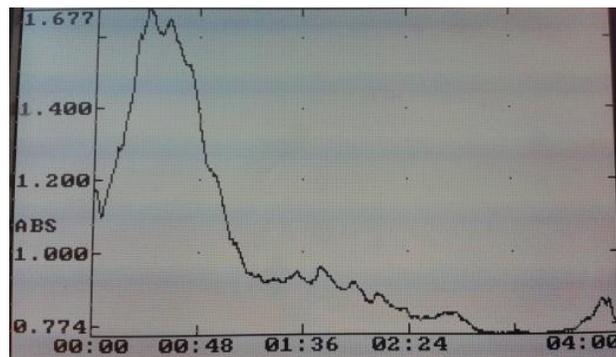


Figura 13. Curva de actividad obtenida del homogenado de la muestra

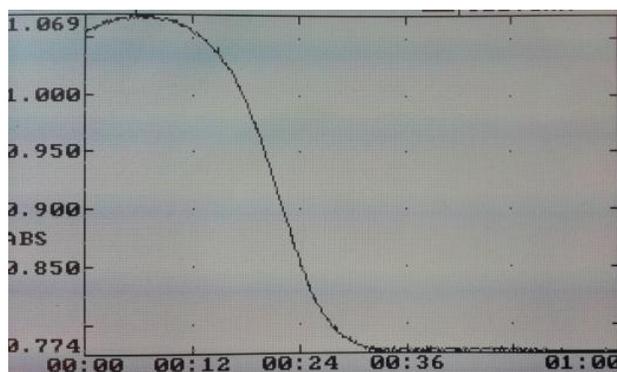


Figura 14. Curva de actividad obtenida del sobrenadante del homogenado de la muestra

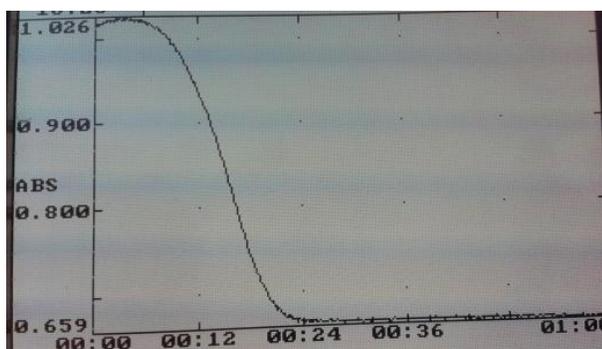


Figura 15. Curva de actividad obtenida después de la precipitación por sales de la muestra

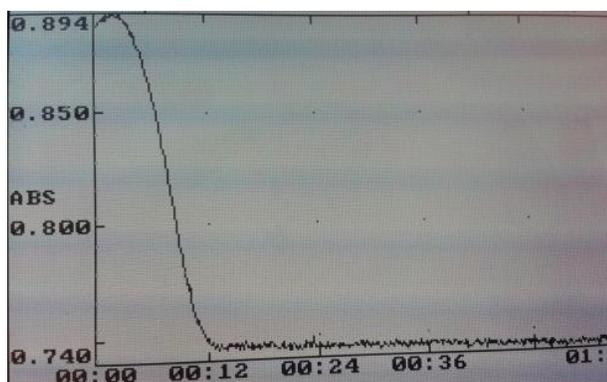


Figura 16. Curva de actividad obtenida después de la diálisis de la muestra

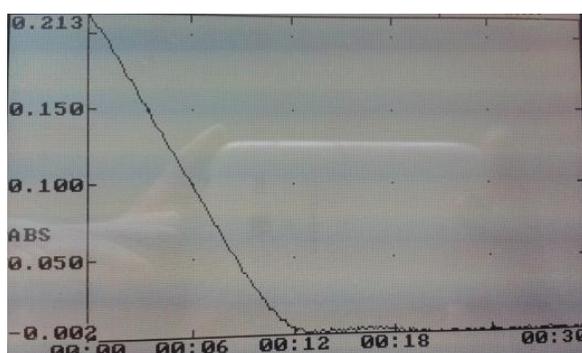


Figura 17. Curva de actividad obtenida tras la columna de intercambio iónico DEAE-C

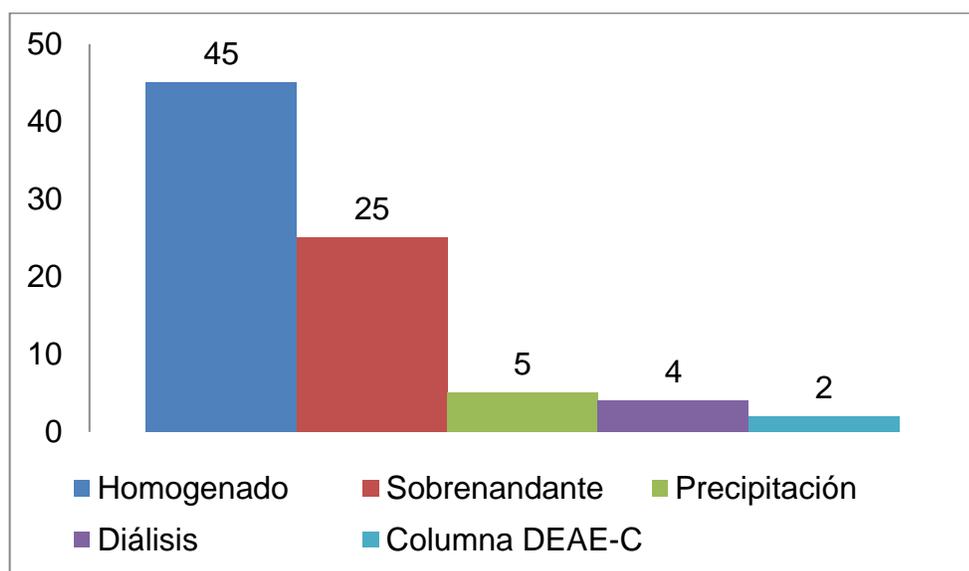
5. Manejo de datos

A continuación se muestra una tabla con los datos extraídos a lo largo de esta investigación.

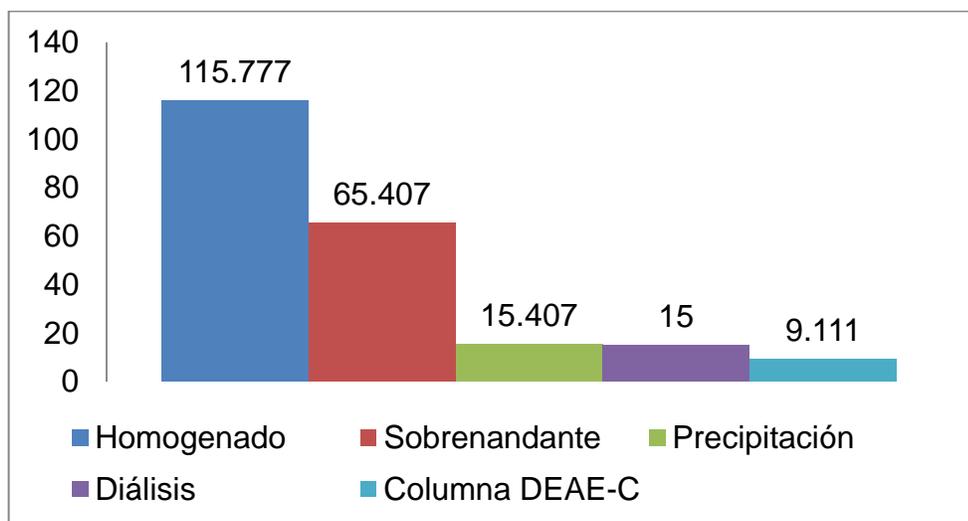
El cálculo de la actividad enzimática se basó en la $\Delta A/\text{min}$ y la cantidad de proteínas determinada en cada una de las etapas de purificación.

Tabla 7. Datos resumidos. Donde se presentan los principales resultados de cada una de las etapas de la purificación de la enzima tirosinasa.

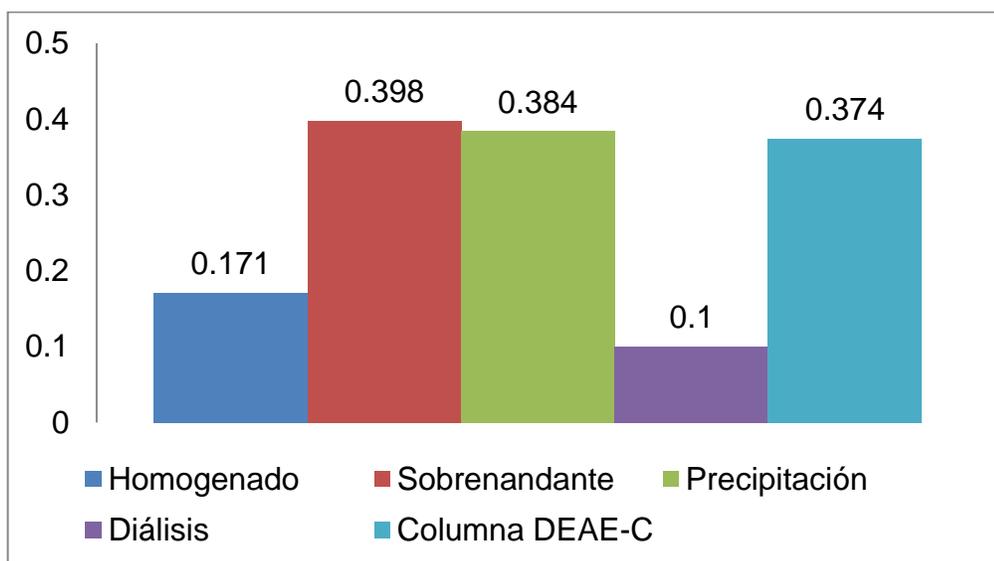
Etapas de purificación	Volumen (ml)	Proteínas [C] ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	$\Delta A/\text{min}$	CRF	Actividad ($\Delta A/\text{min})(\text{ng})^{-1}$
Homogenado	~ 45	115.777	0.171	0.751	7
Sobrenadante	25	65.407	0.398	0.896	30
Precipitación	5	15.407	0.384	0.826	124.6
Diálisis	4	15.407	0.1	0.615	32.4
Columna DEAE-C	2	9.111	0.374	0.798	205.2



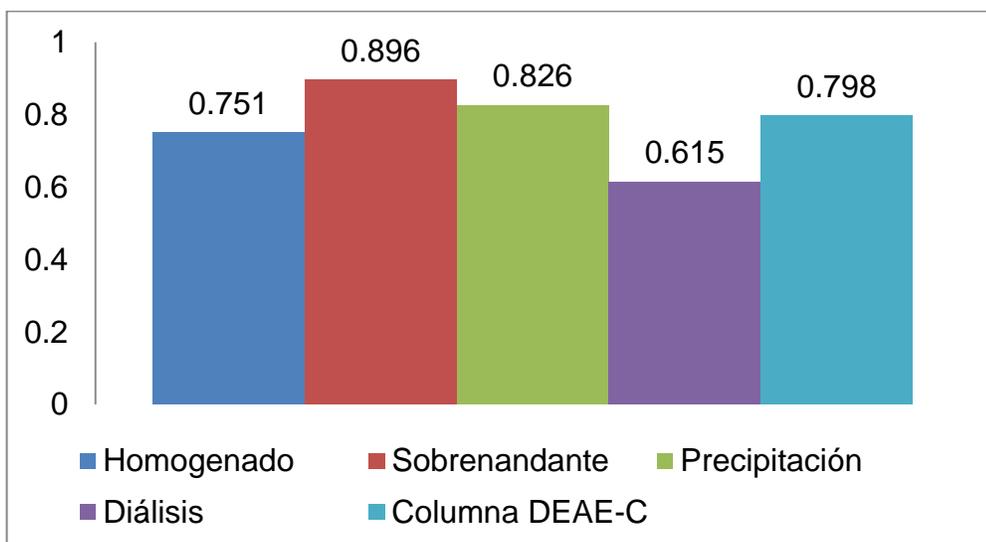
Gráfica 1. Variaciones en el volumen total de la muestra (ml). Donde se puede observar una variación significativa en los volúmenes finales de cada una de las etapas de la purificación



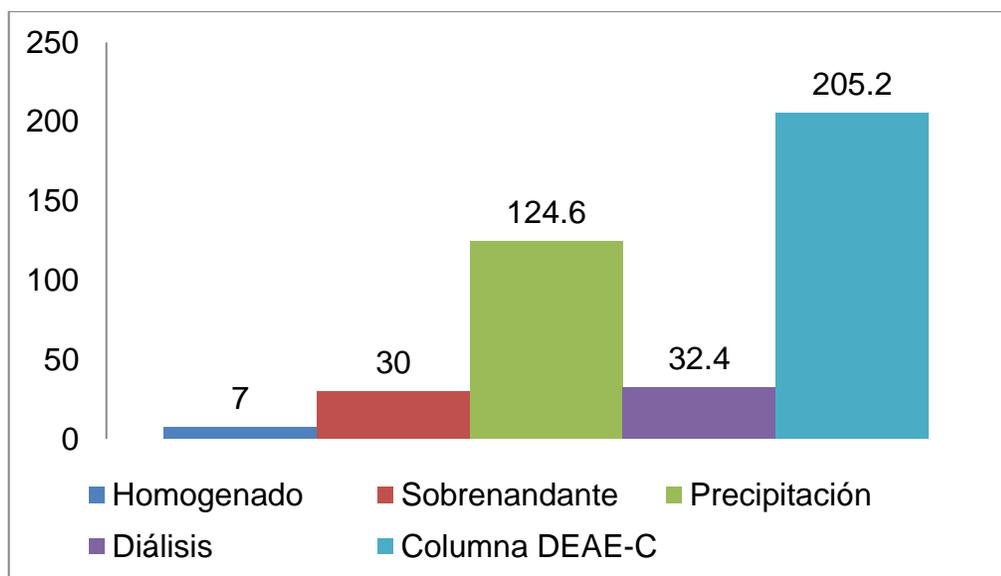
Gráfica 2. Cantidad total de proteínas ($\mu\text{g/ml}$) presente en cada una de las muestras en las diferentes etapas de purificación. Donde se logra observar una disminución gradual y relevante de la misma



Gráfica 3. $\Delta A/\text{min}$ obtenidos durante los ensayos enzimáticos de cada una de las muestras obtenidas en las diferentes etapas de la purificación. Donde se observa una buena actividad enzimática, con excepción de la muestra de la diálisis, ya que se logra ver una disminución significativa en su actividad



Gráfica 4. Coeficiente de correlación entre el tiempo y la absorbancia máxima obtenido durante los ensayos enzimáticos de cada una de las muestras



Gráfica 5. Valores de $\Delta A/\text{min}$ por nanogramos de proteína. Donde se observa el progreso en la purificación de la enzima durante cada una de las etapas de extracción, pero de igual manera se observa la pérdida de actividad o inhibición de la actividad durante la etapa de diálisis.

VIII. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos a lo largo de esta investigación demuestran que una especie de hongos del género *Lactarius* provenientes de la región de Baja California presenta actividad de tirosinasa, siendo esta de gran importancia en cuanto a aplicaciones a nivel biotecnológico. Además con esto se logra poner en la mira la amplia variedad de recursos naturales que ofrece esta zona con clima mediterráneo.

De acuerdo a los resultados registrados durante el desarrollo de la metodología se puede observar una purificación progresiva de la muestra problema y cómo es que se ve reflejada dicha purificación tanto en la cantidad proteica, como en la actividad enzimática obtenida en cada una de las etapas. Y, analizando los resultados mostrados anteriormente, se puede decir que la actividad de tirosinasa de esta enzima es eficaz, ya que gradualmente se logró llegar a un consumo completo del sustrato en el último paso de purificación, incrementando también la velocidad de reacción.

El método utilizado durante este trabajo para llevar a cabo la extracción y purificación de la enzima tirosinasa del hongo del género *Lactarius* fue el más comúnmente utilizado para este propósito. Tal como lo realizado por Nadaroglu y Tasgin quienes lograron extraer Lacasa del hongo *Lactarius volemus* utilizando un método muy similar al planteado en este trabajo y el cual arrojó muy buenos resultados. Dicha investigación parece ser de las primeras en

utilizar especies de macromicetos del género *Lactarius* dentro del área de los biocatalizadores, ya que no se logran encontrar más antecedentes sobre extracción de enzimas en este género. Actualmente se desarrollan diversos métodos para cumplir con este fin; sin embargo, en la bibliografía sólo se registran unos pocos específicos para tirosinasas de hongos.

Estas metodologías concuerdan en varias etapas a lo largo de la purificación pero utilizan métodos químicos diferentes o difieren en cuanto a los equipos o reactivos a utilizar. Por lo tanto, el procedimiento a elegir dependerá de los recursos con los que se cuente y los métodos que favorezcan al operador y al entorno en donde se desarrollará la investigación. Cada una de las metodologías posee ventajas y desventajas y no se puede elegir una como el mejor procedimiento a seguir, por lo que su éxito dependerá de la dedicación durante su realización.

En el caso de este método se presentaron inconvenientes durante del desarrollo de la metodología que tuvieron que irse resolviendo paulatinamente conforme se avanzaba y se tenía mayor conocimiento y experiencia en el tema. Y, como se mencionó anteriormente, es importante puntualizar que es complicado definir un protocolo eficiente y estandarizado de extracción y purificación, las condiciones no siempre son similares y una pequeña diferencia podría arrojar resultados completamente diferentes. Para evitar esto, durante este estudio se trató de trabajar en un entorno lo más controlado posible y bajo las mismas condiciones de temperatura, pH, salinidad y luminosidad.

Se lograron obtener buenos resultados al llevar a cabo la precipitación por medio de sulfato de amonio, el cual es uno de los pasos principales, ya que en esta etapa se da inicio a la purificación de la enzima que pretendemos obtener. Las proteínas precipitaron al saturar la solución hasta un 70%, mientras que con la saturación al 35% no hubo precipitado alguno, las proteínas se mantuvieron en la solución, logrando con esto eliminar moléculas que no son de nuestro interés.

No obstante, se presentó un inconveniente después de obtener la fracción proteica de la precipitación con sulfato de amonio. La muestra presentaba una cantidad muy elevada de pigmentos, los cuales interfirieron durante la corrida por la columna de intercambio iónico ocasionando un taponamiento en la parte superior de la resina e impidiendo con esto el paso de la muestra por la misma. Para solucionar este inconveniente se procedió a realizar un filtrado de la muestra antes de ser sometida a la cromatografía, lo que se realizó por medio de una bomba de vacío. Este procedimiento mejoró de sobremanera la corrida a lo largo de la columna de intercambio iónico (Figura 8). Esta problemática es una de las principales durante la extracción y purificación de tirosinasas fúngicas y parece ser muy común durante el desarrollo de estos procedimientos según se ve registrado en numerosas publicaciones.

Sin embargo, según se puede verificar en la gráfica 7, este procedimiento realizado para solucionar la problemática ocasionada por la

presencia elevada de pigmentos dañó de alguna manera el rendimiento de nuestra enzima, ya que tanto el valor de $\Delta A/\text{min}$ como el coeficiente de correlación entre el tiempo de degradación del sustrato y la absorbancia (CRF) disminuyeron. Esto podría haberse ocasionado durante la diálisis, probablemente al eliminar cofactores necesarios para llevar a cabo la acción de la enzima, ya que estos se caracterizan por tener baja masa molecular, y/o también pudo haber sucedido durante el filtrado al vacío de la muestra al desnaturalizar la proteína por cambios imprevistos en la temperatura o pH. Como se sabe, factores como la temperatura, pH y cofactores, son aspectos de gran influencia en la actividad enzimática.

Contrariamente a lo ocurrido durante el filtrado de la muestra, donde el rendimiento de la enzima decayó, al final de la purificación se logró mejorar el resultado y se obtuvo un incremento en el mismo. Esto sucedió durante la purificación por medio de la cromatografía de intercambio iónico. Es posible que el bajo rendimiento haya ocurrido debido a que la muestra se contaminó durante la filtración y se hayan mezclado moléculas en la solución donde se encontraba nuestra muestra, lo que ocasionó que se inhibiera la actividad enzimática durante el ensayo; a su vez, esto daría como resultado un bajo rendimiento de la enzima. Por otra parte, al pasar la muestra filtrada por la columna, ésta favoreció a que las moléculas contaminantes se eliminaran, purificando nuestra enzima y mejorando en gran medida el rendimiento enzimático.

La medición de la cinética enzimática fue llevada a cabo utilizando ácido cafeico como sustrato, ya que la tirosinasa tiene la capacidad de llevar a cabo dos reacciones de oxidación, cresolasa y catecolasa. El ácido cafeico nos ayuda a determinar la actividad de catecolasa de la enzima y, según se logra apreciar en las tablas y gráficas de resultados, desde un inicio hubo aparición de esta actividad. Estos trabajos preliminares, que arrojaron resultado positivo, permitieron tomar la decisión de trabajar con *Lactarius* y llegar a obtener un alto grado de purificación de la enzima. Una vez seleccionada la muestra objeto de estudio, se procedió a trabajar siguiendo el esquema de purificación presentado en la Figura 2.

Al inicio, en la realización de ensayos enzimáticos, se utilizó una concentración de sustrato de $100\mu\text{M}$ y un tiempo de degradación de 4 min durante los ensayos enzimáticos, lo cual tuvo que ser ajustado en cada etapa de la purificación. Los ajustes en el tiempo de degradación se llevaron a cabo debido a que conforme el grado de purificación aumentaba, el tiempo que tomaba la degradación del sustrato era cada vez menor. Es decir, la velocidad de reacción aumentaba conforme se avanzaba en el grado de purificación de nuestra enzima de interés.

En el último ensayo enzimático, llevado a cabo con la muestra obtenida de la cromatografía de intercambio iónico, el último paso de la purificación, se optó por cambiar la concentración del sustrato, ésta se redujo hasta $50\mu\text{M}$. Esto debido a que la concentración de proteínas también se redujo

considerablemente, por lo que la actividad de la enzima se vio afectada y la concentración de sustrato quedo muy elevada (Tabla 1).

Por lo tanto, cuando se redujo la concentración a la mitad (de 100 μ M a 50 μ M de ácido cafeico) se logró una degradación total del sustrato en un tiempo de 30 segundos, mucho menor al tiempo de inicio que era de 4 minutos. Mientras que cuando se realizó el ensayo con la concentración de 100 μ M la actividad de la enzima era casi nula. Lo anterior es explicable si consideramos que la concentración de la enzima disminuyó notablemente y al utilizar una concentración alta de sustrato se produjo el efecto conocido como inhibición por exceso de sustrato, lo que ocasiona una disminución en la actividad enzimática.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son muy alentadores para continuar trabajando con esta especie de hongo, el cual sólo se sabe que pertenece al género *Lactarius*. Como ya se mencionó anteriormente, los biocatalizadores tienen un campo de aplicación bastante extenso, y las enzimas tirosinasas no son la excepción, su campo se extiende desde la industria alimenticia y farmacéutica, hasta la ambiental.

IX. CONCLUSIONES

1. La metodología del presente trabajo, diseñada para el aislamiento y purificación de la actividad de tirosinasa, permite obtener un aumento progresivo de actividad enzimática, lo que sugiere un incremento en el grado de pureza de la enzima.
2. El hongo *Lactarius* sp. de Baja California presenta actividad de tirosinasa, con lo que Baja California aporta una nueva fuente de obtención de biocatalizadores con actividad de polifenoloxidasas.

X. RECOMENDACIONES

Durante el desarrollo de esta investigación se presentaron diversos imprevistos, por lo que no se logró una completa caracterización de la proteína purificada, por lo que se recomienda llegar hasta el final en este aspecto y poder comparar sus características estructurales, peso molecular, posibles inhibidores, etc, con otros autores.

Para corroborar que la enzima obtenida en esta investigación puede ser aplicada en la industria alimenticia, farmacéutica y medioambiental, deben hacerse estudios más completos, en donde se determine su estabilidad ante distintos sustratos y ambientes.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Dolashki, A., Gushterova, A., Voelter, W. and Tchorbanov, B. (2009) Identification and characterization of tyrosinase from *Streptomyces albus* by mass spectrometry. *BIOTECHNOL. & BIOTECHNOL. EQ.* 23/2009/SE SPECIAL EDITION/ON-LINE. Vol. 23, No. 1, 946-950.

Duarte L. T., Batista, T. J., Fontes, S. M., Alves, G. T. and Freitas B. M. T. (2012). Production and characterization of tyrosinase activity in *Pycnoporus sanguineus*. *BRAZILIAN JOURNAL of MICROBIOLOGY*, Vol. 43, No. 1, 21-29.

Duckworth, H. W. and Coleman, J. E. (1970) Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase. *The JOURNAL of BIOLOGICAL CHEMISTRY*, Vol. 245, No. 7, 1613-1625

Durán, N., Rosa, M.A., D'Annibale, A. and Gianfreda, L. (2002) Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *ENZYME and MICROBIAL TECHNOLOGY*, ELSEVIER, Vol 31, No. 7, 907–931.

Faccio, G., Kruusb, K., Saloheimob, M. and Thöny-Meyera, L. (2012) Bacterial tyrosinases and their applications. *PROCESS BIOCHEMISTRY*, ELSEVIER, Vol. 47, No. 12, 1749-1760.

Haghbeen, K., Jazii, F. R., Karkhane, A. A. and Borojerdi, S. S. (2004) Purification of tyrosinase from edible mushroom. *IRANIAN JOURNAL of BIOTECHNOLOGY*, Vol. 2, No. 3, 189 -194.

Haghbeen, K., and Tan, E. W. (2003). Direct spectrophotometric assay of monooxygenase and oxidase activities of mushroom tyrosinase in the presence of synthetic and natural substrates. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, ELSEVIER, Vol. 312, No. 1, 23–32.

Halaouli, S., Asther, M., Sigoillot, J.C., Hamdi, M. and Lomascolo, A. (2006) Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. *JOURNAL of APPLIED MICROBIOLOGY, THE SOCIETY for APPLIED MICROBIOLOGY*, Vol. 100, No. 2, 219–232.

Lantto, R. (2007) Protein cross-linking with oxidative enzymes and transglutaminase. Effects in meat protein systems. Espoo. VTT Publications 642. 114 p. + app. 49 p.

Mayer, A.M., Harel, E. and Ben-Shaul, R. (1966) Assay of catechol oxidase—a critical comparison of methods. *PHYTOCHEMISTRY*, Vol. 5, No. 4, 783–789.

Nadaroglu, H. and Tasgin, E. (2013) Purification and characterisation of laccase from *Lactarius volemus* and its application in removal of phenolic compounds from fruit juice. *JOURNAL of FOOD, AGRICULTURE & ENVIRONMENT*, Vol.11, (3&4), 109-114.

Nicell, J. A. (2001) Environmental applications of enzymes. *INTERDISCIPLINARY ENVIRONMENTAL REVIEW*, Vol. 3, No. 1, 14-41.

Otávio, R., Rotuno, V., Lopes, M.A., Krieger, N. and Mitchell, D. (2007) The Biotechnological Potential of Mushroom Tyrosinases. *FOOD TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, Vol. 45, No. 3, 287–294.

Wada, S., Ichikawa, H. and Tatsumi, K. (1993) Removal of phenols from wastewater by soluble and immobilized tyrosinase. *BIOTECHNOLOGY and BIOENGINEERING*. Vol. 42, No. 7, 854-858.

Seo, S-Y., Sharma, V. K., and Sharma, N. (2003) Mushroom Tyrosinase: Recent Prospects. *JOURNAL of AGRICULTURAL and FOOD CHEMISTRY*., AMERICAN Chemical Society, Vol. 51, No. 10, 2837-2853.

Yamauchi, K., Mitsunaga, T. and Batubara, I. (2011). Isolation, Identification and tyrosinase inhibitory activities of the extractives from *Allamanda cathartica*. *NATURAL RESOURCES*, Scientific Research, Vol. 2, No. 3, 167-172.