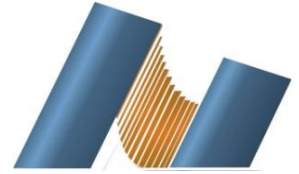




**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA

LICENCIATURA EN NANOTECNOLOGÍA

Bionanotecnología

**EFFECTO DE LA MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LA ENZIMA
PEROXIDASA VERSÁTIL DE *Bjerkandera adusta* EN LA
TRANSFORMACIÓN DE CONTAMINANTES**

TESINA

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
LICENCIADO EN NANOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

OMAR SILVA TORRES

DIRECTOR DE TESIS:

DR. RAFAEL VÁZQUEZ DUHALT

Ensenada, Baja California, México, agosto del 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hago constar que el trabajo que presento es de mi autoría y que todas las ideas, citas textuales, datos, ilustraciones, gráficas, etc. sacados de cualquier obra o debidas al trabajo de terceros, han sido debidamente identificados y citados en el cuerpo del texto y en la bibliografía y acepto que en caso de no respetar lo anterior puedo ser sujeto de sanciones universitarias.

Afirmo que el material presentado no se encuentra protegido por derechos de autor y me hago responsable de cualquier reclamo relacionado con la violación de derechos de autor.

Omar Silva Torres

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio del Departamento de Bionanotecnología del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Rafael Vázquez Duhalt.

RESUMEN

En este trabajo se estudió el efecto de una modificación química superficial con triptófanos (Trp) de la enzima Peroxidasa versátil (VP) de *Bjerkandera adusta*. La VP es una enzima híbrida estructural de la LiP y la MnP, y cataliza la oxidación de una gran variedad de moléculas, cuyo aceptor final de electrones es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Se compararon las actividades específicas de la enzima modificada con Trp (W-VP) y la enzima VP nativa en la transformación de 13 contaminantes tóxicos, entre ellos hidrocarburos poliaromáticos (HPA), disruptores endocrinos (DE), plaguicidas y colorantes artificiales. No se encontraron diferencias significativas en la transformación de los diferentes sustratos con respecto a la enzima no modificada.

Además se implementó un protocolo de modificación química de la VP para realizar dos modificaciones con aminoácidos formadores de radicales libres: modificación con histidina (H-VP) y modificación con fenilalanina (F-VP). Las preparaciones modificadas fueron evaluadas en la transformación del colorante artificial: Azul Brillante de Remazol R.

Se obtuvieron los parámetros cinéticos de dichas modificaciones y se compararon con los valores de la VP nativa y la W-VP reportados en la literatura. Los resultados mostraron que la W-VP es la modificación que muestra el mejor desempeño catalítico.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está dedicado especialmente para esa persona que siempre me impulsó a seguir adelante, cuyo corazón no conoció límites y cuya nobleza siempre caracterizó: mi padre. Siempre estarás presente dentro de mi corazón, y espero que donde quiera que te encuentres estés orgulloso de mí, por este logro que tú me apoyaste incondicionalmente a alcanzar. ¡Gracias papá!

Gracias mamá, por todo tu apoyo incondicional, por hacerme un mejor ser humano y por tu infinito amor. Fernando, gracias por ayudarme a terminar esta meta, este trabajo también es para ti, nunca lo hubiese logrado sin tu ayuda, muchas gracias carnalito. Gracias Iván y Sayari por siempre estar conmigo, aunque no físicamente, sé que siempre puedo contar con ustedes. También agradezco a toda mi familia, mis abuelos, mis sobrinos, mis tíos y tías por su apoyo.

Agradezco al Dr. Rafael por permitirme pertenecer a su grupo de investigación, por sus enseñanzas y por su paciencia. Me siento orgulloso de ser parte de Bionano.

Gracias Flor por tu invaluable ayuda en la realización de este trabajo. Estoy seguro que serás una excelente doctora. Gracias Dulce y Karla, por sus consejos y aclararme mil dudas que tenía. Gracias Dra. Katrin, por su apoyo siempre. También agradezco a mis amigos de CNyN, a mis compañeros de la licenciatura, a mi tutora Elizabeth por todo el apoyo, y más que nada por ser mi amiga.

Gracias Israel por tu ayuda, tu paciencia y tu apoyo siempre. SEM.

¡Gracias UNAM!

ÍNDICE

Resumen.....	4
Índice.....	6
Introducción.....	7
1. Antecedentes.....	9
1.1 Contaminación ambiental.....	9
1.1.1 Hidrocarburos poliaromáticos (HPA).....	9
1.1.2. Colorantes artificiales.....	10
1.1.3. Disruptores endocrinos (DE).....	11
1.2 Transformación enzimática de contaminantes.....	12
1.3 Hongos de podredumbre blanca.....	13
1.3.1 Peroxidasa versátil (VP).....	13
1.3.2 Ciclo catalítico de la VP.....	14
1.3.3 Modificación superficial de la VP con triptófanos (W-VP).....	15
1.4 Hipótesis.....	16
1.5 Objetivos.....	16
2. Materiales y métodos.....	17
2.1 Enzima.....	17
2.2 Reactivos.....	17
2.3 Equipo.....	17
2.4 Métodos.....	19
2.4.1 Cuantificación de la proteína.....	19
2.4.2 Funcionalización.....	19
2.4.3 Actividad específica.....	19
2.4.4 Parámetros cinéticos.....	20
2.4.5 Total turnover number (TTN).....	21
3. Resultados y discusión.....	22
4. Conclusiones.....	32
5. Perspectivas.....	33
6. Referencias.....	34

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente la contaminación ambiental es una problemática global, que se produce cuando el entorno natural no puede destruir un elemento sin daño o perjuicio a sí mismo (Solís, 2013).

Existen un problema y un desafío relacionados con la contaminación: el problema es que debido al incremento de la población y las actividades humanas, se genera continuamente una gran cantidad de desechos, muchos de ellos tóxicos. El desafío es la restauración de lugares que ya han sido alterados por la contaminación por compuestos tóxicos (Canul, 2006).

Las emisiones industriales y de los automóviles son responsables de gran parte de la contaminación ambiental. Entre los múltiples contaminantes que liberan al ambiente, se encuentran los hidrocarburos poliaromáticos (HPA) resultantes de la combustión incompleta del carbón y de los combustibles fósiles. Estos compuestos son considerados como un riesgo a la salud humana debido a su potencial carcinógeno y mutagénico (Hernández-López, 2011).

Además de los HPA, los plaguicidas son una amenaza latente. Aunque en un principio fueron de origen natural, en la Revolución Industrial la dependencia alimentaria de las crecientes urbes generó una gran presión en cuanto a la capacidad de producir y preservar los alimentos, por lo que se comenzaron a utilizar principalmente de sustancias tóxicas inespecíficas y de muy bajo costo (Ortega Elorza, 2011).

Algunas de estas sustancias químicas se encuentran en la categoría de Sustancias Tóxicas, Persistentes y Bioacumulables (STPB), dado que poseen propiedades fisicoquímicas que les permite viajar grandes distancias, tener vidas medias largas y efectos en la salud de las personas y el ambiente.

La biotecnología ofrece muchas oportunidades para abordar las cuestiones relativas al tratamiento del ambiente contaminado (Pakshirajan *et al.* 2014).

Esto se debe a que existen moléculas biológicas, como las enzimas, que son capaces de transformar los contaminantes en compuestos menos tóxicos.

Entre las enzimas más estudiadas se encuentran las producidas por los hongos ligninolíticos, como la lacasa y la peroxidasa versátil (VP). La VP es un híbrido estructural y funcional de la lignino peroxidasa (LiP) y de la manganeso peroxidasa (MnP). Tiene la capacidad de oxidar una gran variedad de sustratos recalcitrantes, de ahí su interés biotecnológico. El principal problema de estas enzimas es su inestabilidad y que son fácilmente inactivadas por su sustrato, el peróxido de hidrógeno (Valderrama, *et al.* 2002).

Debido a que su aplicación está limitada, se ha impulsado la búsqueda de métodos que mejoren su desempeño catalítico, a través de la modificación química.

En un trabajo realizado recientemente relacionado con la enzima VP modificada químicamente en su superficie con triptófanos mostró un aumento de su rendimiento catalítico y mejoró su estabilidad operacional (Sánchez-Alejandro *et al.* 2016).

Por lo anterior, en este trabajo se estudió el efecto de la modificación química de la enzima en la transformación de plaguicidas, HPA, colorantes artificiales y disruptores endocrinos. Los resultados con las preparaciones modificadas se compararon con la transformación de estos contaminantes con la VP sin modificar.

1. ANTECEDENTES

1.1 CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

La contaminación ambiental es uno de los problemas más críticos que existen en la actualidad. A medida que aumenta la interacción del hombre con la naturaleza, el medio ambiente se deteriora cada vez más. Se denomina contaminación ambiental a la presencia de un agente externo en el ambiente, ya sea físico, químico o biológico, que puede ser perjudicial para la salud, seguridad y bienestar de plantas, animales o seres humanos (Rao *et al.* 2010).

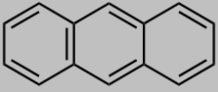

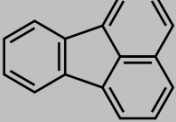
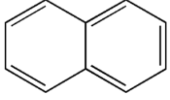
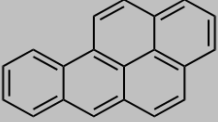
Uno de los mayores problemas es la incapacidad tecnológica para restaurar los ambientes dañados por la acción de compuestos que llegan al ambiente debido a la contaminación. La biotecnología tiene un papel importante en la restauración de estos ambientes, ya que se ha demostrado que la utilización de microorganismos y agentes biológicos (como las enzimas) son capaces de transformar ciertos contaminantes en otros compuestos que son menos tóxicos (Torres *et al.* 2003).

Algunos compuestos incluso están catalogados como contaminantes orgánicos persistentes (COPs) ya que tienen una gran estabilidad y son poco degradables. A continuación se mencionan algunos estudiados en este trabajo.

1.1.1 Hidrocarburos poliaromáticos (HPA)

Los HPA son xenobióticos inorgánicos semivolátiles, que contienen dos o más anillos fusionados en su estructura química. Son compuestos hidrofóbicos, y su persistencia en el ambiente se debe principalmente a su baja solubilidad en agua. La mayoría se producen como resultado de la combustión de combustibles fósiles, como subproductos de procesos industriales, y durante la cocción de los alimentos (Cerniglia, 1992).

Tabla 1. Fórmula química de algunos HPAs.

HPA	Fórmula
Antraceno C ₁₈ H ₁₀ PM. 178.2	
Fenantreno C ₁₄ H ₁₀ PM. 178.2	
Fluorantreno C ₁₃ H ₁₀ PM. 166.6	
Naftaleno C ₁₀ H ₈ PM. 128.2	
Pireno C ₁₆ H ₁₀ PM.202.3	

Datos tomados del "The Merck Index, 12th Ed."

La EPA (*Environmental Protection Agency*, por sus siglas en inglés) ha clasificado a 16 HPA como contaminantes químicos prioritarios. Algunos de ellos se muestran en la tabla 1 con su fórmula química. Estos compuestos se han asociado a diferentes tipos de cáncer, dependiendo de la dosis, el tiempo de exposición, la ruta de administración, así como las características del individuo que está expuesto (Uribe Alvarez, 2010).

1.1.2 Colorantes artificiales

Al igual que los HPA, varios colorantes artificiales están catalogados como tóxicos y carcinogénicos (Chun, K.T. 1992). En la industria textil se ha estimado que aproximadamente el 15% de la materia colorante es liberada en los efluentes de aguas residuales. Los colorantes artificiales que se aplican en la industria, están diseñados para resistir la luz solar, el agua, algunos productos químicos, así como la degradación microbiana (Tinoco *et al.* 2007). Es por ello que son capaces de resistir ciertas condiciones y ser potencialmente tóxicos. Algunos ejemplos son: Negro ácido 194, Negro reactivo 5, Azul reactivo 38, Azul reactivo 72, Azul Brillante de Remazol R.

1.1.3 Disruptores endocrinos (DE)

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), un disruptor endocrino (DE) es una sustancia exógena o mezcla de ellas que altera las funciones del sistema endocrino. Este sistema es el encargado de la segregación de hormonas que están implicadas en funciones como la homeostasis, el crecimiento, el desarrollo sexual, entre otros, en un organismo (Sanders, 2004).

Uno de los mayores riesgos de los DE es que pueden alterar el desarrollo y diferenciación sexual de los animales. Por ejemplo en los peces, que ocasiona un desbalance en la proporción sexual y por ende una disminución de las poblaciones. Entre las principales fuentes de estas sustancias se encuentran los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales. Algunos ejemplos de ellos son: bisfenol-A, nonilfenol y 17 β -estradiol (Torres-Duarte, 2012).

1.2 TRANSFORMACIÓN ENZIMÁTICA DE CONTAMINANTES

La eliminación de los contaminantes orgánicos que están ampliamente distribuidos en el planeta se considera una de las principales preocupaciones para lograr un desarrollo sustentable. La biorremediación es un método más seguro y menos perjudicial que los procesos físico-químicos comunes. Además de que es un tratamiento más rentable (Ang *et al.* 2005).

La biorremediación consiste en el uso de microorganismos, ya sea introducidos o de origen natural, o de enzimas que sean capaces de degradar contaminantes persistentes en otros compuestos que sean no tóxicos o menos tóxicos.

Las enzimas fueron la primer propuesta para el tratamiento de residuos en los años 30's, sin embargo no fue sino hasta los años 70's que se utilizaron para dirigirse hacia contaminantes específicos (Aitken, 1993).

El uso de las enzimas como agentes descontaminantes representa una alternativa viable para la transformación de estos compuestos, ya que supera algunas de las desventajas que tiene el uso de microorganismos. Por ejemplo, las enzimas pueden tener una alta o baja especificidad, por lo que es posible aplicarse a una gran variedad de compuestos. También pueden ser empleadas en condiciones extremas que limitan la actividad microbiana, además son eficaces a bajas concentraciones de contaminantes.

Para utilizar una enzima en biorremediación, se debe primero lograr que ésta se mantenga de manera óptima durante todas las condiciones de operación. Debe tener una alta afinidad por el sustrato (K_m en el rango de micromolar). Así como también debe soportar los diferentes factores externos que se presenten (Gianfreda y Bollag, 2002).

Las clases de enzimas más utilizadas en la remediación son las hidrolasas, las transferasas, mono-oxigenasas y las oxidorreductasas. Algunos ejemplos de oxidorreductasas son las deshalogenasas, fenoloxidasas y peroxidasas. En condiciones de laboratorio se ha probado en gran número de enzimas de estas clases que pueden transformar compuestos contaminantes (Camarero *et al.* 2005).

Un ejemplo de enzima perteneciente a las peroxidasas es la HRP (del inglés *Horseradish peroxidase*) que ha sido ampliamente estudiada debido a que puede catalizar la oxidación de una gran variedad de compuestos aromáticos tóxicos. Se han hecho grandes esfuerzos por optimizar el rendimiento de la HRP en la remoción de compuestos fenólicos de soluciones acuosas. Mejoras como alargar el tiempo de vida útil para así reducir costos, así como el uso de aditivos como el polietilenglicol para proteger a la enzima de una prematura inactivación, o adición de absorbentes que la protegen de la inactivación causada por los productos de reacción, e incluso la inmovilización en soportes sólidos son algunos ejemplos de lo que se ha logrado (Nicell *et al.* 2006).

Dichos métodos de modificación que se realizan para alterar o proporcionar nuevas propiedades catalíticas a las enzimas tienen como principal desventaja la falta de control con relación al grado y especificidad de la reacción.

1.3 HONGOS DE PODREDUMBRE BLANCA

Los hongos de podredumbre blanca producen enzimas oxidativas extracelulares (catalizadores biológicos que son producidos por los hongos y secretados al exterior) incluyendo la lacasa, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa. Estas enzimas son responsables de la degradación de la lignina, que es un polímero de la madera que le brinda rigidez a la planta y la protege del ataque microbiano (Shoemaker y Leisola, 1990). El nombre de “podredumbre blanca” se debe al aspecto blanquecino que adquiere la madera una vez que los hongos han degradado la lignina.

Se ha mostrado que estas enzimas son capaces de metabolizar compuestos xenobióticos como HPA, fenoles clorados y plaguicidas (Guerra-Rivera *et al.* 2011).

1.3.1 Peroxidasa versátil (VP)

La VP es una enzima híbrida estructural de la LiP y la MnP, y pertenece al grupo de las peroxidases. Este grupo es una familia de las oxidorreductasas, que catalizan la oxidación de una gran variedad de moléculas, cuyo aceptor final de electrones es el peróxido de hidrógeno. El elemento en común de las peroxidases es su grupo prostético, un grupo hemo (Pogni *et al.* 2005).

Fue descrita por primera vez en cepas de *Pleurotus eryngii* que degradan lignina (Martínez, M.J. *et al.* 1996). Aunque también es producida por hongos del género *Pleurotus*, *Bjerkandera* y *Lepista*, entre otros (Pérez-Boada *et al.* 2005).

El interés biotecnológico de la VP de *B. adusta* es que tiene la habilidad de oxidar grandes moléculas de sustrato en ausencia de Mn(II). Dependiendo de las

condiciones de la reacción, la VP puede oxidar sustratos que no alcanzan el grupo hemo, a través de un intermediario altamente reactivo o por medio de un residuo de aminoácido superficial activado (Ayala Aceves *et al.* 2001).

1.3.2 Ciclo catalítico de la VP

El ciclo comienza con la sustracción de dos electrones de la VP en estado basal, por el aceptor final el peróxido de hidrógeno, como se observa en la Figura 1. Esto produce el compuesto C-I_A que contiene un oxo-Fe^{IV}=O y un radical catiónico en la porfirina. Los electrones se transfieren desde las moléculas del sustrato en dos etapas. La reducción de un electrón produce el compuesto C-II_A que contiene un oxo-Fe^{IV}=O. Y después, la reducción del otro electrón conduce a la forma basal de la enzima.

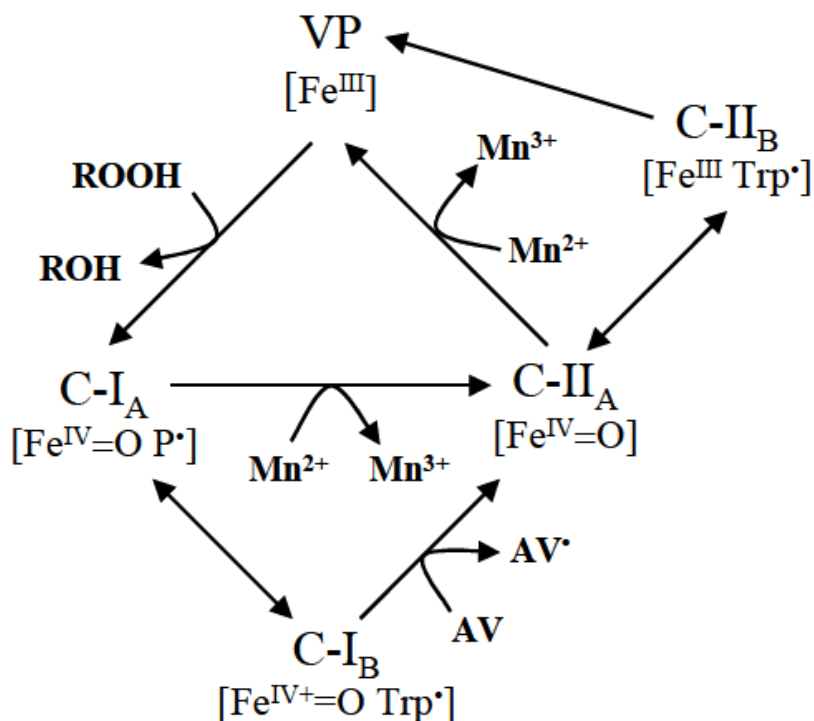


Figura 1. Ciclo catalítico de la VP (Pérez-Boada *et al.* 2005).

La oxidación del sustrato puede además proceder del proceso LRET (*Long-rate electron transfer* por sus siglas en inglés) que implica un radical proteico expuesto en la superficie para la oxidación de moléculas de alto peso molecular. La presencia de un Trp (Trp*) cercano al grupo prostético hemo de la enzima es el sitio para la oxidación de estos sustratos (Pérez-Boada *et al.* 2005).

1.3.3. Modificación superficial de la VP con triptófanos (W-VP)

Recientemente se publicó un estudio donde se realizó una modificación superficial a la enzima VP con triptófanos (Trp) (Sánchez-Alejandro *et al.* 2016). Es bien sabido que la VP de *B. adusta* tiene dos Trp expuestos al solvente, el cual el Trp 177 es selectivamente oxidado por el Compuesto I_A y el compuesto II_A. El objetivo de incorporar más Trp a la proteína es incrementar el número de sitios activos en la superficie de la misma. Entre otras cosas, los autores compararon el rendimiento catalítico de la VP nativa y la modificada con Trp (W-VP). La W-VP mostró un incremento del 55% en la velocidad de oxidación comparada con la VP con el sustrato azul brillante de Remazol R. Además aumentó el número total de recambio (TTN) para sustratos voluminosos. Se concluyó que la modificación con Trp incrementa el rendimiento catalítico de la VP y mejora su estabilidad operacional.

En dicho estudio se analizaron los sustratos 2,6-dimetoxifenol, manganeso II y el azul brillante de Remazol R. Por lo que el objetivo del presente trabajo es estudiar el efecto de la VP modificada, W-VP, en la transformación de otros sustratos como HPAs, colorantes artificiales, plaguicidas y disruptores endocrinos.

1.4 HIPÓTESIS

La modificación química de la superficie de la VP con aminoácidos formadores de radicales libres incrementará la actividad enzimática de degradación de contaminantes.

1.5 OBJETIVOS

General:

- Estudiar el comportamiento catalítico de la VP modificada químicamente en su superficie con aminoácidos formadores de radicales libres en la degradación de compuestos contaminantes.

Particulares:

- Evaluar la actividad catalítica de la VP (nativa) en la degradación de contaminantes.
- Implementar un protocolo de modificación superficial de la VP con distintos aminoácidos aromáticos.
- Caracterizar cinéticamente la VP con las modificaciones realizadas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Enzima

La enzima VP de *B. adusta* fue aislada y purificada en el laboratorio de Bionanotecnología del CNYN, y fue proporcionada por Sánchez-Alejandro.

2.2 Reactivos

El antraceno, pireno, fenantreno, pentaclorofenol, catecol, triclosan, β -estradiol, paration, bisfenol-A, azul brillante de Remazol R, acetonitrilo, peróxido de hidrógeno, triptófano, así como N-hydroxy-succinimide, N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodi-imidehydrochloride, y N-bromo-succinimide (NBS) fueron comprados en Sigma–Aldrich Co. (St. Louis, MO). La histidina fue adquirida de Merck. El 4-Clorofenol se compró a Fluka. El fosfato de potasio monobásico y dibásico fueron adquiridos de Baker.

2.3 Equipo

Se utilizó el HPLC (High Performance Liquid Chromatography, por sus siglas en inglés) de Agilent Technologies. El HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla, la cual se basa en las interacciones posibles entre dichos componentes eluidos con un solvente y la fase estacionaria constituida por un soporte en la columna.

Esquema del equipo de HPLC

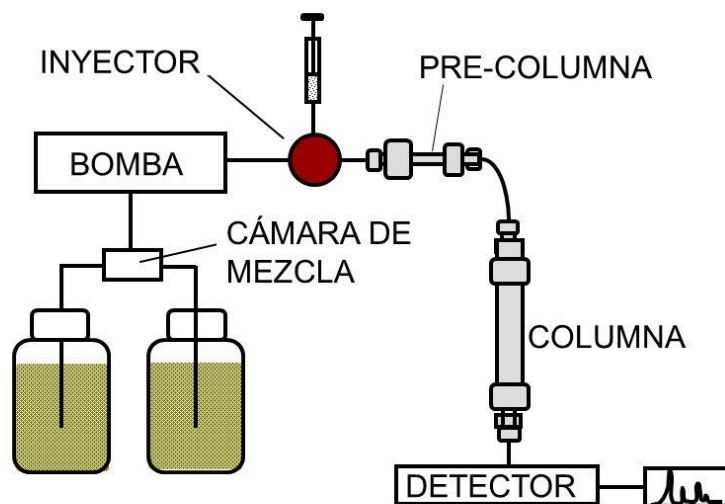


Figura 2. Esquema del HPLC (Tomado de <http://slideplayer.es>).

La muestra que se desea analizar es inyectada en la fase móvil, cuyos compuestos emigran de acuerdo a las interacciones no covalentes entre éstos y la columna. Los componentes principales del equipo son: una bomba, inyector, una columna y un detector (Figura 2). Se empleó la columna de fase reversa Phenomex Kinetex 5UC18 (150 x 4.60mm).

El espectrofotómetro utilizado fue Cary 60 UV-Vis de Agilent Technologies.

2.4 Métodos

2.4.1 Cuantificación de la proteína

Las concentraciones de la VP nativa y W-VP fueron estimadas con el método Soret a una longitud de 420 y 409 nm respectivamente, el coeficiente de extinción molar de $203,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Moreira *et al.* 2006) y utilizando la ley de Lambert-Beer:

$$C = \frac{A}{\epsilon l}$$

Donde C es la concentración de la enzima, A es la absorbancia, ϵ es el coeficiente de extinción molar y l la longitud de la celda (1 cm).

2.4.2 Funcionalización

Se siguió el protocolo de funcionalización de la VP propuesto por Sánchez-Alejandro *et al.* (2016). Además de la funcionalización con triptófanos, también se utilizaron, por separado, los aminoácidos fenilalanina (Phe) e histidina (His). La reacción se llevó a cabo en 10 ml que contenían 2.84×10^{-7} moles de VP, 4.90×10^{-5} moles de Trp, 1.0×10^{-3} moles de carbodiimida y 2.0×10^{-4} moles de succinimida en una solución amortiguadora de borato de sodio, 50 mM y pH 5. Posteriormente se dializó por 5 horas a 4°C en 2 L de solución de fosfato de sodio a pH 5. Por último se concentró en el amicon y se guardó a 4°C . Se realizó el mismo procedimiento sustituyendo el Trp por Phe, así como con His.

2.4.3 Actividad específica

La oxidación enzimática de los siguientes sustratos se llevó a cabo a temperatura ambiente y se cuantificó por HPLC: antraceno, pireno, fenantreno, pentaclorofenol, 4-clorofenol, catecol, triclosan, B-estradiol, bisfenol-A y paration. Con estos compuestos sólo se utilizó la W-VP y con el fin de tener un punto de comparación se evaluó también la actividad catalítica de la VP nativa.

La reacción se preparó en 1 ml con 100 μ l de VP (ó W-VP) a una concentración inicial de la enzima de 4.36×10^{-9} mol/ml. La concentración final del sustrato fue de 200 μ M (a excepción del catecol y β -estradiol que fue de 80 μ M), la del peróxido de hidrógeno de 1 mM, en un amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 4). La reacción se inició con la adición del peróxido de hidrógeno. Después de 10 minutos se inyectaron 100 μ l de la mezcla de reacción en el HPLC y se cuantificó el área del pico del sustrato a la máxima longitud de onda a la que absorbe el compuesto. La elución se realizó con una mezcla de acetonitrilo/agua (75:25) y a un flujo de 0.5 ml/min. Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado.

Además, se midió la actividad enzimática en el espectrofotómetro del Negro ácido 194, Azul reactivo 198 y el azul brillante de Remazol R, con coeficientes de extinción molar de $5.4951 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $14.233 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $8.48 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ respectivamente. La reacción se realizó en 1 ml de mezcla, en la que se adicionaron 5 μ l de VP (o W-VP) a 4.36×10^{-9} mol/ml, y se inició la reacción con la adición del peróxido de hidrógeno a una concentración final de 1 mM. Se utilizó un amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 4). La cantidad de sustrato añadida fue la necesaria para llevar la mezcla de reacción a una absorbancia inicial de 1.

2.4.4 Parámetros cinéticos

Las constantes catalíticas k_{cat} y K_{m} fueron determinadas para la VP modificada con histidina (H-VP) y fenilalanina (F-VP) utilizando como sustrato el azul brillante de Remazol R con una longitud de onda $\lambda=592$ nm. Se calcularon a partir de las velocidades de reacción estimadas bajo condiciones de saturación de uno de los sustratos. La K_{m} y k_{cat} se estimaron a través del ajuste no lineal de los datos en el modelo de Michaelis-Menten, usando el software MMfit (J.P.G. Malthouse).

2.4.5 Total turnover number (TTN)

La tasa total de recambio (en *inglés* total turnover number) fue determinada en 10 ml de reacción, que contenía 1 mM de H₂O₂ y 1 mM de azul brillante de Remazol R. Se monitoreó hasta no detectar cambio en la reacción. La cantidad de enzima se ajustó para que la transformación del sustrato estuviera en el intervalo entre 20 y 80% y así asegurar una completa reacción enzimática sin el agotamiento del sustrato.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presencia de un sitio catalítico expuesto en la VP de *B. adusta* da lugar a que esta enzima sea capaz de oxidar sustratos de moléculas grandes y sustratos difícilmente oxidables en ausencia de un mediador. Con base en los resultados de EPR (*Electron paramagnetic resonance*, por sus siglas en inglés), Pogni y colaboradores identificaron que el radical era un residuo de Triptófano con una proximidad al grupo prostético hemo de 10 Å (Pogni *et al.* 2005). Se modificó la VP en su superficie, con alrededor de 15 Trp adicionales, con el fin de incrementar el número de sitios activos (Sánchez-Alejandro *et al.* 2016). Por lo tanto, se estudió la actividad de esta nueva enzima modificada, W-VP, contra diferentes sustratos.

Los resultados de las actividades específicas de ambas enzimas se muestran en la tabla 2. Algunas actividades específicas de la W-VP fueron levemente mayores que las de la VP nativa, a excepción del 4-clorofenol. De los 10 compuestos estudiados por HPLC, solamente tres de ellos no fueron oxidados por ningún enzima: pireno, fenantreno y paratión.

Tabla 2. Actividades específicas de la VP nativa y W-VP con diferentes sustratos.

Sustrato	λ_{\max} (nm)	VP nativa		W-VP	
		% Degradado	Actividad específica (min ⁻¹)	% Degradado W-VP	Actividad específica (min ⁻¹)
Antraceno	255	20.19	9.26 ± 0.4	45.86	21.04 ± 3.20
Pireno	270	NR	NR	NR	NR
Fenantreno	250	NR	NR	NR	NR
Pentaclorofenol	215	57.24	26.26 ± 4.6	73.40	33.67 ± 2.08
4-Clorofenol	225	65.43	30.02 ± 3.7	43.55	19.98 ± 1.7
Catecol	275	30.77	35.29 ± 1.5	60.42	69.29 ± 0.01
Triclosan	280	50.68	23.25 ± 5.3	57.66	26.45 ± 0.9
β- Estradiol	280	46.98	53.88 ± 0.8	40.01	45.88 ± 4.37
Bisfenol-A	280	59.88	27.47 ± 2.1	65.03	29.83 ± 1.3
Paratión	275	NR	NR	NR	NR

NR: Reacción no detectada. Los resultados presentados son las medias, ± es la desviación estándar de tres réplicas.

Los tres primeros sustratos de la Tabla 2 corresponden a HPAs. Se ha reportado una correlación entre el potencial de ionización (PI) y la actividad específica de las enzimas. El PI es el valor de energía que se requiere para sustraer un electrón del orbital molecular más alto del compuesto (Canul, 2006).

Se ha determinado un valor de PI umbral para cada enzima: LiP oxida PAHs con un IP ≤ 7.55 eV (Vazquez-Duhalt *et al.* 1994), mientras que la MnP oxida PAHs con un IP hasta de 8.2 eV (Bogan *et al.* 1996). Para la VP se reportó un PI de ≤ 7.42 eV (Wang *et al.* 2003). El IP del fenantreno es superior a 7.42 eV, de tal forma que no pudo ser oxidado por la VP nativa, y tampoco por la W-VP. Mientras que el IP del pireno es 7.42 eV. En lo que respecta al antraceno, Wang *et al.* reportó que la oxidación del antraceno refleja que los grupos metil pueden captar electrones, haciendo que los átomos de carbono adyacentes sean deficientes de ellos y por lo tanto más susceptibles a la oxidación. En este trabajo no se realizó una identificación de los productos de oxidación, sin embargo es bien sabido que los productos principales son sus quinonas correspondientes (Figura 3).

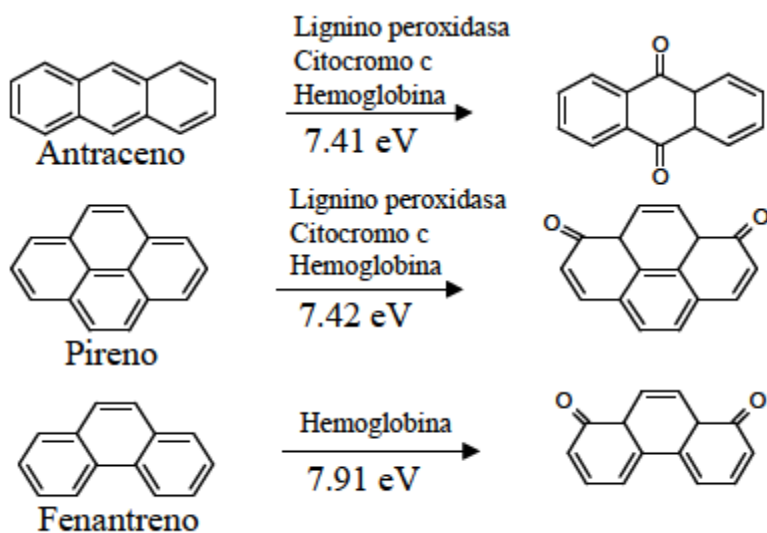


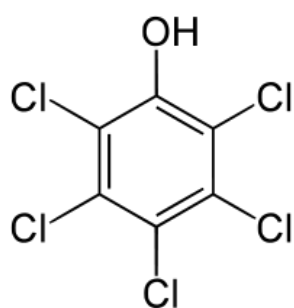
Figura 3. Oxidación de HPAs con hemoproteínas (Canul, 2006).

Tres de los compuestos analizados son disruptores endocrinos (DE): triclosan, bisfenol-A y β -estradiol. Los tres fueron sustrato para las enzimas, sin embargo no hubo diferencias significativas en las actividades específicas de la W-VP y la VP nativa.

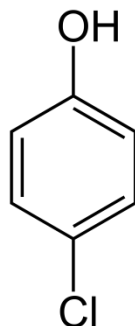
En compuestos fenólicos como el pentaclorofenol tampoco se observaron diferencias razonables. En el catecol se observó que la W-VP fue capaz de transformar aproximadamente el doble de sustrato que la VP nativa. Las actividades específicas fueron 69.29 min^{-1} y 35.29 min^{-1} , respectivamente.

El 4-clorofenol en la VP nativa mostró ligeramente mayor actividad específica que la W-VP, siendo estas 30 y 20 min^{-1} , respectivamente. Ninguna enzima fue capaz de transformar el paratión.

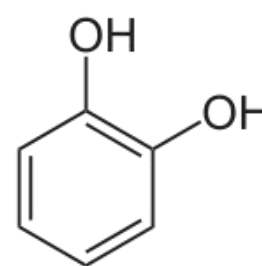
En los controles experimentales, en ausencia de H_2O_2 o enzima, no hubo transformación detectada.



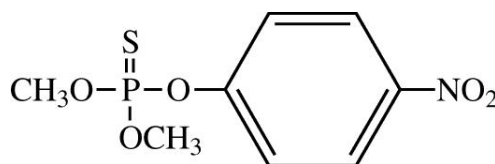
Pentaclorofenol



4-clorofenol



Catecol



Paratión

Figura 4. Estructura química de algunos compuestos fenólicos.

Está documentada la transformación de di, tri, tetra y penta-fenoles clorados (Osman *et al.* 1998). Este proceso se realiza mediante una deshalogenación oxidativa que catalizan las peroxidasas extracelulares (como la VP), y comienza con la creación de radicales libres en el sustrato. Las enzimas son capaces de catalizar la reacción sólo en el carbono de la posición *para* del anillo fenólico. Sustratos como el pentaclorofenol y 4-clorofenol presentaron prácticamente las mismas actividades específicas. Por lo que no se ha encontrado diferencia importante entre la W-VP y la VP nativa.

Dávila-Vazquez *et al.* analizaron varios plaguicidas con la VP de *B. adusta*. Entre ellos el DNOC (2-metil, 4-6-dinitrofenol), el cual posee un grupo $-NO_2$, (grupo aceptor de electrones) en la posición *para* de su anillo fenólico. Al no encontrar actividad de la VP en este sustrato sugirieron que este grupo podría incrementar el PI de la molécula, haciendo que sea más difícil de conseguir el radical libre (Dávila-Vazquez *et al.* 2005). Esto daría respuesta al porqué la VP nativa y la W-VP no transformaron al paratión, el cual posee también un grupo $-NO_2$ en esa posición del anillo fenólico, como se observa en la figura 4.

Colorantes artificiales

Los tres colorantes artificiales fueron sustrato para las enzimas. Las condiciones de reacción fueron pH 4, en ausencia de manganeso. Estas condiciones se han reportado como óptimas para reacciones lignino-peroxidasa (independientes de Mn^{2+}) (Tinoco *et al.* 2007).

Es bien conocido que la VP de *B. adusta* tiene al menos dos sitios de unión del sustrato a la proteína; un sitio de unión del manganeso y un sitio activo localizado en el residuo superficial, como se mencionó anteriormente. Para sustratos de muy alto peso molecular incapaces de llegar al grupo hemo, la oxidación se lleva a cabo en este residuo superficial, en el cual los electrones son conducidos a través de un camino intramolecular al grupo hemo de la enzima.

Tabla 3. Actividades específicas de la VP nativa y W-VP para tres diferentes colorantes artificiales. Los resultados presentados son las medias, \pm es la desviación estándar de tres réplicas.

Sustrato	λ_{\max} (nm)	Actividad VP (min^{-1})	Actividad W-VP (min^{-1})
Negro ácido 194	575	1704.6 \pm 290	2260.56 \pm 95
Azul reactivo 198	625	349.36 \pm 27	193.48 \pm 92
Azul brillante de Remazol R	592	243.36 \pm 51	937.87 \pm 25.81

En la tabla 3 se observan los resultados de los experimentos. Se puede observar que la W-VP presentó una mayor actividad específica en el azul brillante de Remazol R (figura 5), con más de tres veces actividad que la VP nativa. No obstante para el Negro ácido 194 es confuso, ya que la desviación estándar en la W-VP es muy grande, aunque se observa un pequeño incremento en la actividad específica. Esto se debe a un mayor número de sitios activos, como se ha dicho anteriormente. Tinoco y colaboradores reportaron que el Trp172 superficial está involucrado en la decoloración de colorantes industriales en la VP, de acuerdo a una vía de transferencia electrónica de largo alcance (*long-rate electron transfer*, LRET) (Tinoco *et al.* 2007). Esto significa que para esos sustratos, el aumento de Trp superficiales incrementó la actividad, aunque este cambio no sea el esperado.

El mayor reto en la degradación enzimática de colorantes es que éstos tienen una muy amplia diversidad de estructuras químicas.

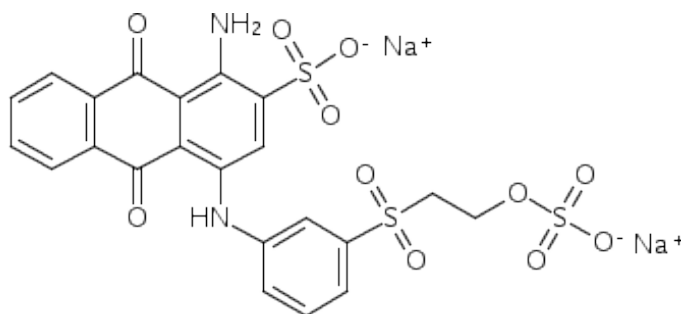
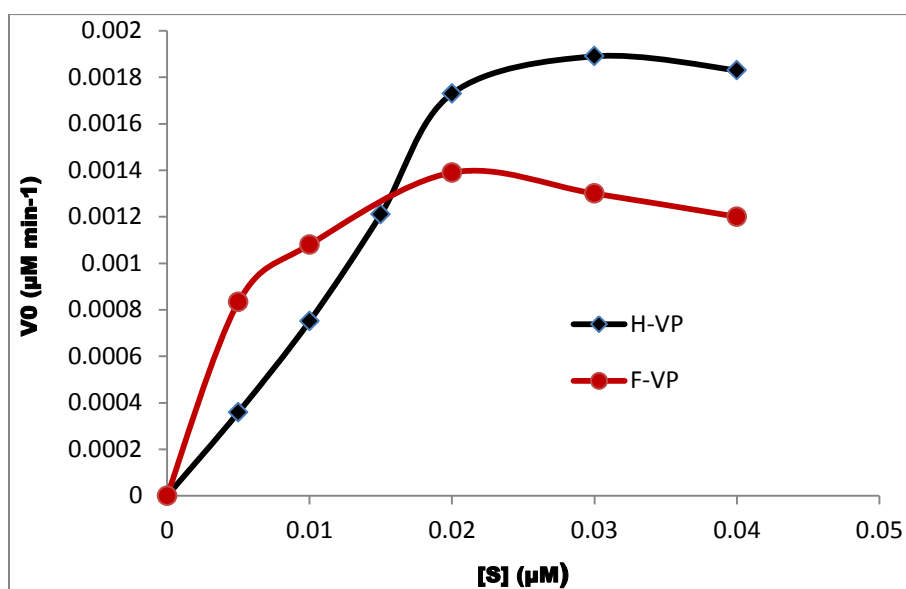


Figura 5. Estructura química de azul brillante de Remazol R.

Degradación de un colorante industrial con H-VP y F-VP

Debido a la poca diferencia entre las actividades específicas de la W-VP y la VP nativa en HPAs, DE y plaguicidas, se optó por estimar los parámetros cinéticos de otras variantes de VP modificadas teniendo como sustrato un colorante artificial. La primera de ellas, modificada con histidina (H-VP) y la segunda con fenilalanina (F-VP). Se implementó el mismo protocolo en las modificaciones utilizado para la W-VP. Se midió la concentración por banda Soret, y se ajustó para igualar sus concentraciones con la de la W-VP (1.35×10^{-9} mol/ml). Posteriormente se llevaron a cabo las reacciones enzimáticas y los resultados se compararon con los reportados por Sánchez-Alejandro y colaboradores para la VP nativa.

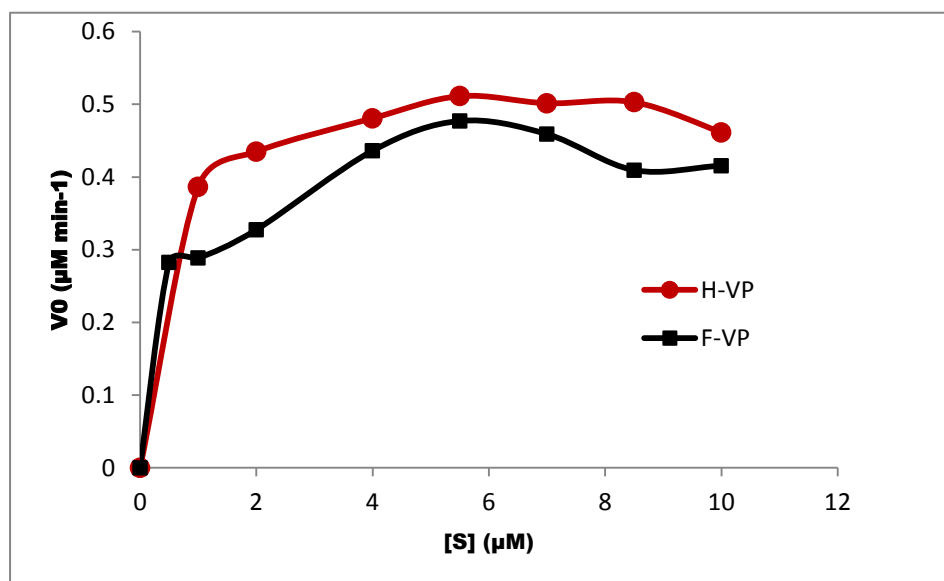


Gráfica 1. Curvas de Michaelis-Menten para la H-VP y F-VP, en donde se varió la concentración del sustrato: azul brillante de Remazol R.

La caracterización cinética de las enzimas modificadas se realizó mediante la medición de las velocidades iniciales de oxidación con el sustrato azul brillante de Remazol R. Para el cálculo de la K_M del sustrato se varió la concentración de éste, manteniendo la misma concentración de enzima y una concentración final de H_2O_2 de 1 mM (Gráfica 1). Para calcular la K_M del H_2O_2 se fijó una cantidad de sustrato y

se varió la concentración del H_2O_2 , conservando la concentración de enzima (Gráfica 2).

Las constantes catalíticas se calcularon con el modelo de Michaelis-Menten usando una regresión no lineal.



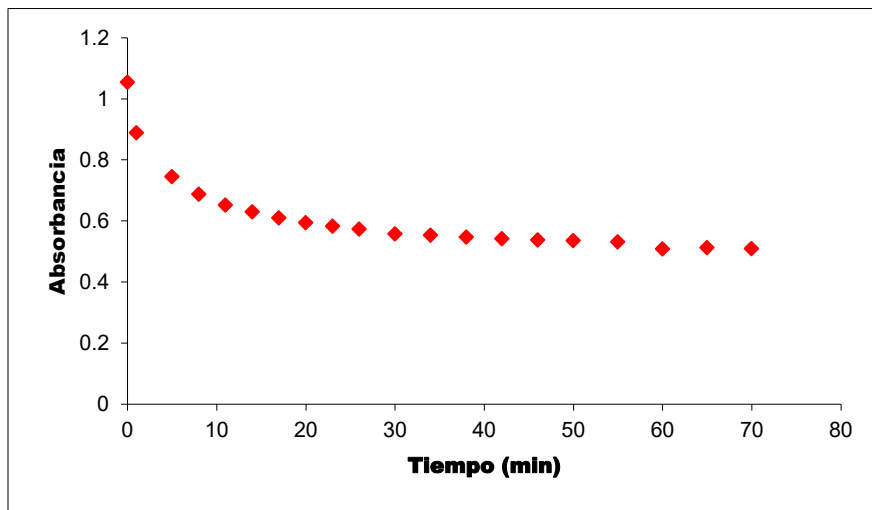
Gráfica 2. Curvas de Michaelis-Menten para la H-VP y F-VP, en donde se varió la concentración del H_2O_2 .

Se define la K_M como la concentración del sustrato a la que: $V = \frac{V_{m\acute{a}x}}{2}$.

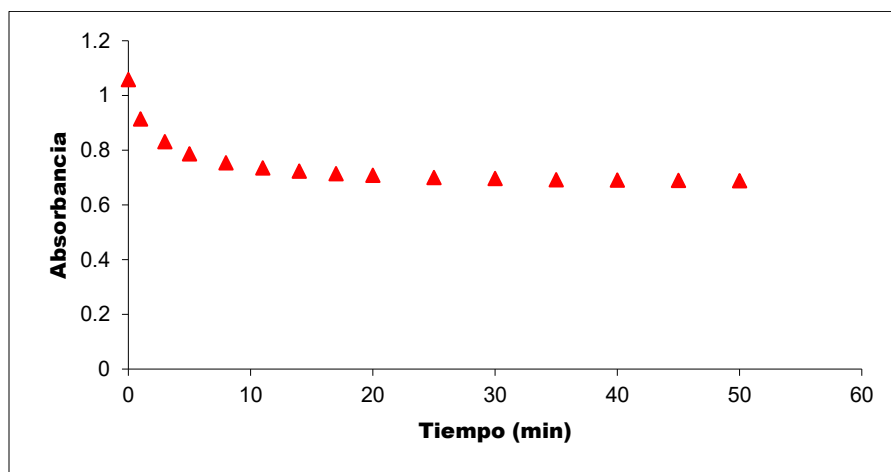
Con el ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten, es posible determinar la K_M y la k_{cat} .

Cálculo del *total turnover number* (TTN)

El TTN es el número moléculas de sustrato transformadas por moléculas de enzima, hasta la completa inactivación de la misma. Esta reacción se realizó en 10 ml que contenían 1 mM de H₂O₂. Se monitoreó la reacción hasta que no se detectó cambios en la absorbancia. Las curvas para ambas enzimas se muestran en las gráficas 3 y 4.



Gráfica 3. TTN de la H-VP.



Gráfica 4. TTN de la F-VP.

Para estimar el valor del TTN se toma en cuenta el ΔA , que es el valor más alto de Abs menos el mínimo, dividido entre el ϵ del sustrato, en este caso del azul brillante de Remazol R ($8480 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Este valor a su vez es dividido entre la cantidad de moles de enzima VP agregados. Se tomó en cuenta un coeficiente de extinción molar de la VP $\epsilon = 203,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los resultados se pueden ver en la tabla 4.

Tabla 4. Constantes catalíticas de VP y sus modificaciones con el sustrato azul brillante de Remazol R.

Enzima	Sustrato	H_2O_2			Sustrato			$t_{1/2}$ (min)	TTN
		k_{cat} (min^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M ($\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)	k_{cat} (min^{-1})	K_M (mM)	k_{cat}/K_M ($\text{min}^{-1} \text{mM}^{-1}$)		
VP*	Azul brillante de Remazol R	1060 \pm 69	3.7 \pm 1.3	287	681 \pm 61	0.01 \pm 0.003	68100	3.2	2140 \pm 123
W-VP*		1600 \pm 118	155 \pm 80	10	1659 \pm 113	0.01 \pm 0.002	165900	6.3	3300 \pm 56
H-VP		803 \pm 47	420 \pm 150	1.91	630 \pm 42	0.01 \pm 0.002	63000	3.2	2009 \pm 83
F-VP		686 \pm 41	570 \pm 90	1.20	450 \pm 14	0.005 \pm 0.002	90000	1.9	1456 \pm 210

* Valores publicados por Sánchez-Alejandro *et al.* (2016).

La F-VP mostró una disminución en la actividad catalítica del 24%, mientras que la H-VP disminuyó 35% cuando las comparamos con la VP nativa (Tabla 4). La actividad catalítica de la W-VP se incrementó un 51% como reportó Sánchez-Alejandro. Las eficiencias catalíticas del H_2O_2 disminuyeron a menos del 1% en ambas enzimas modificadas (H-VP y F-VP). La reducción en la k_{cat} de las enzimas modificadas puede deberse a un decremento de la velocidad de transferencia de los electrones entre el sustrato y el grupo hemo.

La k_{cat}/K_M indica la eficiencia catalítica de la enzima a concentraciones de sustrato por debajo de los niveles de saturación. Un mayor valor de ésta significa que es mejor sustrato para la enzima. Se reportó que en la W-VP el incremento fue el doble de eficiencia que la VP nativa. En la enzima F-VP el aumento corresponde a

un 32% y en la H-VP se registró una disminución del 7.5% en la k_{cat}/K_M . En cuanto al tiempo de vida media, no se encontraron cambios significativos en ninguna modificación de la enzima.

Los valores del TTN tampoco fueron favorecedores. En la H-VP no se observó cambio significativo, mientras que en la F-VP hubo una disminución del número de moléculas degradadas por moléculas de enzima. Estos resultados dan lugar a que los Trp son la mejor opción de modificación química de la VP, a comparación de la His y la Phe. Como trabajo a futuro sería conveniente realizar EPR a las enzimas H-VP y F-VP con el fin de corroborar la presencia de la formación de radicales adicionales.

4. CONCLUSIONES

Al comparar la actividad específica de la VP nativa y W-VP en diferentes sustratos (HPAs, disruptores endocrinos, plaguicidas) no se observaron diferencias significativas en su rendimiento catalítico.

Solamente los HPAs no fueron transformados por ningún enzima. Y aunque no se incrementó la capacidad de degradación de las enzimas contra los demás sustratos, se comprobó que la W-VP no pierde la capacidad de degradación, ya que los valores de actividad fueron muy parecidos entre ambas enzimas.

La modificación superficial de la VP con aminoácidos (His y Phe) tampoco resulto favorecedor. Sin embargo fue posible obtener enzimas modificadas que no perdían del todo la capacidad de oxidación contra colorantes artificiales.

Por último, al comparar las tres modificaciones de la VP, se comprobó que la W-VP muestra mayor rendimiento en comparación que la H-VP y F-VP para el sustrato azul brillante de Remazol R.

5. PERSPECTIVAS

Son muchas las áreas de aplicación de las enzimas. Una de ellas, el área ambiental presenta grandes ventajas que las hace un objeto de estudio permanente, como lo es la no generación de productos tóxicos o un menor costo de producción. Las enzimas tienen diferentes modos de actuar ya que pueden operar intracelularmente, es decir, en presencia o en el interior de las células originarias; y extracelularmente, ya sea en presencia o ausencia de sus células originarias. También pueden encontrarse ligadas por medio de diferentes enlaces a una matriz sólida, es decir inmovilizadas.

Por sus características, la VP es una enzima única cuyo estudio comenzó hace aproximadamente 20 años. Eso implica que aún existen muchas interrogantes en la potencialidad de ésta enzima.

Un aspecto positivo de este trabajo fue que se obtuvieron diferentes modificaciones de la enzima VP con aminoácidos aunque estos no hayan mejorado la actividad enzimática. Sin embargo, aún quedan varias alternativas de investigación, como lo es inmovilizar la enzima y/o sus modificaciones, así como el uso de nanopartículas para evaluar y mejorar su actividad y así, hacer posible su uso a nivel industrial.

Un trabajo a corto plazo con la VP, como anteproyecto de tesis para la maestría, es la inmovilización de ésta en “supercages” de $\text{Cu}(\text{OH})_2$, debido a que se reportó que estas estructuras por si solas funcionan como un sistema enzimático artificial, con un rendimiento catalítico mayor que la HRP.

Es necesario explorar más alternativas para lograr una mayor eficiencia en la degradación de sustratos tóxicos, y así avanzar en la solución de un gran problema mundial como lo es la contaminación ambiental.

6. REFERENCIAS

- **Aitken, M. D.** (1993). Waste treatment applications of enzymes: opportunities and obstacles. *Chem Eng J* 1993;52: B49–58.
- **Ang, E. L., Zhao, H., Obbard, J. P.** (2005). Recent advances in the bioremediation of persistent organic pollutants via biomolecular engineering. *Enzyme Microb. Technol.* 37, 487-496.
- **Ayala Aceves M., Bartto M.C., Basosi R., Vazquez-Duhalt R., Pongi R.** (2001). Spectroscopic characterization of a manganese–lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera adusta* in the absence of manganese: evidence of a protein centred radical by hydrogen peroxide. *J. Mol.Catal. B Enzym.* 16. 159–167.
- **Bogan, B.W., Schoenike, B., Lamar, R.T., Cullen, D.** (1996). Manganese peroxidase mRNA and enzyme activity levels during bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarboncontaminated soil with *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2381–2386.
- **Camarero S. et al.** (2005) Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1775-1784.
- **Canul, Juan Carlos.** (2006). Modificación química *ex-situ* del grupo hemo de la peroxidasa versátil de *Bjerkandera adusta* y el efecto en su actividad enzimática. (Tesis de Maestría). Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos, México.
- **Cerniglia, C.E.** (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodeg.* 3: 351-368
- **Davila-Vazquez G., Tinoco R., Pickard M. A., Vazquez-Duhalt R.** (2005). Transformation of halogenated pesticides by versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta* *Enzyme Microb. Technol.* 36. p. 223.
- **Gianfreda, L., Bollag, J.-M.** (2002). Isolated enzymes for the transformation and detoxification of organic pollutants. In: R.G. Burns, R. Dick (eds). *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications*. Marcel Dekker, New York, pp: 491-538.
- **Guerra-Rivera, G., Ramos-Leal, M., Sánchez-Reyes, A., Domínguez-Guilarte, O., Argüelles-Álvarez, J., Manzano-León, A., Sánchez-López, M.** (2011). Degradación

biológica de contaminantes orgánicos persistentes por hongos de la podredumbre blanca. Revista CENIC. Ciencias Biológicas, 42

- **Hernández-López, E. Lorena.** (2011). Diseño de un biocatalizador tricomponente para desulfuración en medios orgánicos. (Tesis de Maestría). Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos, México.
- **K. T. Chung, S.E. Stevens, C.E. Cerniglia.** (1992). The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. *Crit. Rev. Microbiol.* 18. 175
- **Martínez, M.J., Ruiz-Dueñas, F.J., Guillén, F. and Martínez, A.T.** (1996). *Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from Pleurotus eryngii.* *Eur. J. Biochem.* **237** (2): 424–432.
- **Moreira, P.R., Bouillenne E., Almeida-Vara E., Malacata F.X., Frere J.M., Cardoso Duarte J.** (2006). *Enzyme and Microbial Technology.* 38. 28–33.
- **Nicell, J. A.** (2006). Environmental applications of enzymes. Department of Civil Engineering and Applied Mechanics, McGill. University. Quebec. Canada.
- **Ortega Elorza, Laura E.** (2011). Contaminación ambiental en México por plaguicidas persistentes y su relación con problemas de salud durante el desarrollo prenatal y la infancia. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- **Osman A. M., Posthumus M. A., Veeger C., Laane C., Rietjens IMCM.** (1998). Conversion of pentahalogenated phenols by microperoxidase-8/H₂O₂ to benzoquinone-type products. *Chem Res Toxicol.* 11:1319–25
- **Pakshirajan K, Rene E.R. and Ramesh A.** (2014) Biotechnology in environmental monitoring and pollution abatement, *BioMed Research International*, Volume 2014, Article number 235472.
- **Pérez-Boada, M., Ruiz-Dueñas, F. J., Pogni, R., Basosi, R., Choinowski, T., Martínez, M. J., Piontek, K. and Martínez, A. T.** (2005). Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways. *J. Mol. Biol.* 354: 385-402.
- **Pogni R., Baratto M. C., Giansanti S., Teutloff C., Verdin J., Valderrama B., Lenzian F., Lubitz W., Vazquez- Duhalt R., Basosi R.** (2005). Tryptophan-based radical in the catalytic mechanism of versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. *Biochemistry.* 44 4267–4274.

- **Rao, M.A, Scelza, R, Scotti, R, & Gianfreda, L.** (2010). Role of enzymes in the remediation of polluted environments. *Journal of soil science and plant nutrition*, 10(3), 333-353.
- **Sánchez-Alejandro F., Juárez-Moreno K., Baratto M.C., Basosi R., Vazquez-Duhalt, R.** (2016). Tryptophan-surface modification of versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta* enhances its catalytic performance. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 124, 45–51
- **Sanders, S.** (2004). *Lo Esencial En Sistema Endocrino Y Aparato Reproductor*. Segunda edición. Elsevier. Madrid, España. ISBN: 84-8174-699-1.
- **Shoemaker, H. E. and Leisola, M. S. A.** (1990). Degradation of lignin by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biotechnol.* 13: 101-109.
- **Solís Segura, L., López Arriaga, J. A.** (2006). *Principios básicos de contaminación ambiental*. Primera Edición. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México. ISBN: 9688358134
- **Tinoco R, Verdin J, Vazquez-Duhalt R.** (2007). Role of oxidizing mediators and tryptophan 172 in the decoloration of industrial dyes by the versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 46, 1–7.
- **Torres E., Bustos-Jaimes, I. y Le Borgne, S.** (2003). Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Appl. Catal. B: Environ.* 46: 1-15.
- **Torres-Duarte C.** (2012). *Transformación enzimática de disruptores endocrinos: aplicación a sistemas de acuicultura*. Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- **Uribe Álvarez, C.** (2010). *Determinación de Hidrocarburos policíclicos aromáticos en muestras de aceite comestible por medio de espectroscopia de fluorescencia*. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- **Valderrama B, Ayala M. and Vazquez-Duhalt R.** (2002). Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. *Chemistry and Biology*, 9, 555-565.
- **Vazquez-Duhalt, R., Westlake, D.W.S., and Fedorak, P.M.** (1994). Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 459– 466.