



Acta Universitaria

ISSN: 0188-6266

actauniversitaria@ugto.mx

Universidad de Guanajuato

México

Camacho-Morales, Reyna Lucero; Durón-Castellanos, Areli; Flores-Martínez, Alberto; Zazueta-Sandoval, Roberto
Actividades dihidrodiol-deshidrogenasa en *Mucor circinelloides* YR-1 aislada de suelo contaminado con petróleo
Acta Universitaria, vol. 20, núm. 3, diciembre, 2010, pp. 45-50
Universidad de Guanajuato
Guanajuato, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=41618860006>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Actividades dihidrodiol-deshidrogenasa en *Mucor circinelloides* YR-1 aislada de suelo contaminado con petróleo

Reyna Lucero Camacho-Morales*, Areli Durón-Castellanos*, Alberto Flores-Martínez*, Roberto Zazueta-Sandoval*

RESUMEN

Después de crecer células de la cepa YR-1 de *Mucor circinelloides* en naftaleno como única fuente de carbono, fue revelada la presencia de cinco actividades: 1, 2-dihidroxi-1, 2-dihidro-naftalenediol deshidrogenasa mediante zimogramas electroforéticos, utilizando (+)-cis-1(R), 2(s)-dihidroxi-1, 2-dihidronaftaleno como sustrato y NADP⁺ como aceptor de electrones. Las bandas NDD1, NDD3 y NDD5 que mostraron una mayor intensidad en los zimogramas y por su movilidad electroforética, fueron purificadas a homogeneidad por pasos secuenciales de electroforesis-electroelución para conocer tanto el peso molecular, como el número de subunidades que conforman a cada banda de actividad. Los resultados mostraron pesos moleculares de 98.64 kDa, 48.87 kDa y 102.45 kDa, para cada subunidad respectiva. Se concluye que las actividades no son isoformas conformadas por la misma subunidad proteica, las enzimas nativas son homopoliméricas y no contienen subunidades protoméricas compartidas.

ABSTRACT

After the growth of cells of strain YR-1 of *Mucor circinelloides* with naphthalene as sole carbon source, the presence of five different 1, 2-dihydroxi-1, 2-dihydro-naphthalenediol dehydrogenase activities were revealed by electrophoretic zymograms using (+)-cis-1(R), 2(s)-dihydroxi-1, 2-dihydronaphthalene as substrate and NADP⁺ as electron acceptor. The bands NDD1, NDD3 and NDD5 showing the highest intensity in the zymograms and by their relative electrophoretic mobilities, were purified to homogeneity by means of sequential steps of electrophoresis-electroelution to know both, the molecular weight and the number of subunits that conform each activity band. The results show molecular weights of 98.64 kDa, 48.37 kDa and 102.45 kDa for the subunit of each protein band respectively. We conclude that these activities there are not enzymatic isoforms conformed by the same proteic subunit, the native enzymes have a homopolymeric structure and they do not share any protomeric subunit.

Recibido: 12 de mayo de 2010
Aceptado: 2 de octubre de 2010

INTRODUCCIÓN

La habilidad de los microorganismos para biodegradar hidrocarburos aromáticos y usarlos como fuente de carbono, depende de la presencia de al menos dos sustituyentes hidroxilo en alguno de los anillos de los hidrocarburos poliaromáticos (Dagley, 1971). Las reacciones iniciales del mecanismo de biodegradación de hidrocarburos

Palabras clave:
dihidrodiol deshidrogenasa; *mucor circinelloides*; biodegradación; naftaleno.

Keywords:
dihydrodiol dehydrogenase; *mucor circinelloides*; biodegradation; naphthalene.

puede ser representada por la secuencia general mostrada en la figura 1, la cual ha sido demostrada en forma total o parcial para más de 130 sustratos aromáticos distintos (Rogers y Gibson, 1977). Es claro que las enzimas denominadas dihidrodiol-deshidrogenasas que catalizan el segundo paso de la ruta donde se obtiene el "diol" a partir del dihidrodiol correspondiente, son un grupo de enzimas que tienen un papel importante en la biodegradación de muchos compuestos aromáticos (Rogers y Gibson, 1977).

* Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato. Universidad de Guanajuato. Noria Alta s/n C.P. 36050. Guanajuato. Gto. Tel (473)732 0006 ext. 8148. Fax. Ext. 8153. Correo electrónico: zazueta@quijote.ugto.mx.

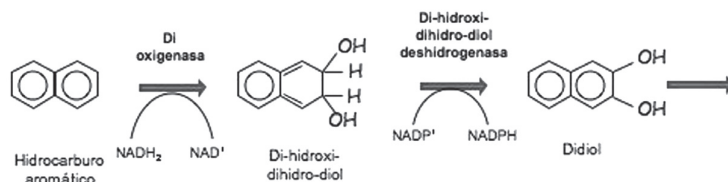


Figura 1. Esquema de la posible ruta de biodegradación de los hidrocarburos aromáticos, iniciando con una reacción catalizada por una enzima di-oxigenasa, seguida por una reacción catalizada por una di-hidrodiol-deshidrogenasa.

Particularmente en hongos, se ha demostrado que poseen la habilidad de metabolizar compuestos aromáticos en una forma similar a la descrita para células de mamífero (Ferris *et al.*, 1973; Smith y Rosazza, 1974) en las que se ha establecido su dependencia para usar el NADP^+ como aceptor de electrones, a diferencia de las células bacterianas que son NAD^+ dependientes. No obstante, existen escasos reportes en la literatura acerca de estudios sistemáticos de las dihidrodiol-deshidrogenasas fúngicas y prácticamente ninguno en mucorales, así como tampoco existen reportes acerca de la detección de éstas enzimas por medio de zimogramas electroforéticos.

Con los estudios del metabolismo de hidrocarburos, tanto alifáticos (Silva *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2009) como aromáticos (Zazueta *et al.*, 2003), realizados por nuestro grupo de trabajo con la cepa YR-1 de *Mucor circinelloides* que fue aislada de suelo contaminado con petróleo en las cercanías de la refinería de PEMEX en Salamanca, Gto., se ha establecido la importancia que tienen las enzimas que catalizan tanto el primero como el segundo paso en la biodegradación de ambos tipos de compuestos.

El objetivo principal del presente trabajo es conocer el efecto del naftaleno usado como fuente de carbono sobre la morfología y demostrar la presencia de enzimas dihidrodiol deshidrogenasa en el hongo filamentoso *Mucor circinelloides* cepa YR-1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo de estudio

La cepa YR-1 *Mucor circinelloides* fue aislada de muestras de suelo contaminado con petróleo de los alrededores de la refinería de Salamanca, Gto.

Medios de cultivo

YPG: Extracto de levadura 0.3 %; peptona 1 %; glucosa 2 %; H_2O cbp 1 L; pH 4.5 (Bartnicki-Garcia y Nickerson, 1962). Este mismo medio adicionado de agar (1.5 %) fue utilizado como medio de almacenamiento. MMSP: Medio mínimo de sales (modificación del medio mínimo de Lee: KH_2PO_4 2.5 g; MgSO_4 0.2 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g; NaCl 5 g; peptona de caseína al 0.1 %; H_2O cbp 1 L. El medio para crecimiento, fue complementado con diferentes fuentes de carbono: Glucosa (BIOXON) usada como control de comparación morfológica y n-Naftaleno (SIGMA-ALDRICH).

Obtención de esporas

Se sembraron esporas del hongo en placas de Petri conteniendo medio de cultivo YPG pH 4.5 adicionado con agar al 2 %, las cuales se incubaron por 5 días a 28 °C. Las esporas se cosecharon bajo condiciones de esterilidad y se lavaron con agua destilada estéril de 3-5 veces. Finalmente fueron resuspendidas en un volumen mínimo de agua destilada estéril. La concentración de esporas se obtuvo por el conteo en una cámara de Neubauer y posteriormente se almacenaron en congelación a -20 °C.

Propagación en medio líquido

Matraces de 2 L conteniendo 600 ml de medio MSP suplementados con 1 % v/v, cada una de las fuentes de carbono a probar fueron inoculados con una suspensión de esporas para dar una concentración final de 10^5 esp/ml. Los matraces se incubaron a 28 °C por 22 h, con una agitación de 120 rpm. Las células de cada cultivo se colectaron por filtración a través de papel Whatman no. 1. Las células obtenidas de los respectivos cultivos fueron resuspendidas en un volumen mínimo de solución amortiguadora de rompimiento (Tris-HCl 50 mM pH 8.5 conteniendo 1mM de fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF), se adicionaron 3 ml de perlas de vidrio de 0.45 mm - 0.60 mm de diámetro y se procedió al rompimiento balístico en un homogenizador de células tipo Braun modelo MSK (Braun Melsungen, RFA) por 4-6 periodos de 1 min, empleando una corriente de CO_2 líquido para mantener baja la temperatura (4 °C). El homogenado celular obtenido se sometió a centrifugación a 104 450xg (40k = 40 mil revoluciones/min) a 4 °C, durante 1h. La pastilla obtenida, formada por la fracción mixta de membranas (p40k) fue descartada y el sobrenadante o fracción soluble (s40k), fue recuperada en alícuotas de 1 ml y fueron guardadas a -70 °C para experimentos posteriores.

Micro-cultivos

Se realizaron micro-cultivos del hongo en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono, utilizando un soporte de vidrio en "v" dentro de una placa de Petri, conteniendo un portaobjetos la cual fue esterilizada a 121 °C por 15 min en autoclave. Bajo condiciones de esterilidad se colocó sobre el portaobjetos un cubo de medio de cultivo sólido (0,5 cm por lado), el cual fue inoculado con esporas frescas (una semana de antigüedad) y se incubó a 28 °C hasta aparición de micelio.

Determinación de proteína

La determinación de proteína se efectuó por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), interpolando los valores de absorbencia a 750 nm, en una curva de calibración preparada de 0 µg a 100 µg de albúmina bovina.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se utilizó el método descrito por Laemli (1970). Para condiciones nativas (PAGE) al 6 % de acrilamida, se omitió el SDS y la muestra no fue calentada. Para revelar los patrones proteicos después de un corrimiento electroforético, los geles se tiñeron con nitrato de plata (Wray *et al.*, 1980).

Zimogramas de la actividad de dihidro-diol-deshidrogenasa

No existen reportes previos acerca de la detección de dihidrodiol-deshidrogenasas en geles. Los posibles electromorfos con actividad de dihidro-diol-deshidrogenasa se detectaron por medio de modificaciones (Durón *et al.*, 2005) realizadas al método descrito por Nikolova *et al.* (1991). Brevemente: después de la electroforesis el gel fue sometido a inmersión durante 120 min en una solución de revelado cuya composición es: metosulfato de fenacina (PMS), 0.5 mg; *p*-nitroazul de tetrazolio (PNAT), 7.5 mg; NADP⁺, 14.34 mg; Tris-HCl 50 mM de pH 8.5, 24 ml y 0.02 moles de sustrato que en este caso fue el (+)-cis-1(R), 2(s)-dihidroxi-1, 2-dihidronaftaleno (naftalendiol).

Microscopía

Muestras de células crecidas en las diferentes fuentes de carbono fueron observadas al microscopio de luz modelo Axioskop Carl Zeiss y documentada su morfología por fotografía directa, usando una cámara acoplada Axiocam MRc Carl Zeiss.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis fisiológico

Inicialmente se investigó la morfología del hongo cuando fue crecido en un medio mínimo de sales adicionado con glucosa (control) o naftaleno como únicas fuentes

de carbono, tanto en medio sólido, como en medio líquido. En el medio sólido con glucosa el crecimiento micelital fue masivo, observándose gran cantidad de esporangios (figura 2a).

Con el objeto de realizar las observaciones de las estructuras de los esporangios con mayor detalle, se realizaron micro-cultivos del hongo. En la figura 2 b y 2c se observan los detalles del esporangióforo. El efecto del naftaleno sobre el crecimiento en medio sólido no se pudo realizar, ya que técnicamente no fue posible incorporar en forma homogénea el hidrocarburo al medio de cultivo, por lo que se realizaron experimentos de crecimiento en medio líquido utilizando naftaleno (figura 2d) y glucosa (figura 2e), donde es clara la diferencia que presenta el desarrollo del hongo tanto en la cantidad de masa celular, como en la morfología que presentan las hifas.

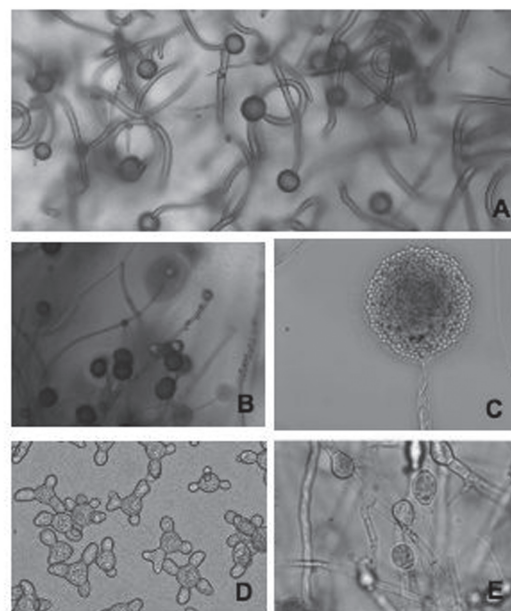


Figura 2. Patrones morfológicos de la cepa YR-1 de *Mucor circinelloides*. **A**, crecimiento en placa en medio mínimo de sales sólido, adicionado de glucosa al 0.5 %, como única fuente de carbono, detalle de los esporangios. Aumento 400x. **B y C**, estructuras de los esporangios en micro-cultivos en medio de sales con glucosa como única fuente de carbono. Aumento 400x. **D y E**, crecimiento de YR-1 en medio líquido de sales, con naftaleno (0.5 %) y glucosa (0.5 %) como fuentes de carbono respectivamente, incubando por 18 h. Aumento 400x.

Detección de las actividades dihidro-diol-deshidrogenasa

Con el objeto de establecer el número de posibles enzimas con actividad de dihidrodiol-deshidrogenasa presentes en la cepa YR-1, ésta se creció en un medio de sales con naftaleno como única fuente de carbono. Se obtuvo el extracto libre de células (s40k), el cual fue sometido a electroforesis en condiciones

nativas y las actividades enzimáticas fueron reveladas con naftalendiol como sustrato y NADP⁺ como aceptor de electrones. Es importante resaltar el hecho de que, en la literatura no existen informes en los que se haya descrito el uso de zimogramas electroforéticos para la visualización *in situ* de ninguna actividad enzimática del tipo de las dihidrodiol deshidrogenasas, incluyendo las naftalendiol deshidrogenasas descritas tanto en bacterias (Bollag *et al.*, 1975; Gibson *et al.*, 1975), como en hongos (Cerniglia y Gibson, 1977), lo que implica que éste es el primer informe donde se visualizan las actividades mencionadas por medio de un zimograma. En la figura 3 se puede observar el resultado de un corrimiento electroforético típico, en donde se aprecia que en los extractos libres de células de la cepa YR-1 se detectaron cinco diferentes electromorfos con actividad de naftalendiol deshidrogenasa (carril 1) y, tomando como base la movilidad electroforética que presentan y por el tipo de sustrato empleado para su detección (naftalendiol), fueron designadas como naftalendiol deshidrogenasas (NDD) de la 1 a 5 respectivamente. Los carriles 2 y 3 corresponden a los controles negativos del experimento: sin el sustrato para revelar la actividad enzimática (carril 2) o con el extracto enzimático calentado a ebullición (carril 3), en los que no se observa ninguna banda, lo que implica que las bandas observadas en el carril 1 corresponden a especies químicas de naturaleza proteica que utilizan el naftalendiol como sustrato. Como complemento a este resultado se calcularon las movilidades relativas (*Rf*) y se realizó la estimación de la actividad enzimática por medio del análisis densitométrico de la intensidad de cada una de las bandas de actividad (tabla 1). Los resultados muestran que la NDD3 fue la de mayor actividad, siguiéndole la NDD1, lo que sugiere una mayor afinidad de estas enzimas por el naftalendiol.

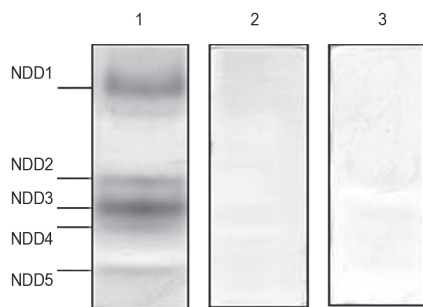


Figura 3. Zimogramas de actividad de las dihidrodiol deshidrogenasas. Las actividades enzimáticas fueron reveladas con naftalendiol como sustrato y NADP⁺ como aceptor de electrones. Carriles: 1, extracto s40k; 2, extracto s40k, sin adición de sustrato; 3, extracto s40k calentado a ebullición por 5 minutos. En todos los carriles se cargaron 600 µg de proteína. Las siglas a la izquierda de la figura, indican las diferentes actividades NDD.

Tabla 1.

Presencia de actividades dihidrodiol-deshidrogenasa (NDD) NADP⁺-dependientes en extractos libres de células (S40k) de la cepa YR-1 de *Mucor circinelloides*, crecida en naftaleno como fuente de carbono, usando naftalendiol como sustrato enzimático

Isoenzima	Unidades Relativas de Intensidad ^a	<i>Rf</i> ^b
NDD1	74.7	0.21 ± 0.01
NDD2	44.9	0.56 ± 0.012
NDD3	100.0	0.67 ± 0.008
NDD4	43.4	0.73 ± 0.02
NDD5	31.7	0.89 ± 0.02

^a Unidades densitométricas relativas a la banda NDD3, correspondiente a 100%
^b *Rf* = promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

$$Rf = \frac{\text{Distancia migrada por la banda de actividad}}{\text{Distancia migrada por el frente del colorante}}$$

La desviación estándar fue calculada con el promedio de tres experimentos independientes y cada uno ellos fue realizado por triplicado.

Peso molecular de las subunidades que conforman a las distintas Actividades NDD

Habiéndose detectado 5 diferentes bandas de actividad, se planteó la pregunta si todas ellas podrían ser isoenzimas o isoformas de la misma enzima. Para tratar de elucidar si las actividades NDD reveladas por actividad enzimática en zimograma eran enzimas diferentes, se decidió investigar en función del peso molecular el tipo de sub-unidad(es) que conformaban a cada banda de actividad. Se seleccionaron las bandas correspondientes a las NDD1, 3 y 5, en base a la intensidad de cada banda de actividad y su movilidad relativa. Las bandas seleccionadas se purificaron por medio de su electroelución de un gel nativo y los electroeluidos fueron sometidos a PAGE-SDS para determinar sus patrones proteicos tiñendo con nitrato de plata. En la figura 4 se observa el resultado correspondiente a las muestras purificadas de las NDD1, 3 y NDD5, donde es claro que el método de purificación es muy efectivo para obtener muestras proteicas de alto grado de pureza, ya que, en todos los casos se detectó sólo una banda de proteína tiñendo por plata, el cual es un criterio de alto valor para evaluar la eficiencia de los métodos bioquímicos para la purificación de proteínas. Utilizando proteínas de referencia de peso molecular conocido, se calcularon los pesos moleculares de las posibles subunidades que conforman a las

NDD1, 3 y 5, obteniéndose los valores de 98.64 kDa, 48.87 kDa y 102.45 kDa respectivamente (tabla 2). Es claro que en función de los pesos moleculares mostrados por cada una de las proteínas purificadas, las diferentes NDD's están conformadas por un solo tipo de subunidad de distinto peso molecular para cada una, lo que implica que se trata de proteínas homopoliméricas diferentes, todas con actividad de dihidrodiol deshidrogenasa, es decir isoenzimas.

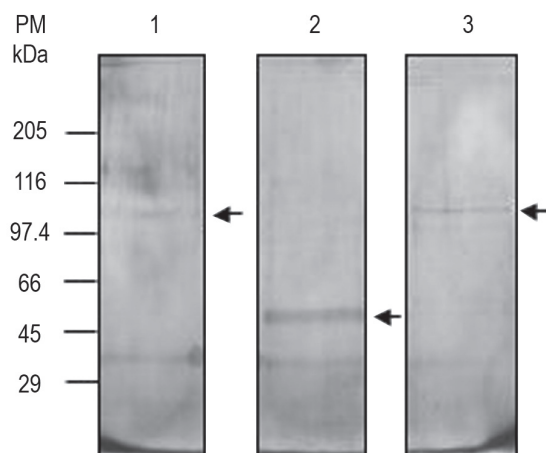


Figura 4. Patrones proteicos de las NDD's, teñidos con nitrato de plata. Carriles: 1, NDD1; 2, NDD2; 3, NDD3. En todos los carriles se ajustó la cantidad de proteína a 20 µg. Las flechas indican las bandas de proteína que corresponden a las subunidades que conforman cada enzima.

Tabla 2.

Cálculo del peso molecular de las subunidades proteicas de las diferentes dihidrodiol-deshidrogenasa (DHD) NADP⁺-dependientes en extractos libres de células (S40k) de la cepa YR-1 de *Mucor circinelloides*, crecida en naftaleno como fuente de carbono.

Isoenzima	Peso molecular (kDa)	Rf ^a
NDD1	98.64 ± 1.5	0.42 ± 0.03
NDD3	48.87 ± 0.8	0.57 ± 0.01
NDD5	102.5 ± 2.0	0.33 ± 0.017

Rf^a = promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

$$Rf = \frac{\text{Distancia migrada por la banda}}{\text{Distancia migrada por el frente del colorante}}$$

La desviación estándar fue calculada como el promedio de tres experimentos independientes y cada uno de ellos, fue realizado por triplicado.

Hasta este momento no es posible descartar si las diferentes bandas de actividad mostradas en los zimogramas pertenecen realmente a actividades dihidrodiol deshidrogenasa o se trata de enzimas alcohol deshidrogenasa con baja especificidad de sustrato, capaces de utilizar entre otros alcoholes al naftalendiol. Los resultados sugieren fuertemente que la NDD designada como 3, que fue la isoenzima que mayor actividad presentó, podría ser candidata a ser la enzima participante dentro de la ruta de degradación de los hidrocarburos aromáticos, particularmente del naftaleno, por lo que es importante puntualizar que con ella se continuarán las investigaciones tanto de inducción, como de su caracterización bioquímica y molecular. Del mismo modo, con la enzima pura, es posible obtener anticuerpos contra ella y poder realizar estudios de inmunocitoquímica para establecer su localización intracelular.

CONCLUSIONES

En la presente investigación se logró establecer que en la cepa YR-1 de *Mucor circinelloides* existen 5 bandas de proteína con actividad de dihidrodiol-deshidrogenasa, las cuales se manifiestan como isoenzimas, ya que están conformadas por subunidades proteicas de diferente peso molecular, cada isoenzima tiene una composición homopolimérica y ninguna subunidad protomérica es compartida por las enzimas nativas.

REFERENCIAS

- Barthnicki-García, S., y Nickerson, W. J. (1962). *Nutrition, growth and morphogenesis of Mucor rouxii*. J. Bactol. 84: 841-858.
- Bollag, J. M., Czaplicki, E. J., y Minard, R. D. (1975). Bacterial metabolism of 1-Naphtol. Agric. Food Chem. 23: 85-90.
- Cerniglia, C. E., y Gibson, D. T. (1977). Metabolismo of naphthalene by *Cunninghamella elegans*. Appl. Environm. Microb. 34: 363-370.
- Dagley, S. (1971). Catabolism of aromatic compounds by microorganisms. P.1-46. In: A. H. Rose and J. F. Wilkinson (ed), *Advances in microbial physiology*. Vol. 6 Academic Press Inc., New York.
- Durón, C. A., Zazueta-Novoa, V., Silva, H., Alvarado, C. Y., Peña E., y Zazueta-Sandoval, R. (2005). Detection of NAD⁺-dependent alcohol dehydrogenase activities in YR-1 strain of *Mucor circinelloides*, a potential bioremediator isolated from petroleum-contaminated soils. Appl. Biochem. Biotechnol. 121-124: 279-288.
- Ferris, J. P., Fasco, M. J., Stylianopolou, F. L., Jerina, D. M., daly, J. W., y Jeffrey, A. M. (1973). Monooxygenase activity in *Cunninghamella bairneri*: evidence for a fungal system similar to liver microsomes. Arch. Biochem. Biophys. 156: 97-103.

- Gibson, D. T., Mahadevan, V., Jerina, D. N., Yagi, H., y Yeh, H. J. (1975). Oxidation of the carcinogens benzo[a]pyrene and benzo[a]anthracene to dihydrodiols by a bacterium. *Science*. 189: 295-297.
- Laemli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T6. *Nature*. 227: 680-685.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J. Farr, A.L., y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Nikolova P., y Ward, O.P. (1991) Production of L-phenylacetyl carbinol by biotransformation: product and by-product formation and activities of the key enzymes in wild type and ADH isoenzyme mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bio-technol Bioeng.* 20: 493-498.
- Rogers, J. E. y Gibson, D. T. (1977). Purification and properties of cis-Toluene dihydrodiol dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 130 (3): 1117-1124.
- Silva-Jiménez, H., y Zazueta-Sandoval, R. (2005). Intracellular fate of hydrocarbons. Possible existence of specific compartments for their biodegradation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121-124: 205-217.
- Silva, H. J., Zazueta-Novoa, V., Durón, C. A., Rodríguez R. C., Leal-Morales C. A., y Zazueta-Sandoval, R. (2009). Intracellular distribution of fatty alcohol oxidase (FAO) activity in *Mucor circinelloides* YR-1 isolated from petroleum-contaminated soils. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 96: 527-535.
- Smith, R. V., y Rosazza, J. P. (1974). Microbial models of mammalian metabolism. Aromatic hydroxylation. *Arch. Biochem. Biophys.* 161: 551-558.
- Wray, W., Bouliskas, T., Wray, V. P., y Hancock, R. (1981) Silver staining of proteins in polyacrilamide gels. *Anal. Biochem.* 118: 197-203
- Zazueta-Sandoval, R., V. Zazueta-Novoa, H. Silva-Jiménez y R. Cabrera Ortiz. (2003). A different method of measuring and detecting mono and di-oxygenase activities. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 105-108: 725-736.