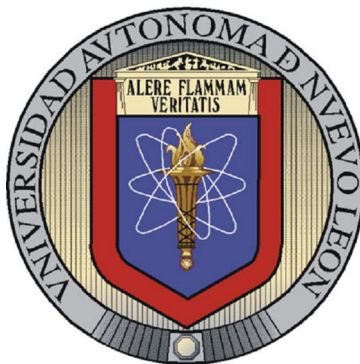


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNOLÍTICAS POR HONGOS DE PUDRICIÓN  
BLANCA AISLADOS EN NUEVO LEÓN

Por

M. C. Ma. GUADALUPE ROJAS VERDE

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en BIOTECNOLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA

Febrero del 2010

APROBACIÓN DE TESIS DOCTORAL POR COMITÉ DE TESIS

PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNOLÍTICAS POR HONGOS  
DE PUDRICIÓN BLANCA AISLADOS  
EN NUEVO LEÓN

Comité de Tesis

Dra. Katiushka Arévalo Niño  
Director de Tesis

---

Dra. Ma. Del Socorro Flores González  
Secretario

---

Dra. Julia Verde Star  
Vocal

---

Dra. Lilia H. Morales Ramos  
Vocal

---

Dr. Benito Pereyra Alférez  
Vocal

---

Dr. Octavio Loera Corral  
Director Externo

---

Dr. Luis J. Galán Wong  
Suplente

---

APROBACIÓN DE TESIS DOCTORAL POR COMITÉ ACADÉMICO

PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNOLÍTICAS POR HONGOS  
DE PUDRICIÓN BLANCA AISLADOS  
EN NUEVO LEÓN

Comité de Doctorado

---

---

---

---

---

---

---

---

---

Subdirector de Estudios de Posgrado

## DEDICATORIA

A Ese Ser, que nos da la Voluntad, el Valor, el Ánimo y la Entereza para afrontar cada nueva etapa en la vida.

A mis Padres: Claudio Rojas y Guadalupe Verde. Por ustedes es que he llegado a este punto. Sin su apoyo, sin su cariño, sin sus enseñanzas, nada de esto sería posible. Los quiero.

A mis Hermanos: Claudio, porque siempre fuiste un ejemplo y aun ahora lo sigues siendo. Asael, tu paciencia, ese enorme corazón, tu apoyo, te quiero mucho. Hugo, por ti gordito.

A ti, que llegaste a mi vida sin planearlo, sin esperarlo, sin imaginar que cambiarías todas mis expectativas...que me das el ánimo para seguir, que me apoyas, consuelas. Por enseñarme que todo tiene su tiempo para llegar. Por ser y estar siempre presente en mi corazón.



## AGRADECIMIENTOS

Dra. Katiushka Arévalo Niño, por el apoyo brindado durante todos estos años. Por su paciencia, sus enseñanzas tanto a nivel personal como académico y principalmente por darme la oportunidad de trabajar con usted.

M. C. Rosa Elena Delgado, Fuiste, eres y seguirás siendo un ejemplo en todos los sentidos. Gracias Amiga.

M. C. Luisa Y. Solís Soto... por las risas, el llanto, por tus enseñanzas, consejos, paciencia, apoyo y sobre todo, por brindarme tú amistad estos años.

Ruby, Eli, Nancy, Nerla, Hilda, Maestra Lucía, por esos momentos de sano esparcimiento, por enriquecer mi vida, por las risas, encuentros, desencuentros, pláticas de café...hicieron del L1 un lugar entrañable.

Dra. Andrea Alcazar Pizaña, por tu ayuda, consejos y amistad.

A todas mis amigas, pues aun en la distancia están mas cerca que nunca...Ivonne, Claudia, Vero, Martha, Ana, Angela, Rosy. Siempre están en mi mente.

Isabel, Agustín, Anahí, Carmen, Tere, Isela, Myriam, por los buenos ratos compartidos, por la ayuda y apoyo no solo en la tesis si no en muchas otras áreas y por su amistad. A las amistades recientes, Vero, Aida, Jessica...

A todo el personal del L1.

A la gente del LABGEM, Luisa, Faby, Rosy, Israel, Rocío, Shaggy, Brenda, Aldo, Alma...por hacer agradable mi estancia temporal.

Al Instituto de Biotecnología, por proporcionarme las instalaciones y facilidades para la realización de este trabajo.

Al Comité de Tesis: Dra. Socorro Flores González, Dra. Julia Verde Star, Dr. Benito Pereyra Alférez, Dra. Lilia H. Morales Ramos y en especial, al Dr. Octavio Loera Corral. Por sus observaciones y apoyo dado durante el desarrollo de esta investigación.

Al personal administrativo del Instituto de Biotecnología, Josué, Mirna, Edna, Norma.

Al Conacyt, por proporcionarme el apoyo económico.

A todas y cada una de las personas que estuvieron presentes durante todos estos años. Que compartieron conmigo momentos inolvidables, que dejaron una huella y marcaron mi vida. Muchas Gracias.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Sec.</b>		<b>Pág.</b>
1.	RESUMEN Y ABSTRACT	22
2.	INTRODUCCIÓN	24
2.1.	IMPORTANCIA Y JUSTIFICACIÓN	25
3.	HIPÓTESIS	27
4.	OBJETIVOS	
	4.1 Objetivo general	28
	4.2 Objetivos particulares	28
5.	ANTECEDENTES	29
	5.1 Características de la lignino celulosa	29
	5.2 Mecanismo de la biodegradación de la lignina	31
	5.3 Hongos de pudrición blanca	32
	5.3.1 Basidiomicetos	33
	5.3.1.1 <i>Trametes sp</i>	33
	5.3.1.2 <i>P. chrysosporium</i>	34
	5.3.2 Enzimas lignolíticas	34
	5.3.2.1 Lacasa (EC 1.10.3.2)	35
	5.3.2.2 LiP (Lignino Peroxidasa)	37
	5.3.2.3 MnP (Manganeso Peroxidasa)	38
	5.3.3 Colorantes sintéticos	39
	5.3.3.1 Clasificación de los colorantes	40

5.3.3.2	Método para la remoción de colorantes	40
5.3.3.3	Tratamiento biológico: Hongos de pudrición blanca	42
6.	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
6.1.	Diseño Experimental	44
6.2.	Aislamiento de los Hongos	44
6.3.	Identificación de los Hongos	45
6.3.1	Extracción del DNA	45
6.3.2	Amplificación de segmentos de ITS1-ITS4 (gen 5.8S)	46
6.3.3	Purificación del producto de PCR	47
6.3.4	Clonación	47
6.3.5	Secuenciación	47
6.4.	Observación al microscopio	48
6.5.	Microorganismos	48
6.6.	Métodos de Evaluación Primaria en Medio Sólido	48
6.7.	Condiciones de Crecimiento para el Ensayo Enzimático	49
6.8.	Ensayos de Actividad Enzimática	49
6.9.	Efecto de la Concentración de Glucosa en GMM sobre la Actividad Enzimática de Lac, LiP y MnP	50
6.10.	Efecto de la Fuente de Carbono en GMM sobre la Actividad Enzimática de Lac, LiP y MnP	51
6.11.	Determinación de Glucosa y pH	51
6.12.	Determinación de Biomasa	51
6.13.	Inductores	51
6.14.	Efecto del pH y la Temperatura en el Extracto Crudo	52
6.15.	Determinación del Tiempo de Vida Media	52
6.16.	Biotransformación de Colorantes Sintéticos en Medio Sólido	52
6.17.	Biotransformación del Colorante RBBR por Extractos Crudos	53
6.18.	Biotransformación del Colorante RBBR en Cultivo Sumergido	53
6.19.	Determinación de Isoenzimas por Electroforesis en Geles de Poliacrilamida (Zimogramas)	54
7.	<b>RESULTADOS</b>	
7.1.	Aislamiento e Identificación Morfológica	55
7.2.	Observación al Microscopio	57

7.3. Producción de Oxidasas y Peroxidasas en Medio Sólido (Evaluación Primaria)	58
7.4. Actividad Enzimática en Medio Líquido	58
7.4.1 Medio Mineral-Glucosa (GMM)	59
7.4.1.1. Diferente concentración de Glucosa	59
7.4.1.1.1. RVAN2	59
7.4.1.1.2. RVAN12	63
7.4.1.2. Actividad Enzimática con Diferentes Fuentes de Carbono	66
7.4.1.2.1. RVAN2	66
7.4.1.2.2. RVAN12	68
7.4.1.3. Cinética de Crecimiento y Actividad Enzimática en GMM	70
7.4.1.3.1. RVAN2	70
7.4.1.3.2. RVAN12	71
7.4.1.3.3. RVAN18	72
7.4.1.3.4. RVAN19	72
7.4.1.3.5. <i>P. ostreatus</i>	74
7.4.1.4. Actividad Enzimática en GMM con Diferentes Inductores	75
7.4.1.4.1. RVAN2	76
7.4.1.4.2. RVAN12	81
7.4.2. Medio de Harina de Soya (SMM)	87
7.4.2.1. Cinética de Crecimiento y Producción Enzimática	
7.4.2.1.1. RVAN2	88
7.4.2.1.2. RVAN12	89
7.4.2.1.3. RVAN18	90
7.4.2.1.4. RVAN19	91
7.4.2.1.5 <i>P. ostreatus</i>	92
7.4.2.2. Inductores	95
7.4.2.2.1. RVAN2	96
7.4.2.2.2. RVAN12	106
7.5. Determinación de pH y Temperatura Óptima	116
7.5.1. pH Óptimo	
7.5.1.1 Lacasa y LiP	117
7.5.2. Estabilidad al pH	118
7.5.2.1. RVAN2	118

7.5.2.2. RVAN12	119
7.5.3. Temperatura Óptima	
7.5.3.1. RVAN2	121
7.5.3.2. RVAN12	122
7.6. Estabilidad de los Extractos Crudos	123
7.6.1. RVAN2	
7.6.1.1. Extractos Crudos sin CuSO <sub>4</sub> 500 μM	123
7.6.1.2 Extractos Crudos con CuSO <sub>4</sub> 500 μM	124
7.6.2. RVAN12	
7.6.2.1. Extractos Crudos sin CuSO <sub>4</sub> 1000 μM	125
7.6.2.2. Extractos Crudos con CuSO <sub>4</sub> 1000 μM	126
7.7. Colorantes	127
7.7.1 Degradación en Medio Sólido	127
7.7.2 Decoloración por Extractos Crudos	128
7.7.2.1 RVAN2	128
7.7.2.2 RVAN12	128
7.7.3. Biotransformación en Medio Líquido	130
7.7.3.1. Aspectos Cinéticos de RVAN2	
7.7.3.1.1. Lacasa	131
7.7.3.1.2. Consumo de la Fuente de Carbono	132
7.7.3.1.3. Proteína	132
7.7.3.1.4. Actividad Específica	134
7.7.3.2. Aspectos Cinéticos de RVAN12	
7.7.3.2.1. Lacasa	134
7.7.3.2.2. Consumo de la Fuente de Carbono	135
7.7.3.2.3. Proteína	135
7.7.3.2.4. Actividad Específica	137
7.8. Zimogramas	137
7.8.1. Extractos de GMM	137
7.8.1.1. Fuente de Carbono	138
7.8.1.2. Inductores GMM	138
7.8.1.2.1. Sulfato de Cobre	139
7.8.1.2.2. Sulfato de Manganeso	140
7.8.1.2.3. Etanol	142

7.8.1.2.4. Siringaldazina	142
7.8.2. Extractos de SMM	142
7.8.2.1. Control	
7.8.2.1.1. RVAN2	143
7.8.2.1.2. RVAN12	143
7.8.2.2. Inductores	
7.8.2.2.1. Sulfato de Cobre	144
7.8.2.2.2. Sulfato Manganoso	147
7.8.2.2.3. Siringaldazina	150
7.8.2.2.4. Etanol	153
7.8.3. RBBR	156
7.8.3.1. RVAN2	156
7.8.3.2. RVAN12	157
7.9. Identificación Molecular de RVAN2 y RVAN12	159
7.9.1. RVAN2	160
7.9.2. RVAN12	162
8.    DISCUSION	165
9.    CONCLUSIONES	179
10.   LITERATURA CITADA	182

## LISTA DE FIGURAS

<b>Fig.</b>		<b>Pág.</b>
5.1.	Estructura parcial de la lignina	31
5.2.	Oxidación de los grupos fenólicos de la lignina catalizados por la Lacasa	36
5.3.	Mecanismo de Reacción catalizada por la Lignino Peroxidasa (LiP)	38
5.4.	Mecanismo de reacción catalizada por la Manganese Peroxidasa (MnP)	39
7.1.	Hongos recolectados en diversas áreas de Nuevo León	55
7.2.	Micelio vegetativo de diversos hongos (basidiomicetos nativos)	56
7.3.	Morfología macroscópica de los aislados en medio extracto de malta-extracto de levadura	57
7.4.	Cultivos obtenidos después de 6 días de incubación a 30° C	57
7.5.	Oxidación de los diferentes substratos utilizados para evaluar la producción de oxidasas y peroxidasas en medio sólido	58
7.6.	Actividad enzimática de Lacasa del sobrenadante del cultivo de RVAN2 en GMM	60
7.7.	Azúcares Residuales de RVAN2 en GMM	61
7.8.	Contenido de Proteína (mg/mL) de RVAN2 en GMM	62
7.9.	Actividad Específica de Lacasa en el sobrenadante del cultivo de RVAN2 en GMM	62
7.10.	Actividad enzimática de Lacasa del sobrenadante del cultivo de RVAN12 en GMM	63
7.11.	Azúcares Residuales de RVAN12 en GMM	64
7.12.	Contenido de Proteína (mg/mL) de RVAN12 en GMM	65
7.13.	Actividad Específica de Lacasa del sobrenadante de los cultivos de RVAN12 en GMM	66
7.14.	Actividad Enzimática de Lacasa del sobrenadante del cultivo de RVAN2	

	en Medio Mineral, adicionado de diferentes fuentes de carbono	67
7.15.	Actividad de Lacasa del sobrenadante del cultivo de RVAN12 en Medio Mineral, adicionado de diferentes fuentes de carbono	69
7.16.	Etapa final de los cultivos líquidos de las 4 cepas nativas estudiadas en GMM	70
7.17.	Cinética de Crecimiento y Actividad Enzimática de Lacasa del sobrenadante del cultivo de RVAN2 en GMM	71
7.18.	Cinética de Crecimiento y Actividad Enzimática de Lacasa del sobrenadante del cultivo de RVAN12 en GMM	72
7.19.	Cinética de Crecimiento y Actividad Enzimática de RVAN18 en GMM	73
7.20.	Cinética de Crecimiento y Actividad Enzimática de RVAN19 en GMM	73
7.21.	Cinética de Crecimiento y Actividad Enzimática de <i>Pleurotus ostreatus</i> en GMM	74
7.22.	Actividad Enzimática de Lacasa de RVAN2 en GMM, adicionado con diferentes compuestos	76
7.23.	Actividad Enzimática de LiP de RVAN2 en GMM, adicionado con diferentes compuestos	78
7.24.	Contenido de Proteína de RVAN2 en GMM, adicionado con diferentes compuestos	80
7.25.	Actividad Específica de Lacasa de RVAN2 en GMM, adicionado con diferentes compuestos	81
7.26.	Actividad Enzimática de Lacasa de RVAN12 en GMM, adicionado con diferentes compuestos	82
7.27.	Actividad Enzimática de LiP de RVAN12 en GMM, adicionado con diferentes compuestos	84
7.28.	Contenido de Proteína en el cultivo de RVAN12 en GMM, adicionado con diferentes compuestos	86
7.29.	Actividad Específica de Lacasa de RVAN12 en GMM, adicionado con diferentes compuestos	87
7.30.	Morfología y aspecto de los aglomerados miceliales al final del ensayo, en SMM	88
7.31.	Cinética de Crecimiento y Actividad Enzimática del sobrenadante del cultivo de RVAN2 en SMM	89
7.32.	Cinética de Crecimiento y Actividad Enzimática del sobrenadante del	



	cultivo de RVAN12 en SSM	90
7.33.	Cinética de Crecimiento y Actividad Enzimática del sobrenadante del cultivo de RVAN18 en SMM	91
7.34.	Cinética de Crecimiento y Actividad Enzimática del sobrenadante del cultivo de RVAN19 SMM	92
7.35.	Cinética de Crecimiento y Actividad Enzimática del sobrenadante del cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i> en SMM	93
7.36.	Actividad Enzimática de Lacasa en el sobrenadante de RVAN2 en SMM, adicionado con diferentes compuestos	96
7.37.	Actividad Enzimática de LiP en el sobrenadante de RVAN2 en SMM, adicionado con diferentes compuestos	99
7.38.	Actividad Enzimática de MnP en el sobrenadante de RVAN2 en SMM, adicionado con diferentes compuestos	104
7.39.	Contenido de Proteína (mg/mL) de RVAN2 en SMM, adicionado con diferentes compuestos	104
7.40.	Actividad Específica Lacasa en el sobrenadante de RVAN2 en SMM, adicionado con diferentes compuestos	105
7.41.	Actividad Enzimática de Lacasa del sobrenadante de RVAN12 en SMM, adicionado con diferentes compuestos	106
7.42.	Actividad Enzimática de LiP de RVAN12 en SMM, adicionado con diferentes compuestos	109
7.43.	Actividad Enzimática de MnP de RVAN12 en SMM, adicionado con diferentes compuestos	112
7.44.	Contenido de Proteína (mg/mL) de RVAN12 en SMM, adicionado con diferentes compuestos	115
7.45.	Actividad Específica de Lcasa de RVAN12 en SMM, adicionado con diferentes compuestos	116
7.46.	Efecto del pH sobre la Actividad Enzimática de Extractos Crudos de RVAN2 y RVAN12, en SMM	117
7.47.	Estabilidad de Lacasa al pH en los extractos de RVAN2	118
7.48.	Estabilidad de LiP al pH en los extractos de RVAN2	119
7.49.	Estabilidad de Lacasa al pH en los extractos de RVAN12	120
7.50.	Estabilidad de LiP al pH en los extractos de RVAN12	121
7.51.	Temperatura Óptima de los extractos de RVAN2	122

7.52.	Temperatura Óptima de los extractos de RVAN12	123
7.53.	Estabilidad y tiempo de vida media del extracto de RVAN2	124
7.54.	Estabilidad y tiempo de vida media del extracto de RVAN12	125
7.55.	Estabilidad y tiempo de vida media del extracto de RVAN12 adicionado de sulfato cúprico 1000 $\mu$ M	126
7.56.	Biotransformación de diversos colorantes por RVAN2 y RVAN12	127
7.57.	Tiempo Máximo de Biotransformación por RVAN2 y RVAN12	128
7.58.	Biotransformación de RBBR a diferentes valores de pH y Temperatura por el Extracto Crudo de RVAN2 en SMM al día de máxima actividad	129
7.59.	Biotransformación de RBBR a diferentes valores de pH y Temperatura por el Extracto Crudo de RVAN12, obtenido de cultivos en SMM al día de máxima actividad	129
7.60.	Biotransformación del colorante RBBR por RVAN2 y RVAN12	131
7.61.	Actividad Enzimática de Lacasa en el sobrenadante de RVAN2 en GMM.	132
7.62.	Azúcares Residuales en el sobrenadante de RVAN2 en GMM	133
7.63.	Contenido de Proteína (mg/mL) en en sobrenadante de RVAN2 en GMM	133
7.64.	Actividad Enzimática Específica de Lacasa en el sobrenadante de RVAN2 en GMM	134
7.65.	Actividad Enzimática de Lacasa en el sobrenadante de RVAN12 en GMM	135
7.66.	Azúcares Residuales en el sobrenadante de RVAN12 en GMM	136
7.67.	Contenido Proteína (mg/mL) de RVAN12 en GMM	136
7.68.	Actividad Específica de Lacasa en el sobrenadante de RVAN12 en GMM.	137
7.69.	Perfil enzimático de los extractos crudos de RVAN2, en medio con acetato de sodio como fuente de carbono	138
7.70.	Perfil Enzimático de RVAN2 adicionado de $\text{CuSO}_4$ 500 $\mu$ M en GMM	139
7.71.	Perfil Enzimático de RVAN2 adicionado de $\text{CuSO}_4$ 1000 $\mu$ M en GMM	140
7.72.	Perfil Enzimático de RVAN12 adicionado de $\text{CuSO}_4$ 500 $\mu$ M en GMM	141
7.73.	Perfil Enzimático de RVAN2 adicionado de $\text{MnSO}_4$ 40 mg/L en GMM	141
7.74.	Perfil Enzimático de RVAN2 adicionado de Siringaldazina 1.16 $\mu$ M en GMM	142
7.75.	Perfil Enzimático de RVAN2 en SMM sin adición de Inductor	143
7.76.	Perfil Enzimático de RVAN12 en SMM sin adición de Inductor	144
7.77.	Perfil Enzimático de RVAN2 en SMM con $\text{CuSO}_4$ 500 $\mu$ M	145

7.78.	Perfil Enzimático de RVAN2 en SMM con CuSO <sub>4</sub> 1000 µM	145
7.79.	Perfil Enzimático de RVAN12 en SMM con CuSO <sub>4</sub> 500 µM.	146
7.80.	Perfil Enzimático de RVAN12 en SMM con CuSO <sub>4</sub> 1000 µM	147
7.81.	Perfil Enzimático de RVAN2 en SMM con MnSO <sub>4</sub> 11 mg/L	148
7.82.	Perfil Enzimático de RVAN2 en SMM con MnSO <sub>4</sub> 40 mg/L	148
7.83.	Perfil Enzimático de RVAN12 en SMM con MnSO <sub>4</sub> 11 mg/L	149
7.84.	Perfil Enzimático de RVAN12 en SMM con MnSO <sub>4</sub> 40 mg/L	150
7.85.	Perfil Enzimático de RVAN2 en SMM con Siringaldazina 0.116 mM	151
7.86.	Perfil Enzimático de RVAN2 en SMM con Siringaldazina 1.16 µM	151
7.87.	Perfil Enzimático de RVAN12 en SMM con Siringaldazina 0.116 µM	152
7.88.	Perfil Enzimático de RVAN12 en SMM con Siringaldazina 1.116 µM	153
7.89.	Perfil Enzimático de RVAN2 en SMM con Etanol 30 g/L.	154
7.90.	Perfil Enzimático de RVAN2 en SMM con Etanol 35 g/L	154
7.91.	Perfil Enzimático de RVAN12 en SMM con Etanol 30 g/L	155
7.92.	Perfil Enzimático de RVAN12 en SMM con Etanol 35 g/L	156
7.93.	Perfil Enzimático de RVAN2 en GMM + RBBR 200 ppm	157
7.94.	Perfil Enzimático de RVAN2 en GMM + CuSO <sub>4</sub> + RBBR 200 ppm	157
7.95.	Perfil Enzimático de RVAN12 en GMM + RBBR 200 ppm	158
7.96.	Perfil Enzimático de RVAN12 en GMM + CuSO <sub>4</sub> + RBBR 200 ppm	158
7.97.	DNA genómico de las cepas RVAN2 y RVAN12	159
7.98.	Gel de agarosa al 1.5% de la región ITS	160
7.99.	Gel de agarosa 0.8% de las diferentes clonas transformadas	160
7.100.	Secuencia de las regiones ITS1-5.8s-ITS2 de la cepa RVAN2	161
7.101.	Comparación de la secuencia de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 con <i>Trametes hirsuta</i> y un basidiomiceto no identificado	161
7.102.	Secuencia de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 de la cepa RVAN12	162
7.103.	Comparación de la secuencia de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 con <i>Trametes hirsuta</i> y <i>Trametes maxima</i>	163

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Pág.</b>
5.1. Métodos existentes para el tratamiento de colorantes vertidos al ambiente	41
5.2. Hongos y su mecanismo de decoloración	43
7.1. Efecto de la concentración de glucosa en la actividad de Lacasa por RVAN2 en GMM	60
7.2. Efecto de la concentración de glucosa en la actividad de Lacasa por RVAN12 en GMM	64
7.3. Efecto de la fuente de carbono en la actividad de Lacasa por RVAN2	68
7.4. Efecto de la fuente de carbono en la actividad de Lacasa por RVAN12	69
7.5. Actividad enzimática de Lacasa en cuatro cepas nativas y cepa control en GMM	75
7.6. Efecto de la adición de inductores en la actividad de Lacasa en RVAN2 en GMM	77
7.7. Efecto de la adición de inductores en la actividad de LiP en RVAN2 en GMM	80
7.8. Efecto de la adición de inductores en la actividad de Lacasa en RVAN12 en GMM	83
7.9. Efecto de la adición de inductores en la actividad de LiP en RVAN12 en GMM	85
7.10. Actividad enzimática de Lacasa en cuatro cepas nativas y cepa control en SMM	94
7.11. Actividad enzimática de LiP en cuatro cepas nativas y cepa control en SMM	94
7.12. Actividad enzimática de MnP en cuatro cepas nativas y cepa control en SMM	95

7.13.	Efecto de la adición de inductores en la actividad de Lacasa en RVAN2 en SMM	98
7.14.	Efecto de la adición de inductores en la actividad de LiP en RVAN2 en SMM	101
7.15.	Efecto de la adición de inductores en la actividad de MnP en RVAN2 en SMM	103
7.16.	Efecto de la adición de inductores en la actividad de Lacasa en RVAN12 en SMM	108
7.17.	Efecto de la adición de inductores en la actividad de LiP en RVAN12 en SMM	112
7.18.	Efecto de la adición de inductores en la actividad de MnP en RVAN12 en SMM	114
7.19.	Resultados de la comparación con la base de datos EMBL	164

## NOMENCLATURA

ABTS	Ácido 2, 2'-(3-etil benzotiazolin-6-sulfónico)
HCl	Ácido clorhídrico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ATCC	American type cultura colection
RBBR	Azul reactivo de remazol brillante
cm	Centímetros
Cl <sub>2</sub>	Cloro
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
$\epsilon$	Coefficiente de extinción
$\varnothing$	Diámetro
SDS	Dodecil sulfato de sodio
LD <sub>50</sub>	Dosis letal media
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
LME	Enzimas modificadoras de la lignina
FD	Factor de dilución
° C	Grados centígrados
g	Gramos
h	Hora
ITS	Internal transcriber spacer
kDa	Kilo daltones
Lac	Lacasa
Lb	Libras
LiP	Lignino Peroxidasa
L	Litro
MnP	Manganeso Peroxidasa
SMM	Medio de harina de soya
GMM	Medio mineral glucosa
m	Metro

$\mu\text{L}$	Microlitros
$\mu\text{M}$	Micromolar
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
min	Minutos
M	Molar
nm	Nanómetros
$\text{N}_2$	Nitrógeno
pb	Pares de bases
ppm	Partes por millón
w	Peso
pH	Potencial de hidrógeno
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
$\text{CuSO}_4$	Sulfato de cobre
$\text{MnSO}_4$	Sulfato manganoso
UV	Ultravioleta
U	Unidades
vol.	Volumen

## 1.- RESUMEN

El uso de metabolitos secundarios producidos por microorganismos y en particular por hongos, sigue siendo una alternativa muy importante en diversas industrias, lo anterior debido a la creciente demanda de procesos igualmente eficientes pero amigables con el medio ambiente. Los hongos de pudrición blanca representan una alternativa en la producción de dichos metabolitos, específicamente enzimas lignolíticas. En este trabajo se decidió trabajar con tales hongos, debido a que pueden llegar a representar una alternativa viable en la implementación de técnicas encaminadas a diversos procesos biotecnológicos que permitan abatir los altos índices de contaminación del ambiente. El aislamiento de los hongos de pudrición blanca así como la producción de sus enzimas fue llevada a cabo en dos medios de cultivo modificados. La capacidad que presentan los hongos lignolíticos así como sus enzimas (extractos crudos), en la degradación de colorantes sintéticos se realizó en medio sólido así como en cultivos líquidos. Los resultados indicaron que el medio de harina de soya (SMM) fue el mejor para lograr una actividad enzimática elevada junto con la adición de sulfato de cobre en este medio como en el medio mineral-glucosa (GMM), siendo RVAN2 y RVAN12, ambas especies de *Trametes*, cepas capaces de producir las tres enzimas lignolíticas más importantes: Lacasa, Lignino Peroxidasa y Manganese Peroxidasa. La degradación del colorante RBBR (Azul Reactivo de Remazol Brillante), se realizó en el medio con bajo contenido de nitrógeno (GMM), logrando una total biotransformación en los primeros días de la fermentación. Finalmente, los hongos fueron identificados como especies de *Trametes*. Lo anterior sugiere que los hongos aislados pueden ser utilizados en diversos procesos biotecnológicos, entre ellos la degradación de colorantes sintéticos; sin embargo, si lo que se desea es la alta actividad enzimática es recomendable el medio de harina de soya. Se plantea la posibilidad de estudiar estos hongos en el tratamiento de efluentes textiles así como en los desechos derivados de la industria papelera, entre otros.



## ABSTRACT

The production of secondary metabolites by fungi continues to be one of the most important alternatives in diverse industries due to the growing demand. The white rot fungi, identified as a *Trametes* species, present an alternative in the production of such metabolites, specifically ligninolytic enzymes. The isolation of such fungi, as well as the production of its enzymes, was conducted based on the modification of two culture mediums. The evaluation of the capacity for the degradation of colorants that these fungi present was conducted in plates as well as in a liquid culture medium and the crude extracts obtained from such medium which yielded the greatest enzymatic production. The results indicated that the soy meal medium (SMM), with an additive of copper sulphate, is the most qualified medium to obtain an elevated enzymatic activity, with the strains being capable of producing the three most important ligninolytic enzymes: laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase. In the case of the degradation of RBBR, the evaluation was conducted in the low-nitrogen-content medium (GMM), obtaining a total biotransformation in the first few days of the fermentation period. The aforesaid suggests that the isolated strains can be utilized in diverse biotechnological processes, among them the degradation of synthetic colorants. However, if the aim is to obtain the high ligninolytic enzyme production, the soy meal medium is recommended. The possibility of studying these fungi for the treatment of textile effluents, as well as the waste derived from the paper industry, among others, is planned.

## 2. INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas se ha incrementado el uso de microorganismos para la producción de una gran variedad de compuestos, como los ácidos orgánicos utilizados en la industria de alimentos; antibióticos, proteínas, vitaminas, hormonas, etc., aplicados a la industria farmacéutica. Lo anterior, debido a la creciente demanda en la producción de metabolitos secundarios por hongos, sigue siendo una de las alternativas más importantes en las industrias mencionadas.

Específicamente, los hongos perfectos son fuente abundante de un amplio rango de productos naturales. Sin embargo, se han realizado más investigaciones convencionales para la producción de diversos metabolitos, más que para el desarrollo de bioprocesos encaminados al estudio de hongos perfectos. Dentro de este grupo de hongos, se encuentran los basidiomicetos, los cuales se clasifican en hongos de pudrición blanca, pudrición parda y pudrición oscura, en base a los cambios que ocasionan en la madera. Los hongos de pudrición blanca son los mejores degradadores de compuestos lignolíticos. La principal característica de estos hongos es su habilidad para producir una gran cantidad de metabolitos secundarios mediante la ruta metabólica de los ácidos shikímico y cinámico (Guillen y Evans, 1994).

En el caso de las enzimas, éstas son una herramienta muy importante en diversos procesos biotecnológicos, desde aquellos poco refinados como la biorremediación hasta procesos más finos, como la catálisis quiral selectiva. Enzimas extracelulares, incluyendo Lignino Peroxidasa, Manganese Peroxidasa, Lacasas y oxidasas que generan peróxido de hidrógeno necesario para la actividad de la peroxidasa, son las responsables de la degradación de lignina y compuestos similares (Hattaka, 1994). La baja especificidad que presentan y la fuerte habilidad oxidativa de los sistemas de degradación, los hace capaces de atacar un amplio rango de compuestos, muchos de ellos altamente tóxicos (Kornilowicz-Kowalska, *et al.*, 2006).

La Lacasa es una fenol-oxidasa, producida no solo por basidiomicetos, también por plantas, bacterias, hongos imperfectos e insectos, en cada uno de ellos presenta una función en particular, desde la polimerización de la lignina en plantas, hasta la queratinización en insectos (Hoeggert, *et al.*, 2004). Tanto la Lignino Peroxidasa como la

Manganeso Peroxidasa, utilizan el peróxido de hidrógeno como mediador para degradar un amplio espectro de compuestos similares a la lignina, al igual que compuestos aromáticos, por una oxidación no específica del sustrato.

Dentro de las especies de hongos más estudiados se encuentran, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta*, *Pleurotus ostreatus*, entre otros. Algunos de ellos son capaces de producir solo Lignina y Manganeso Peroxidasa, o Lacasa y cualquiera de las otras dos, ya sea de forma constitutiva o inducible, así mismo tienen la capacidad de producir múltiples isoenzimas, las cuales presentan diferentes propiedades catalíticas. A pesar de ello, se continúa la búsqueda de cepas que permitan una sobreproducción de tales metabolitos y que sean capaces de utilizarse en diversos procesos biotecnológicos. Puesto que son muchos los factores que intervienen en la producción de enzimas lignolíticas, desde la especie, medio de cultivo, temperatura óptima, presencia o ausencia de compuestos aromáticos (inductores y/o potenciadores), aun tratándose de cepas de la misma especie, se propuso como objetivo principal, la recolección y el aislamiento de cepas nativas en diversas áreas del Estado de Nuevo León, así como determinar la producción de tres de las principales enzimas lignolíticas, Lacasa, Lignina Peroxidasa (LiP) y Manganeso Peroxidasa (MnP) en dos medios de cultivo modificados, utilizados para la obtención de las mismas.

## **2.1. IMPORTANCIA Y JUSTIFICACIÓN**

Los altos índices de contaminantes liberados al ambiente siguen en incremento, muchos de ellos son de difícil degradación. La mayoría de los métodos existentes dan soluciones parciales al problema, por lo que es necesaria la implementación de estrategias que sean más amigables al ambiente. El uso de microorganismos es una alternativa viable pues son de fácil manejo y algunos de ellos pueden llegar a degradar completamente los compuestos que en su mayoría llegan a presentar problemas a la salud. Debido a ello, se buscaron cepas nativas de basidiomicetos, los cuales han probado su enorme capacidad en la degradación de contaminantes tan diversos como los colorantes textiles, compuestos organoclorados e incluso insecticidas. Previo a la utilización de estos microorganismos es necesario determinar la respuesta de los hongos a diversos medios de cultivo. Es sabido que especies de *Trametes* son capaces de producir las tres enzimas lignolíticas principales, sin embargo la respuesta de los hongos y la síntesis de sus enzimas son dependientes del medio de cultivo ensayado. Por estas razones, se probaron dos medios de cultivo, así como diversos compuestos reportados previamente con el fin de incrementar la actividad enzimática. Los valores obtenidos fueron comparados con una cepa de colección internacional *Pleurotus ostreatus* ATCC 58053 para tratar de igualar e

incluso incrementar la síntesis de las enzimas lignolíticas, de igual forma, se evaluó la capacidad que presenten los hongos a ser seleccionados, en la biotransformación de un colorante reactivo utilizado para determinar la capacidad degradativa de diversos microorganismos.

### **3. HIPÓTESIS**

En las áreas boscosas del Estado de Nuevo León existen hongos de pudrición blanca capaces de producir enzimas lignolíticas: Lacasa, Lignino Peroxidasa y/o Manganese Peroxidasa en cultivo sumergido y que puedan presentar la capacidad de degradar colorantes sintéticos tanto en medio sólido como en cultivo sumergido.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la producción de enzimas lignolíticas por hongos de pudrición blanca, basidiomicetos aislados en Nuevo León.

### **4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Recolectar y obtener la fase vegetativa de los basidiomicetos de diversas áreas de Nuevo León.
2. Evaluar de forma preliminar la producción de oxidasas y peroxidasas en medio sólido.
3. Evaluar la capacidad de producción de enzimas lignolíticas, Lacasa, Lignino Peroxidasa y Manganese Peroxidasa en dos medios de cultivo: Alto y bajo contenido en nitrógeno (cultivo sumergido), de cuatro cepas nativas de basidiomicetos y un control.
4. Evaluar el efecto de la fuente de carbono en el medio de cultivo con bajo contenido en nitrógeno.
5. Determinar el efecto de inductores y/o potenciadores para la producción de enzimas lignolíticas en ambos medios.
6. Identificar molecularmente las cepas nativas con mayor capacidad productora en ambos medios de cultivo.
7. Evaluar la capacidad decolorativa de los basidiomicetos identificados, mediante pruebas en medio sólido, en medio líquido y por los extractos crudos.

## 5. ANTEDECENTES

Muchos productos, algunos de ellos ancestrales se elaboran mediante la participación de microorganismos y/o algunos de los metabólicos producidos por ellos, como lo son la elaboración de queso, cerveza, vino, entre otros. Dichos procesos se encuentran confinados dentro de la biotecnología convencional. La forma como las enzimas llevan a cabo sus funciones, son mediante reacciones estereoespecíficas con una alta precisión, razón por la cual se prefieren a los procesos realizados por tecnología química, debido a que los productos generados deben ser purificados posteriormente. Una de las ventajas principales es el bajo costo que implica su uso, mientras que los procesos químicos requieren de condiciones especiales, muchas de las cuales incrementan considerablemente los costos. Dada la amplia diversidad de microorganismos en el mundo, se puede encontrar una enzima que permita o genere una reacción determinada y por consiguiente, un producto deseable, pero es necesaria la búsqueda de tales microorganismos.

Por otro lado, con el paso de los años, se ha visto que tanto los microorganismos como sus enzimas, pueden ser capaces de utilizarse en ámbitos tan diversos como la petroquímica, la farmacéutica, cosmética, alimentos y en las últimas fechas, en la biorremediación. La atención se centró a partir de la década de los 70's, en hongos perfectos y sus enzimas lignolíticas debido principalmente a las propiedades que presentan las mismas frente a diversos procesos, muchos de ellos encaminados al mejoramiento de las condiciones ambientales (Whiteley y Lee, 2006). Los microorganismos continúan siendo una de las fuentes de productos naturales menos estudiadas a pesar de ofrecer grandes posibilidades para la obtención de nuevas estructuras y actividades biológicas (Brizuela, *et al.*, 1998).

### 5.1. CARACTERÍSTICAS DE LA LIGNINOCELULOSA

El material lignocelulósico de los vegetales o de las plantas está constituido, típicamente, por los polisacáridos celulosa, hemicelulosa y lignina (Howard, *et al.*, 2003; Pérez, *et al.*, 2003). El contenido de celulosa va de 40-60%, el de hemicelulosa de 15-50% y el de lignina de 10-30%, dependiendo del tipo de vegetal, del tejido y edad del

mismo. La organización celular es bastante regular; una pared celular típica de un tejido vegetal está constituida por una laminilla media, una pared primaria y otra secundaria; esta última compuesta a su vez, por tres capas:  $S_1$ ,  $S_2$  y  $S_3$ . Por lo general la capa  $S_2$  es la de mayor espesor comparado con la pared primaria, la laminilla media y las otras dos capas ( $S_1$  y  $S_3$ ). En la laminilla media se encuentra casi toda la lignina y su proporción disminuye conforme se acerca al lumen; la pared secundaria contiene muy poca lignina, está constituida principalmente por polisacáridos. A cada capa de la pared secundaria se adhieren la celulosa y cantidades mínimas de otros constituyentes formando estructuras longitudinales llamadas micro fibrillas, dentro de cada una de las cuales se encuentran las moléculas lineales de celulosa unidas lateralmente por puentes de hidrógeno y por fuerzas de Van der Waals. Los grados de ordenamiento de las moléculas de la celulosa difieren; cuando están altamente ordenadas se denominan amorfas. Dentro de la pared secundaria, la lignina está concentrada en los espacios localizados entre las miofibrillas y en las regiones amorfas, entre cristales de celulosa. Se sugiere que la asociación de la celulosa con la lignina es en gran parte física, formando un sistema de entrecruzamiento de polímeros. Esta íntima asociación física se considera responsable de su resistencia a la degradación biológica. En las regiones amorfas, entre cristales de celulosa se encuentran también hemicelulosa, minerales y otros materiales como grasas, ceras, aceites esenciales, taninos, resinas, carbohidratos solubles y proteínas (Leal, 1985).

La lignina es el compuesto aromático más abundante sobre la tierra, forma una matriz que rodea a la celulosa. Esta matriz retarda significativamente la depolimerización de la celulosa y por ello, la lignina juega un papel clave en el ciclo del carbono de la tierra (Edwards, *et al.*, 1993). Es considerada como un material incrustante ya que es el último componente sintetizado por el tejido vegetal; su producción aumenta conforme envejece la planta. Es un polímero estructural de las plantas vasculares, formada por unidades de fenil-propano; proporciona a las plantas rigidez y unión entre sus células, además de disminuir la permeabilidad del agua a través de las paredes celulares y proteger a las células de invasiones por microorganismos. La formación de lignina en los tejidos vegetales es sumamente compleja y no totalmente entendida; comprende varias etapas, tanto de reacciones puramente químicas como enzimáticas a partir de tres precursores primarios, todos del tipo alcoholes de fenil propano. En consecuencia, la molécula de lignina presenta una estructura ramificada e irregular (Figura 5.1).



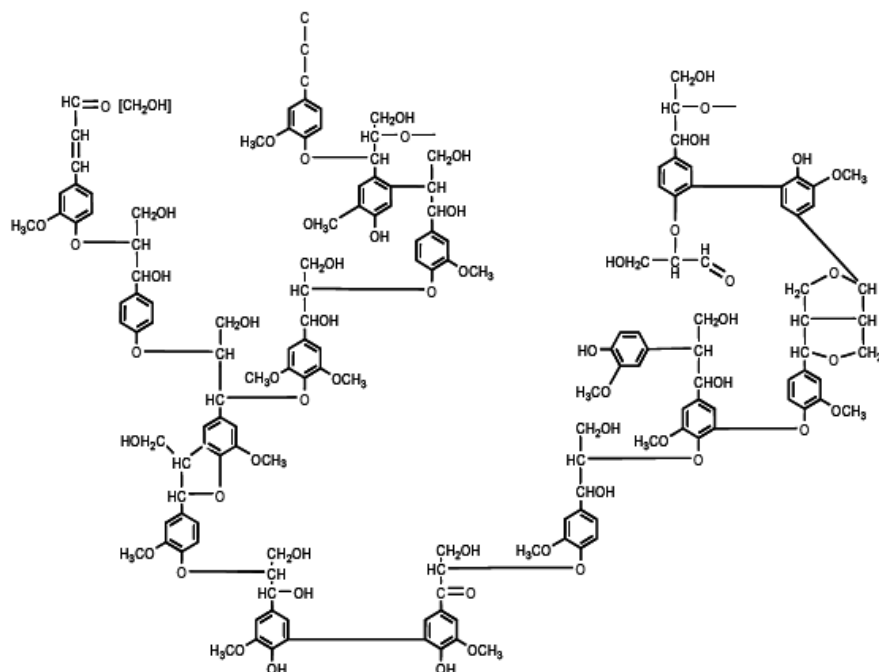


Figura 5.1.- Estructura parcial de la lignina (Tomado de Dávila y Vázquez-Duhalt, 2006)

## 5.2. MECANISMO DE BIODEGRADACIÓN DE LA LIGNINA

No se conoce con exactitud el mecanismo preciso con que la lignina es degradada. Es un polímero heterogéneo y de unidades irregulares de fenil propano, lo cual la hace resistente a la degradación química o enzimática, protegiendo a la celulosa.

Las especies de hongos que son capaces de degradar la madera pueden dividirse en hongos de pudrición oscura, pudrición suave y pudrición blanca (Martinez, *et al.*, 2005). Así mismo, bacterias tales como *Streptomyces* sp. y actinomicetos pueden llevar a cabo una oxidación similar a la realizada por los hongos de pudrición blanca. Sin embargo, estas bacterias solamente tienen la habilidad para modificar y degradar parcialmente las moléculas de lignina. De igual forma especies tales como *Fusarium proliferatum* son capaces de producir Lacasa y aril alcohol oxidasa, este microorganismo responde a las diferentes condiciones de cultivo (Hernández, *et al.*, 2005).

Se ha postulado un esquema general sobre la degradación de este biopolímero basado en el estudio de la incubación de micelio de hongos de pudrición blanca y oscura con compuestos aromáticos de bajo peso molecular y estructura similar a la de la lignina o con ligninas de varios tipos de vegetales y se han analizado los cambios químicos y estructurales en los sustratos usados. Se ha observado que ambos tipos de hongos causan una disminución en el contenido de grupos metoxilo de la molécula de lignina. Al no

poseer enlaces hidrolizables, se cree que el proceso es llevado a cabo mediante enzimas oxidativas. Únicamente los hongos de pudrición blanca tienen la capacidad para romper los enlaces éter, similares a los de la lignina (tipo arilglicerol- $\alpha$ -aril) y sólo ellos producen enzimas fenol-oxidasas extracelulares involucradas en la degradación de lignina (Ohkuna, *et al.*, 2001; Higuchi, 2004). Al utilizar compuestos aromáticos modelo se comprobó que las fenoloxidasas extracelulares hidrolizan los anillos aromáticos y pueden causar una ruptura oxidativa de los mismos, así como otras reacciones de probable relevancia en la degradación de la lignina, como la formación de radicales libres, los que pueden inducir la ruptura de los enlaces entre el anillo aromático y la cadena de fenil propano.

### 5.3. HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA

Los hongos de pudrición blanca comprende un grupo heterogéneo de hongos micro y macroscópicos, los más conocidos son los basidiomicetos y algunos ascomicetos del género *Xylaraceae*. Sin embargo, los más estudiados son los primeros, debido a que son productores de metabolitos biológicamente activos, estos hongos están representados por alrededor de 30, 000 especies. Los basidiomicetos producen una amplia gama de productos naturales, proteínas extracelulares, agentes antimicrobianos, antifúngicos, antivirales, enzimas de importancia en el área ambiental y otros metabolitos. Este grupo de microorganismos puede adaptarse a diversas restricciones ambientales (Brizuela, *et al.*, 1998; Pointing, 2001).

En el área ambiental, ha crecido el interés en la implementación en técnicas de biorremediación mediante el uso de tecnologías enzimáticas (Whiteley y Lee, 2006). En ese sentido, se continúan realizando investigaciones enfocadas a los sistemas biológicos con poblaciones específicas de microorganismos, midiendo la biomasa activa así como indicadores, demanda química de oxígeno y remoción de fósforo. De igual forma, a partir de la década de los 30's, se implemento el uso de enzimas para el tratamiento de desechos. Sin embargo, fue hasta los 70's que las enzimas se usaron para contrarrestar contaminantes específicos, (compuestos orgánicos policíclicos, pirenos, bifenilos, dibenzo [*p*] dioxinas, etc (Hammel, *et al.*, 1986). Dentro de las enzimas más estudiadas se encuentran las lignolíticas, producidas principalmente por los basidiomicetos de pudrición blanca. La principal característica de estos hongos es la capacidad que presenta para la degradación de uno de los compuestos más recalcitrantes: la lignina, un polímero polifenólico heterogéneo localizado dentro del substrato lignocelulósico. Es precisamente esta característica la que dio pie a extensos estudios, ya que se ha demostrado la capacidad de degradar otros compuestos que presenten características similares a la

lignina y/o sus precursores. El nombre de estos hongos deriva de los cambios que ocasiona en madera cuando es atacada por este tipo de hongos.

### 5.3.1- BASIDIOMICETOS

En los últimos años se ha incrementado la búsqueda de nuevas cepas de basidiomicetos. Se ha visto que las especies de *Trametes* son una de las más eficientes productoras de Lacasas.

Dentro de este grupo existen muchos hongos que han sido estudiados desde la década de los 70's, siendo los más importantes, *Trametes versicolor* (Archibald, 1992), un basidiomiceto localizado en las raíces de muchas plantas, así como *Phanerochaete chrysosporium*, perteneciente a una familia de hongos causante de podredumbre de las raíces de los árboles (Grabski, *et al.*, 1998).

#### 5.3.1.1. *Trametes sp.*

Durante muchos años, el interés en este tipo de hongos se centro en la utilización de los mismos para el blanqueo de la pulpa de papel, al incrementar el brillo de un 32 a un 60% y disminuir el contenido de lignina. Este proceso biológico podría de esta forma reemplazar el Cl<sub>2</sub> utilizado en el tratamiento del blanqueo de pulpa comercial. El blanqueamiento es producido al mezclar un pequeño inóculo del hongo con la pulpa (1-2%) e incubando la mezcla con agitación por espacio de 2 a 5 días. La pulpa tratada de esta forma muestra una reducción en la viscosidad, pero disminuye en poco o en nada la calidad física del papel. Recientemente se ha visto que el contacto de las hifas con las fibras de la pulpa no es requerido, ya que por ejemplo, el licor del cultivo contiene todo lo necesario para el blanqueamiento y puede ser frecuentemente renovado por contacto con la biomasa fúngica (Archibald, 1992).

*T. versicolor* no solo produce la LiP, también la MnP, ambas bajo condiciones determinadas. Sin embargo, en el caso de la LiP producida por *T. versicolor*, aun no se ha podido determinar cual es el papel que tenga en el blanqueamiento del papel por las siguientes razones: (i) la naturaleza extremadamente compleja y poco entendida de la combinación pulpa-micelio-nutriente diluido, en el cual se lleva a cabo el blanqueamiento, (ii) la baja sensibilidad y gran susceptibilidad a artefactos del alcohol veratrilo (VA), (iii) la estructura desconocida del substrato residual de la lignina kraft, (iv) la naturaleza desconocida de las reacciones de deslignificación y bioblanqueo, (v) la pequeña cantidad de lignina unida y el gran tiempo requerido y (vi) la carencia de una rápida y simple prueba de la actividad de blanqueamiento (Archibald, 1992a).

#### 5.3.1.2. *P. chrysosporium*

El sistema lignolítico de *P. chrysosporium* es complejo. Incluye numerosas enzimas tales como peroxidadas, oxidasas, glioxal oxidasas, glucosa oxidasas y celobiosa quinona oxidasas. Las oxidasas y las peroxidadas, particularmente la MnP y la LiP, son dos enzimas extracelulares, consideradas los componentes claves de los procesos lignolíticos. La lignina es degradada por este microorganismo solamente durante el metabolismo idiofásico, en respuesta al nitrógeno, carbono o a la privación de sulfuro (Herpoël, *et al.*, 1999).

Cuando es cultivado bajo condiciones lignolíticas, *P. chrysosporium* produce dos familias de peroxidadas, la LiP, y la MnP, las cuales, junto con un sistema generador de peróxido constituye el mayor componente de su sistema degradador de lignina. Sin embargo, debido a que la síntesis de estas enzimas ocurre solo durante el metabolismo secundario, se producen cantidades limitadas de los mismos. Esta es una de las mayores limitantes en el uso comercial de las enzimas lignolíticas (Bonnarme, *et al.*, 1993).

Jäger *et al.*, reportó la producción de LiP mediante el uso de cultivos agitados sumergidos de *P. chrysosporium* con surfactantes no iónicos, tales como el polioxietileno de monooleato de sorbitan (Tween-80), polietileno monolaurato de sorbitan (Tween-20) o 3-(3-colamidopropil)-dimetilamonio 1-propanesulfonato (CHAPS). Estos surfactantes abren definitivamente la posibilidad de nuevos prospectos para escalar la producción de enzimas lignolíticas en tanques de fermentación agitados. Por el contrario, se ha demostrado que la producción de Lignina Peroxidasa en cultivos estáticos se incrementa substancialmente y el tiempo de fermentación para la máxima actividad es reducida, cuando el medio de cultivo está suplementado con Tween-80, ácido oleico solo o emulsionado con Tween-80. Similarmente, la producción de LiP se incrementa cuando el medio de crecimiento está adicionado con varias fuentes de fosfolípidos.

Debido a la sensibilidad de las colonias esféricas de *P. chrysosporium* a la agitación, se ha determinado que el proceso más eficiente para la producción de esta enzima es la inmovilización del microorganismo en diversos soportes (Ruckenstein y Wang, 1994; Moreira, *et al.*, 1997; Herpoël, *et al.*, 1999).

### 5.3.2.- ENZIMAS LIGNOLÍTICAS

Los hongos de pudrición blanca son los degradadores de lignina más eficientes que existen en la naturaleza. Son productores de un amplio espectro de metabolitos secundarios. Diversos estudios indican que la Lacasa, Manganese Peroxidasa y Lignina Peroxidasa juegan un papel muy importante en la degradación de la lignina. Estas tres enzimas han sido denominadas Enzimas modificadoras de la lignina (LME), por sus

siglas en inglés). Basado en el patrón de producción, los hongos de pudrición se han clasificado en dos grupos, aquellos productores de Lacasa y Manganeso Peroxidasa y aquellos productores de estas enzimas además de la LiP. Las condiciones de cultivo afectan la fisiología del microorganismo y por consiguiente, la síntesis de las enzimas. Al producir una serie de enzimas poco específicas y de tipo extracelular, les permite degradar compuestos insolubles y altamente peligrosos para el ambiente.

El estudio de estos hongos ha llevado a considerarlos como posibles candidatos en diversos procesos de bioremediación.

#### 5.3.2.1.- Lacasa (EC 1.10.3.2)

La Lacasa es una benzendiol: oxígeno oxidoreductasa. Forma parte de un grupo de enzimas que incluyen ascorbato oxidasa y la ceruloplasmina. En insectos tienen la función de queratinizar la cutícula (Arakane, *et al.*, 2005), en bacterias como *Bacillus subtilis*, se encuentra presente en la cubierta de la espora, cuya función se cree es la de darle la pigmentación a la misma (Martins, *et al.*, 2002). Por otro lado, la función que presenta en las plantas es la formación de los precursores de la lignina (O'Malley, *et al.*, 1993).

La Lacasa es una cupro proteína perteneciente a un pequeño grupo de enzimas denominadas oxidasas azules. En general, exhiben cuatro átomos de carbono, importantes en el mecanismo catalítico de la enzima. Diversos estudios moleculares, expresión genética, transcripción y clonación se han realizado de forma exhaustiva.

La forma como lleva a cabo la reacción un substrato fenólico es sujeto a una oxidación de un electrón dando como resultado un radical oxiaril. Esta especie de sitio activo puede ser convertida a una quinona en un segundo estado de oxidación. La quinona así como el producto del radical libre participa en las reacciones de acoplamiento no enzimático que permiten la polimerización. Los substratos para esta enzima están muy extendidos, incluye subunidades de lignina no fenólica en la presencia de substratos primarios listos para ser oxidados, que pueden actuar como mediadores de transferencia de electrones (Figura 5.2).

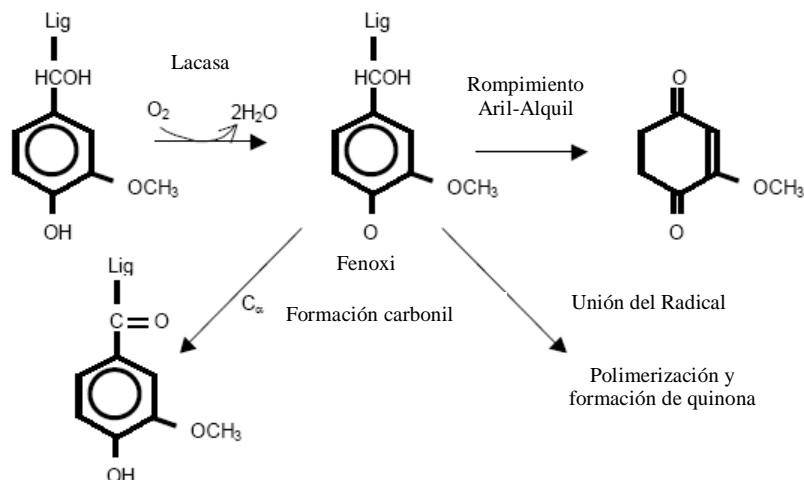


Figura 5.2.- Oxidación de los grupos fenólicos de la lignina catalizados por la Lacasa (Tomado de Archibald, *et al.*, 1997)

### Inducción

En los basidiomicetos, las Lacasas extracelulares son producidas de forma constitutiva en pequeñas cantidades. Sin embargo, su producción puede ser estimulada mediante la adición de una serie de compuestos, todos ellos denominados inductores, principalmente compuestos aromáticos o fenólicos, relacionados a la lignina o sus derivados; esto da como resultado la biosíntesis de nuevas formas extracelulares. Así mismo, la concentración de tales compuestos en el medio de cultivo influye en la producción de Lacasa. Sin embargo, el efecto de estos inductores depende de la especie de hongo a estudiar. Cada hongo presenta una respuesta diferente para el mismo compuesto y misma concentración. Por ejemplo, en especies de *Pycnoporus cinnabarinus* o *P. sanguineus*, la producción de las enzimas lignolíticas responden mejor en medios de cultivo con bajo contenido en nitrógeno. De igual forma, metales como el cobre favorecen significativamente la síntesis de la Lacasa.

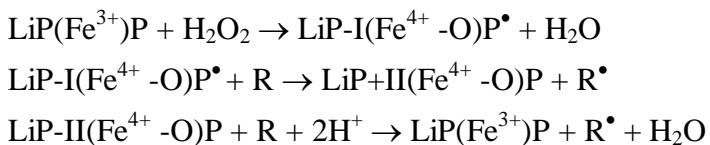
### Isoenzimas

Los hongos presentan la capacidad de sintetizar isoformas (isoenzimas) de la Lacasa. El número de isoformas varía entre las especies y aun dentro de la misma especie, dependiendo de las condiciones de cultivo empleadas. Las isoformas pueden variar significativamente en sus propiedades, punto isoeléctrico, pH, especificidad de sustrato, estabilidad, etc. (Manssur, *et al.*, 2003). Así mismo, se ha visto que estas isoenzimas pueden tener diversos papeles en la fisiología del microorganismo, sometidos a diferentes condiciones de cultivo. *Pleurotus ostreatus* llega a producir al menos ocho isoenzimas, con diferentes pesos moleculares y su producción es regulada por el cobre.

Otras especies capaces de sintetizar isoenzimas son *Corioloopsis rigida*, *Cichomitus squalens*, *Physisporinuns rivulosos* y *Trametes gallica*, relacionadas estrechamente en sus propiedades catalíticas y estructurales. La razón por la cual los hongos son capaces de sintetizar diferentes isoenzimas, es la presencia de múltiples genes de Lacasa.

### 5.3.2.2.- LiP (Lignino Peroxidasa)

Esta enzima es producida por diversos hongos de pudrición blanca. Existen muchos reportes que indican que está involucrada en la degradación de la lignina. Algunas de las más importantes características que la distinguen de otras oxido reductasas, tal como la peroxidasa del rábano, su bajo pH óptimo, así como su alto potencial redox, permitiéndole la oxidación de compuestos aromáticos no fenólicos difíciles de biodegradar, tales como el alcohol veratrilo y bencenos metoxilados (Camarero, *et al.*, 1999), compuestos aromáticos policíclicos, como el DDT; bifenoles policlorinados; dibenzo(p)dioxinas policloradas; lindano y alcanos clorados (Bumpus, *et al.*, 1987; Field, *et al.*, 1992; Joshi, *et al.*, 1997). Tiene un peso molecular de 41kDa, contiene 1 mol de protoporfirina de hierro IX por mol de enzima y existe una serie de isoenzimas de pI de 3.2-4.0. Esta enzima cataliza la oxidación dependiente del peróxido de una gran variedad de compuestos modelo de lignina en una serie de reacciones en multipaso:



En este esquema, R es el sustrato y P es la porfirina. El compuesto de LiP I lleva ambos equivalentes oxidados de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, una como el centro oxiferril (Fe<sup>4+</sup>-O) y uno como un radical π de porfirina (P<sup>•</sup>), mientras que LiP II lleva sólo un equivalente oxidante. El sustrato R es oxidado por el compuesto I a un radical aril con una reacción posterior no enzimática, dando el producto final (Figura 5.3; Edwards, *et al.*, 1993). La ligninasa fue identificada inicialmente como una oxigenasa extracelular y posteriormente como una múltiple peroxidasa. La primera evidencia que la involucra en la degradación de la lignina proviene de la inhibición de tal degradación por la catalasa.

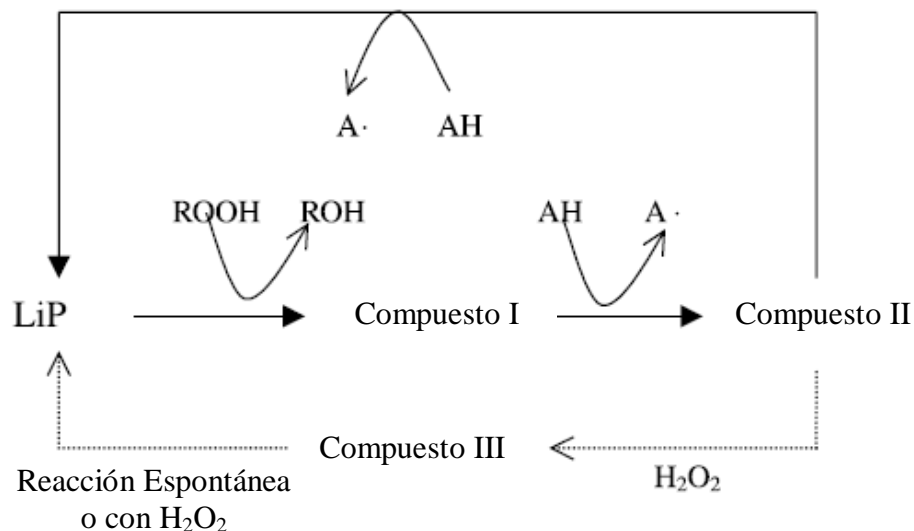


Figura 5.3.- Mecanismo de Reacción catalizada por la Lignina Peroxidasa (LiP) (Tomada de Shah y Nerud, 2002)

#### 5.3.2.3. MnP (Manganeso Peroxidasa)

Es la segunda mayor peroxidasa producida por los hongos de pudrición blanca. Es la única entre las peroxidases en la que su principal sustrato son ácidos orgánicos (por ejemplo, oxalato, malonato, lactato).

El ciclo catalítico típico comienza con la oxidación de la enzima férrica por dos electrones del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para formar el compuesto I (Fe<sub>IV</sub> = O•[P]<sup>•+</sup>), intermediario (Figura 5.4). Este compuesto puede oxidar el Mn<sup>2+</sup> a Mn<sup>+3</sup> o puede oxidar sustratos fenólicos a sus correspondientes radicales y la enzima es reducida a un intermediario de un electrón oxidado a un intermediario de un electrón oxidado, Compuesto II (Fe<sup>IV</sup>=O[P]). El compuesto II de la MnP exhibe un requerimiento absoluto de Mn (II) como reductor. En la presencia de un exceso de peróxido, la enzima es oxidada al Compuesto III (Fe<sup>III</sup>O<sub>2</sub>), el cual no es parte del ciclo catalítico. La MnP también muestra tener la habilidad para acarrear la desproporción del peróxido en la presencia de Mn<sup>2+</sup>.



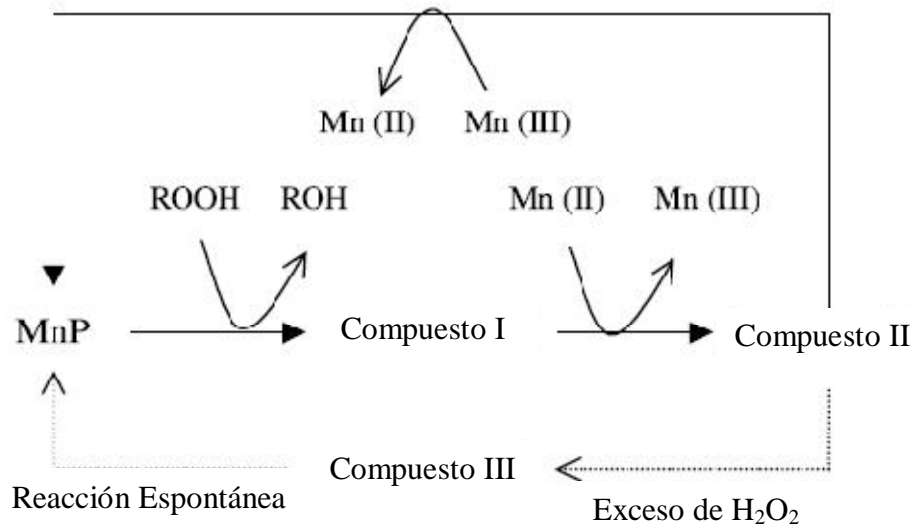


Figura 5.4.- Mecanismo de reacción catalizada por la Manganosa Peroxidasa (MnP) (Tomada de Shah y Nerud, 2002)

Es una enzima ligninolítica extracelular y al igual que la Lignina Peroxidasa, utiliza el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como un oxidante para transformar el Mn<sup>II</sup> a Mn<sup>III</sup> hasta el ion mangánico Mn<sup>+3</sup>. El Mn<sup>III</sup>, estabilizado por quelación, actúa como un oxidante no específico, participando en la degradación de la lignina por el microorganismo que la produce.

Se ha visto que la introducción de un sistema enzimático basado en la Manganosa Peroxidasa en la elaboración del papel podría tener algunas ventajas:

- Reducción del contenido de lignina en la pulpa kraft y como consecuencia, una disminución posterior en la cantidad de químicos necesarios para el blanqueamiento del papel (Paice, *et al.*, 1988);
- Incremento de las propiedades mecánicas de la pulpa debido a que restringe las alteraciones de las fibras de celulosa por que la acción enzimática es más selectiva que el tratamiento químico;
- Por último, una reducción de la energía requerida en el estado de refinado.

### 5.3.3.- COLORANTES SINTÉTICOS

Los colorantes sintéticos son ampliamente utilizados en la industria textil, impresión de papel, fotografía a color, cosméticos, farmacia y la industria de la piel. Estos son importantes desde el punto de vista ambiental ya que pueden formar aminas aromáticas tóxicas. Con el paso de los años su uso se incrementó y por lo tanto, su liberación al medio ambiente; los efectos pueden llegar a ser carcinogénicos y

matagénicos. Del 2-50% de estos colorantes y pigmentos son liberados en forma de desechos, muchos de ellos son persistentes en el ambiente y no son removidos por tratamientos convencionales, por lo cual llegan a atravesar la cadena alimenticia, originando una biomagnificación.

#### 5.3.3.1.- Clasificación de los colorantes

Los colorantes textiles son clasificados como aniónicos (directos, ácidos y reactivos), catiónicos (colorantes básicos) y no aniónicos (colorantes dispersos). Los colorantes aniónicos y no aniónicos incluyen sobre todo cromóforos del tipo azo y antraquinonas. Los colorantes azo son ampliamente utilizados, corresponden a más del 60% del total de colorantes conocidos manufacturados y las aminas tóxicas en los efluentes industriales son el resultado del rompimiento reductivo de las uniones azo. Los colorantes antraquinónicos son más resistentes a la degradación debido a que su estructura aromática está fundida. La alta brillantez e intensidad de los colorantes hacen a los colorantes básicos muy visibles aún a bajas concentraciones. La LD<sub>50</sub> es mayor a 2000 mg/kg con una alta toxicidad y se encontró entre los colorantes básicos y diazo.

Los efluentes de la industria textil se caracterizan por tener un color visible muy alto (3000-4000 unidades), demanda de oxígeno (800-1600 mg/L), rango de pH alcalino (9-11) y sólidos totales (6000-7000 mg/L). Existe un gran interés en el desarrollo de métodos biológicos (microbianos y enzimáticos) para contrarrestar los efectos derivados de la liberación de este tipo de descargas; debido a que estos métodos son considerados atractivos por su costo potencial bajo, compatibilidad con el ambiente y aceptación pública. En general, los efluentes no solo presentan color, también contienen varios compuestos inorgánicos como los sulfuros, sulfatos, cloruros, carbonatos, hidróxido de sodio, peróxidos y compuestos blanqueadores de cloro, otorgándole olor y sabor.

#### 5.3.3.2.- Método para la remoción de colorantes

Diversos métodos se han implementado para la reducción de los colorantes vertidos al ambiente, entre ellos floculación, electroquímica, ozonización, blanqueo, filtración por membrana, irradiación y adsorción con carbón activado (Tabla 1). Sin embargo, la mayoría de tales métodos son altamente específicos y poco económicos aunque si efectivos.

Actualmente, se ha visto que los métodos biológicos son los más efectivos, específicos y de menor intensidad de energía y son ambientalmente benignos, donde resultan en una parcial o completa bioconversión de los contaminantes orgánicos a productos finales no tóxicos estables. Tanto la biosorción y la biodegradación han sido

explorados como métodos de tratamiento biológico de los efluentes contaminados con los colorantes.

Tabla 5.1.- Métodos existentes para el tratamiento de colorantes vertidos al ambiente

MÉTODO	MÉTODO ESPECÍFICO	COMENTARIOS
Físico	Adsorción	Excelente remoción de varios colorantes; el carbón activado es caro; pérdida de material por la regeneración; las reacciones colaterales con la sílica gel son indeseables; material celulósico natural puede tener un costo efectivo, pero el área de superficie es comparablemente menor.
	Filtración por membrana	Efectivo en la remoción de todos los tipos de colorante de las aguas residuales, pero los colorantes concentrados en los lodos necesitan ser dispuestos apropiadamente.
	Intercambio Iónico	Tanto los colorantes aniónicos como catiónicos pueden ser removidos de los efluentes; la regeneración es posible sin pérdida de material; puede no ser aplicable para todos los tipos de colorantes; el costo es prohibitivo.
	Irradiación	Oxidación eficiente de diversos colorantes a escala de laboratorio; requerido alto volumen de oxígeno, lo cual lo hace un sistema poco atractivo
Químico	Oxidación	Eficiente decoloración por oxidación de varios tipos de colorantes; los problemas asociados con la formación del producto; los problemas de mezcla pueden estar asociados con el tratamiento con el reactivo de Fenton; la ozonación tiene tiempos de vida media cortos – 20 min; la liberación de aminas aromáticas está relacionada con NaOCl.
	Electroquímica	Método relativamente nuevo para remoción efectiva; rompimiento de productos no peligrosos; el costo de electricidad es costoso.
	Coagulación	Excelente remoción de los colorantes directos utilizando sulfato ferroso y cloruro férrico; pobre remoción de colorantes ácidos; un alto volumen de formación de mezcla; alto costo de disposición
Biológicos	Biosorción	Aun está en estado de investigación el uso de Biomasa microbiana para sorber y remover los colorantes de las aguas residuales; puede no ser práctico el tratamiento a grandes volúmenes de efluentes industriales; problemas asociados con la disposición de los colorantes adsorbidos en la biomasa; puede ser regenerado usando

	químicos
Biodegradación	Muestra potencial el consorcio de cultivos mixtos en un sistema combinado aerobio/anaerobio para una completa remoción de los compuestos colorantes; los sistemas de células inmovilizadas parecen ser más prácticos que las células bacterianas libres; uso práctico de procesos bacterianos no están bien documentados; se requiere información fisiológica/genética mas entendible
Enzimático	Las preparaciones de Lacasa y peroxidasas ofrecen un método más rápido para la decoloración de los colorantes de las aguas residuales; análisis detallados de la reacción de producto, estudios de escalamiento y evaluación económica cuidadosa se requieren para las aplicaciones comerciales

### 5.3.3.3.- Tratamiento biológico: Hongos de pudrición blanca

De los microorganismos evaluados, los hongos de pudrición blanca son los más ampliamente utilizados para la decoloración/degradación de colorantes (Tabla 2). Anteriormente se asumía que la Lacasa y las peroxidasas solamente podían convertir un tipo limitado de colorantes azo con una conversión preferencial de los colorantes que presentaban sustituyentes fenólicos en posición para de los enlaces del colorante y substituyentes metil o metoxi en la posición 2 o 2,6 en relación al grupo hidroxil. Sin embargo, se demostró que ciertas Lacasas y peroxidasas son capaces de decolorar cierto tipo de colorantes azo tal como el negro reactivo.

*Phanerochaete chrysosporium* es capaz de decolorar diversos colorantes industriales y colorantes poliméricos. Así mismo, otros hongos lignolíticos han mostrado ser capaces de degradarlos. *Pleurotus ostreatus* decolora al colorante polimérico Poli-B411, pero solo bajo ciertas condiciones. De igual forma, *P. ostreiformis* y *Trametes versicolor*, fueron capaces de decolorar el rojo congo y utilizar el azul brillante de remazol como mediador en la oxidación de compuestos modelo, respectivamente.

El mecanismo de la oxidación de los colorantes azo por las peroxidasas tal como la Lignina Peroxidasa, involucra la oxidación del grupo fenólico para producir un radical en el carbono de la unión azo. Entonces, el agua ataca a este carbono fenólico para romper la molécula, produciendo fenildiazeno. Este compuesto puede ser oxidado por una reacción de un electrón, generando N<sub>2</sub>. Para la oxidación de la Lacasa, se ha propuesto un mecanismo similar.

Tabla 5.2.- Hongos y su mecanismo de decoloración

HONGO	ESPECIE	MECANISMO DE ACCIÓN
Hongos de pudrición blanca	<i>Bjerkandera adusta</i>	Manganeso Peroxidasa
	<i>Cyathus bulleri</i>	Lacasa
	<i>Funalia trogii</i>	Adsorción, biodegradación
	<i>Lentinula edades</i>	Lacasa
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Lignino Peroxidasa
	<i>Phebia radiata</i>	Peroxidasa
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Peroxidasa
	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Lacasa
	<i>Trametes versicolor</i>	Biosorción, ligninasa
	<i>Trametes hispida</i>	Lacasa
Otros filamentosos	<i>Aspergillus foetidus</i>	Biosorción, biodegradación
	<i>Aspergillus niger</i>	Adsorción, biodegradación
	<i>Aspergillus sojae</i>	Biosorción
	<i>Botrytis cineria</i>	Adsorción
	<i>Myrothecium verucaria</i>	Biosorción
	<i>Nuerospora crassa</i>	Biosorción
	<i>Rhizopus arrhizus</i>	Biodegradación
	<i>Trichoderma sp.</i>	Biosorción, biodegradación
Levaduras	<i>Candida rugosa</i>	Adsorción
	<i>Cryptococcus heveanensis</i>	Adsorción
	<i>Dekkera bruxellensis</i>	Adsorción
	<i>Klyveromyces maxianus</i>	Adsorción
	<i>Klyveromyces waltii</i>	Adsorción
	<i>Pichia carsonii</i>	Adsorción
	<i>Rhodotorula rubra</i>	Biodegradación
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Biosorción

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL**

El presente trabajo se basó en el estudio experimental comparativo, con el fin de evaluar si las cepas nativas aisladas en el Estado de Nuevo León eran capaces de producir Lacasa, Lignino Peroxidasa y Manganese Peroxidasa y si los niveles alcanzados eran iguales o superiores a los producidos por una cepa de colección, *Pleurotus ostreatus* ATCC 58053, bajo las mismas condiciones de estudio. Para ello, se hizo una selección primaria mediante la oxidación en medio sólido de diversos sustratos para determinación de oxidasas y peroxidasas. Después de realizar dichos ensayos, se seleccionaron cuatro cepas nativas y una cepa de colección internacional. La producción enzimática se realizó en cultivo líquido, en dos medios de cultivo: harina de soya (SMM) y medio mineral-Glucosa (GMM). Los ensayos se hicieron por triplicado, tomando dos muestras por cada uno de ellos.

### **6.2. AISLAMIENTO DE LOS HONGOS**

Los cuerpos fructíferos se colectaron a partir de árboles en pudrición, en áreas con clima húmedo del estado de Nuevo León, Linares (Sur del estado a 350 m del nivel del mar y una temperatura promedio de 22° C); Montemorelos (Centro del estado a 430 m del nivel del mar y una temperatura de 40° C); Santiago (Cerca de la Sierra Madre Oriental, al sur del estado, 445 m del nivel del mar y una temperatura de 21° C); Monterrey y Guadalupe (Noroeste del Estado, temperatura promedio de 24° C, a 538 m sobre el nivel del mar). Se recolectaron alrededor de 50 cuerpos fructíferos, de los cuales se logró el aislamiento satisfactorio de 23. El aislamiento se llevó a cabo en cuatro medios de cultivo colocando parte del cuerpo fructífero sobre placas Petri. Medio 1: Agar extracto de malta-extracto de levadura, cuya composición por litro fue la siguiente: glucosa, 4g; extracto de malta, 10 g; extracto de levadura, 15 g y agar bacteriológico 15g. Medio 2: Agar dextrosa y Papa, marca DIFCO. Medio 3: Agar Czapek Dox (DIFCO). Medio 4: Agar extracto de malta, el cual contiene por litro: glucosa, 4 g; extracto de malta, 10 g y agar bacteriológico, 15 g. Las 23 cepas se mantuvieron de forma rutinaria en agar extracto de

malta-extracto de levadura (el mejor para el aislamiento). Se incubaron a 28° C y se almacenaron a 4° C. Todas estas cepas de basidiomicetos se conservan como cultivos puros en la Colección del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas (UANL).

### **6.3. IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS**

Los hongos aislados quedaron agrupados en diversas especies, entre ellas, *Trametes villosa*, *Schizophyllum commune*, *Poria* sp, *Ganoderma* sp. y *Poliporus sanguineus*. La identificación fue llevada a cabo en base a las características macroscópicas de los cuerpos fructíferos por el Dr. José Guadalupe Marmolejo (Facultad de Ciencias Forestales, UANL). El resto de las cepas fueron nombradas como SL1, SL2, S1, S2, CC1, CC2, RVAN2, RVAN12, CH3, CH5 y CH13. La identificación de los hongos se realizó utilizando cebadores de regiones altamente conservadas, para amplificar las regiones variables ITS1 e ITS2, que permitan comparar con bancos de datos de genes e identificar a los hongos de interés.

#### **6.3.1. EXTRACCION DEL ADN**

La extracción de ADN fúngico se realizó a partir del micelio. El micelio se obtuvo de la superficie de la caja, fue depositado en un mortero y se le agregó nitrógeno líquido para triturarlo (aspecto de pasta). Posteriormente, se colocó en tubos eppendorf de 1.5 mL, en cantidades de 500 µL. Se adicionaron 600 µL de buffer de Urea (21.02 g Urea, 3 mL stock 5M NaCl, 2 mL stock 0.5 M EDTA, 2.5 mL stock 1 M Tris HCl pH 8, 0.5 g Sarcosina. Se aforó a 50 mL con agua miliQ estéril), se mezcló en vortex durante 2 min. Se agregó RNAsa (10 mg/mL) y se mantuvo en reposo durante media hora a temperatura ambiente. Se añadieron 600 µL de fenol-cloroformo 25:25 (Cloroformo 25 mL más fenol saturado 25 mL) y se mezcló en vortex 10 min. Se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 minutos, se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se precipitó con 2 volúmenes de etanol al 100% y 1/10 de acetato de sodio 3M (NaC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub> 12 g en 50 ml de agua miliQ). Se centrifugó a 10 000 rpm durante 2 min. Se lavó la pastilla con 1 mL de etanol al 70%, y se centrifugó nuevamente. Se secó la pastilla y se resuspendió en 25 µL de TE 1X (La dilución TE 1X se obtuvo del stock TE 50X; 2.5 mL Tris-HCl 50 mM, 1 mL EDTA 10 mM pH 7.5, se aforó a 50 mL con agua miliQ, se ajustó a pH 8.0). Por último, se mantuvo a -20° C hasta su uso.

La cantidad de ADN obtenida se determinó por su absorbancia a 260 nm en un espectrómetro GBC (Cintra 10e.), aplicando la fórmula siguiente:

$$[\text{ADN}] = 50 * A_{260\text{nm}} * \text{FD} \quad [\mu\text{g/mL}]$$

Donde el factor de dilución se calculó como:

$$FD = (Vol. Agua miliQ) + (Vol. de la muestra) / Vol. de la muestra$$

La calidad del ADN se cuantificó mediante el valor de la relación de la absorbancia a 260 y 280 nm de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$Calidad\ de\ ADN = A260 / A280$$

Donde un valor entre 1.8 y 2 indica que la solución está libre de proteína, por lo que se tiene una buena calidad de ADN. El ADN se visualizó en un gel de agarosa al 1.5%, con buffer TBE 0.5X (0.1 M Tris, 0.09 M ácido bórico, 1.0 mM EDTA) a 80 volts por 1.2 h.

### 6.3.2 AMPLIFICACIÓN DE SEGMENTOS DE ITS1-ITS4 (GEN 5.8S)

Condiciones de reacción

*Reacción de PCR con cebadores para ITS1-ITS4*

	Concentración	1X
DNAg	50ng	1.0 µL
Buffer	10X	2.5 µL
MgCl <sub>2</sub>	25mM	1.5 µL
dNTPs	10mM	0.5 µL
Primer F	5 µM	2.5 µL
Primer R	5 µM	2.5 µL
Taq	5 u/5µL	0.5 µL
H <sub>2</sub> O miliQ	-- µL	14 µL
	-----	-----
	25 µL	25 µL

#### Temperaturas de reacción

Ciclo	Temperatura °C	Tiempo
Desnaturalización	94	5:00
Alineamiento	94	0:30
	57	0:30
	72	1:00



Los segmentos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5% con buffer TBE 0.5X (0.1 M Tris, 0.09 M ácido bórico, 1.0 mM EDTA) a 80 volts por 1.2 h con marcador de 100 pb.

### **6.3.3. PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR**

Para purificar la banda del tamaño de interés se utilizó el kit de purificación Gel Extraction Systems (MARLIGEN). El producto de PCR (50  $\mu$ L) se corrió en un gel de agarosa al 1% en TBE, las bandas se visualizaron bajo luz UV y se cortó manualmente el fragmento del tamaño de interés. La porción cortada fue transferida a un tubo Eppendorf de 1.5 mL previamente pesado. Se determinó la masa del bloque de agarosa/ADN. Se adicionaron 30  $\mu$ L de solución amortiguadora solubilizadora (L1) por cada 10 mg del gel y se incubaron a 50°C por 15 minutos; se agitó de forma vigorosa cada 3 minutos, posteriormente se incubó por 5 minutos más. La muestra fue cargada en un cartucho, se colocó dentro de un tubo de 2 mL y se centrifugó a 12,000 rpm por 1 minuto y se descartó el líquido filtrado al tubo. Se adicionaron 500  $\mu$ L de la solución L1 al cartucho, se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 rpm por 1 minuto, se descartó el líquido filtrado del tubo. Se añadieron 700  $\mu$ L de solución amortiguadora de lavado (L2), se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y centrifugar a 12,000 rpm por 1 minuto. Se descartó el líquido filtrado y se centrifugó nuevamente por 1 minuto para remover el residuo de solución amortiguadora de lavado. El cartucho se colocó en un tubo Eppendorf de recolección de los fragmentos de ADN retenidos y se eluyó con 25  $\mu$ L solución amortiguadora TE 1X previamente calentada a 65°C. Se incubó por 1 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 12,000 rpm por 2 minutos y se repitió la operación una vez más. El producto obtenido (50  $\mu$ L) se almacenó a -20 °C hasta su uso.

### **6.3.4. CLONACIÓN**

Se utilizó el KIT comercial pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems de PROMEGA ([www.promega.com](http://www.promega.com)) y se siguieron los protocolos indicados en el manual.

### **6.3.5. SECUENCIACIÓN**

La secuencia de la clona elegida se determinó por secuenciación cíclica con el estuche comercial Sequi Therm Excel II Sequencing (DNA Sequencing Manual)

(<http://www.epibio.com/pdftechlit/072pl091.pdf>) y el secuenciador automático de la marca Li-Cor ®.

#### **6.4. OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO**

Después de 7 días de incubación de los hongos a 28° C y resiembras periódicas, se examinaron al microscopio para observar la ausencia de bacterias y la pureza de los hongos, así como la presencia de fíbulas, característica de este tipo de hongos. Para ello, se colocó una gota de azul algodón lactofenol en un cubre objetos, adicionalmente, se tomó con una cinta transparente parte del micelio de la periferia y se colocó sobre la gota de colorante, se observó al microscopio con aceite de inmersión.

#### **6.5. MICROORGANISMOS**

Los basidiomicetos utilizados en el presente trabajo fueron cuatro cepas: *Trametes villosa* (RVAN18), *Schizophyllum commune* (RVAN19), RVAN2 y RVAN12. Así mismo, se usaron tres cepas de referencia *Phanerochaete chrysosporium*, *Bjerkandera adusta* y *Pleurotus ostreatus* ATCC 58053, se descartaron las dos primeras cepas ya que no fue detectada actividad de Lacasa, LiP y MnP en los estudios realizados en medio mineral-glucosa (GMM).

#### **6.6. MÉTODO DE EVALUACIÓN PRIMARIA EN MEDIO SÓLIDO**

Se evaluó la habilidad de las cepas nativas en la producción de enzimas extracelulares, mediante la actividad extracelular oxidativa del ABTS [ácido 2,2'-azino-bis(3-etilenvenzotiazoline-6- sulfónico)] y la actividad de peroxidasa. El ensayo, se llevo a cabo inoculando en placas Petri (90 mm de diámetro), con 30 mL de medio mineral con glucosa (GMM), cuya composición por litro fue la siguiente: extracto de levadura, 1.0 g; glucosa, 10 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 g; KCl, 0.5 g; solución mineral, 1.0 mL ( $\text{B}_4\text{O}_7\text{Na}_2 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , 100 mg;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 10 mg;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 10 mg;  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 10 mg; por litro); cada uno de los hongos estudiados. El pH se ajustó a 5.5 y se esterilizó el medio a 121° C por 15 min. Por otro lado, 100 mg/L de cada uno de los substratos, ABTS, guaiacol u O-anisidina fueron esterilizados por filtración y añadidos al medio de cultivo, al ser enfriado a 45° C después de su esterilización. Las placas se inocularon con un disco de micelio (5 mm diámetro), previamente sembrado en agar extracto de malta-extracto de levadura (descrito anteriormente) y se incubaron a 30° C por 1-30 días. El cromógeno ABTS es un substrato muy sensible que permite el rápido monitoreo de cepas fúngicas capaces de producir enzimas oxidativas extracelulares por medio de una reacción de color. Estos tres

substratos han sido utilizados anteriormente en el monitoreo de enzimas lignolíticas. Aquellas colonias que mostraron un halo verde en el medio y que excedía el diámetro de la colonia fueron consideradas como productoras de actividad oxidativa del ABTS. Por otro lado, aquellas colonias que mostraron un halo naranja en el mismo medio con O-anisidina y un halo café con guaiacol fueron consideradas como productores de actividad peroxidasa.

## **6.7. CONDICIONES DE CRECIMIENTO PARA EL ENSAYO ENZIMÁTICO EN MEDIO LÍQUIDO**

Los matraces ErlenMeyer de 250 mL con 150 mL de cada uno de los medios empleados, se inocularon con 5 fragmentos de micelio (5 mm diámetro). Los medios utilizados fueron: medio de harina de soya (SMM), cuyo contenido por litro fue harina de soya, 30 g; se hirvió por 10 min y se filtro en dos capas de manta. Bacto peptona (DIFCO), 15 g; maltosa, 15 g; Tween 80, 1 mL y L-asparagina, 0.6 g; y el medio mineral-glucosa (GMM), descrito anteriormente sin adición de agar. Los medios se esterilizaron a 121° C por 15 min. Después de inoculados, los matraces se incubaron a 30 °C y 150 rpm, por 10 días en el caso de GMM y por 20 días para SMM.

## **6.8. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA**

Se tomaron alícuotas de 1.5 mL cada dos días del cultivo respectivo, se centrifugaron a 3500 rpm por 20 minutos. Posteriormente, la actividad de Lacasa se determinó en el sobrenadante mediante la oxidación del ABTS en una mezcla de reacción de 2 mM ABTS en 200 mM de buffer de acetato de sodio a pH 5.0 con 100 µL de extracto crudo. La formación del catión se monitoreó espectrofotométricamente a 405 nm ( $\epsilon_{405}=3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), volumen total de 3 mL. Por otro lado, la actividad de Lignino Peroxidasa (LiP) se determinó por la dimerización oxidativa dependiente del peróxido del 2,4-diclorofenol a 25°C. La mezcla de reacción consistió de 26 mM de 4-amino antipirina, 30 mM de 2,4-diclorofenol y 3mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en buffer de succinato de sodio 20 mM a pH 4.5 (Niladevi y Pharma, 2005). La absorbancia se monitoreó a 510 nm ( $\epsilon_{510}=1.85 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). La actividad de MnP se llevó a cabo a 25°C mediante la formación dependiente del peróxido de hidrógeno del complejo malonato-ión mangánico a 270 nm ( $\epsilon_{270}=11590 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). La mezcla de reacción consistió de sulfato manganoso 1.0 mM en 50 mM de buffer de malonato de sodio (pH 4.5) y 100 µL de extracto crudo, la reacción se inició al adicionar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración final de 1.0 mM (Warishii y Gold, 1992). Todas las medidas espectrofotométricas se realizaron en un Espectrofotómetro Beckman MODELO DU 400. Las actividades enzimáticas se

expresaron en unidades, las cuales son definidas como 1  $\mu\text{M}$  de sustrato oxidado por minuto a 25° C. La producción de enzimas lignolíticas extracelulares de las cepas nativas se comparó con aquellas obtenidas con la cepa de referencia, *Pleurotus ostreatus* ATCC 58053, utilizando ambos medios de cultivo.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado, tomando dos muestras de cada uno. A los datos obtenidos se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) con un límite de confianza del 95%, una prueba de rangos múltiples de Tukey con una  $\alpha$  de 0.05, así como la Prueba de Dunnett para determinar diferencias significativas del control con respecto a los tratamientos con un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ .

Variable Independiente: Medios de Cultivo

Variables dependientes: Actividad enzimática de Lacasa, Lignino Peroxidasa y Manganese Peroxidasa en cada uno de los hongos para los dos medios de cultivo.

Los diversos análisis fueron realizados con el programa Statistica ver. 8.0 (StatSoft, Inc.).

#### **6.9. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA EN GMM SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAC, LiP Y MnP**

Con el fin de evaluar el efecto de la concentración de glucosa en la actividad enzimática, se eligieron dos cepas (RVAN2 y RVAN12), para estos estudios. Las concentraciones evaluadas fueron: 0.5, 1.0, 2.5, 7.5 g/L y como control positivo, una concentración de 10 g/L. El resto de los componentes en GMM permanecieron constantes. Los ensayos fueron realizados por duplicado y se realizaron tres lecturas por ensayo.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado, tomando dos muestras de cada uno. A los datos obtenidos se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) con un límite de confianza del 95%, una prueba de rangos múltiples de Tukey con una  $\alpha$  de 0.05, así como la Prueba de Dunnett para determinar diferencias significativas del control con respecto a los tratamientos con un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ .

Variable Independiente: Medios de cultivo.

Variables dependientes: Actividad enzimática de Lacasa, Lignino Peroxidasa y Manganese Peroxidasa en cada uno de los hongos para los dos medios de cultivo.

Los diversos análisis fueron realizados con el programa Statistica ver. 8.0 (StatSoft, Inc.).

### **6.10. EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO EN GMM SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAC, LiP Y MnP**

Con el fin de evaluar el efecto de la fuente de carbono sobre la actividad enzimática en las dos cepas nativas seleccionadas (RVAN2 y RVAN12); se utilizaron cuatro fuentes diferentes, Acetato de sodio, Almidón, Celulosa y Lignina. Todas ellas a una concentración de 1% (w/v). Los ensayos se llevaron a cabo por espacio de 12 días. El resto de constituyentes del medio permanecieron constantes.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado, tomando dos muestras de cada uno. A los datos obtenidos se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) con un límite de confianza del 95%, una prueba de rangos múltiples de Tukey con una  $\alpha$  de 0.05, así como la Prueba de Dunnett para determinar diferencias significativas del control con respecto a los tratamientos con un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ .

Variable Independiente: Medios de Cultivo.

Variabes dependientes: Actividad enzimática de Lacasa, Lignino Peroxidasa y Manganese Peroxidasa en cada uno de los hongos para los dos medios de cultivo.

Los diversos análisis fueron realizados con el programa Statistica ver. 8.0 (StatSoft, Inc.).

### **6.11. DETERMINACIÓN DE GLUCOSA Y pH**

La determinación de glucosa en el medio se realizó por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (Miller, 1959). Por otro lado, el pH se monitoreó utilizando un potenciómetro Beckman Mod. 390, cada dos días.

### **6.12. DETERMINACIÓN DE BIOMASA**

La concentración de biomasa se determinó mediante el peso seco del micelio fúngico. Se retiraron dos matraces ErlenMeyer del agitador orbital (Labconco), cada dos días y el medio de cultivo se filtró a través de papel filtro Whatman No. 1. La biomasa se lavó con agua destilada y se secó a 100° C hasta peso constante.

### **6.13. INDUCTORES**

Los ensayos de inducción se llevaron a cabo de la siguiente forma: Se inocularon matraces que contenían SMM o GMM, de la forma descrita en el punto 6.6. Los inductores probados fueron: Sulfato de cobre, 0.5 y 1.0 mM; sulfato manganeso, 11 y 40 mg/L; siringaldazina, 0.116 y 1.16  $\mu$ M y Etanol, 35 y 40 g/L. Los inductores se añadieron a las 24 horas de inoculados los matraces. La toma de muestra y la actividad enzimática se determinó siguiendo el procedimiento explicado en el punto 6.7.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado, tomando dos muestras de cada uno. A los datos obtenidos se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) con un límite de confianza del 95%, una prueba de rangos múltiples de Tukey con una  $\alpha$  de 0.05, así como la Prueba de Dunnett para determinar diferencias significativas del control con respecto a los tratamientos con un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ .

Variable Independiente: Concentración del Inductor.

Variables dependientes: Actividad enzimática de Lacasa, Lignino Peroxidasa y Manganese Peroxidasa en cada uno de los hongos para los dos medios de cultivo.

Los diversos análisis fueron realizados con el programa Statistica ver. 8.0 (StatSoft, Inc.).

#### **6.14. EFECTO DEL pH Y LA TEMPERATURA EN EL EXTRACTO CRUDO**

El efecto del pH en la actividad de Lacasa se examinó en un rango de pH de 3 a 10, utilizando buffer de citrato de sodio 50 mM pH 3 a 6; buffer de fosfato de sodio 50 mM pH 6 a 8 y buffer tris 50 mM pH 8 a 10. Se utilizó ABTS como sustrato. Así mismo, se analizó el efecto del pH sobre la estabilidad de la enzima después de incubarse por 1 y 24 h en buffer citrato de sodio 50 mM. La estabilidad de Lacasa frente a la temperatura se determinó en un rango de 20° a 90° C, en buffer de citrato de sodio 50 mM, pH 3.0. Las mediciones se realizaron por triplicado en tres experimentos totalmente independientes.

#### **6.15. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE VIDA MEDIA**

Los tiempos de vida media de los extractos de RVAN2 y RVAN12 con y sin la adición de sulfato de cobre 1mM se llevó a cabo incubando cada uno de los extractos crudos en buffer de acetato de sodio 100 mM pH 5 y 50° C. Se determinó la actividad remanente de Lacasa a los 30 min, 1, 2.5, 5, 8, 16, 20 y 24 horas. Las determinaciones se hicieron por duplicado. Se aplicaron diseños matemáticos para explicar el comportamiento de las actividades remanentes.

#### **6.16. BIOTRANSFORMACIÓN DE COLORANTES SINTÉTICOS EN MEDIO SÓLIDO**

Se preparó GMM adicionado de 15 g/L de agar bacteriológico, se esterilizó a 15 lb/15 min. Los colorantes fueron añadidos al medio de cultivo estéril después de ser esterilizados por filtración (tamaño de poro: 22 micras). Las placas prepararon al 50, 100 y 200 ppm. Se inocularon con un fragmento de micelio ( $\varnothing$  5mm), se incubó a 30 °C y se

verificó el halo de biotransformación cada 24 horas, durante 3 semanas. Los colorantes utilizados fueron cristal violeta, Azul Brillante Reactivo de Remazol (RBBR), naranja de metilo y verde brillante (Sigma-Aldrich).

#### **6.17. BIOTRANSFORMACIÓN DEL COLORANTE RBBR POR EXTRACTOS CRUDOS**

Se probaron los extractos crudos de RVAN2 y RVAN12, debido a que fueron las cepas que mejor degradaron los colorantes en placa. Estos extractos se obtuvieron al día de máxima actividad, se inocularon matraces Erlenmeyer que contenían SMM en base al punto 6.6 y se filtraron para separar el micelio. Los extractos se almacenaron a  $-4^{\circ}$  C hasta su utilización. Para llevar a cabo la biotransformación, se utilizó una solución de RBBR a una concentración final de 200 ppm. Se realizaron los ensayos en un rango de pH de 3 a 7, en buffer de acetato de sodio 100 mM pH 3 a 5 y buffer de fosfato de sodio 100 mM pH 5 a 7. Estos ensayos se realizaron a cuatro diferentes temperaturas ( $30^{\circ}$ ,  $40^{\circ}$ ,  $50^{\circ}$  y  $60^{\circ}$  C), con el fin de determinar las mejores condiciones de degradación. El estudio se realizó a intervalos de 15 minutos durante una hora. La transformación se midió en base a la disminución en la absorbancia a 595 nm (máxima longitud de onda a la cual absorbe el colorante). Los valores de colorante remanente fueron obtenidos en base a curvas de calibración a los diferentes valores de pH estudiados.

#### **6.18. BIOTRANSFORMACIÓN DEL COLORANTE RBBR EN CULTIVO SUMERGIDO**

Se utilizaron las cepas RVAN2 y RVAN12, las cuales fueron activadas según se menciona en el punto 6.6. Posteriormente, se inocularon en el medio de bajo contenido en nitrógeno (GMM), a las 24 horas se añadió el colorante a una concentración final de 200 ppm. Puesto que el mejor inductor utilizado en el medio de glucosa fue el cobre, se adicionó simultáneamente al medio con colorante. Por otro lado, como control positivo se inocularon matraces bajo las mismas condiciones pero sin la adición de sulfato de cobre. Finalmente, como control se incubó un matraz adicionado de colorante sin inocular, con el fin de determinar la transformación abiótica del RBBR. Cada 48 horas se tomaron alícuotas, se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 min, para separar el micelio del sobrenadante. El colorante remanente se midió leyendo a la máxima absorbancia del RBBR (595 nm). Se determinó la cantidad de colorante transformado, mediante una curva de calibración y se restó el control.

Se realizaron tres ensayos independientes.

### **6.19. DETERMINACIÓN DE ISOENZIMAS POR ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (ZIMOGRAMAS)**

Las muestras de los extractos crudos extracelulares de cada uno de las diferentes condiciones probadas fueron colectadas al día de máxima actividad y/o durante el transcurso de la fermentación. La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) fue realizado a pH alcalino bajo condiciones no desnaturalizantes en una cámara de electroforesis Hoeffer. El gel separador contenía 12% de acrilamida y solución buffer Tris-HCl 375 mM (pH 8.8). El gel concentrador presentó una concentración al 5% de acrilamida y solución buffer Tris-HCl 125 mM (pH 6.8). La solución buffer de corrida fue Tris-HCl 25 mM y glicina 122 mM (pH 8.8). El gel fue previamente equilibrado en buffer de acetato de sodio 100 mM (pH 5.0) por 15 min a temperatura ambiente, lavado con el mismo buffer y teñido con una solución de ABTS al 0.3% en buffer de acetato de sodio 100 mM (pH 5.0) como sustrato.



## 7. RESULTADOS

### 7.1.- AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA

Se recolectaron un total de 50 hongos, de diversas áreas de Nuevo León: Linares, Montemorelos, Santiago, San Pedro, Guadalupe y Monterrey, algunos de los cuales correspondían a los géneros de *Trametes*, *Picnoporus*, *Schizophyllum*, *Stereum*, entre otros (Figura 7.1).

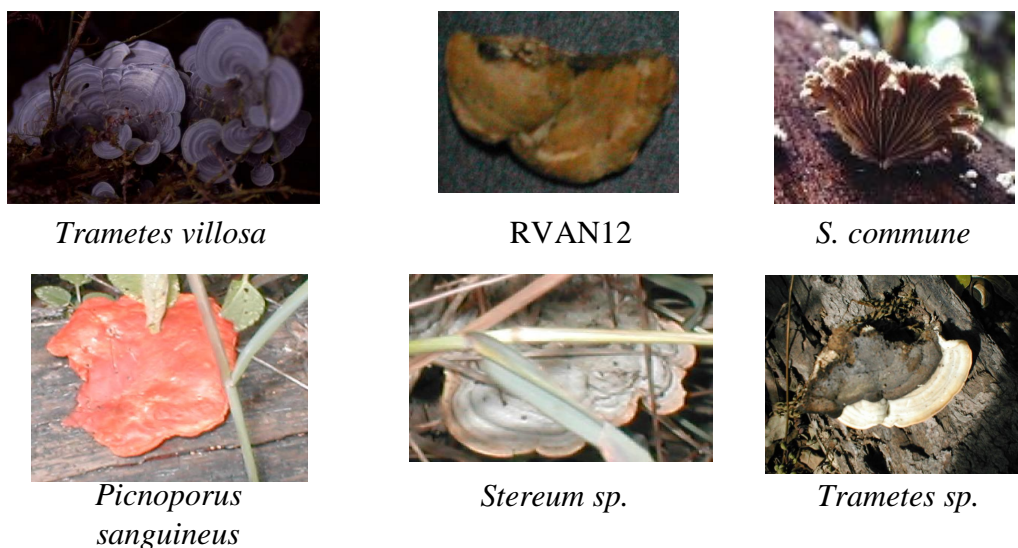


Figura 7.1.- Hongos recolectados en diversas áreas de Nuevo León. Morfología macroscópica.

Con el fin de seleccionar el mejor medio de cultivo, se hicieron ensayos preliminares con las cuatro primeras cepas aisladas (*Trametes villosa*, *Schizophyllum commune*, así como las denominadas RVAN2 y RVAN12). La morfología macroscópica fue diferente en cada medio, así mismo el tiempo en el cual se alcanzó el máximo crecimiento; mientras que en Extracto de Malta (EM) el micelio desarrollado era abundante, en Czapek por el contrario, era muy pobre. El mejor fue el Extracto de Malta-Glucosa (EMG), que generó un crecimiento abundante y que a la vez permitió la toma de muestra para los inóculos. Sin embargo, *S. commune* respondió mejor en el medio EM (Figura 7.2).

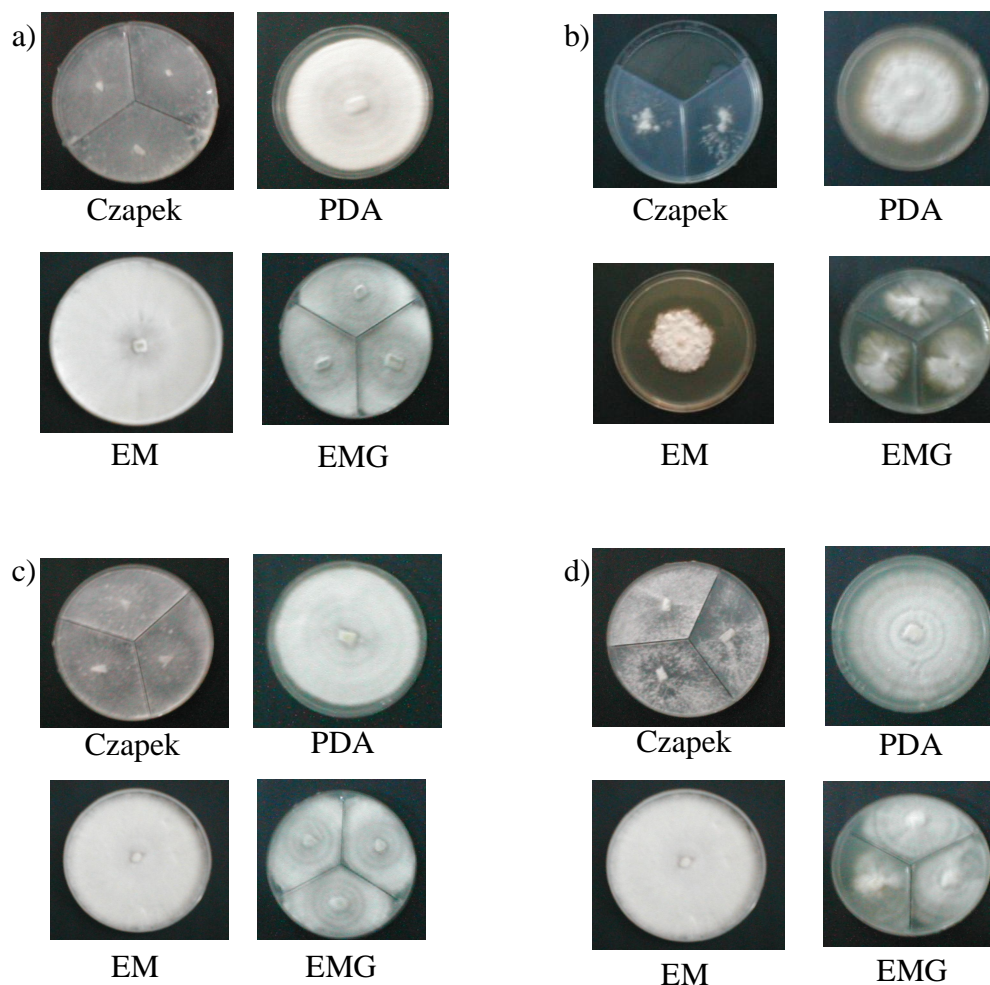


Figura 7.2.- Micelio vegetativo de diversos hongos (basidiomicetos nativos). a) *Trametes villosa* (RVAN18). b) *Schizophyllum commune* (RVAN19). c) RVAN2. d) RVAN12.

Una vez seleccionado el medio, el total de los hongos recolectados se sembraron en él, se observó que la morfología macroscópica de los aislados fue muy diversa, ya que algunos formaban micelio vegetativo blanco mientras que el micelio aéreo era de color naranja, por otro lado, muchos presentaron un micelio de color blanco algodonoso (Figura 7.3).

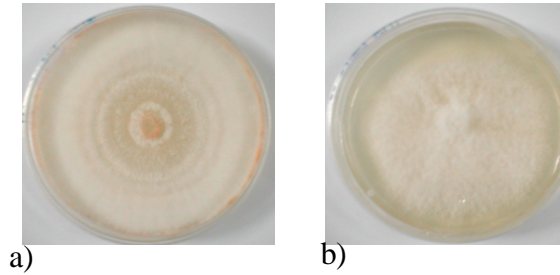


Figura 7.3.- Morfología macroscópica de dos hongos aislados en medio extracto de malta-extracto de levadura. a) Se observa un micelio, con crecimiento concéntrico anular, así como esporas de color naranja. b) Micelio blanco de aspecto algodonoso.

### 7.2.- OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO

A todos aquellos hongos cuya fase vegetativa fue obtenida, se les hizo tinción con azul algodón-lactofenol. Se eligieron aquellos que presentaron fíbulas, que son estructuras características de los basidiomicetos (Figura 7.4). Como se observa, el tamaño y grosor de las hifas, así como las fíbulas, son diferentes en cada uno de los hongos.

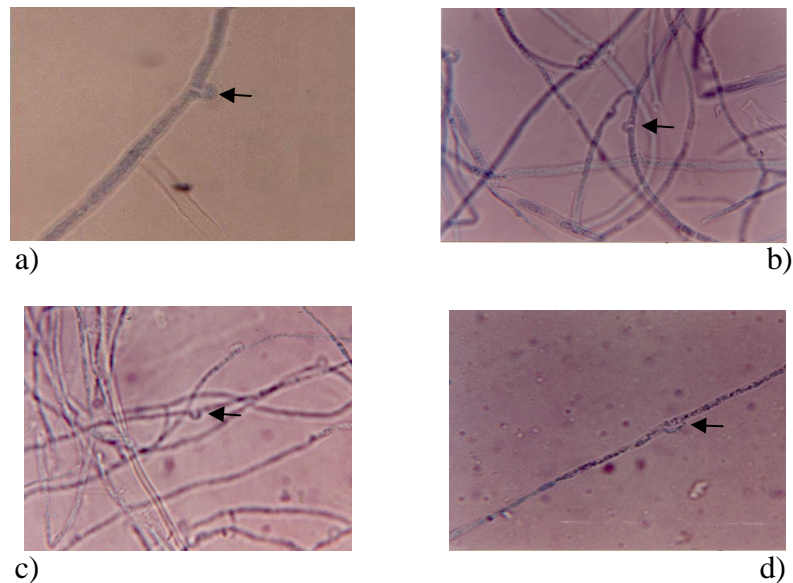


Figura 7.4.- Cultivos obtenidos después de 6 días de incubación a 30° C. Se observan diversas fíbulas teñidas de azul (↑). a) RVAN2, b) RVAN12, c) RVAN18 y d) RVAN19. (Azul algodón-lactofenol, x 100)

### 7.3.- PRODUCCIÓN DE OXIDASAS Y PEROXIDASAS EN MEDIO SÓLIDO (EVALUACIÓN PRIMARIA)

Todas las cepas presentaron comportamientos diferentes cuando se evaluó la capacidad para la producción de oxidasas y peroxidasas en medio sólido. Dicha evaluación fue hecha en base a la coloración dada en los diferentes substratos (Figura 7.5). En base a ello, los hongos que presentaron la mayor actividad fueron RVAN2 y RVAN12, seguidas por CC1, CC2, CH7 y CH12, el resto presentó una actividad baja. Por otro lado, CH3, CH5 y CH9 no dieron actividad después de 30 días. Aquellos hongos que dieron una alta oxidación de ABTS, también la dieron para el guaiacol y la o-anisidina, aunque en ésta última se observó una menor oxidación del mismo. Incluso las cepas de referencia, *Pleurotus ostreatus* ATCC 58053, *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24735 y *Bjerkandera adusta* UAMH8258, oxidaron ligeramente los substratos probados. De las tres cepas de referencia, la oxidación fue mayor en *P. ostreatus*, mientras que *P. chrysosporium* reaccionó después de 15 días de incubación.

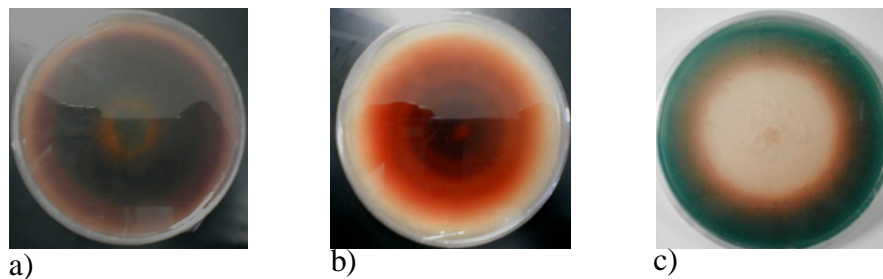


Figura 7.5.- Oxidación de los diferentes substratos utilizados para evaluar la producción de oxidasas y peroxidasas en medio sólido. Cepa RVAN12 en medio sólido. a) Guaiacol. b) O-anisidina. c) ABTS

### 7.4.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN MEDIO LÍQUIDO

Los medios probados fueron el medio de glucosa (GMM) y el medio de harina de soya (SMM). El ensayo para el primer medio se llevó por espacio de 12 días, debido a que la mayoría de las cepas, después del día 10 daban negativa la detección de Lacasa. Mientras que para el medio SMM fue de 20 días. Las cepas se incubaron a 30 °C y una agitación de 150 rpm.

#### **7.4.1.- MEDIO MINERAL-GLUCOSA (GMM)**

Para evaluar el efecto de la concentración de glucosa, se seleccionaron dos cepas RVAN2 y RVAN12 para hacer este estudio preliminar en base a los resultados obtenidos en el medio sólido.

##### 7.4.1.1. Diferente concentración de Glucosa

Las concentraciones de glucosa que se ensayaron fueron 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 y 10 g/l (tratamientos del 1 al 5 y el control, respectivamente). Esta última concentración es la sugerida en la mayoría de los artículos revisados, por lo cual fue tomada como el control.

##### 7.4.1.1.1.- RVAN2

La producción de Lacasa fue muy similar en todas las concentraciones ensayadas, a excepción de 10 g/L. Ya que a esta concentración se desplazó el día de máxima actividad al día ocho, decayendo a cero a los 10 días. En el resto de las concentraciones analizadas, por el contrario, la máxima actividad fluctuó del día dos al día cuatro (Figura 7.6).

Por otro lado, el análisis de varianza mostró una diferencia altamente significativa entre los diferentes tratamientos ( $p \leq 0.0000$ ). Al comparar todos los tratamientos, incluido el control, mediante una prueba de rangos múltiples de Tukey, se determinó que existen 3 grupos de homogeneidad. Se encontró que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos 1, 3, 4 y 5, mientras que el tratamiento 2 y el control mostraron diferencias altamente significativas con el resto de los tratamientos y entre ellos. Por otro lado, la prueba de Dunnett, indicó que el total de tratamientos fueron estadísticamente diferentes con respecto al control (Tabla 7.1).

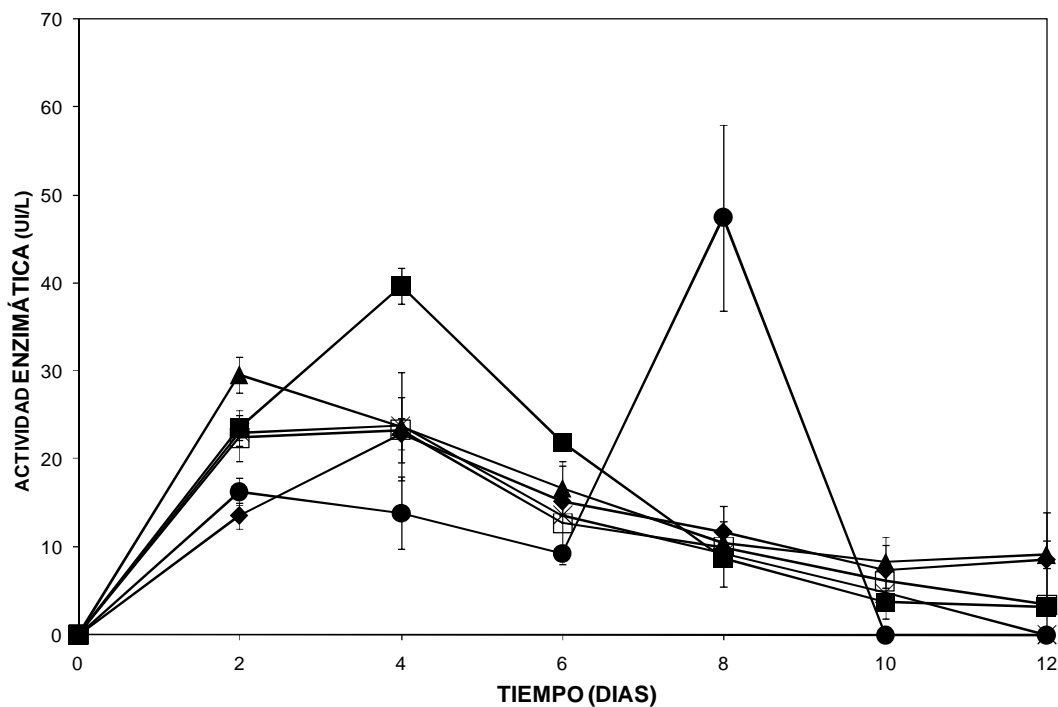


Figura 7.6.- Actividad enzimática de Lacasa del sobrenadante del cultivo de RVAN2 en GMM. ◆, 0.5 g/L; ■, 1.0 g/L; ▲, 2.5 g/L; ×, 5.0 g/L; □, 7.5 g/L; ●, 10 g/L. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de dos ensayos totalmente independientes.

Tabla 7.1. Efecto de la concentración de glucosa en la actividad enzimática de Lacasa por RVAN2 en GMM

TRATAMIENTO	PROMEDIO (U/L) <sup>1</sup>	DUNNETT (p)
0.5 g/L	22.92 $\pm$ 1.71(4) <sup>a</sup>	0.000006
1.0 g/L	39.73 $\pm$ 1.71(4) <sup>b</sup>	0.006124
2.5 g/L	29.61 $\pm$ 1.71(2) <sup>a</sup>	0.000006
5.0 g/L	23.80 $\pm$ 1.71(4) <sup>a</sup>	0.000006
7.5 g/L	23.34 $\pm$ 1.71(4) <sup>a</sup>	0.000006
10 g/L (control)	47.9 $\pm$ 1.40(8) <sup>c</sup>	

<sup>1</sup> Promedio de tres ensayos independientes  $\pm$  error estándar. ( ) Día de máx. actividad

<sup>2</sup> Valores seguidos por letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes  $p \leq 0.05$

Los resultados obtenidos indicaron que la mejor concentración fue a 10 g/L, por lo cual en los ensayos posteriores fue la seleccionada para trabajar.

El consumo de la fuente de carbono a las concentraciones de 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 y 7.5 g/L fue muy similar. Al día cuatro, más del 95% de la fuente de carbono se había agotado. Por otro lado, a una concentración de 10 g/L se alcanzó dicho consumo hasta el día 10 del ensayo (Figura 7.7). Se observó que conforme la fuente de carbono se agotaba, la actividad enzimática se incrementaba.

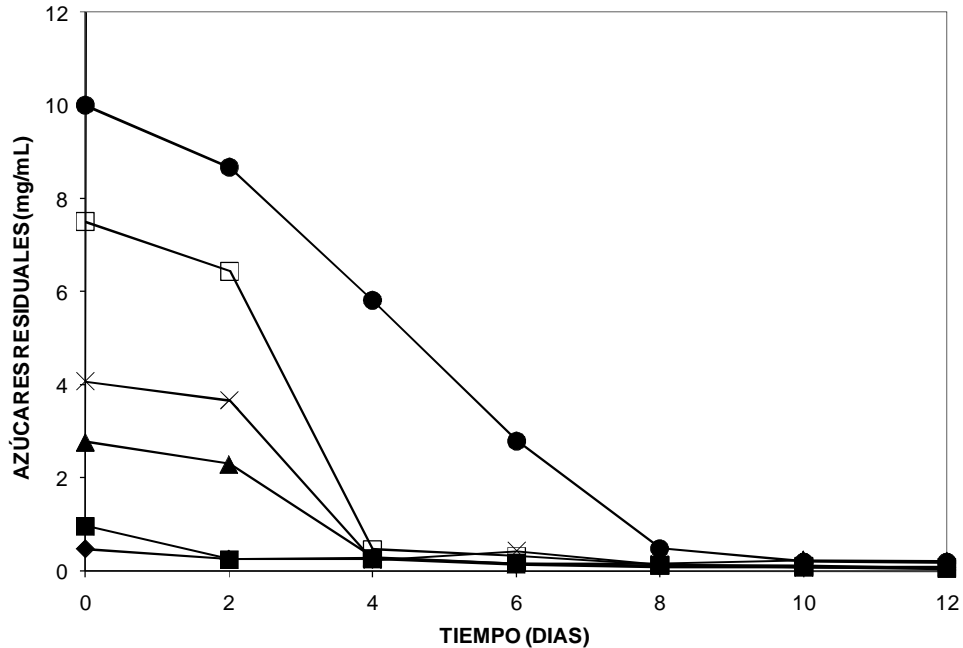


Figura 7.7.- Azúcares residuales de RVAN2 en GMM. ◆, 0.5 g/L; ■, 1.0 g/L; ▲, 2.5 g/L; ×, 5.0 g/L; □, 7.5 g/L; ●, 10 g/L. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de dos ensayos totalmente independientes.

El contenido de proteínas determinado a los sobrenadantes de las diferentes concentraciones de fuente de carbono, presentó un comportamiento similar, a excepción de la concentración a 0.5 g/L, la cual fue mostró el menor contenido de proteínas (Figura 7.8).

Finalmente, la actividad específica de la Lacasa fue variable, siendo los valores más altos aquellos presentados por las concentraciones a 0.5 y 1.0 g/L de glucosa, con 9.01 y 6.07 U/mg de proteína, respectivamente (Figura 7.8). Por otro lado, a 10 g/L se observó la menor actividad específica, 2.3 U/mg de proteína (Figura 7.9).

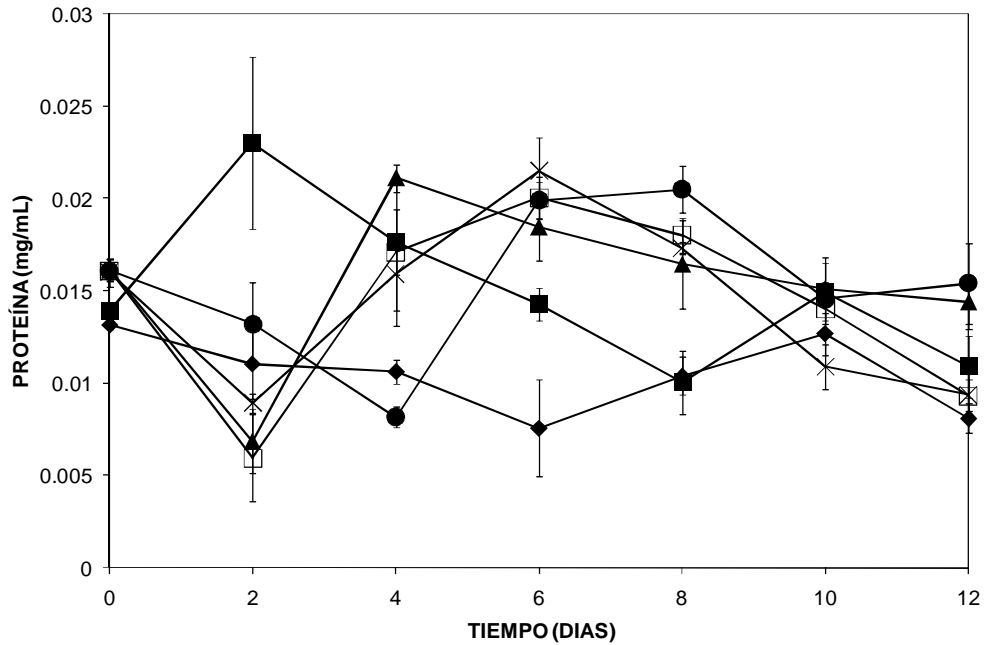


Figura 7.8.- Contenido de Proteína (mg/mL) de RVAN2 en GMM. ◆, 0.5 g/L; ■, 1.0 g/L; ▲, 2.5 g/L; ×, 5.0 g/L; □, 7.5 g/L; ●, 10 g/L. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de dos ensayos totalmente independientes.

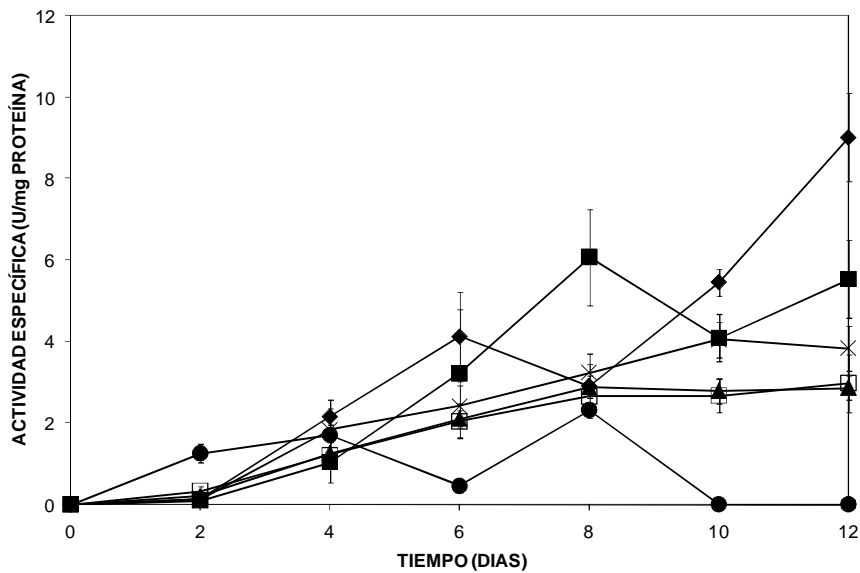


Figura 7.9.- Actividad específica (U/mg) de Lacasa del sobrenadante del cultivo de RVAN2 en GMM. ◆, 0.5 g/L; ■, 1.0 g/L; ▲, 2.5 g/L; ×, 5.0 g/L; □, 7.5 g/L; ●, 10 g/L. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de dos ensayos totalmente independientes.



#### 7.4.1.1.2.- RVAN12

En general la actividad de Lacasa fue muy similar en todas las concentraciones probadas, con el valor máximo presentado a la concentración de 10 g/L (90.3 U/L). Por otro lado, los días de máxima actividad se encontraron de los días seis al 10, aunque a 0.5 g/L se retardó ligeramente, llegando a su máximo el día 12 (Figura 7.10).

Por otro lado, el análisis de varianza mostró una diferencia altamente significativa entre los diferentes tratamientos ( $p \leq 0.0000$ ). Al comparar todos los tratamientos, incluido el control, mediante una prueba de rangos múltiples de Tukey, se determinó que existen 4 grupos de homogeneidad. Los grupos de homogeneidad formados son: grupo 1, por los tratamientos 1 y 2; grupo 2, tratamientos 2, 4 y 5; grupo 3, tratamientos 3, 4 y 5; grupo 4, control. Mediante la prueba de Dunnett se determinó una diferencia altamente significativa entre el control y los 5 tratamientos (Tabla 7.2).

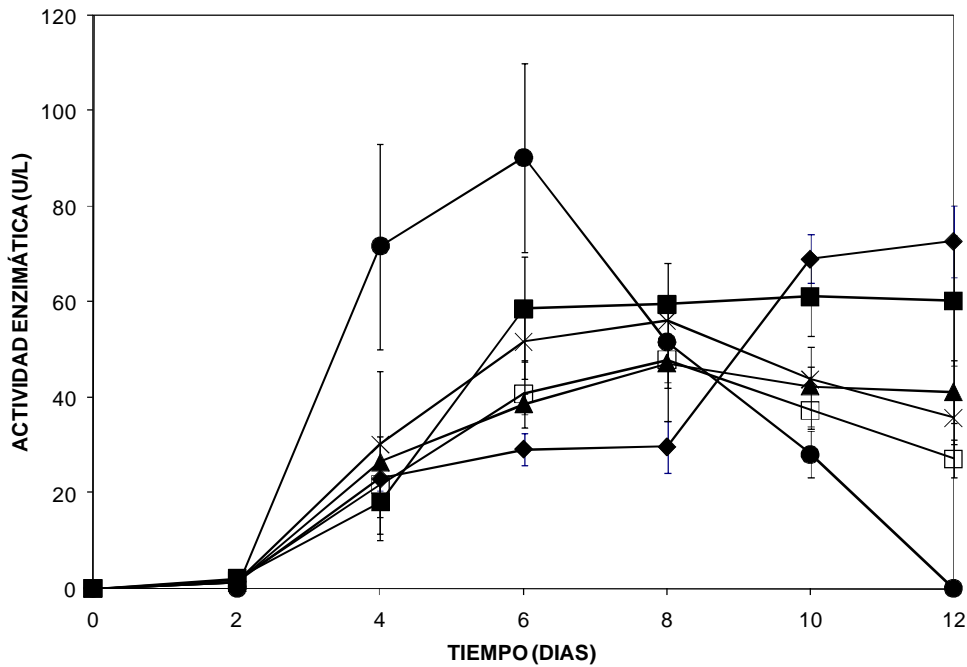


Figura 7.10.- Actividad enzimática de Lacasa del sobrenadante del cultivo de RVAN12 en GMM. ◆, 0.5 g/L; ■, 1.0 g/L; ▲, 2.5 g/L; ×, 5.0 g/L; □, 7.5 g/L; ●, 10 g/L. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de dos ensayos totalmente independientes.

Tabla 7.2. Efecto de la concentración de glucosa en la actividad enzimática de Lacasa por RVAN12 en GMM

TRATAMIENTO	PROMEDIO (U/L) <sup>1</sup>	DUNNETT (p)
0.5 g/L	72.76±3.08(12) <sup>a</sup>	0.000056
1.0 g/L	61.28±3.08(10) <sup>a,b</sup>	0.000006
2.5 g/L	47.19±3.08(8) <sup>c</sup>	0.000006
5.0 g/L	56.14±3.08(8) <sup>b,c</sup>	0.000006
7.5 g/L	47.96±3.08(8) <sup>b,c</sup>	0.000006
10 g/L (control)	95.86±2.51(6) <sup>d</sup>	

<sup>1</sup> Promedio de tres ensayos independientes ± error estándar. ( ) Día máx. actividad

<sup>2</sup> Valores seguidos por letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes p≤0.05

La glucosa fue consumida casi totalmente a partir del día 6, tanto para la concentración a 0.5, 1.0 y 2.5 g/L (Figura 7.11). Por lo que el día 6 correspondió al día de máxima actividad de Lacasa. Por otro lado, en las concentraciones a 5.0 y 7.5 g/L, al final del ensayo solamente habían sido consumidos el 40 y 35% de la fuente de carbono, respectivamente (Figura 7.11).

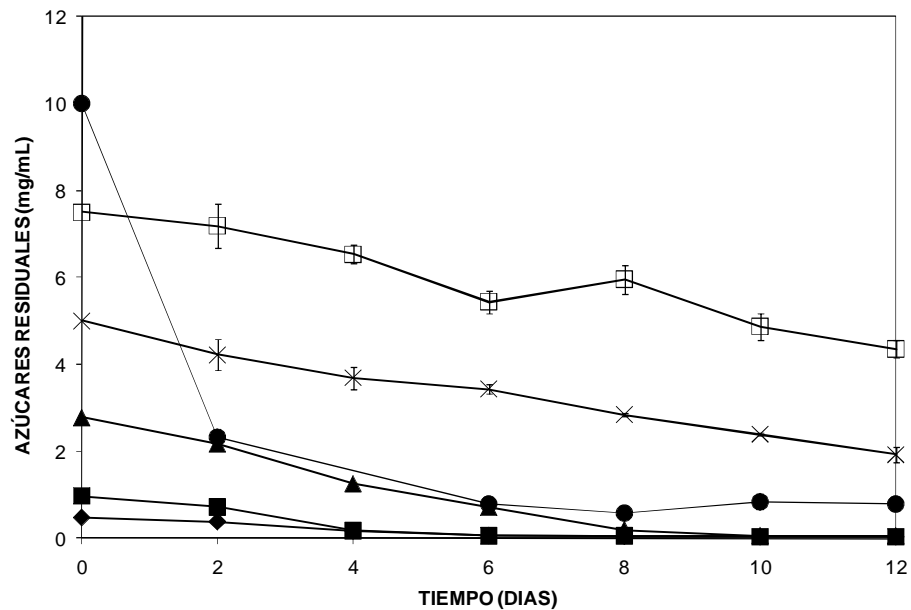


Figura 7.11.- Azúcares residuales de RVAN12 en GMM. ◆, 0.5 g/L; ■, 1.0 g/L; ▲, 2.5 g/L; ×, 5.0 g/L; □, 7.5 g/L; ●, 10 g/L. Los símbolos representan el promedio ± la desviación estándar del duplicado de dos ensayos totalmente independientes.

En general, el comportamiento del contenido de proteína fue similar en todas las concentraciones, a lo largo de toda la cinética se observó un incremento y una disminución en la producción de la misma, a excepción de la concentración a 0.5 g/L (Figura 7.12).

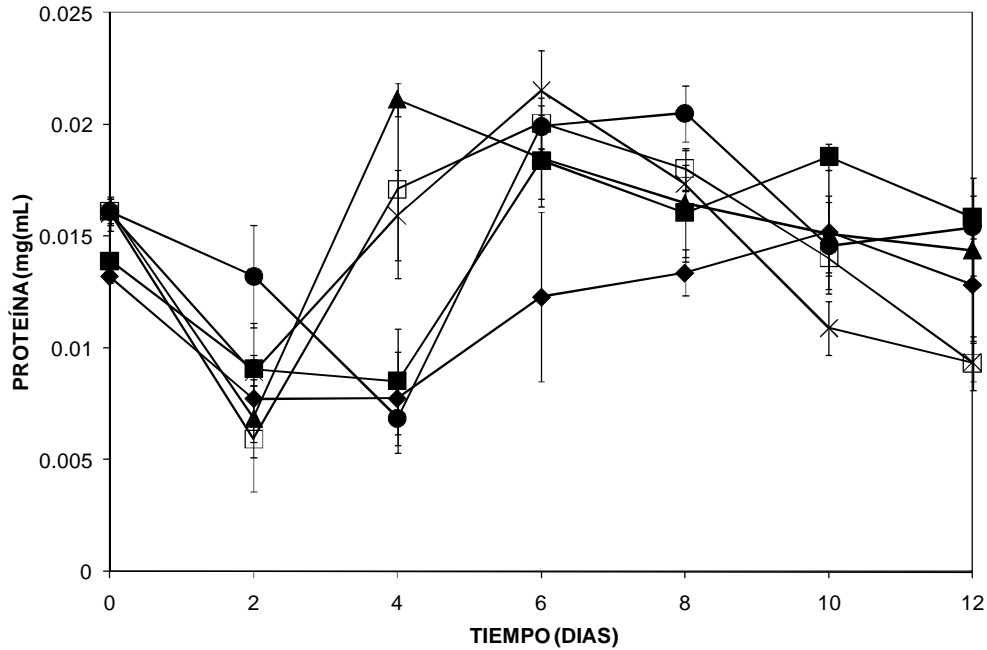


Figura 7.12.- Contenido de Proteína (mg/mL) de RVAN12 en GMM. ◆, 0.5 g/L; ■, 1.0 g/L; ▲, 2.5 g/L; ×, 5.0 g/L; □, 7.5 g/L; ●, 10 g/L. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de dos ensayos totalmente independientes.

Finalmente, la actividad específica se incrementó considerablemente, siendo todas muy similares a excepción de la obtenida a 10 g/L, cuyo máximo valor fue de 8.8 U/mg de proteína (Figura 7.13), seguida de 5.9 U/mg de proteína (día 12), correspondiente a 0.5 g/L de glucosa.

Después de seleccionar la mejor concentración de la fuente de carbono (glucosa) y con el fin de evaluar si existen otras fuentes de carbono que incrementen la actividad enzimática de Lacasa. Se probaron cuatro fuentes de carbono, en base a reportes existentes.

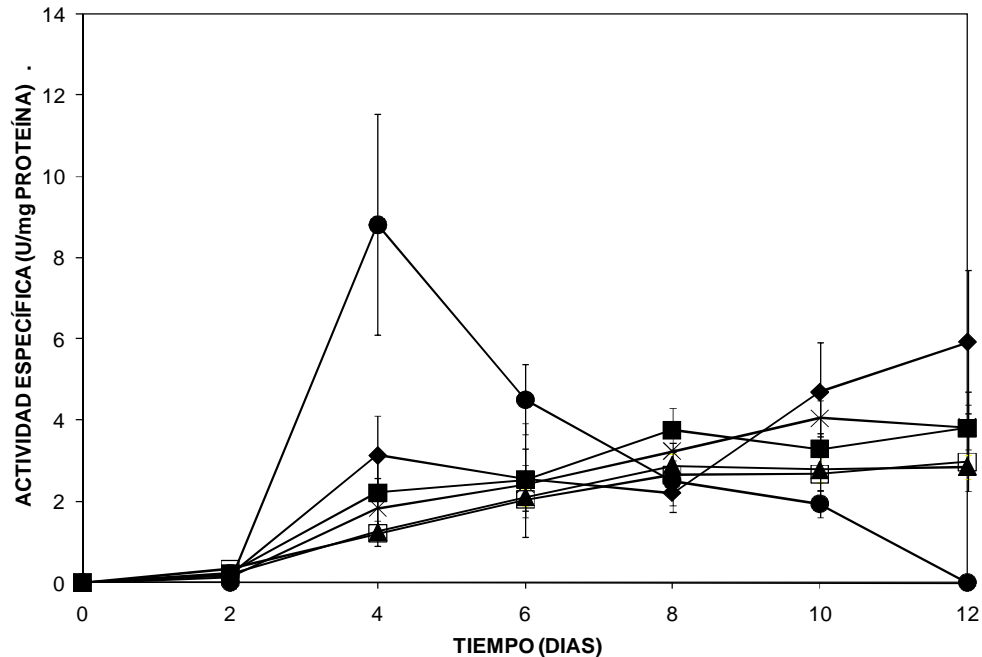


Figura 7.13.- Actividad enzimática específica de Lacasa del sobrenadante de los cultivos de RVAN12 en GMM. ◆, 0.5 g/L; ■, 1.0 g/L; ▲, 2.5 g/L; ×, 5.0 g/L; □, 7.5 g/L; ●, 10 g/L. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de dos ensayos totalmente independientes.

#### 7.4.1.2.- Actividad enzimática con diferentes fuentes de carbono

Se probaron diferentes fuentes de carbono en dos de las cepas nativas, RVAN2 y RVAN12, ya que fueron las que mejor actividad presentaron en el medio de glucosa. Las concentraciones fueron de 10 g/L de glucosa, acetato, almidón, celulosa y lignina (tratamiento uno al cuatro, el cinco fue eliminado del estadístico). Cabe mencionar que en el caso de lignina kraft, no se detectó actividad durante el desarrollo de la fermentación en matraz.

##### 7.4.1.2.1.- RVAN2

En el caso de RVAN2, se observó que la mejor fuente de carbono fue glucosa, con 47.5 U/L, seguido del medio de cultivo adicionado con acetato de sodio, la cual dió una producción de 33.2 U/L; al final del ensayo enzimático. Con el resto de las fuentes de carbono, los valores de actividad de Lacasa oscilaron de 11 a 13 U/L (Figura 7.14).

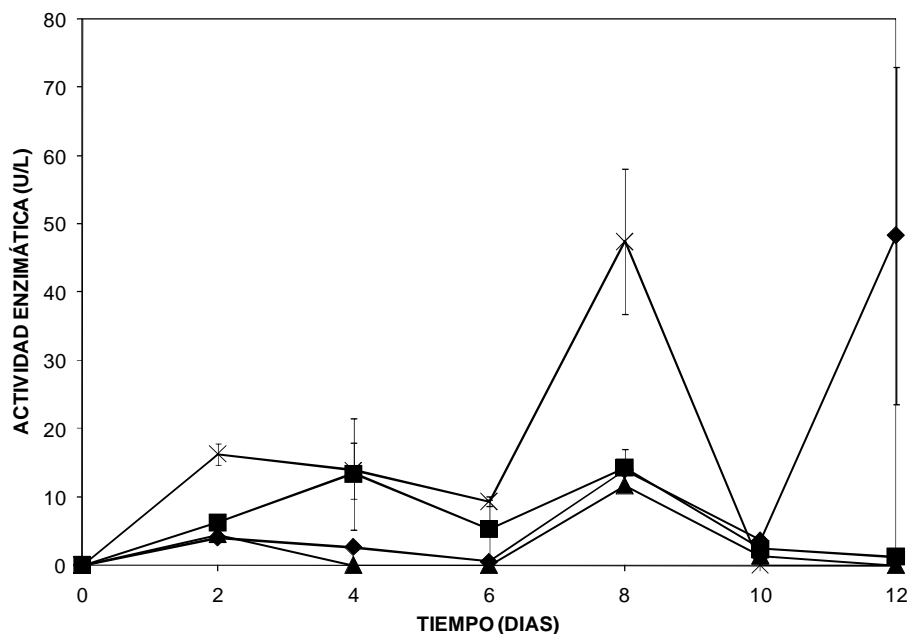


Figura 7.14.- Actividad enzimática de Lacasa del sobrenadante del cultivo de RVAN2 en Medio Mineral adicionado de diferentes fuentes de carbono. ♦, Acetato; ■, Almidón; ▲, Celulosa; ×, Glucosa. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de dos ensayos totalmente independientes.

El análisis de varianza mostró una diferencia altamente significativa entre los diferentes tratamientos ( $p \leq 0.000017$ ). Al comparar todos los tratamientos, incluido el control, mediante una prueba de rangos múltiples de Tukey, se determinó que existen 2 grupos de homogeneidad. Se observó una diferencia altamente significativa del tratamiento uno con respecto al 3 y 4 ( $p \leq 0.000952$  y  $p \leq 0.000503$ ); el tratamiento dos con tres y cuatro ( $p \leq 0.000853$  y  $p \leq 0.000461$ ), mientras que entre el tratamiento uno y dos no mostró diferencia significativa ( $p \geq 0.999$ ) y tres y cuatro ( $p \geq 0.983$ ). La prueba de Dunnett determinó que el acetato de sodio no mostró diferencia significativa con respecto al control, mientras que el almidón y la celulosa cristalina mostraron una diferencia altamente significativa con el control (Tabla 7.3).

Tabla 7.3. Efecto de la fuente de carbono en la actividad enzimática de Lacasa por RVAN2

TRATAMIENTO	PROMEDIO (U/L) <sup>1</sup>	DUNNETT (p)
GLUCOSA (CONTROL)	47.89±10.6(10) <sup>a</sup>	
ACETATO DE SODIO	48.34±24.66(12) <sup>a</sup>	0.9999
ALMIDÓN	14.31±2.83(8) <sup>b</sup>	0.000444
CELULOSA CRISTALINA	11.66±0.18(8) <sup>b</sup>	0.000194

<sup>1</sup> Promedio de tres ensayos independientes ± error estándar. ( ) Día máx. actividad

<sup>2</sup> Valores seguidos por letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes  $p \leq 0.05$

En cuanto a la fuente de carbono, el acetato presentó valores muy similares con respecto al control. Dado que la glucosa es una fuente de carbono económica y de fácil adquisición, así como los resultados obtenidos en el estadístico, se decidió trabajar con la misma para los ensayos posteriores.

#### 7.4.1.2.2.- RVAN12

Con respecto a la actividad enzimática de Lacasa observado con RVAN12, tres de las fuentes de carbono que se emplearon mostraron comportamientos muy similares: acetato (98.92 U/L), glucosa (90.3 U/L) y almidón (85.8 U/L) (Figura 7.15).

El análisis de varianza aplicado a los valores de Lacasa al día de máxima actividad, mostró una diferencia altamente significativa entre los diferentes tratamientos ( $p \leq 0.000017$ ). Al comparar todos los tratamientos, incluido el control, mediante una prueba de rangos múltiples de Tukey, se determinó que existen 2 grupos de homogeneidad. Se observó una diferencia altamente significativa del tratamiento cuatro con respecto a los tratamientos uno, dos y tres ( $p \leq 0.000366$ ,  $p \leq 0.000934$  y  $p \leq 0.000462$ ). Entre estos tres tratamientos no se detectó diferencia significativa. La prueba de Dunnett determinó que el acetato de sodio (tratamiento dos) y el almidón (tratamiento 3), no mostraron diferencia significativa con respecto al control. Sólo el tratamiento cuatro, presentó una diferencia altamente significativa (Tabla 7.4).

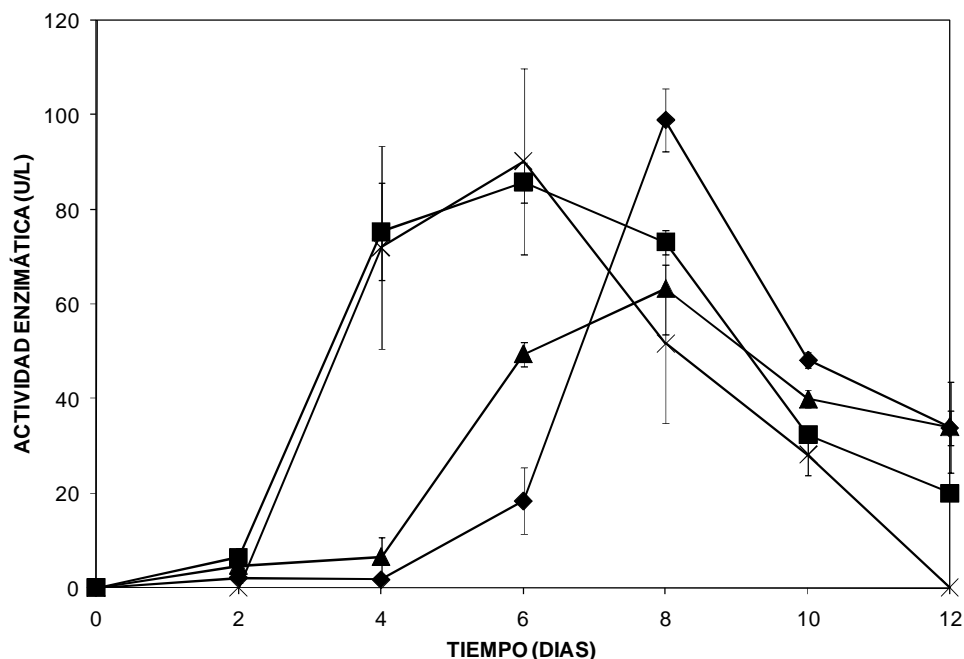


Figura 7.15.- Actividad enzimática de Lacasa del sobrenadante del cultivo de RVAN12 en Medio Mineral, adicionado de diferentes fuentes de carbono. ♦, Acetato; ■, Almidón; ▲, Celulosa; ×, Glucosa. Los símbolos representan el promedio ± la desviación estándar del duplicado de dos ensayos totalmente independientes.

Tabla 7.4. Efecto de la fuente de carbono en la actividad enzimática de Lacasa en RVAN12

TRATAMIENTO	PROMEDIO (U/L) <sup>1</sup>	DUNNETT (p)
GLUCOSA (CONTROL)	91.10±19.7(6) <sup>a</sup>	
ACETATO DE SODIO	98.9±6.67(8) <sup>a</sup>	0.8846
ALMIDÓN	84.96±4.15(4) <sup>a</sup>	0.4116
CELULOSA CRISTALINA	63.44±9.67(8) <sup>b</sup>	0.000117

<sup>1</sup> Promedio de tres ensayos independientes ± error estándar. ( ) Día máx. actividad

<sup>2</sup> Valores seguidos por letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes  $p \leq 0.05$

Los resultados obtenidos con RVAN12 fueron muy similares a RVAN2, en cuanto a concentración y fuente de carbono, por lo cual y en base a los estadísticos obtenidos, se seleccionó a la glucosa a una concentración de 10 g/L para los ensayos posteriores, con el resto de las cepas estudiadas.

#### 7.4.1.3.- Cinética de crecimiento y Actividad Enzimática en GMM

En base a los resultados de los experimentos anteriores, en los cuales se determinó que la glucosa fue la mejor fuente de carbono, así como a una concentración de 10 g/L, los ensayos posteriores se hicieron bajo estas condiciones de crecimiento para el resto de las cepas. Así mismo, se usaron las tres cepas de referencia *P. ostreatus*, *P. chrysosporium* y *B. adusta*. Es importante destacar que hubo formación de aglomerados miceliales, denominados pellets, cuyo tamaño fue muy variable, en algunos casos tenía forma regular, mientras que otros cultivos presentaban ligeras proyecciones de micelio (Figura 7.16). La consistencia del medio se tornó muy viscosa para RVAN19, lo cual dificultaba la toma de las alícuotas.

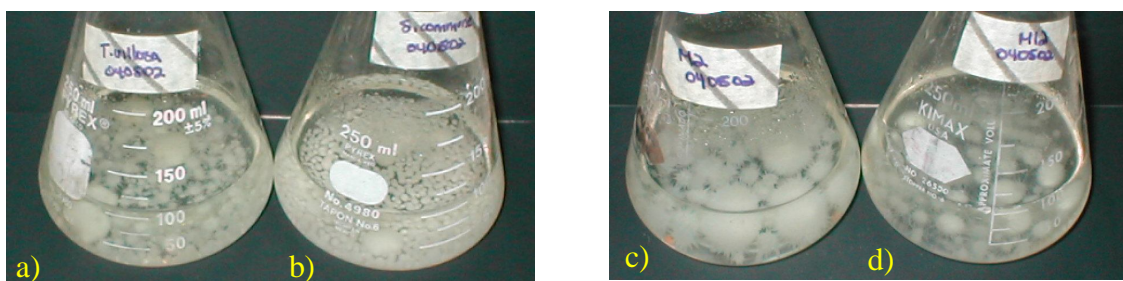


Figura 7.16.- Etapa final de los cultivos líquidos de las 4 cepas nativas estudiadas en GMM. El Aglomerados de micelio. a) RVAN18. b) RVAN19. c) RVAN2. d) RVAN12

Al igual que en el medio sólido, en la fermentación en líquido hubo variaciones muy importantes en cuanto a los niveles de actividad enzimática. Se detectó la actividad de Lacasa en tres cepas nativas (RVAN2, RVAN12 y RVAN18) y en la cepa de referencia (*P. ostreatus*); mientras que en las otras dos cepas de referencia, *Bjerkandera adusta* y *Phanerochaete chrysosporium* no fue detectada la actividad de Lacasa. Finalmente, en ninguna de las cepas estudiadas, tanto nativas como de referencia, fueron detectados las actividades de LiP y MnP bajo las condiciones ensayadas.

##### 7.4.1.3.1.- RVAN2

La cinética de crecimiento de RVAN2 mostró que a medida que se desarrolló el crecimiento, se observaba una disminución del pH de 5.5 a 2.8 en el día 12. Debe tenerse presente que las variaciones en el pH se desarrollaron libres y sin control durante el transcurso del ensayo. Cuando el 95% de la glucosa había sido consumida, el microorganismo se encontraba en la fase estacionaria, con ligeros incrementos y disminuciones en la concentración de biomasa. La síntesis de Lacasa fue detectada a



partir del día dos y esta se incrementó coincidiendo con el consumo de azúcares, la disminución del pH y finalmente con el crecimiento del microorganismo. Después del consumo del 95% de glucosa presente, la actividad máxima alcanzada fue de 47.45 U/L al día ocho, cayendo a cero a partir del décimo día (Figura 7.17).

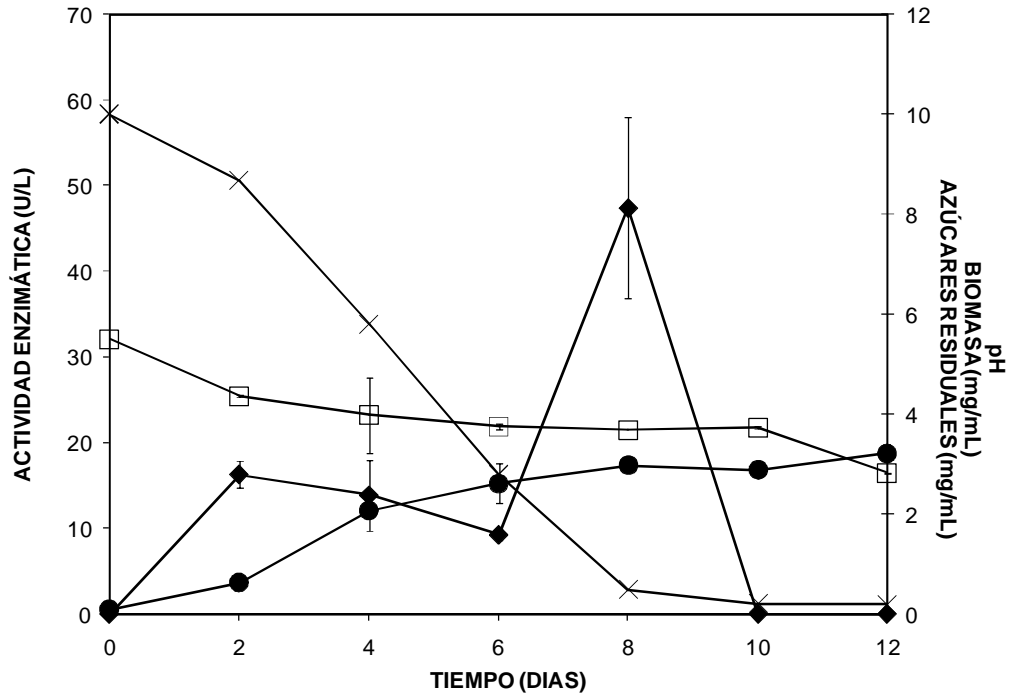


Figura 7.17.- Cinética de Crecimiento y Actividad Enzimática de Lacasa del sobrenadante del cultivo de RVAN2 en GMM. ◆, Lacasa; ●, Biomasa; ×, Azúcares Residuales; □, pH. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de dos ensayos totalmente independientes.

#### 7.4.1.3.2.- RVAN12

En el caso de RVAN12, presentó un crecimiento más lento y, como consecuencia, la producción de biomasa fue menor que la presentada por RVAN2 (2.3 mg/mL). El 80% de la glucosa fue consumida durante los dos primeros días del ensayo. Por otro lado, el pH tuvo un ligero descenso, siendo más marcado del día dos al cuatro, posteriormente este permaneció constante durante el transcurso de la cinética. Finalmente, la máxima actividad enzimática se alcanzó al día seis (90.3 U/L), cuando el microorganismo se encontraba en la fase exponencial de crecimiento (Figura 7.18).

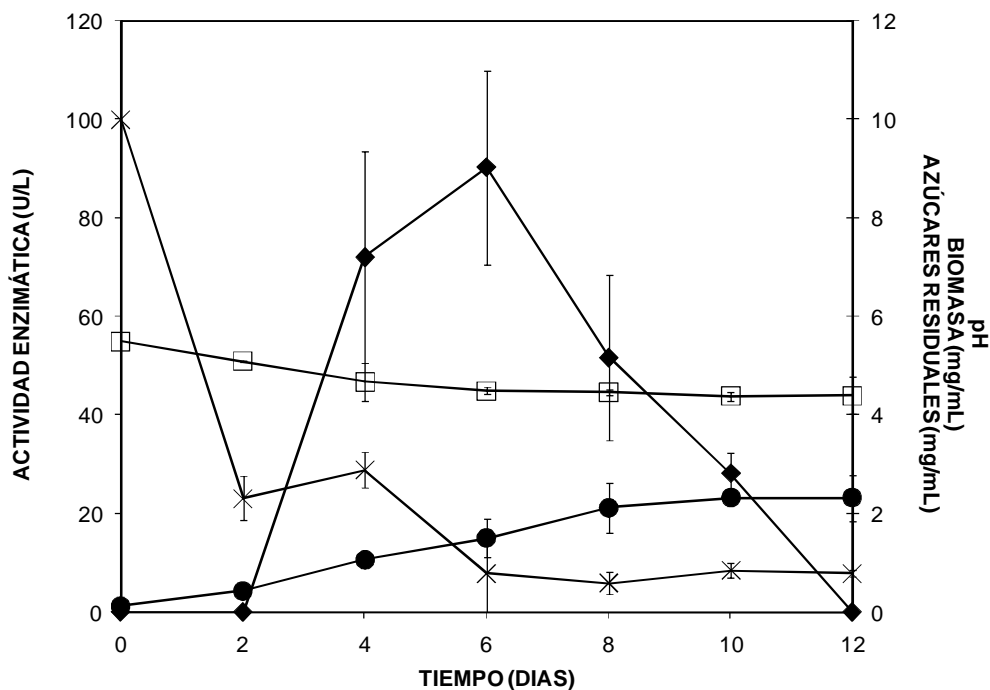


Figura 7.18.- Cinética de Crecimiento y Actividad Enzimática de Lacasa del sobrenadante del cultivo de RVAN12 en GMM. ♦, Lacasa; ●, Biomasa; ×, Azúcares Residuales; □, pH. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de dos ensayos totalmente independientes.

#### 7.4.1.3.3.- RVAN18

La cinética de crecimiento de *Trametes villosa* (RVAN18), mostró que la producción de biomasa fue acompañada de una ligera disminución en el pH, alcanzando el valor mínimo de 3.4, lo cual coincidió con el consumo máximo de glucosa al día seis. Sin embargo, conforme la biomasa se incrementó el pH aumentó hasta un valor de 3.8, coincidiendo con el máximo crecimiento (2.15 mg/mL). La actividad enzimática alcanzó su más alto valor al día 4, presentándose en la fase exponencial de crecimiento, con 16.66 U/L (Figura 7.19).

#### 7.4.1.3.4.- RVAN19

*Schizophyllum commune* (RVAN19), fue el hongo que mayor biomasa produjo (5.5 mg/mL), mientras el pH disminuyó lentamente de 5.5 a 5. Por otro lado, el consumo de azúcares fue ligeramente más lento que el resto de las cepas nativas, siendo hasta el día 10 que se consumió más del 95% de los mismos (Figura 7.20). Sin embargo, la actividad de Lacasa no fue detectada en el transcurso del ensayo, esto a pesar de haberse detectado una ligera oxidación en el medio sólido.

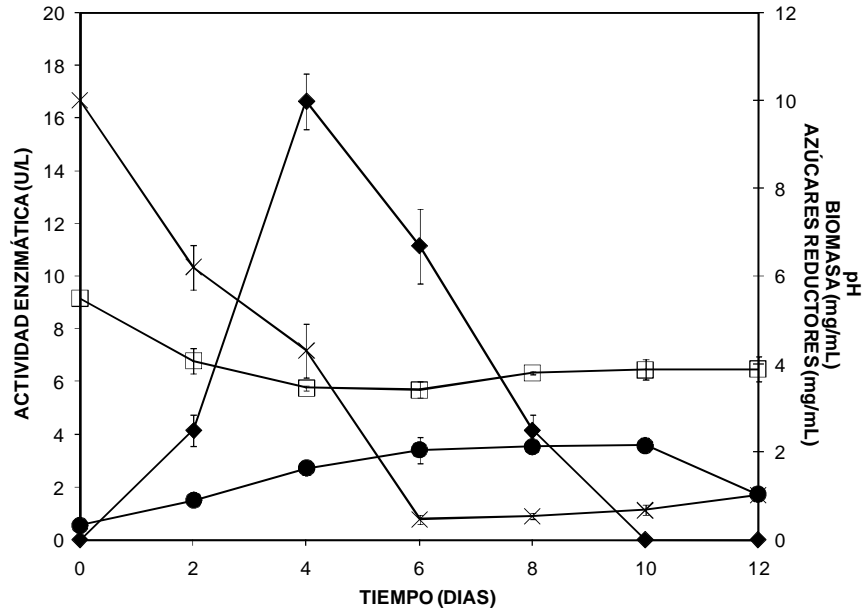


Figura 7.19.- Cinética de Crecimiento y Enzimática de Lacasa del sobrenadante del cultivo de RVAN18 en GMM. ♦, Lacasa; ●, Biomasa; ×; Azúcares Residuales; □, pH. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de dos ensayos totalmente independientes.

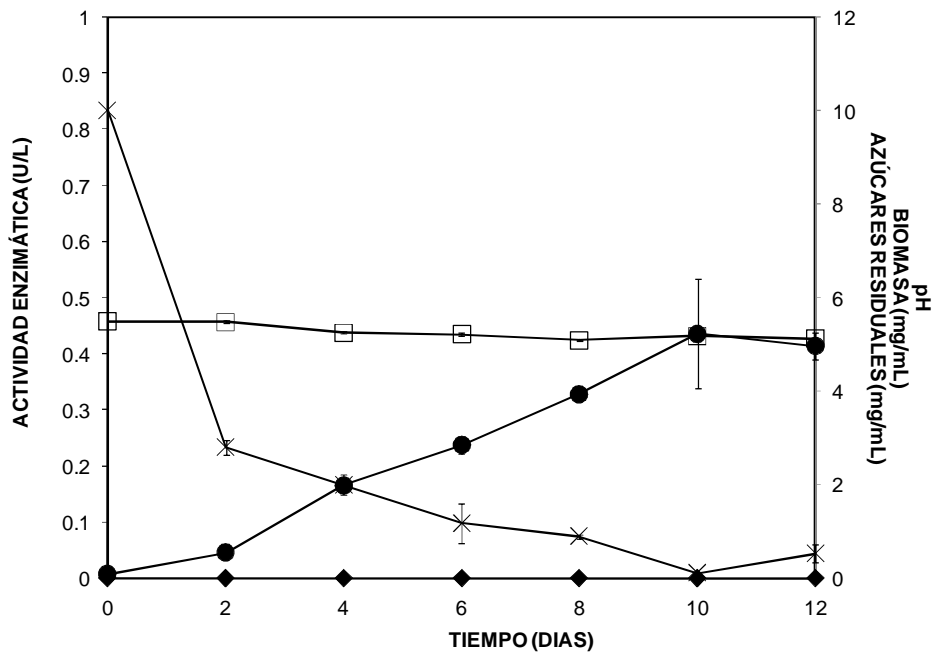


Figura 7.20.- Cinética de Crecimiento y Enzimática de Lacasa del sobrenadante del cultivo de RVAN19 en GMM. ♦, Lacasa; ●, Biomasa; ×; Azúcares Residuales; □, pH. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de dos ensayos totalmente independientes.

#### 7.4.1.3.5.- *Pleurotus ostreatus* (Cepa de referencia)

Con el fin de comparar el comportamiento de las cepas nativas con respecto a una cepa control, se hicieron cinéticas de crecimiento y ensayos de actividad enzimática de *P. ostreatus* durante 12 días, bajo las mismas condiciones que para las cepas nativas previamente descritas.

La producción de biomasa comenzó a dispararse a partir del día 12 (último día de ensayo), lo cual indicó que la fase exponencial se alargó en comparación al resto de las cepas. El consumo de azúcares también se observó muy lento, pues solamente el 50% de la fuente de carbono fue consumida al final del ensayo. El pH, por otro lado, no se vio afectado, manteniendo su valor en 5.3. En cuanto a la actividad enzimática de Lacasa, ésta alcanzó un máximo valor de 61 U/L al día cuatro, decayendo su actividad a partir de ese día, sin embargo al día 12 se observó un ligero incremento de la misma (Figura 7.21). En cuanto a las actividades de LiP y MnP no fueron detectadas en el medio de cultivo durante los 12 días en los cuales se llevo la cinética enzimática.

Se encontró que RVAN12, una de las cuatro cepas nativas, presentó una mayor actividad de Lacasa así como una mayor producción de biomasa y una disminución en el pH mayor que en la cepa de referencia (*P. ostreatus*).

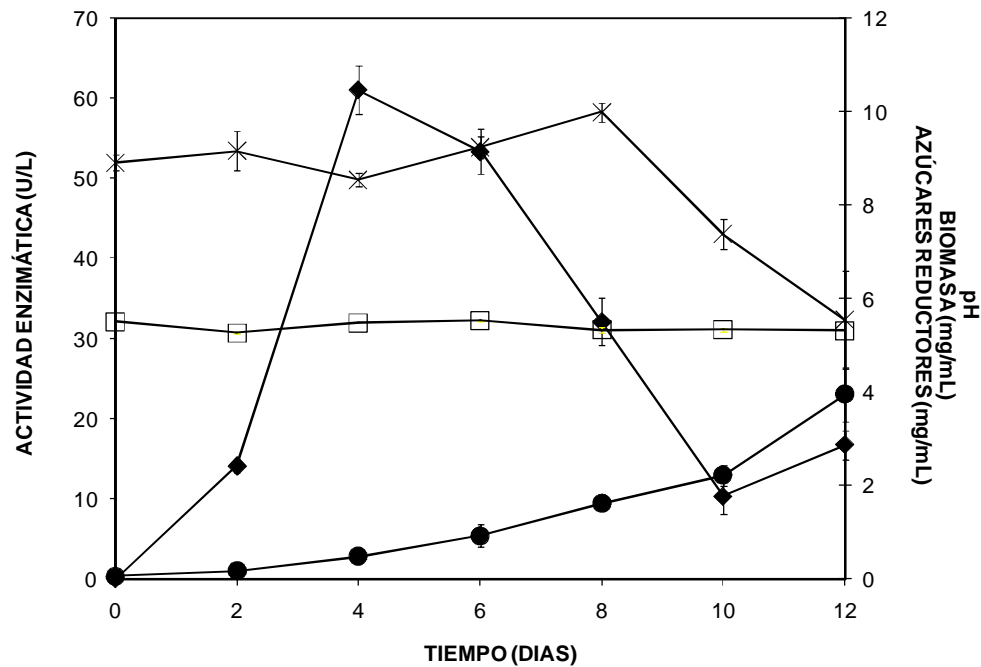


Figura 7.21.- Cinética de Crecimiento y Enzimática de Lacasa del sobrenadante del cultivo de *Pleurotus ostreatus* en GMM. ◆, Lacasa; ●, Biomasa; ×, Azúcares Residuales; □, pH. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

El análisis de varianza arrojó una diferencia altamente significativa entre los diferentes tratamientos para la Lacasa, al día de máxima actividad ( $p \leq 0.00000$ ). Al realizar la comparación de rangos múltiples de Tukey, se determinó la existencia de cuatro grupos de homogeneidad; por otro lado, no hubo diferencia significativa entre RVAN2 y el control (*P. ostreatus*). RVAN18 fue diferente significativamente a RVAN19, RVAN2, RVAN12 y el Control ( $p \leq 0.0177$ ,  $p \leq 0.000129$ ,  $p \leq 0.000129$  y  $p \leq 0.000129$ , respectivamente). RVAN19 con respecto a RVAN18, RVAN2, RVAN12 y el Control ( $p \leq 0.0177$ ,  $p \leq 0.000129$ ,  $p \leq 0.000129$ ,  $p \leq 0.000129$ , respectivamente). RVAN2 con RVAN12, RVAN18 y RVAN19 ( $p \leq 0.000129$ ,  $p \leq 0.000129$  y  $p \leq 0.000129$ , respectivamente); no presentó diferencias significativas con el Control ( $p \geq 0.0505$ ). Finalmente, RVAN12 mostró diferencias significativas con RVAN2, RVAN18, RVAN19 y el Control con  $p \leq 0.000129$  para las tres primeras y  $p \leq 0.000132$ , para el Control. La prueba de Dunnett determinó que a excepción de RVAN2, el resto de los tratamientos fueron diferentes significativamente (Tabla 7.5).

Tabla 7.5. Actividad Enzimática de Lacasa en 4 cepas nativas y cepa Control en GMM

TRATAMIENTO	PROMEDIO (U/L) <sup>1</sup>	DUNNETT (p)
RVAN2	47.897±10.6(8) <sup>a</sup>	0.0246
RVAN12	91.012±19.7(6) <sup>b</sup>	0.000013
RVAN18	16.66±4.31(4) <sup>d</sup>	0.000011
RVAN19	0.0±0.0 <sup>c</sup>	0.000011
<i>P. ostreatus</i> (CONTROL)	61.00±2.99(4) <sup>a</sup>	

<sup>1</sup> Promedio de tres ensayos independientes ± error estándar. ( ) Día máx. actividad

<sup>2</sup> Valores seguidos por letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes  $p \leq 0.05$

Los resultados anteriores permitieron determinar que la mayor cepa en la producción de Lacasa bajo condiciones limitantes de nitrógeno y carbono fue RVAN12, incluso superior a lo determinado para *P. ostreatus* ATCC 58053. Por otro lado, RVAN2 no presentó diferencias significativas, por lo cual se decidió probar inductores en las dos cepas nativas y descartar la cepa control.

#### 7.4.1.4.- Actividad Enzimática en GMM con diferentes Inductores

Se llevaron a cabo ensayos enzimáticos en GMM adicionado con diferentes compuestos, algunos de los cuales se ha reportado que son capaces de incrementar y/o inducir la síntesis de enzimas lignolíticas tales como la Lacasa. Los compuestos fueron

cobre (sulfato de cobre), manganeso (sulfato de manganeso), etanol y siringaldazina, todos ellos a dos diferentes concentraciones (Mencionados previamente en material y métodos, punto 6.12). Las actividades que fueron detectadas en este medio adicionado con los diferentes inductores fueron Lacasa y Lignino Peroxidasa.

#### 7.4.1.4.1.- RVAN2

Todos los compuestos probados afectaron la actividad enzimática de Lacasa, sin embargo fue más evidente en el caso del sulfato de cobre a una concentración de 500  $\mu\text{M}$  con 2942.8 U/L y 1000  $\mu\text{M}$  con 871.11 U/L. El resto de los inductores presentaron poco efecto en la síntesis de la Lacasa, las actividades fueron de 10 a 92 U/L (Figura 7.22).

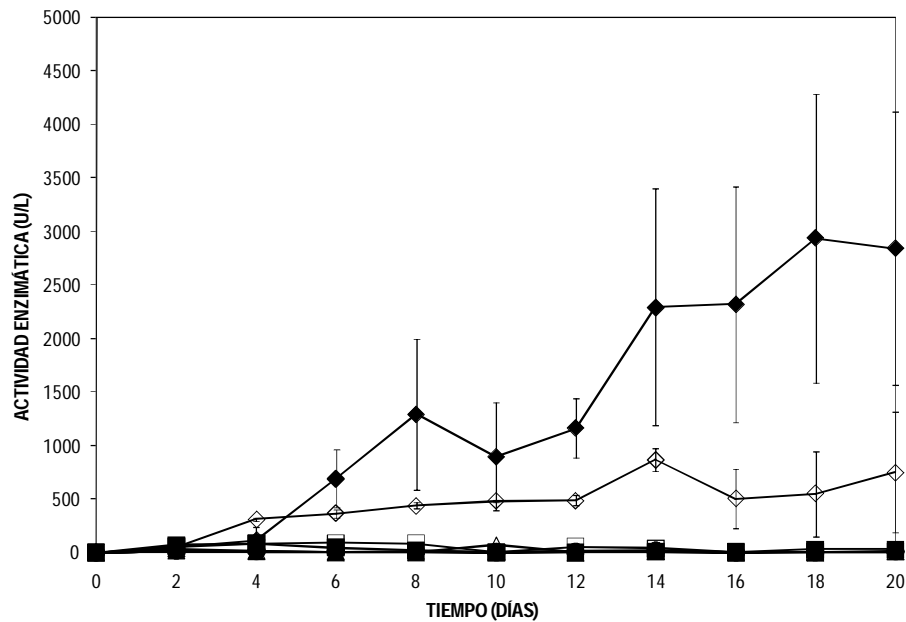


Figura 7.22.- Actividad enzimática de lacasa en RVAN2 en GMM, adicionado con diferentes compuestos. ◆, Cobre 500  $\mu\text{M}$ ; ◇, Cobre 1000  $\mu\text{M}$ ; ●, Manganeso 11 mg/L; ○, Manganeso 40 mg/L; ▲, Siringaldazina 0.116  $\mu\text{M}$ ; △, Siringaldazina, 1.16  $\mu\text{M}$ ; ■, Etanol 30 g/L; □, Etanol 35 g/L; ---, Control. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

En el análisis multifactorial, se analizaron como factores el tipo de inductor así como la concentración del mismo sobre la actividad de Lacasa. El análisis arrojó una diferencia altamente significativa ( $p \leq 0.00000$ ). Con el fin de determinar que factor estaba influyendo de forma significativa, se realizaron análisis de varianza de una sola vía con cada uno de los factores. Con respecto al factor Inductor, se determinó que existía una diferencia altamente significativa ( $p \leq 0.000002$ ). Al realizar la prueba de rangos múltiples

de Tukey, se determinó que existen dos grupos de homogeneidad dependiendo del compuesto utilizado. Dicha comparación de medias, arrojó la existencia de diferencias altamente significativas del sulfato de cobre con el control y el resto de inductores ( $p \leq 0.000204$ ,  $p \leq 0.000150$ ,  $p \leq 0.000142$  y  $p \leq 0.000146$ , para el control, etanol, sulfato manganoso y siringaldazina, respectivamente). Mientras que el control no mostró diferencias significativas con el resto de inductores ( $p \geq 0.05$ ). La Prueba de Dunnett, determinó que solo el cobre presentó diferencias altamente significativas con respecto al control ( $p \leq 0.000041$ ).

Con respecto al factor concentración, no se observaron diferencias significativas ( $p \geq 0.21$ ), por lo cual no se aplicó la prueba de rangos múltiples de Tukey.

Al llevar a cabo la interacción de ambos factores, se presentaron dos grupos de homogeneidad y se confirmaron los resultados anteriores, en los cuales se observó que el sulfato de cobre a una concentración de 500  $\mu\text{M}$  presentó una diferencia altamente significativa con el medio adicionado con el mismo compuesto a una concentración de 1000  $\mu\text{M}$ , así como al resto de inductores a las diferentes concentraciones de los mismos, con respecto al control ( $p \leq 0.000151$ ). El control no mostró diferencia significativa con el resto de inductores incluyendo el sulfato de cobre a 1000  $\mu\text{M}$  ( $p \geq 0.05$ ). Finalmente, al realizar la prueba de Dunnett, el sulfato de cobre a 500 y 1000  $\mu\text{M}$ , presentaron una diferencia significativa con el control (Tabla 7.6).

Tabla 7.6. Efecto de la adición de inductores en la actividad de Lacasa en RVAN2 en GMM

INDUCTOR	CONCENTRACION	PROMEDIO (U/L) <sup>1</sup>	DUNNETT (p)
CONTROL	----	47.898±3.106(8) <sup>a</sup>	
COBRE	500 $\mu\text{M}$	2942.78±1349(18) <sup>b</sup>	0.000009
	1000 $\mu\text{M}$	871.11±105(14) <sup>a</sup>	0.04277
ETANOL	30 g/L	47.79±9.982(18) <sup>a</sup>	1.0000
	35 g/L	92.026±2.016(6) <sup>a</sup>	1.0000
MANGANESO	11 mg/L	22.45±5.160(14) <sup>a</sup>	1.0000
	40 mg/L	20.700±4.160(14) <sup>a</sup>	1.0000
SIRINGALDAZINA	0.11 $\mu\text{M}$	16.639±2.063(2) <sup>a</sup>	1.0000
	11 $\mu\text{M}$	73.866±5.911(10) <sup>a</sup>	1.0000

<sup>1</sup> Promedio de tres ensayos independientes  $\pm$  desviación estándar. ( ) Día máx. actividad

<sup>2</sup> Valores seguidos por letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes  $p \leq 0.05$

Para la actividad de Lacasa, el mejor compuesto para incrementar dicha actividad fue sulfato de cobre a una concentración de 500  $\mu\text{M}$ . El resto de compuestos no mostró efecto alguno en la lacasa.

En cuanto a la actividad de Lignino Peroxidasa (LiP), al igual que en el caso de la Lacasa, el sulfato de cobre mostró un efecto positivo a las dos concentraciones manejadas de 500 y 1000  $\mu\text{M}$  con respecto al resto de los inductores. Los valores máximos alcanzados fueron de 153.95 y 57.8 U/L, respectivamente. Con el resto de los inductores, los valores alcanzados oscilaron de 6 a 19.6 U/L, mientras que en el control, por el contrario, no se detectó actividad durante los 20 días que duró el ensayo enzimático (Figura 7.23).

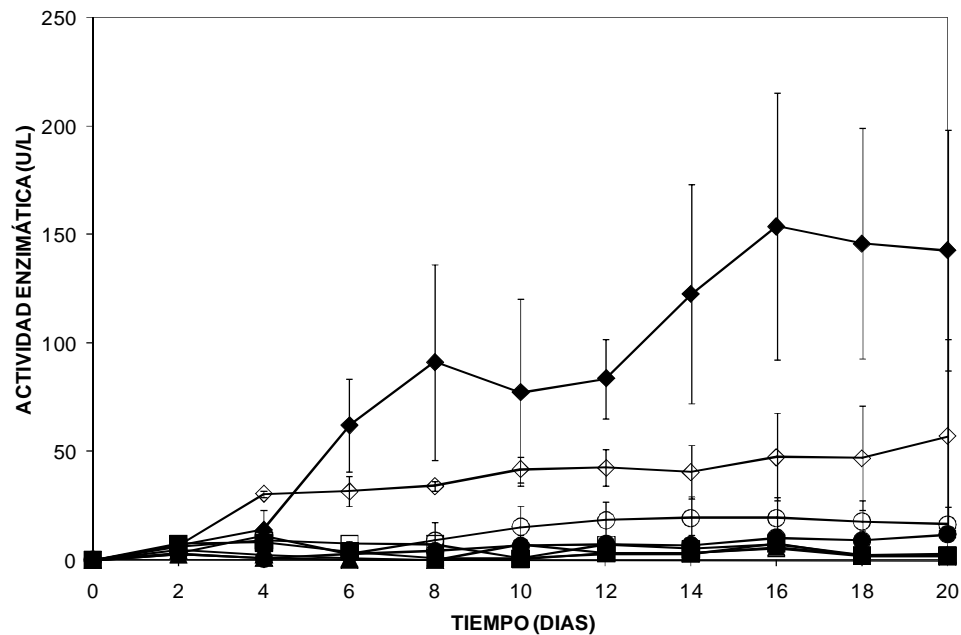


Figura 7.23.- Actividad enzimática de LiP en RVAN2 en medio Mineral-Glucosa (GMM), adicionado con diferentes compuestos. ◆, Cobre 500  $\mu\text{M}$ ; ◇, Cobre 1000  $\mu\text{M}$ ; ●, Manganeso 11 mg/L; ○, Manganeso 40 mg/L; ▲, Siringaldazina 0.116  $\mu\text{M}$ ; △, Siringaldazina, 1.16  $\mu\text{M}$ ; ■, Etanol 30 g/L; □, Etanol 35 g/L; ---, Control. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

En el análisis multifactorial, se analizaron como factores el tipo de inductor así como la concentración del mismo sobre la actividad de Lacasa. El análisis arrojó una diferencia altamente significativa ( $p \leq 0.00000$ ). Con el fin de determinar que factor estaba



influyendo de forma significativa, se realizaron análisis de varianza de una sola vía con cada uno de los factores. Con respecto al factor Inductor, se determinó que existía una diferencia altamente significativa ( $p \leq 0.000000$ ). Al realizar la prueba de rangos múltiples de Tukey, se determinó que existen tres grupos de homogeneidad dependiendo del compuesto utilizado, dos de ellos conformado por el sulfato de cobre a ambas concentraciones y el tercero, por el resto de compuestos así como por el control. Por otro lado, la comparación de medias arrojó la existencia de diferencias altamente significativas del sulfato de cobre con el control y el resto de inductores ( $p \leq 0.000138$ ,  $p \leq 0.000140$ ,  $p \leq 0.000173$  y  $p \leq 0.000136$ , para el control, etanol, sulfato manganeso y siringaldazina, respectivamente). Mientras que el control no mostró diferencias significativas con el resto de inductores ( $p \geq 0.05$ ). La Prueba de Dunnett, determinó que solo el cobre presentó diferencias altamente significativas ( $p \leq 0.000015$ ).

Con el factor concentración, no se observaron diferencias significativas ( $p \geq 0.1607$ ), por lo cual no se aplicó la prueba de rangos múltiples de Tukey al no existir diferencias.

Al llevar a cabo la interacción de ambos factores, se presentaron tres grupos de homogeneidad. Se observó que el sulfato de cobre a ambas concentraciones presentaron diferencias significativas con respecto al control ( $p \leq 0.000151$  y  $p \leq 0.0283$ , a 500 y 1000  $\mu\text{M}$  de cobre, respectivamente). Sin embargo, con respecto al resto de inductores, solo a la menor concentración se presentó una alta diferencia significativa ( $p \leq 0.000151$ ). El resto de tratamientos (inductores a las diferentes concentraciones), no mostraron diferencias significativas entre sí ( $p \geq 0.05$ ). Finalmente, al realizar la prueba de Dunnett, el cobre tanto a 500  $\mu\text{M}$  como a 1000  $\mu\text{M}$ , presentaron una diferencia significativa con el control (Tabla 7.7).

Al igual que en el caso anterior, los resultados obtenidos indican que el sulfato de cobre a ambas concentraciones, se incrementa la actividad de la LiP, ya que en medio basal (sin la adición de tales compuestos), no fue detectada.

En cuanto al contenido de proteína, el comportamiento fue muy similar en todos los cultivos adicionados con los diferentes inductores y a las dos concentraciones manejadas de cada uno de ellos. Se observó una disminución e incremento repetitivo, siendo el más característico en ensayo con siringaldazina a 1.16  $\mu\text{M}$  (Figura 7.24).

Tabla 7.7. Efecto de la adición de inductores en la actividad de LiP en RVAN2 en GMM

INDUCTOR	CONCENTRACION	PROMEDIO (U/L) <sup>1</sup>	DUNNETT (p)
CONTROL	----	0.00±0.00 <sup>a</sup>	
COBRE	500 µM	153.95±61.35(16) <sup>c</sup>	0.000009
	1000 µM	57.10±44.64(20) <sup>b</sup>	0.008467
ETANOL	30 g/L	7.94±0.187(4) <sup>a,b</sup>	0.9984
	35 g/L	9.199±0.465(16) <sup>a,b</sup>	0.9958
MANGANESO	11 mg/L	11.83±2.433(20) <sup>a,b</sup>	0.9800
	40 mg/L	19.65±10.08(14) <sup>a,b</sup>	0.7787
SIRINGALDAZINA	0.116 µM	6.079±0.0936(16) <sup>a,b</sup>	0.9997
	1.16 µM	7.294±0.374(16) <sup>a,b</sup>	0.9991

<sup>1</sup> Promedio de tres ensayos independientes ± desviación estándar. ( ) Día máx. actividad

<sup>2</sup> Valores seguidos por letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes p≤0.05

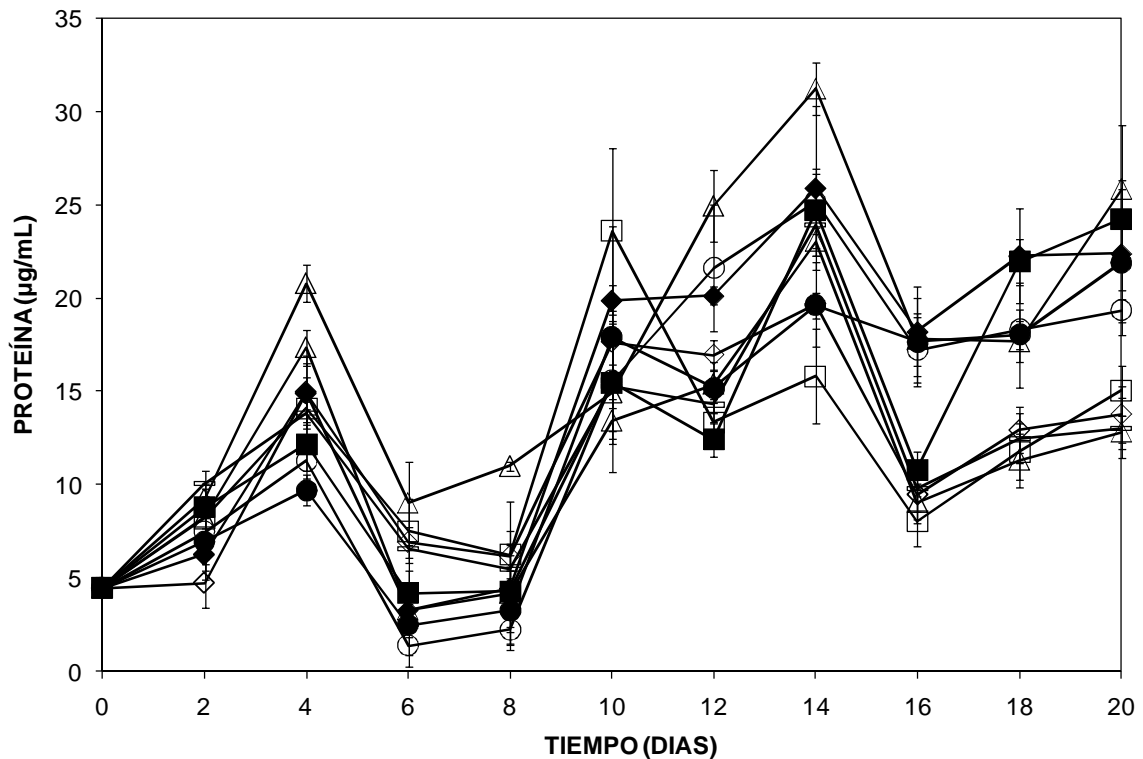


Figura 7.24.- Contenido de proteína de RVAN2 en GMM, adicionado con diferentes compuestos. ♦, Cobre 500 µM; ◇, Cobre 1000 µM; ●, Manganese 11 mg/L; ○, Manganese 40 mg/L; ▲, Siringaldazina 0.116 µM; △, Siringaldazina, 1.16 µM; ■, Etanol 30 g/L; □, Etanol 35 g/L; ---, Control. Los símbolos representan el promedio ± la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

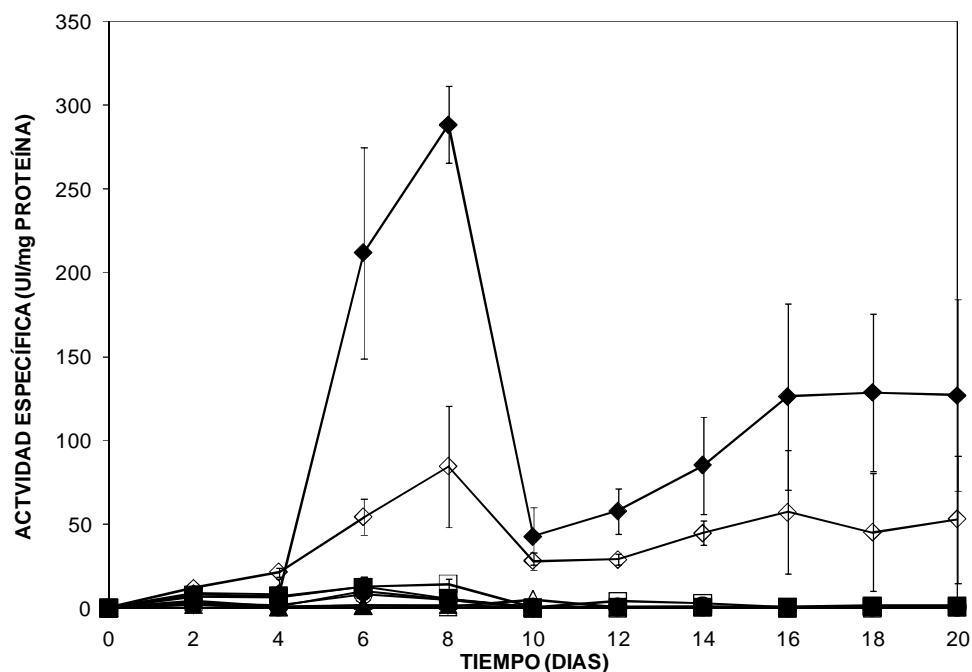


Figura 7.25.- Actividad Específica de Lacasa en RVAN2 en GMM, adicionado con diferentes compuestos. ◆, Cobre 500 µM; ◇, Cobre 1000 µM; ●, Manganeso 11 mg/L; ○, Manganeso 40 mg/L; ▲, Siringaldazina 0.116 µM; △, Siringaldazina, 1.16 µM; ■, Etanol 30 g/L; □, Etanol 35 g/L; ---, Control. Los símbolos representan el promedio ± la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

#### 7.4.1.4.2.- RVAN12

Se observó un comportamiento muy similar que el mostrado por RVAN2. El cobre a 500 µM fue el que presentó un mayor efecto, con una actividad de 6868 U/L al día 16, lo que implicó un incremento de 404 veces con respecto al control. Seguido de cobre a 1000 µM y sulfato manganoso a 40 mg/L con 911.7 y 457.1 U/L, respectivamente. El resto de los inductores presentaron un incremento de la actividad pero en menor proporción que el alcanzado por el sulfato de cobre a 500 µM. (Figura 7.26).

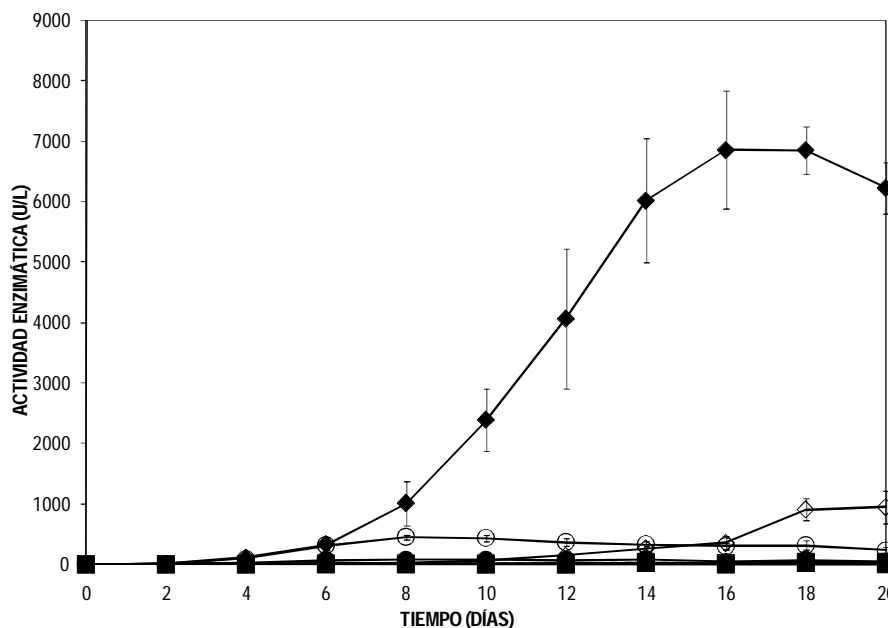


Figura 7.26.- Actividad Enzimática de Lacasa en RVAN12 en GMM, adicionado con diferentes compuestos. ♦, Cobre 500 µM; ◇, Cobre 1000 µM; ●, Manganeso 11 mg/L; ○, Manganeso 40 mg/L; ▲, Siringaldazina 0.116 µM; △, Siringaldazina, 1.16 µM; ■, Etanol 30 g/L; □, Etanol 35 g/L; —, Control. Los símbolos representan el promedio ± la desviación estándar del duplicado de dos ensayos totalmente independientes.

En el análisis multifactorial, se analizaron como factores el tipo de inductor así como la concentración del mismo sobre la actividad de Lacasa. El análisis arrojó una diferencia altamente significativa ( $p \leq 0.000016$ ). Con el fin de determinar que factor estaba influyendo, se realizaron análisis de varianza de una sola vía con cada uno de los factores. Con respecto al factor Inductor, se determinó que existía una diferencia altamente significativa ( $p \leq 0.000000$ ). Al realizar la prueba de rangos múltiples de Tukey, se determinó que existen dos grupos de homogeneidad dependiendo del compuesto utilizado. Descarta el hecho de que el primer grupo de homogeneidad esta formado por los tres inductores, etanol, manganeso, siringaldazina así como el control, mientras que el segundo grupo de homogeneidad esta formado exclusivamente por el cobre. Este análisis indicó la existencia de diferencias altamente significativas del cobre con respecto al control ( $p \leq 0.000475$ ), etanol ( $p \leq 0.000222$ ), manganeso ( $p \leq 0.000363$ ) y siringaldazina ( $p \leq 0.000218$ ). El control, por el contrario, no mostro diferencias significativas con el resto de los inductores ( $p \geq 0.9999$ ). La Prueba de Dunnett, determinó que solo el cobre presento diferencias altamente significativas contra el control ( $p \leq 0.000155$ ), no así el resto de inductores ( $p \geq 0.99$ ). Con el factor concentración, no se observaron diferencias

significativas ( $p \geq 0.1025$ ), por lo cual no se aplicó la prueba de rangos múltiples de Tukey.

Al presentar diferencias significativas el análisis de varianza multifactorial, se realizó la prueba de rangos múltiples entre la interacción de ambos factores. Estos resultados confirmaron lo que se obtuvo con el análisis univariado, en el cual el inductor que presentó un efecto en la Lacasa fue el cobre. El cobre a 500  $\mu\text{M}$  presentó una diferencia altamente significativa con respecto al cobre a 1000  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000151$ ), etanol, manganeso y siringaldazina, todos a ambas concentraciones ( $p \leq 0.000151$ ). En cuanto al sulfato de cobre, este presentó diferencias significativas con etanol 30 g/L ( $p \leq 0.01087$ ), etanol 35 g/L ( $p \leq 0.01309$ ), manganeso 11 mg/L ( $p \leq 0.02049$ ), siringaldazina 0.116  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.01068$ ) y siringaldazina 1.16  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.01058$ ). Se generaron tres grupos de homogeneidad. Finalmente, al realizar la prueba de Dunnett, el cobre a ambas concentraciones presentaron diferencia altamente significativa con respecto al control ( $p \leq 0.000009$  y  $p \leq 0.002272$ , para 500 y 1000  $\mu\text{M}$ , respectivamente), (Tabla 7.8).

Tabla 7.8. Efecto de la adición de inductores en la actividad de Lacasa en RVAN12 en GMM

INDUCTOR	CONCENTRACION	PROMEDIO (U/L) <sup>1</sup>	DUNNETT (p)
CONTROL	-----	91.102±13.195(6) <sup>a</sup>	
COBRE	500 $\mu\text{M}$	6869.09±979.7(16) <sup>c</sup>	0.000009
	1000 $\mu\text{M}$	955.03±266.2(20) <sup>b</sup>	0.002272
ETANOL	30 g/L	34.71±2.907(18) <sup>a</sup>	0.9999
	35 g/L	51.56±5.036(18) <sup>a</sup>	1.0000
MANGANESO	11 mg/L	94.17±2.812(14) <sup>a</sup>	1.0000
	40 mg/L	457.38±39.6(8) <sup>a,b</sup>	0.4358
SIRINGALDAZINA	0.116 $\mu\text{M}$	33.11±2.097(18) <sup>a</sup>	0.9999
	1.16 $\mu\text{M}$	32.22±0.924(18) <sup>a</sup>	0.9999

<sup>1</sup> Promedio de tres ensayos independientes  $\pm$  desviación estándar. ( ) Día máx. actividad

<sup>2</sup> Valores seguidos por letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes  $p \leq 0.05$

El análisis estadístico permitió determinar que el mejor inductor fue el sulfato de cobre a ambas concentraciones y entre ellos, a 500  $\mu\text{M}$  se incrementa hasta 75 veces la actividad de lacasa.

En cuanto a la actividad detectada de LiP, se observó un comportamiento muy similar al presentado por la Lacasa, esto es, su producción se vio favorecida por la presencia de los diversos inductores, los más representativos de tal efecto, fueron el sulfato de cobre 500  $\mu\text{M}$ , seguido del sulfato manganoso a 40 mg/L, con 563 y 107.7 U/L, respectivamente. Por otro lado, es de destacarse que el control, es decir el medio sin la adición de ninguno de los inductores, no presentó actividad de LiP durante los 20 días de ensayo. El día de máxima actividad fue diferente en todos los inductores probados (Figura 7.27).

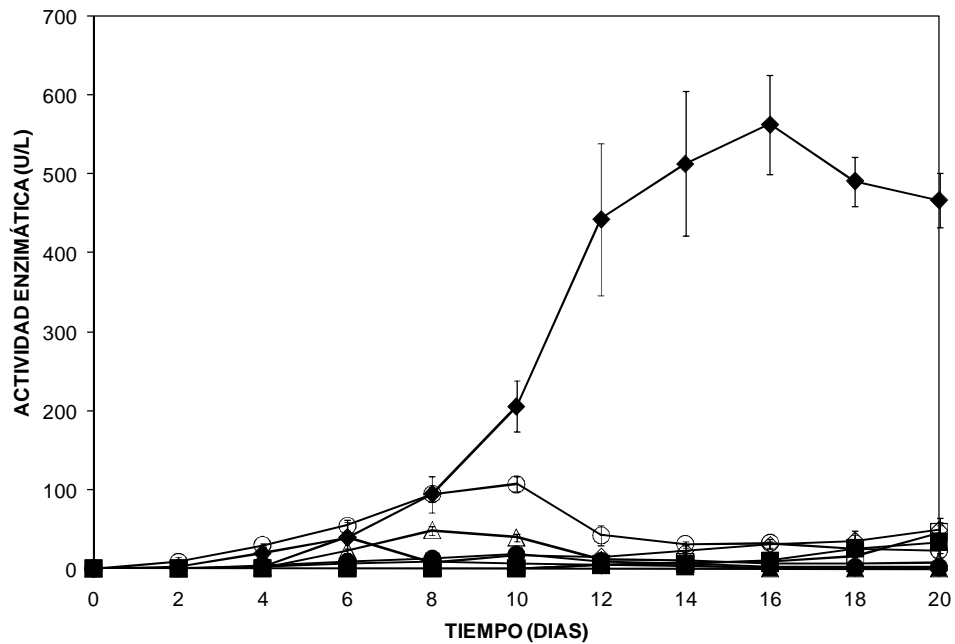


Figura 7.27.- Actividad enzimática de LiP de RVAN12 en GMM, adicionado con diferentes compuestos. ◆, Cobre 500  $\mu\text{M}$ ; ◇, Cobre 1000  $\mu\text{M}$ ; ●, Manganeso 11 mg/L; ○, Manganeso 40 mg/L; ▲, Siringaldazina 0.116  $\mu\text{M}$ ; △, Siringaldazina, 1.16  $\mu\text{M}$ ; ■, Etanol 30 g/L; □, Etanol 35 g/L; —, Control. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de dos ensayos totalmente independientes.

En el análisis multifactorial, se analizaron como factores el tipo de inductor así como la concentración del mismo sobre la actividad de Lacasa. El análisis arrojó una diferencia altamente significativa ( $p \leq 0.00000$ ). Al igual que en los casos anteriores, se procedió a realizar un análisis univariado, con el fin de determinar cual de los factores estaba afectando de forma significativa la actividad de LiP. Con respecto al factor Inductor, se determinó que existía una diferencia altamente significativa ( $p \leq 0.000392$ ). La comparación de rangos múltiples de Tukey con un nivel de significancia de 0.5, arrojó

que existe una diferencia significativa del cobre con el control ( $p \leq 0.00129$ ), etanol ( $p \leq 0.002905$ ), manganeso ( $p \leq 0.007993$ ) y siringaldazina ( $p \leq 0.001781$ ). Se presentaron dos grupos de homogeneidad, el primero de ellos representado por el control, etanol, manganeso y siringaldazina; el segundo por el cobre. La prueba de Dunnett arrojó que existe una diferencia altamente significativa del cobre con respecto al control ( $p \leq 0.000493$ ). El análisis del factor concentración no arrojó diferencias significativas ( $p \geq 0.1048$ ).

Al llevar a cabo la interacción de ambos factores, se presentaron tres grupos de homogeneidad. Al igual que lo obtenido en el anova univariado, se observó que el sulfato de cobre a 500  $\mu\text{M}$  presentó una diferencia altamente significativa con el control y el resto de inductores ( $p \leq 0.000151$ ). El manganeso a una concentración de 40 mg/L fue significativamente diferente con respecto al control ( $p \leq 0.000490$ ). El manganeso a 11 mg/L presentó diferencias significativas con la concentración a 40 mg/L ( $p \leq 0.01099$ ). Otra diferencia observada fue la que presentó el manganeso a 40 mg/L con la siringaldazina a 0.116  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.003664$ ). Se formaron tres grupos de homogeneidad y, finalmente, la prueba de Dunnett mostró que tanto el cobre a 500  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000009$ ), como el manganeso a 40 mg/L ( $p \leq 0.000103$ ) son diferentes significativamente al control (Tabla 7.9).

Tabla 7.9. Efecto de la adición de inductores en la actividad de LiP en RVAN12 en GMM

<b>INDUCTOR</b>	<b>CONCENTRACION</b>	<b>PROMEDIO (U/L)<sup>1</sup></b>	<b>DUNNETT (p)</b>
CONTROL	-----	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	
COBRE	500 $\mu\text{M}$	514.55 $\pm$ 93.74(14) <sup>c</sup>	0.000009
	1000 $\mu\text{M}$	49.76 $\pm$ 14.44(20) <sup>a,b</sup>	0.008467
ETANOL	30 g/L	33.84 $\pm$ 25.8(20) <sup>a,b</sup>	0.9984
	35 g/L	46.12 $\pm$ 9.15(20) <sup>a,b</sup>	0.9958
MANGANESO	11 mg/L	18.51 $\pm$ 5.34(10) <sup>a</sup>	0.9800
	40 mg/L	107.71 $\pm$ 9.37(10) <sup>b</sup>	0.7787
SIRINGALDAZINA	0.116 $\mu\text{M}$	8.78 $\pm$ 4.29(8) <sup>a</sup>	0.9997
	1.16 $\mu\text{M}$	48.71 $\pm$ 5.46(8) <sup>a,b</sup>	0.9991

<sup>1</sup> Promedio de tres ensayos independientes  $\pm$  desviación estándar. ( ) Día m<sup>x</sup>. actividad

<sup>2</sup> Valores seguidos por letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes  $p \leq 0.05$

Como sucedió con RVAN2, el cobre a ambas concentraciones incrementa considerablemente la actividad de LiP, pues en el medio basal no fue detectada tal actividad. De ellos, a 500  $\mu\text{M}$  fue la mejor concentración, con un incremento de nueve veces la actividad dada por el cobre a 1000  $\mu\text{M}$ .

Por otro lado, el contenido de proteína fue muy similar, a excepción de la presentada con el cobre, con el cual se logró la mayor actividad enzimática, cuyo máximo valor fue de 31.4  $\mu\text{g/L}$ , con el resto de los inductores el contenido de proteína fluctuó de 13-21  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 7.28). Este contenido de proteína se presentó dos días después de alcanzada la máxima actividad producida por el microorganismo en el medio líquido.

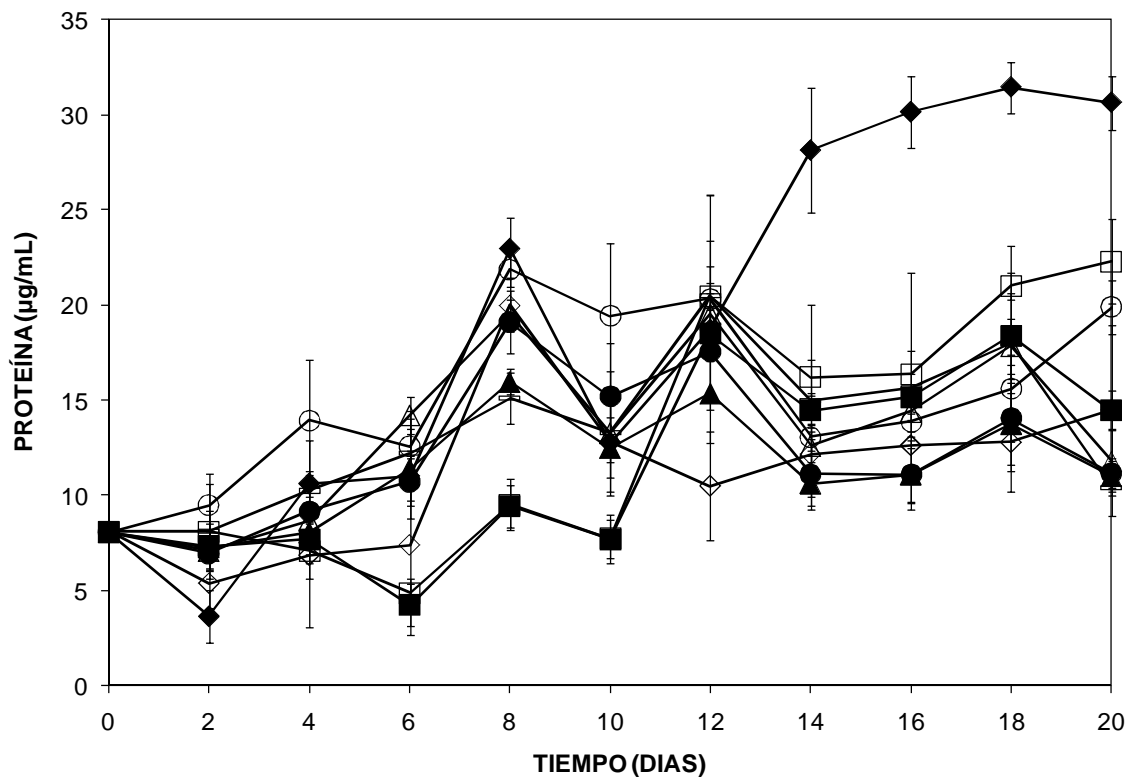


Figura 7.28.- Contenido de Proteína en el cultivo de RVAN12 en GMM, adicionado con diferentes compuestos. ◆, Cobre 500  $\mu\text{M}$ ; ◇, Cobre 1000  $\mu\text{M}$ ; ●, Manganeso 11 mg/L; ○, Manganeso 40 mg/L; ▲, Siringaldazina 0.116  $\mu\text{M}$ ; △, Siringaldazina, 1.16  $\mu\text{M}$ ; ■, Etanol 30 g/L; □, Etanol 35 g/L; ---, Control. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de dos ensayos totalmente independientes.

Finalmente, la actividad específica mostró un comportamiento muy similar, destacó el sulfato de cobre a ambas concentraciones, fue mayor a 500  $\mu\text{M}$  que a 1000  $\mu\text{M}$ , con valores de 229.7 y 72.9 U/mg de proteína, mientras que el sulfato manganoso a



40 mg/L, alcanzó una actividad específica de 26 U/mg de proteína (Figura 7.29). El resto de los compuestos no presentó un incremento considerable en la actividad, el contenido de proteína producida fue similar para todos.

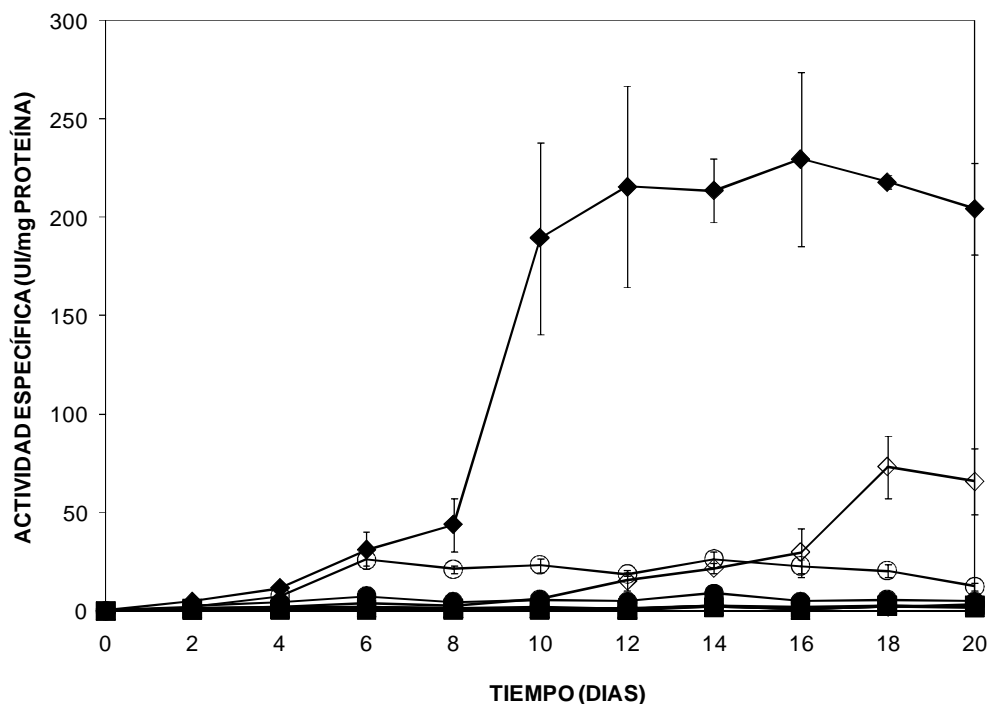


Figura 7.29.- Actividad Específica de Lacasa en RVAN12 en GMM, adicionado con diferentes compuestos. ◆, Cobre 500 µM; ◇, Cobre 1000 µM; ●, Manganeso 11 mg/L; ○, Manganeso 40 mg/L; ▲, Siringaldazina 0.116 µM; △, Siringaldazina, 1.16 µM; ■, Etanol 30 g/L; □, Etanol 35 g/L; —, Control. Los símbolos representan el promedio ± la desviación estándar del duplicado de dos ensayos totalmente independientes.

#### 7.4.2.- MEDIO DE HARINA DE SOYA (SMM)

El medio de harina de soya, al contrario del medio de glucosa (GMM), muestra una mayor complejidad en su composición. El comportamiento presentado por los diversos hongos es muy variado tanto entre ellos como en relación al obtenido con el medio GMM. Se presentó formación de aglomerados de micelio, pellets; así mismo, el ensayo enzimático fue llevado por espacio de 20 días, ya que las actividades enzimáticas fueron mayores a las observadas en el medio basal (GMM).

De las cepas de referencia se utilizó *P. ostreatus*, ya que tanto en *Phanerochaete chrysosporium* como *Bjerkandera adusta* no se detectaron actividades de Lacasa, LiP y/o MnP en este medio, por lo cual se descartaron.

Cabe mencionar que tanto la consistencia como el aspecto del medio de cultivo fueron muy diferentes al presentado por el GMM, al igual que el aspecto y tamaño de los pellets, definido visualmente (Figura 7.30).

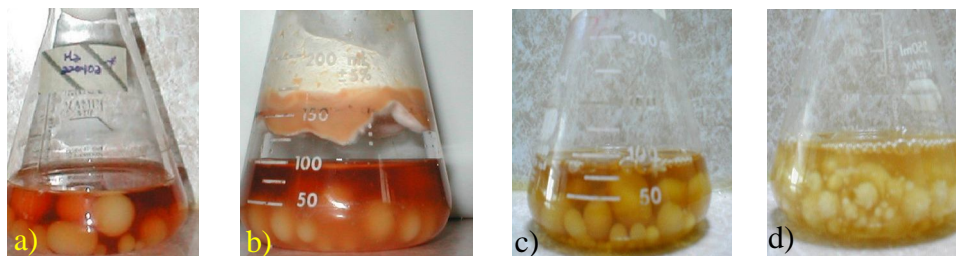


Figura 7.30.- Morfología y aspecto de los aglomerados miceliales al final del ensayo, en SMM. a) RVAN2. b) RVAN12. c) RVAN18. d) RVAN19.

#### 7.4.2.1.- Cinética de Crecimiento y Producción Enzimática

##### 7.4.2.1.1.- RVAN2

La cinética de crecimiento de RVAN2 en SMM mostró una ligera disminución en el pH, llegando a 4.3; a partir del día 16 se incrementó este valor hasta llegar a 7.3. Se debe considerar que éste no fue controlado durante los 20 días que duro el ensayo.

Por otro lado, el consumo de azúcares fue lento, se agotó el 30% cuando alcanzó su máxima producción de biomasa (11.275 mg/mL). A partir de este momento, el microorganismo entró en la fase estacionaria por lo cual se observó una disminución e incremento en la concentración de biomasa, llegó a su mínimo valor al final del ensayo enzimático.

La síntesis de Lacasa y Lignino Peroxidasa, llegaron a su máximo valor en este punto, con una actividad de 5150 y 151 U/L, respectivamente. Estos valores de actividad disminuyeron conforme el microorganismo continuaba con el crecimiento. Lo anterior coincidió con el incremento en el valor de pH. Finalmente, la producción de Manganese Peroxidasa, se disparó al final de la cinética, cuando el valor de pH se incrementó y la fuente de carbono había sido consumida casi en su totalidad y el microorganismo se encontraba al final de la fase estacionaria (Figura 7.31).

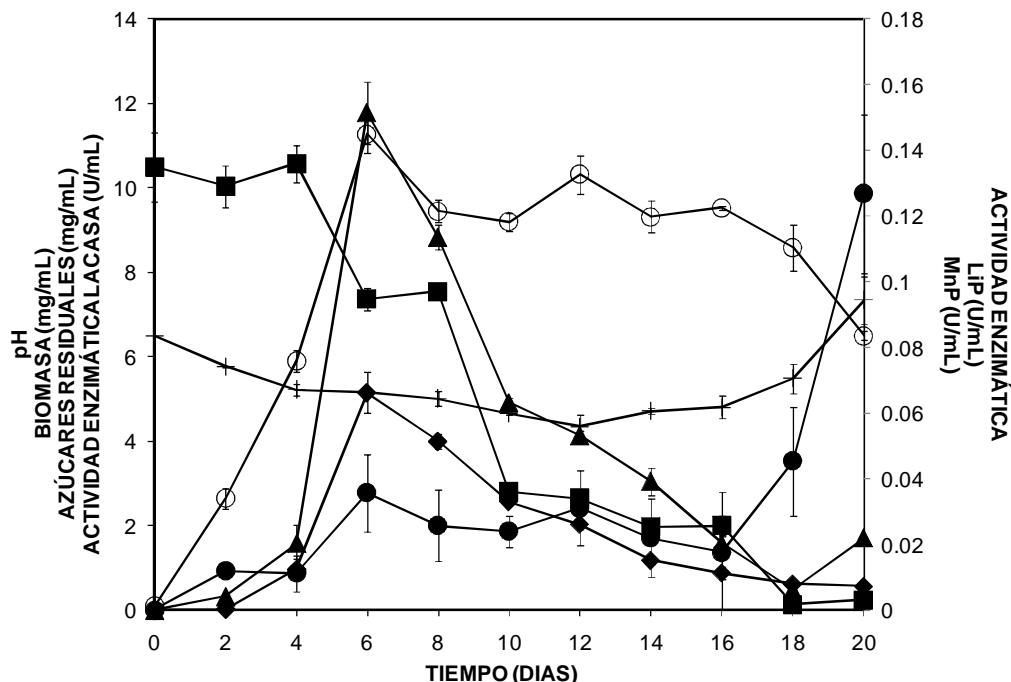


Figura 7.31.- Cinética de Crecimiento y Actividad Enzimática del sobrenadante del cultivo de RVAN2 en SMM. ♦, Lacasa;▲, LiP; ●, MnP; ○, Biomasa; ■; Azúcares Residuales; +, pH. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

#### 7.4.2.1.2.- RVAN12

El crecimiento de RAVN12 fue ligeramente menor al observado en RVAN2. La máxima producción de micelio se alcanzó al sexto día del ensayo, con 10.2 mg/mL. A partir de este día comenzó la fase estacionaria.

En cuanto al pH, llegó al mínimo valor al día 10 con 4.3; se presentó un incremento ligero a partir de este día, sin embargo este aumento fue menor al dado por RVAN2, con 5.04.

Con respecto a la fuente de carbono, esta fue consumida mas del 95% al día 10, cuando el microorganismo se encontraba en la fase estacionaria y se presentaba el mínimo de valor de pH. El consumo de estos azúcares fue mayor que el obtenido por RVAN2.

Finalmente, la producción de Lacasa comenzó a partir del sexto día y alcanzó su máximo valor al día 12 con 13,430 U/L, después del agotamiento de la fuente de carbono. La producción de LiP, alcanzó su máximo valor con 4466 U/L, la cual decayó a partir del día 14. Finalmente, la producción de MnP fue de 65.6 U/L al día 16, cuando el pH se incrementó y el crecimiento llegaba al final de la fase estacionaria (Figura 7.32).

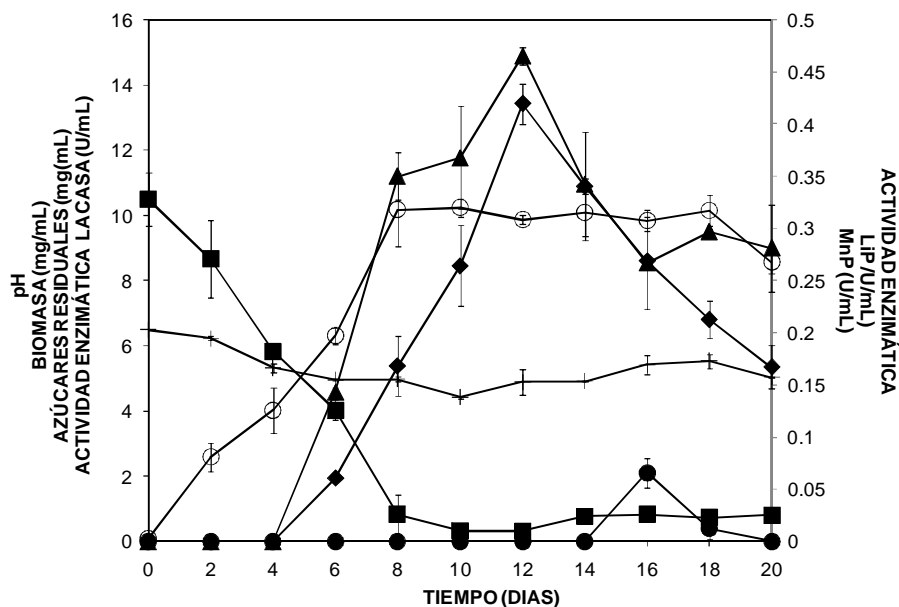


Figura 7.32.- Cinética de Crecimiento y Actividad Enzimática del sobrenadante del cultivo de RVAN12 en SMM. ♦, Lacasa;▲, LiP; ●, MnP; ○, Biomasa; ■; Azúcares Residuales; +, pH. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

#### 7.4.2.1.3.- *Trametes villosa* (RVAN18)

El crecimiento en el caso de *Trametes villosa*, fue ligeramente diferente al presentado por las dos cepas anteriores. Alcanzó una producción de 11.29 mg/mL de micelio, su fase exponencial se extendió más que en las cepas RVAN2 y RVAN12.

Por otro lado, el pH mostró una ligera disminución, alcanzó su mínimo valor al día seis, cuando el microorganismo se encontraba a la mitad de la fase exponencial y más del 98 % de la fuente de carbono había sido consumida, esta velocidad de consumo fue superior a la observada en las cepas anteriores. Al final de la cinética se observó un incremento en el valor de pH con 7.09.

Por último, la actividad de Lacasa se detectó a partir del día dos. Alcanzó la máxima producción alrededor del octavo día (0.398 U/mL); en cuanto a la LiP, esta enzima también se produjo en menor proporción que RVAN2 y RVAN12, con una actividad de 0.012 U/mL al día ocho, al igual que en el caso de la Lacasa. No fue detectada la actividad de MnP durante el transcurso del ensayo enzimático (Figura 7.33).

#### 7.4.2.1.4.- *Schizophyllum commune* (RVAN19)

*Schizophyllum commune* fue el hongo con mayor producción de biomasa, comportamiento similar al presentado en el medio GMM, con 17 mg/mL. La fase exponencial de crecimiento fue más extensa, lo cual indicó que tuvo un crecimiento más lento.

El mínimo valor de pH con 5.9 se alcanzó al día 10, menor a la presentada por el resto de los hongos. A partir de este día, se incrementó hasta alcanzar un valor final de 7.4. Lo anterior coincidió con la disminución en el crecimiento del microorganismo.

A diferencia de los hongos anteriores, la fuente de carbono se consumió casi en su totalidad, cuando se encontraba a la mitad del crecimiento y el pH aun no alcanzaba el mínimo valor reportado.

Finalmente, tanto la actividad de Lacasa con 620 U/L como de LiP con 18 U/L, fueron mayores a la producida por *Trametes villosa*, los días 16 y 20, respectivamente. Esto se presentó cuando el valor de pH comenzaba a incrementarse; la fuente de carbono había sido consumida casi en su totalidad y la biomasa se encontraba casi al final de la fase exponencial de crecimiento. No se logró detectar actividad de MnP durante el transcurso del ensayo enzimático (Figura 7.34).

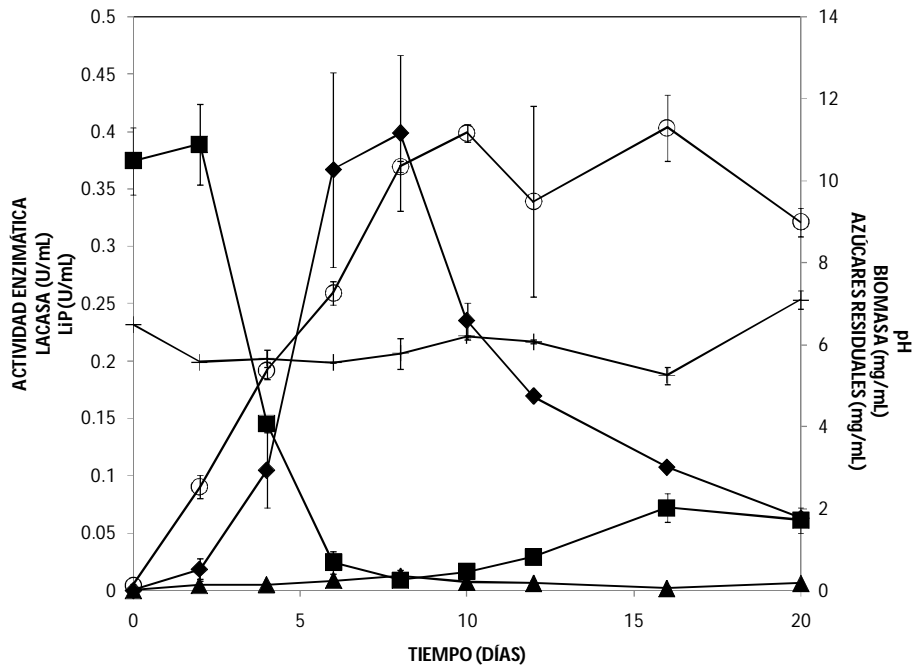


Figura 7.33.- Cinética de Crecimiento y Actividad Enzimática del sobrenadante del cultivo de RVAN18 en SMM. ◆, Lacasa; ▲, LiP; ○, Biomasa; ■; Azúcares Residuales; +, pH. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

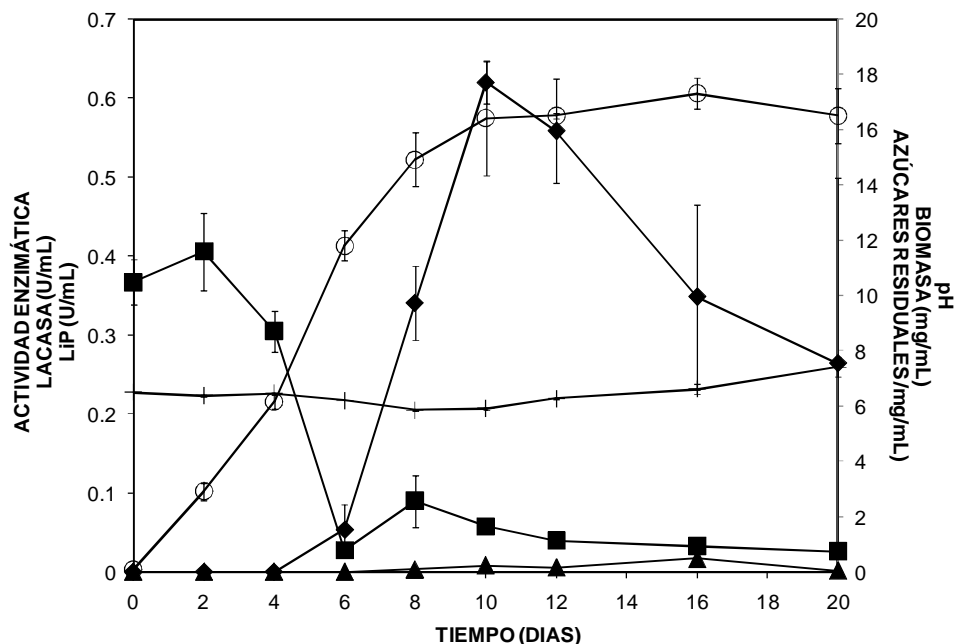


Figura 7.34.- Cinética de Crecimiento y Actividad Enzimática del sobrenadante del cultivo de RVAN19 en SMM. ♦, Lacasa; ▲, LiP; ●, MnP; ○, Biomasa; ■; Azúcares Residuales; +, pH. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

#### 7.4.2.1.5.- Cepa Control, *P. ostreatus*

La cepa control mostró un comportamiento muy diferente al dado por el resto de los hongos estudiados. La producción de biomasa fue de 10 mg/mL al día seis, posterior a ese día se llegó a la fase estacionaria del crecimiento, en la cual se observó un decaimiento en la producción de biomasa, siendo esta de 5.8 mg/mL al final del ensayo. En cuanto al pH, este se incrementó a 7.68 a partir del día cuatro, hasta llegar al máximo de 8.3, continuando constante este valor hasta el final de la fermentación. La fuente de carbono fue consumida lentamente, al final del ensayo restaba el 65% de la misma. Este comportamiento fue muy similar al presentado en GMM. La producción de las enzimas lignolíticas fue de 5872, 235.9 y 211 U/L, para Lacasa, LiP y MnP, respectivamente. Todas ellas alcanzaron el máximo alrededor del día 10 para Lacasa y LiP y para MnP el día (Figura 7.35).

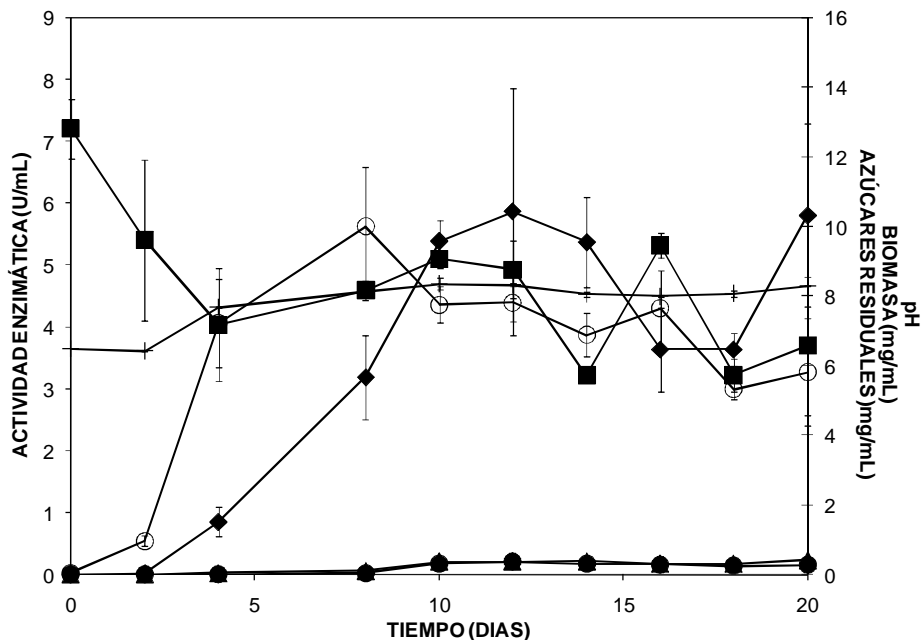


Figura 7.35.- Cinética de Crecimiento y Actividad Enzimática del sobrenadante del cultivo de *Pleurotus ostreatus* en SMM. ♦, Lacasa; ▲, LiP; ●, MnP; ○, Biomasa; ■; Azúcares Residuales; +, pH. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

Como se pudo determinar, las enzimas producidas por la cepa control fueron inferiores a la presentada por RVAN12 y muy similar a lo encontrado en RVAN2, aunque fue superior a lo presentado por RVAN18 y RVAN19. Debido a esto, los ensayos posteriores realizados con el medio de harina de soya se llevaron a cabo con RVAN2 y RVAN12.

Con el fin de determinar si realmente existió una diferencia en las actividades enzimáticas entre el total de cepas estudiadas así como de las nativas con respecto al control, se realizó un análisis de varianza, comparación de rangos múltiples de Tukey y la prueba de Dunnett.

Para la actividad de Lacasa, se determinó que existe una diferencia altamente significativa ( $p \leq 0.000000$ ). La comparación de rangos múltiples arrojó una diferencia significativa de la cepa control con RVAN12 ( $p \leq 0.000129$ ), RVAN18 ( $p \leq 0.000129$ ) y RVAN19 ( $p \leq 0.000129$ ), no así para RVAN2 ( $p \geq 0.6135$ ). Mientras que RVAN12 mostró diferencias significativas con el total de cepas ( $p \leq 0.000129$ ). Tampoco se observó diferencia significativa entre RVAN18 y RVAN19 ( $p \geq 0.9879$ ). Se generaron tres grupos de homogeneidad. Por último, mediante la prueba de Dunnett se determinó que tanto

RVAN12, RVAN18 y RVAN19 presentaron diferencias altamente significativas con el control (Tabla 7.10).

Tabla 7.10. Actividad Enzimática de Lacasa en 4 cepas nativas y cepa Control en SMM

TRATAMIENTO	PROMEDIO (U/L) <sup>1</sup>	DUNNETT (p)
RVAN2	5141.28±423.48(6) <sup>a</sup>	0.4352
RVAN12	13398.63±548.517(12) <sup>a</sup>	0.000011
RVAN18	398.62±52.976(8) <sup>b</sup>	0.000011
RVAN19	620.67±22.776(10) <sup>c</sup>	0.000011
<i>P. ostreatus</i> (CONTROL)	5872.36±1995.08(6) <sup>b</sup>	

<sup>1</sup> Promedio de tres ensayos independientes ± desviación estándar. ( ) Día máx. actividad

<sup>2</sup> Valores seguidos por letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes p≤0.05

De esta forma, se determinó que la mejor cepa en la producción de Lacasa fue RVAN12, incluso superior a lo encontrado con la cepa control. Por otro lado, RVAN2 fue similar al control y el resto, presentaron valores inferiores.

Para la actividad de LiP, el análisis de varianza mostró que existen diferencias altamente significativas (p≤0.000000). La prueba de rangos múltiples de Tukey arrojó que existen diferencias altamente significativas entre las diferentes cepas (p≤0.000129), a excepción de las cepas RAVAN18 y RVAN19, ya que entre ellas no existieron diferencias significativas (p≥0.9991). Mediante esta prueba, se detectaron cuatro grupos de homogeneidad. Al comparar las cuatro cepas nativas contra el control mediante la prueba de Dunnett, se determinó que todas cepas son diferentes significativamente al control (p≤0.000011, para RVAN12, RVAN18 y RVAN19; p≤0.000700 para RVAN2), (Tabla 7.11).

Tabla 7.11. Actividad Enzimática de LiP en 4 cepas nativas y cepa Control en SMM

TRATAMIENTO	PROMEDIO (U/L) <sup>1</sup>	DUNNETT (p)
RVAN2	151.51±7.577(6) <sup>a</sup>	0.4352
RVAN12	466.03±56.57(12) <sup>a</sup>	0.000011
RVAN18	12.73±3.89(8) <sup>b</sup>	0.000011
RVAN19	16.99±6.56(16) <sup>c</sup>	0.000011
<i>P. ostreatus</i> (CONTROL)	235.95±33.18(12) <sup>b</sup>	

<sup>1</sup> Promedio de tres ensayos independientes ± desviación estándar. ( ) Día máx. actividad

<sup>2</sup> Valores seguidos por letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes p≤0.05



Con respecto a LiP, se presentó el mismo comportamiento que el dado con la Lacasa, encontrando que RVAN12 es superior a la cepa control, mientras que RVAN2 es similar y el resto, presentan valores inferiores de LiP.

Para la actividad de MnP, el análisis de varianza mostró que existe un efecto altamente significativo dependiendo de la cepa ( $p \leq 0.000000$ ). La comparación de rangos múltiples arrojó diferencias significativas entre el control y las cuatro cepas nativas ( $p \leq 0.000129$ , para cada una de ellas). No existió diferencia significativa entre RVAN18 y RVAN19 ( $p \geq 1.0000$ ). RVAN2 mostró diferencias significativas con todas, así como RVAN12 ( $p \leq 0.000129$ ). Se generaron cuatro grupos de homogeneidad

Se generaron tres grupos de homogeneidad. Por último, mediante la prueba de Dunnett se determinó que RVAN2, RVAN12, RVAN18 y RVAN19 presentaron diferencias altamente significativas con el control (Tabla 7.12).

Tabla 7.12. Actividad Enzimática de MnP en 4 cepas nativas y cepa Control en SMM

TRATAMIENTO	PROMEDIO (U/L) <sup>1</sup>	DUNNETT (p)
RVAN2	126.8±19.18(20) <sup>a</sup>	0.000011
RVAN12	65.69±10.77(16) <sup>b</sup>	0.000011
RVAN18	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.000011
RVAN19	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.000011
<i>P. ostreatus</i> (CONTROL)	211.01±17.09(12) <sup>d</sup>	

<sup>1</sup> Promedio de tres ensayos independientes ± desviación estándar. ( ) Día máx. actividad

<sup>2</sup> Valores seguidos por letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes  $p \leq 0.05$

En cuanto a la actividad de MnP, se determinó que la cepa control fue la mejor para tal enzima.

Al englobar el comportamiento de las cepas con respecto a las tres enzimas lignolíticas, la mejor fue RVAN12, debido a la actividad de Lacasa y LiP alcanzada en el medio de harina de soya (SMM), comportamiento similar al encontrado en el medio de glucosa (GMM). Por otro lado, se decidió seguir estudiando a RVAN2 ya que presentó valores similares a la cepa control en actividad de lacasa.

#### 7.4.2.2.- Inductores

Se probaron los mismos compuestos utilizados en el medio GMM, bajo las mismas condiciones, por espacio de 20 días. Igualmente, se determinó Lacasa, LiP y

MnP. Las cepas utilizadas fueron aquellas que presentaron una actividad igual o mayor que la cepa control.

#### 7.4.2.2.1.- RVAN2

El efecto sobre la producción de Lacasa fue muy diferente, dependiendo del compuesto utilizado para tratar de favorecer el incremento en la actividad enzimática. Con la adición de Etanol a una concentración de 30 g/L, se detecto una actividad similar a la presentada por el control, de 5022 U/L y 4141 U/L, respectivamente. Mientras que el resto de los compuestos mostraron una actividad de Lacasa inferior, cuyos valores fueron de 1781.1 U/L (sulfato manganeso, 40 mg/L) hasta 4078 U/L (sulfato de cobre 1000  $\mu$ M). A pesar de esto, se observa que el decaimiento o la disminución en la actividad de Lacasa es mucho más lenta que en el caso del control, en el cual a partir del máximo día, esta tiende a disminuir drásticamente (Figura 7.36).

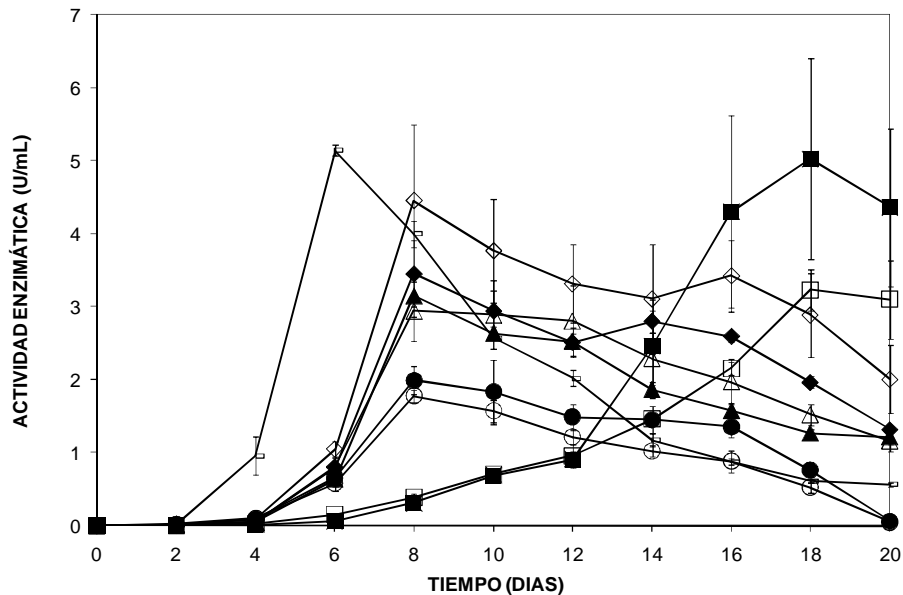


Figura 7.36.- Actividad Enzimática de Lacasa en el sobrenadante de RVAN2 en SMM, adicionado con diferentes compuestos. ◆, Cobre 500  $\mu$ M; ◇, Cobre 1000  $\mu$ M; ●, Manganeso 11 mg/L; ○, Manganeso 40 mg/L; ▲, Siringaldazina 0.116  $\mu$ M; △, Siringaldazina, 1.16  $\mu$ M; ■, Etanol 30 g/L; □, Etanol 35 g/L; ---, Control. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

El análisis de varianza determinó que existen diferencias altamente significativas ( $p \leq 0.000000$ ). Por lo cual se llevo a cabo un análisis de varianza por separado para cada uno de los factores. El tipo de inductor presentó un afecto altamente significativo en la

actividad de la Lacasa ( $p \leq 0.0000$ ). La comparación de rangos múltiples de Tukey, determinó que existieron diferencias significativas entre el control (medio sin inductor) y los inductores, cobre ( $p \leq 0.0372$ ), manganeso ( $p \leq 0.000130$ ) y siringaldazina ( $p \leq 0.007609$ ), mientras que entre el control y el etanol no se observó diferencias significativas ( $p \geq 0.1034$ ). Lo mismo sucedió entre el cobre y la siringaldazina ( $p \geq 0.5808$ ) y entre el cobre y el etanol ( $p \geq 0.9835$ ); lo anterior dio como resultado la formación de cuatro grupos de homogeneidad. En cuanto a la prueba de Dunnett, se encontró que el cobre, etanol, manganeso y siringaldazina presentaron diferencias significativas con respecto al control ( $p \leq 0.01515$ ,  $p \leq 0.04453$ ,  $p \leq 0.000009$  y  $p \leq 0.000023$ , respectivamente).

En cuanto al efecto de la concentración sobre la actividad enzimática de Lacasa, el análisis de varianza determinó que existen diferencias significativas ( $p \leq 0.001436$ ). La comparación de rangos múltiples de Tukey arrojó diferencias significativas entre el control y las dos concentraciones ( $p \leq 0.005393$  y  $p \leq 0.001058$ ), mientras que entre la concentración uno y la dos, no se observaron diferencias significativas ( $p \geq 0.6396$ ). Se formaron dos grupos de homogeneidad. La prueba de Dunnett, mostró que existieron diferencias significativas del control con respecto a la concentración uno ( $p \leq 0.003245$ ) y a la concentración dos ( $p \leq 0.000592$ ).

Al realizar el análisis de varianza multifactorial, teniendo como factores el tipo de inductor y la concentración de los mismos, determinó que existen diferencias altamente significativas ( $p \leq 0.00000$ ). Mediante la comparación de rangos múltiples de Tukey, se observó la respuesta dada por los tratamientos. El control presentó diferencias significativas con cobre a 500  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.001458$ ), Etanol a 35 g/L ( $p \leq 0.000323$ ), manganeso 11 mg/L y mangeso 40 mg/L ( $p \leq 0.000143$ ), siringaldazina a 0.116  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000228$ ) y siringaldazina a 1.16  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000153$ ). El cobre a 500  $\mu\text{M}$  presento diferencias con respecto al control ( $p \leq 0.0001458$ ), etanol 30 g/L ( $p \leq 0.003557$ ), manganeso 11 mg/L ( $p \leq 0.008002$ ) y manganeso 40 mg/L ( $p \leq 0.001540$ ). El cobre a 1000  $\mu\text{M}$  arrojó diferencias significativas con el etanol 35 g/L ( $p \leq 0.04765$ ), manganeso 11 mg/L y 40 mg/L ( $p \leq 0.000143$ ), siringaldazina 0.116  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.02665$ ) y siringaldazina 1.16  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.005669$ ). El etanol a 30 g/L mostró diferencias significativas con el cobre a 500  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.003557$ ), etanol a 35 g/L ( $p \leq 0.000651$ ), manganeso a 11 mg/L y 40 mg/L ( $p \leq 0.000143$ ), siringaldazina 0.116  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000381$ ) y siringaldazina 1.16  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000175$ ). El etanol a 35 g/L mostró diferencias significativas con el control ( $p \leq 0.000323$ ), etanol a 30 g/L ( $p \leq 0.000651$ ), y manganeso a 11 y 40 mg/L ( $p \leq 0.04083$  y  $p \leq 0.00875$ , respectivamente). El manganeso a 11 mg/L mostró diferencias significativas

con el control ( $p \leq 0.000143$ ), cobre a 500  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.008002$ ), cobre a 1000  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000143$ ), etanol a 30 g/L ( $p \leq 0.000143$ ) y etanol a 35 g/L ( $p \leq 0.040843$ ). El manganeso a 40 mg/L presentó diferencias significativas con respecto al control ( $p \leq 0.000143$ ), cobre a 500  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.00154$ ), cobre a 1000  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000143$ ), etanol a 30 g/L ( $p \leq 0.000143$ ), etanol a 35 g/L ( $p \leq 0.000143$ ) y etanol a 30 g/L ( $p \leq 0.000381$ ). La siringaldazina a 0.116  $\mu\text{M}$  y 1.16  $\mu\text{M}$  presentaron diferencias significativas con el control ( $p \leq 0.000228$  y  $p \leq 0.000153$ , respectivamente), con el cobre a 500  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.02666$  y  $p \leq 0.005669$ , respectivamente) y con el etanol a 30 g/L ( $p \leq 0.000381$  y  $p \leq 0.000175$ , respectivamente). Se formaron cinco grupos de homogeneidad, mientras que la prueba de Dunnett arrojó que existieron diferencias significativas de los tratamientos con cobre a 500  $\mu\text{M}$ , etanol a 35 g/L, manganeso a 11 y 40 mg/L, así como siringaldazina a 0.116 y 1.16  $\mu\text{M}$  (Tabla 7.13).

Tabla 7.13. Efecto de la adición de inductores en la actividad de Lacasa en RVAN2 en SMM

INDUCTOR	CONCENTRACION	PROMEDIO (U/L) <sup>1</sup>	DUNNETT (p)
CONTROL	----	5141.3±423.96(6) <sup>a</sup>	
COBRE	500 $\mu\text{M}$	3457.92±452(8) <sup>b,c</sup>	0.000335
	1000 $\mu\text{M}$	4454.9±1042.7(8) <sup>a</sup>	0.3282
ETANOL	30 g/L	5026.9±1377.4(18) <sup>a</sup>	0.9999
	35 g/L	3235.2±282.3(18) <sup>a,b,c</sup>	0.000053
MANGANESO	11 mg/L	1992.8±194.4(8) <sup>d,e</sup>	0.000007
	40 mg/L	1781.8±80.12(8) <sup>e</sup>	0.000007
SIRINGALDAZINA	0.116 $\mu\text{M}$	3151.52±290.95(8) <sup>c,d</sup>	0.000029
	1.16 $\mu\text{M}$	2945.5±403.5(8) <sup>c,d,e</sup>	0.000010

<sup>1</sup> Promedio de tres ensayos independientes  $\pm$  desviación estándar. ( ) Día máx. actividad

<sup>2</sup> Valores seguidos por letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes  $p \leq 0.05$

A excepción del etanol, el cual no presentó diferencias significativas con el control, el resto de los inductores generó un efecto negativo en la síntesis de Lacasa, contrario a lo obtenido con el medio GMM, el cual favoreció la síntesis de esta enzima en RVAN2.

Algo muy diferente se observó con la actividad enzimática de la LiP. Los inductores a ambas concentraciones mostraron un efecto positivo en la actividad enzimática. El sulfato manganeso a una concentración de 11 mg/L, fue el compuesto que

favoreció en mayor proporción la producción de LiP con .0406 U/mL,  $\cong 2.7$  veces con respecto al control. Por otro lado, el compuesto que menos incrementó la actividad fue la siringaldazina a 1.16  $\mu$ M, con 0.2316 U/mL, 1.53 veces más. El resto osciló entre los valores antes mencionados (Figura 7.37).

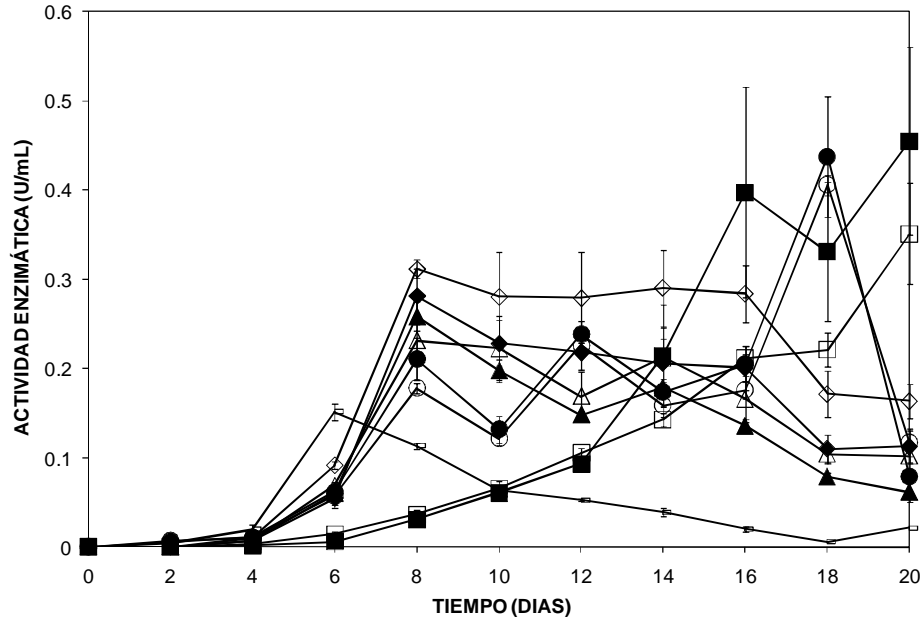


Figura 7.37.- Actividad Enzimática de LiP en el sobrenadante de RVAN2 en SMM, adicionado con diferentes compuestos. ◆, Cobre 500  $\mu$ M; ◇, Cobre 1000  $\mu$ M; ●, Manganeso 11 mg/L; ○, Manganeso 40 mg/L; ▲, Siringaldazina 0.116  $\mu$ M; △, Siringaldazina, 1.16  $\mu$ M; ■, Etanol 30 g/L; □, Etanol 35 g/L; ---, Control. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

El análisis de varianza determinó que existen diferencias altamente significativas ( $p \leq 0.000000$ ). Por lo cual se llevo a cabo un análisis de varianza por separado para cada uno de los factores. El tipo de inductor presentó un afecto altamente significativo en la actividad de la LiP ( $p \leq 0.0000$ ).

La comparación de rangos múltiples de Tukey arrojó que existieron diferencias significativas del control con el resto de los inductores, cobre ( $p \leq 0.000176$ ), etanol ( $p \leq 0.000130$ ), manganeso ( $p \leq 0.000130$ ) y siringaldazina ( $p \leq 0.01264$ ). No se presentaron diferencias significativas entre la siringaldazina y el cobre ( $p \geq 0.1792$ ), ni entre el etanol y el manganeso ( $p \geq 0.9261$ ). Existieron diferencias del cobre con el etanol y el manganeso ( $p \leq 0.000130$  y  $p \leq 0.000148$ ); el etanol con el control, cobre y siringaldazina ( $p \leq 0.000130$ ,  $p \leq 0.000324$  y  $p \leq 0.000130$ , respectivamente); el manganeso presentó diferencias entre el

control ( $p \leq 0.000130$ ), cobre ( $p \leq 0.000148$ ) y siringaldazina ( $p \leq 0.000130$ ); finalmente, la siringaldazina mostró diferencias significativas con el control ( $p \leq 0.01264$ ), el etanol ( $p \leq 0.000130$ ) y el manganeso ( $p \leq 0.000130$ ). Se formaron tres grupos de homogeneidad conformado el grupo uno por cobre y siringaldazina, el grupo dos por etanol y manganeso y el tercero por el control. Con la prueba de Dunnett se determinó que el cobre, etanol, manganeso y siringaldazina fueron significativamente diferentes al control ( $p \leq 0.000023$ ,  $p \leq 0.000009$  y  $p \leq 0.004975$ , respectivamente).

En cuanto al efecto de la concentración sobre la actividad enzimática de LiP, el análisis de varianza determinó que existen diferencias significativas ( $p \leq 0.000024$ ). La comparación de rangos múltiples de Tukey arrojó diferencias entre el control y cada una de las concentraciones manejadas ( $p \leq 0.000134$  y  $p \leq 0.000330$ , respectivamente). Se formaron dos grupos de homogeneidad conformados por el control por un lado y por las dos concentraciones por otro. Se determinó mediante la prueba de Dunnett que existieron diferencias significativas entre el control y ambas concentraciones ( $p \leq 0.000014$  y  $p \leq 0.000144$ , uno y dos, respectivamente).

Para visualizar el efecto en la interacción del tipo de inductor como de la concentración empleada en cada uno de ellos y, puesto que se determinó mediante el análisis multifactorial que existieron diferencias altamente significativas ( $p \leq 0.00000$ ), se sometieron a una prueba de rangos múltiples. Dicha prueba arrojó que existen diferencias significativas entre el control y el cobre a 500  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.001529$ ) y 1000  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000179$ ), etanol 30 y 35 g/L, manganeso 11 y 40 mg/L ( $p \leq 0.000143$ ) y siringaldazina 0.116  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.014417$ ). El cobre, además de presentar diferencias significativas con el control, las presentó con el etanol a 30 g/L ( $p \leq 0.000148$ ) y con el manganeso a 11 y 40 mg/L ( $p \leq 0.000199$  y  $p \leq 0.002436$ , respectivamente). El cobre a 1000  $\mu\text{M}$ , además de presentar diferencias significativas con el control, las mostró con el etanol 30 g/L ( $p \leq 0.000416$ ), y el manganeso a 11 mg/L ( $p \leq 0.002178$ ) y 40 mg/L ( $p \leq 0.0468$ ). El etanol a 30 g/L, mostró diferencias con el control, el cobre a ambas concentraciones (valores ya mencionados previamente), con el etanol a 35 g/L ( $p \leq 0.0194$ ), así como con manganeso a 40 mg/L ( $p \leq 0.0194$ ) y con siringaldazina a 0.116  $\mu\text{M}$  y 1.16  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000143$ ). El etanol a 35 g/L, mostro diferencias con el control, así como con etanol a 30 g/L, con la siringaldazina a 1.16  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.004134$ ). El manganeso fue diferente estadísticamente con el control, el cobre a ambas concentraciones (valores ya mencionados), así como con la siringaldazina a las dos concentraciones ( $p \leq 0.000322$  y  $p \leq 0.000148$ , respectivamente). La siringaldazina a 0.116  $\mu\text{M}$  mostró diferencias

significativas con el control, etanol a 35 g/L, y manganeso a ambas concentraciones. Finalmente, la siringaldazina a 1.16  $\mu$ M arrojó diferencias significativas con el etanol y manganeso, a ambas concentraciones. En base a los resultados anteriores, se formaron cinco grupos de homogeneidad. La prueba de Dunnett, por otro lado, determinó que el total de inductores a las dos concentraciones probadas fueron estadísticamente diferentes al control (Tabla 7.14).

Tabla 7.14. Efecto de la adición de inductores en la actividad de LiP en RVAN2 en SMM

INDUCTOR	CONCENTRACION	PROMEDIO (U/L) <sup>1</sup>	DUNNETT (p)
CONTROL	-----	151.51 $\pm$ 7.58(6) <sup>a</sup>	
COBRE	500 $\mu$ M	281.08 $\pm$ 30.8(8) <sup>b,c</sup>	0.000335
	1000 $\mu$ M	311.58 $\pm$ 10.43(8) <sup>b,c</sup>	0.3282
ETANOL	30 g/L	455.48 $\pm$ 105.28(20) <sup>c,e</sup>	0.9999
	35 g/L	351.35 $\pm$ 56.69(20) <sup>d</sup>	0.000053
MANGANESO	11 mg/L	437.64 $\pm$ 67.2(12) <sup>d,e</sup>	0.000007
	40 mg/L	406.03 $\pm$ 11.88(18) <sup>d,e</sup>	0.000007
SIRINGALDAZINA	0.116 $\mu$ M	258.71 $\pm$ 16.47(8) <sup>b,c</sup>	0.000029
	1.16 $\mu$ M	231.61 $\pm$ 44.52(8) <sup>a,b</sup>	0.000010

<sup>1</sup> Promedio de tres ensayos independientes  $\pm$  desviación estándar. ( ) Día máx. actividad

<sup>2</sup> Valores seguidos por letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes  $p \leq 0.05$

La actividad de MnP respondió de forma muy similar a la presentada por la LiP, en el sentido de que fueron favorecidas en diferente proporción, solamente el etanol a ambas concentraciones mostró un efecto negativo e incluso inhibió la actividad de dicha enzima.

El sulfato manganoso, 11 y 40 mg/L dieron como resultado una actividad de 3767 y 2860 U/L, respectivamente al día 18 del ensayo. Esta fue seguida por la siringaldazina 1.16  $\mu$ M con 907.7 U/L (día 20). En el resto de los inductores, los valores de actividad enzimática variaron de 176 a 221.3 U/L (Figura 7.38).

El análisis de varianza multifactorial mostró diferencias altamente significativas ( $p \leq 0.000000$ ). Por tal razón, se llevó, al igual que en los casos anteriores, un análisis de varianza para cada uno de los factores. El primero de los factores analizados fue el tipo de inductor empleado, dicho análisis mostró una diferencia altamente significativa ( $p \leq 0.000000$ ). La prueba de rangos múltiples de Tukey arrojó que existieron diferencias significativas entre los diferentes compuestos empleados. Existió diferencia del control

con el cobre ( $p \leq 0.000176$ ), etanol ( $p \leq 0.000130$ ), manganeso ( $p \leq 0.000130$ ) y siringaldazina ( $p \leq 0.01264$ ). El cobre, además de presentar diferencias significativas con el control, lo fue con respecto a etanol ( $p \leq 0.000324$ ) y manganeso ( $p \leq 0.000148$ ); por otro lado, no presentó diferencias con la siringaldazina ( $p \geq 0.1792$ ). El manganeso, además de mostrar diferencias con el control y el cobre, las presentó con la siringaldazina ( $p \leq 0.000130$ ). Se formaron tres grupos de homogeneidad, el primero de ellos representado por el control, cobre y etanol; el segundo por el control, cobre y siringaldazina y el último grupo, conformado por el manganeso. La prueba de Dunnett arrojó que solo el manganeso fue diferente significativamente al control ( $p \leq 0.000009$ ). El resto de los inductores no mostró diferencia significativa con el control.

El segundo de los factores, la concentración no mostró efecto alguno sobre la actividad enzimática de MnP.

En base a estos resultados y a que el análisis de varianza multifactorial mostró un efecto significativo en los tratamientos, se realizó la comparación de rangos múltiples de Tukey. Dicho análisis mostró que el manganeso a 11 mg/L presentó diferencias significativas con el control ( $p \leq 0.000143$ ), cobre a 500 y 1000  $\mu\text{M}$ , etanol a 30 y 35 g/L ( $p \leq 0.000143$ ), manganeso 40 mg/L ( $p \leq 0.000224$ ), y siringaldazina 0.116 y 1.16  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000143$ ). El manganeso a 40 mg/L presentó diferencias significativas con el resto de los inductores ( $p \leq 0.000143$ ), así como con el manganeso a 11 mg/L ( $p \leq 0.000224$ ). El control presentó diferencias significativas con el manganeso a 11 y 40 mg/L ( $p \leq 0.000143$  para ambos); así como con la siringaldazina 0.116  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.02953$ ). La siringaldazina 0.116  $\mu\text{M}$  arrojó diferencias significativas con el control, así como con el etanol a 30 y 35 g/L ( $p \leq 0.004595$  y  $p \leq 0.00359$ ), y con el manganeso a 11 y 40 mg/L ( $p \leq 0.000143$ ). Se generaron cuatro grupos de homogeneidad, el primero de ellos agrupó al control, el cobre y etanol a ambas concentraciones y la siringaldazina 1.16  $\mu\text{M}$ ; el segundo grupo conformado por el cobre y la siringaldazina, los dos a ambas concentraciones; el tercero por el manganeso 40 mg/L y el cuarto, por el manganeso a 11 mg/L. Finalmente, la prueba de Dunnett, arrojó una diferencia del control con el manganeso a 11 mg/L ( $p \leq 0.000007$ ), manganeso 40 mg/L ( $p \leq 0.0000007$ ) y siringaldazina 0.116  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.00798$ ). El resto de los inductores no fueron significativamente diferentes al control (Tabla 7.15).



Tabla 7.15. Efecto de la adición de inductores en la actividad de MnP en RVAN2

<b>INDUCTOR</b>	<b>CONCENTRACION</b>	<b>PROMEDIO (U/L)<sup>1</sup></b>	<b>DUNNETT (p)</b>
CONTROL	-----	126.77±19.17(20) <sup>a</sup>	
COBRE	500 µM	176.67±82.39(20) <sup>a,b</sup>	0.9999
	1000 µM	310.3±205.16(20) <sup>a,b</sup>	0.8364
ETANOL	30 g/L	14.32±6.8(16) <sup>a</sup>	0.9859
	35 g/L	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.9719
MANGANESO	11 mg/L	3767.26±765.6(18) <sup>c</sup>	0.000007
	40 mg/L	2860.17±185.95(18) <sup>d</sup>	0.000007
SIRINGALDAZINA	0.116µM	712.99±319.45(20) <sup>b</sup>	0.0079
	1.16 µM	221.88±38.68(18) <sup>a,b</sup>	0.9950

<sup>1</sup> Promedio de tres ensayos independientes ± desviación estándar. ( ) Día máx. actividad

<sup>2</sup> Valores seguidos por letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes p≤0.05

Los resultados anteriores señalaron que el sulfato manganoso fue el mejor compuesto tanto para la LiP como para la MnP, no así para la Lacasa. En el caso de las dos primeras enzimas, los valores fueron superiores a lo dado por el control. Mientras que en el caso de la Lacasa se observó una pérdida del 66%, sin embargo el incremento en MnP fue de 22 a 29 veces la actividad con respecto al control.

El contenido de proteína fue muy similar en todos los cultivos adicionados con los diferentes inductores, sin embargo el etanol a una concentración de 30 g/L mostró un incremento gradual a partir del día ocho. El resto de los inductores dieron como resultado un contenido muy similar (Figura 7.39), aunque ello no fue correspondiente con la actividad enzimática la cual fue ligeramente menor a la presentada por el control.

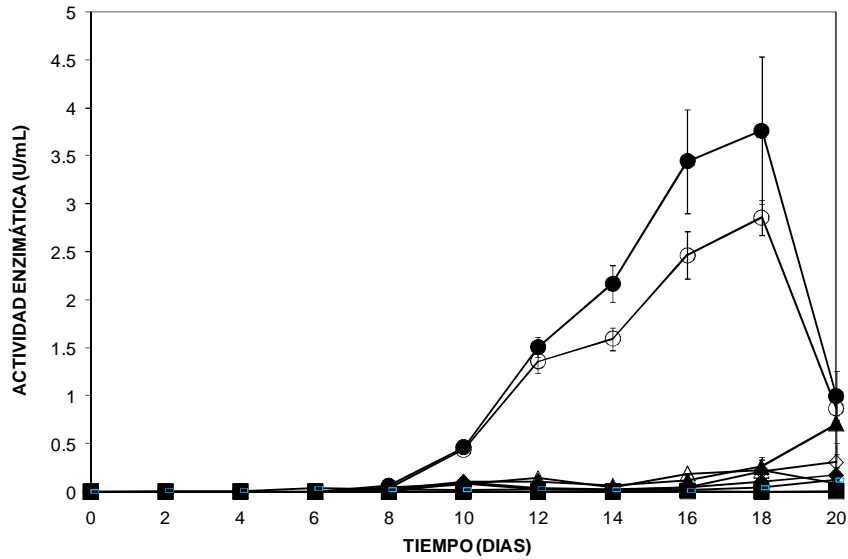


Figura 7.38.- Actividad Enzimática de MnP en el sobrenadante de RVAN2 en SMM, adicionado con diferentes compuestos. ◆, Cobre 500  $\mu\text{M}$ ; ◇, Cobre 1000  $\mu\text{M}$ ; ●, Manganeso 11 mg/L; ○, Manganeso 40 mg/L; ▲, Siringaldazina 0.116  $\mu\text{M}$ ; △, Siringaldazina, 1.16  $\mu\text{M}$ ; ■, Etanol 30 g/L; □, Etanol 35 g/L; ---, Control. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

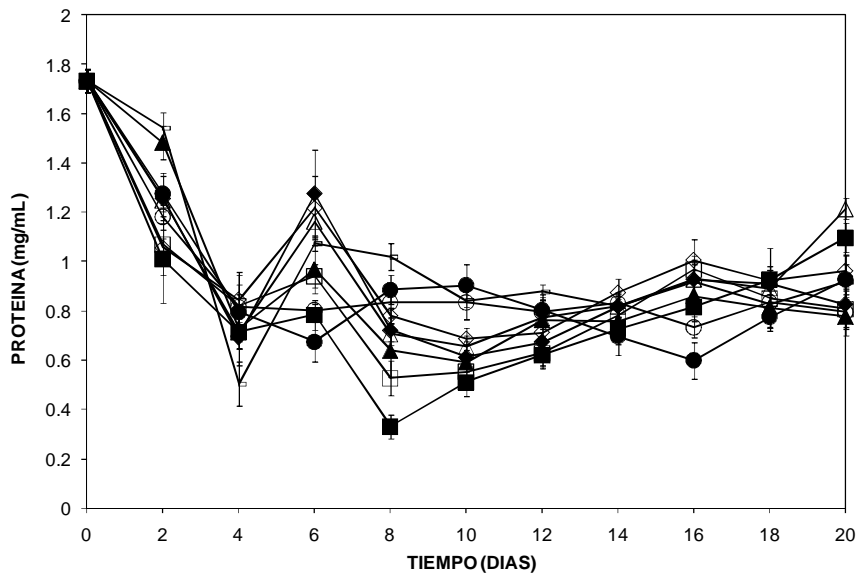


Figura 7.39.- Contenido de Proteína (mg/mL) de RVAN2 en SMM, adicionado con diferentes compuestos. ◆, Cobre 500  $\mu\text{M}$ ; ◇, Cobre 1000  $\mu\text{M}$ ; ●, Manganeso 11 mg/L; ○, Manganeso 40 mg/L; ▲, Siringaldazina 0.116  $\mu\text{M}$ ; △, Siringaldazina, 1.16  $\mu\text{M}$ ; ■, Etanol 30 g/L; □, Etanol 35 g/L; ---, Control. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

Por el contrario, con respecto a la actividad específica si se observaron diferencias en los resultados obtenidos, en los cuales en el control se obtuvo 3.5 U/mg de proteína, mientras que el sulfato de cobre, etanol y siringaldazina los valores fueron de 5.3 y 4.9, 5.09 y 4.1, y 5.3 y 4.8 U/mg de proteína, respectivamente, a ambas concentraciones probadas para cada inductor; fue el manganeso el que presentó una menor actividad específica, 2.2 y 2.23 U/mg de proteína, a 11 y 40 mg/L, respectivamente (Figura 7.40).

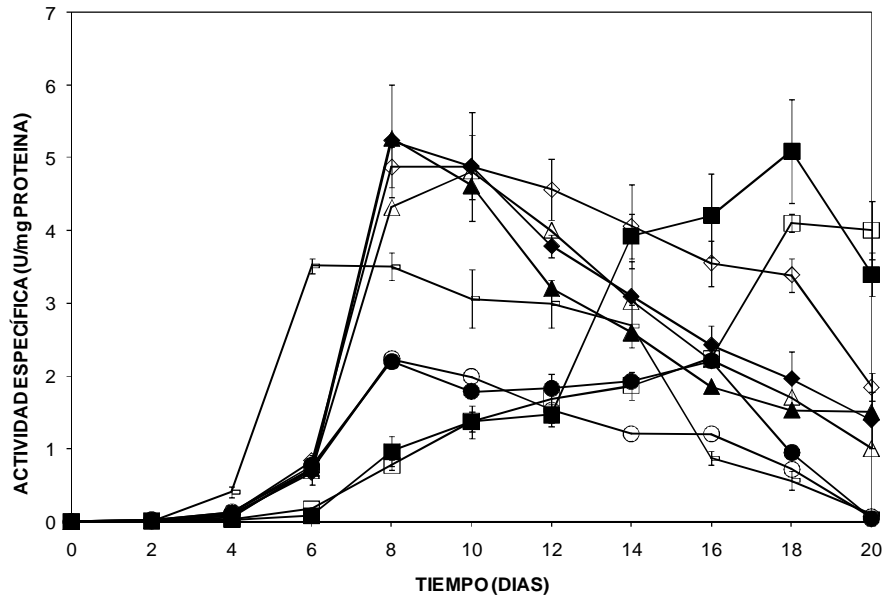


Figura 7.40.- Actividad Específica de Lacasa en el sobrenadante de RVAN2 en SMM, adicionado con diferentes compuestos. ◆, Cobre 500 µM; ◇, Cobre 1000 µM; ●, Manganeseo 11 mg/L; ○, Manganeseo 40 mg/L; ▲, Siringaldazina 0.116 µM; △, Siringaldazina, 1.16 µM; ■, Etanol 30 g/L; □, Etanol 35 g/L; ---, Control. Los símbolos representan el promedio ± la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

Los resultados indicaron que los inductores favorecieron de forma muy diferente al hongo en cuestión. Lo mismo sucedió con la producción de proteína, se observó una respuesta variable en función del compuesto adicionado al medio y a la concentración. Presentando un efecto negativo el sulfato manganeso a ambas concentraciones, 11 y 40 mg/L. Mientras que el sulfato de cobre 500 µM y siringaldazina 0.116 µM fueron los inductores que favorecieron en mayor proporción la producción de Lacasa (actividad específica). En este parámetro no fue aplicado un análisis de varianza.

#### 7.4.2.2.2.- RVAN12

Caso contrario, a RVAN12 los inductores favorecieron considerablemente la producción de Lacasa de esta cepa. El sulfato de cobre a ambas concentraciones dieron como resultado una actividad de 43,869.9 (3.2 veces) y 63,372.56 U/L (4.72 veces), a 500 y 1000  $\mu\text{M}$ , respectivamente, con respecto al control, esto es el medio de cultivo sin la adición de inductores y/o potenciadores. Sin embargo, es de notar que el día de máxima actividad se retardo, puesto que en el control se alcanzó al día 12, mientras que en el medio adicionado con ambas concentraciones de sulfato cúprico, se llegaron al 14 y 16. Las actividades anteriores fueron seguidas por el sulfato manganoso a 11 y 40 mg/L, cuyos máximos valores fueron de 25,607.8 y 27,324.5 U/L, respectivamente (día 16, a ambas concentraciones). Aquellas que afectaron de forma negativa la producción de Lacasa fueron las dos concentraciones de etanol (30 y 35 g/L) (Figura 7.41).

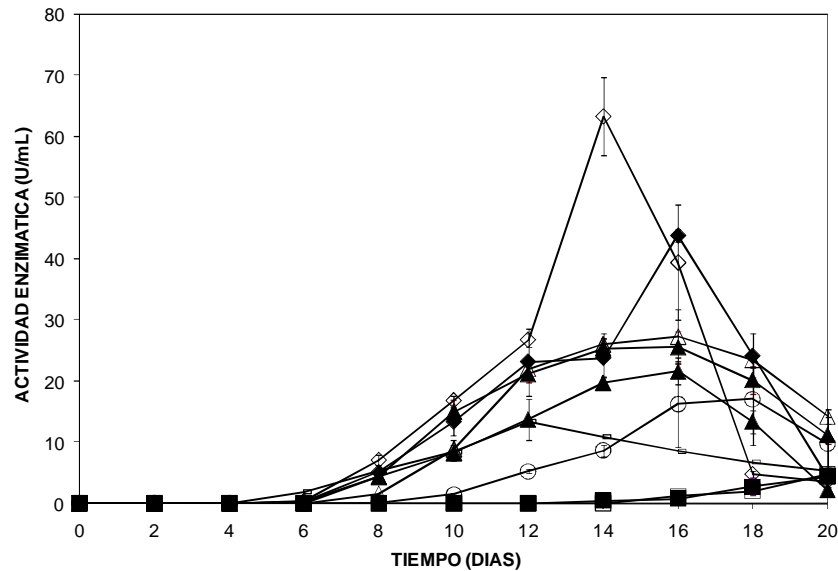


Figura 7.41.- Actividad Enzimática de Lacasa en el sobrenadante de RVAN12 en SMM, adicionado con diferentes compuestos.  $\blacklozenge$ , Cobre 500  $\mu\text{M}$ ;  $\diamond$ , Cobre 1000  $\mu\text{M}$ ;  $\bullet$ , Manganeso 11 mg/L;  $\circ$ , Manganeso 40 mg/L;  $\blacktriangle$ , Siringaldazina 0.116  $\mu\text{M}$ ;  $\triangle$ , Siringaldazina, 1.16  $\mu\text{M}$ ;  $\blacksquare$ , Etanol 30 g/L;  $\square$ , Etanol 35 g/L; ---, Control. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

El análisis multifactorial arrojó que existe una diferencia altamente significativa ( $p \leq 0.00000$ ). En base a esto, se llevó a cabo un análisis de varianza por separado para cada uno de los factores. El tipo de inductor presentó un efecto altamente significativo en la actividad de Lacasa ( $p \leq 0.00000$ ). La comparación de rangos múltiples de Tukey determinó que existieron diferencias significativas entre el control y el cobre

( $p \leq 0.000124$ ), el control y el manganeso ( $p \leq 0.000644$ ). El cobre presentó diferencias significativas, además del control, con el etanol ( $p \leq 0.000124$ ), el manganeso ( $p \leq 0.000124$ ) y la siringaldazina ( $p \leq 0.000124$ ). El etanol no presentó diferencias con el control ( $p \geq 0.05739$ ); fue estadísticamente diferente al cobre ( $p \leq 0.000124$ ), manganeso ( $p \leq 0.000124$ ) y siringaldazina ( $p \leq 0.000141$ ). El manganeso presentó diferencias significativas con el control ( $p \leq 0.000644$ ), con el cobre ( $p \leq 0.000124$ ), etanol ( $p \leq 0.000124$ ) y la siringaldazina ( $p \leq 0.0409$ ). Finalmente, la siringaldazina presentó diferencias significativas con el cobre ( $p \leq 0.000124$ ) y etanol ( $p \leq 0.000141$ ), no fue estadísticamente diferente al control ( $p \geq 0.2461$ ). Se formaron cuatro grupos de homogeneidad, el primero representado por el control y el etanol, el segundo por el control y la siringaldazina, el tercero por el manganeso y el último, por el cobre. La prueba de Dunnett determinó que a excepción de la siringaldazina ( $p \geq 0.1223$ ), el resto de los inductores presentaron diferencias significativas con el control, cobre ( $p \leq 0.000009$ ), etanol ( $p \leq 0.02495$ ) y manganeso ( $p \leq 0.000222$ ). La concentración no presentó efecto significativo en la actividad enzimática de Lacasa ( $p \geq 0.2182$ ).

El análisis multifactorial determinó que existieron diferencias altamente significativas ( $p \leq 0.00000$ ). La comparación de rangos múltiples arrojó la existencia de diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. El control presentó diferencias significativas con el cobre a 500  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000138$ ), cobre a 1000  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000138$ ), etanol a 30 g/L ( $p \leq 0.02214$ ), etanol a 35 g/L ( $p \leq 0.03428$ ), manganeso 11 mg/L ( $p \leq 0.000214$ ), manganeso 40 mg/L ( $p \leq 0.000145$ ) y siringaldazina 0.116  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.01521$ ). El cobre a 500  $\mu\text{M}$  presentó diferencias significativas además del control, con el cobre a 1000  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000139$ ), etanol, manganeso y siringaldazina, todos a ambas concentraciones ( $p \leq 0.000138$ ). El cobre a 1000  $\mu\text{M}$  mostró diferencias significativas además del control y el cobre a 500  $\mu\text{M}$ , con el etanol, manganeso y siringaldazina a ambas concentraciones ( $p \leq 0.000138$ ). El etanol a 30 g/L mostró diferencias significativas con el control ( $p \leq 0.02214$ ), cobre a ambas concentraciones ( $p \leq 0.000138$ ), manganeso y siringaldazina, a ambas concentraciones ( $p \leq 0.000138$ ), no se detectaron diferencias significativas con el etanol a 35 g/L ( $p \geq 1.00000$ ). El etanol 35 g/L fue diferente estadísticamente al control ( $p \leq 0.03428$ ), cobre a ambas concentraciones ( $p \leq 0.000138$ ), manganeso a 11 y 40 mg/L ( $p \leq 0.000138$ ), siringaldazina 0.116  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000139$ ) y siringaldazina 1.16  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000599$ ). El manganeso 11 mg/L presentó diferencias altamente significativas con el control, sulfato de cobre, etanol (los dos a ambas concentraciones) y diferencias significativas con la siringaldazina 1.16  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000214$ ,

$p \leq 0.000138$ ,  $p \leq 0.000138$ ,  $p \leq 0.000138$ ,  $p \leq 0.000138$ ,  $p \leq 0.01295$ , respectivamente); por otro lado, no presento diferencias significativas con el manganeso 40 mg/L y siringaldazina 0.116  $\mu\text{M}$  ( $p \geq 0.9985$  y  $p \geq 0.7105$ , respectivamente). El manganeso 40 mg/L, presentó diferencias significativas con el control, cobre, etanol (ambos a las dos concentraciones) y siringaldazina 1.16  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000145$ ,  $p \leq 0.000139$ ,  $p \leq 0.000138$ ,  $p \leq 0.000138$ ,  $p \leq 0.000138$  y  $p \leq 0.001913$ , respectivamente). La siringaldazina 0.116  $\mu\text{M}$ , presentó diferencias significativas con el control, el cobre a ambas concentraciones y etanol 30 y 35 g/L ( $p \leq 0.01512$ ,  $p \leq 0.000138$ ,  $p \leq 0.000138$ ,  $p \leq 0.000139$ ,  $p \leq 0.000139$ ); no hubo diferencias significativas con el manganeso a 11 y 40 mg/L y con siringaldazina 1.16  $\mu\text{M}$  ( $p \geq 0.7105$ ,  $p \geq 0.2878$  y  $p \geq 0.5083$ , respectivamente). Finalmente, la siringaldazina 1.16  $\mu\text{M}$  no presento diferencias significativas con el control ( $p \geq 0.7468$ ) y con la siringaldazina 0.116. 6 $\mu\text{M}$  ( $p \geq 0.5083$ ); mostró diferencias con el cobre ( $p \leq 0.000138$ , para ambas concentraciones), etanol ( $p \leq 0.000408$ ,  $p \leq 0.000599$ , a 30 y 35 g/L, respectivamente) y manganeso ( $p \leq 0.01295$  y  $p \leq 0.001913$ , para cada concentración). En base a estos resultados se formaron seis grupos de homogeneidad. Por otro lado, mediante la prueba de Dunnett se determinó que los tratamientos del cobre, etanol y manganeso (todos a ambas concentraciones), presentaron diferencias significativas con respecto al control, no así la siringaldazina 1.16  $\mu\text{M}$  (Tabla 7.16).

Tabla 7.16. Efecto de la adición de inductores en la actividad de Lacasa en RVAN12 en SMM

<b>INDUCTOR</b>	<b>CONCENTRACION</b>	<b>PROMEDIO (U/L)<sup>1</sup></b>	<b>DUNNETT (p)</b>
CONTROL	-----	13398.63±548.5(12) <sup>b</sup>	
COBRE	500 $\mu\text{M}$	43869.9±987.1(16) <sup>e</sup>	0.000008
	1000 $\mu\text{M}$	63372.6±6330(14) <sup>f</sup>	0.000008
ETANOL	30 g/L	4443.6±586.7(20) <sup>a</sup>	0.006172
	35 g/L	4869.3±1120(20) <sup>a</sup>	0.00984
MANGANESO	11 mg/L	26607.8±2635(16) <sup>d</sup>	0.000029
	40 mg/L	27153.02±3604(16) <sup>d</sup>	0.000010
SIRINGALDAZINA	0.116 $\mu\text{M}$	21726±2266(16) <sup>c,d</sup>	0.004148
	1.16 $\mu\text{M}$	17145.9±7602(18) <sup>b,c</sup>	0.440965

<sup>1</sup> Promedio de tres ensayos independientes  $\pm$  desviación estándar. ( ) Día máx. actividad

<sup>2</sup> Valores seguidos por letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes  $p \leq 0.05$

La producción de LiP mostró un comportamiento muy similar a la Lacasa, en la cual se vio favorecida por la mayoría de los inductores probados. Tanto el cobre a 500 como a 1000  $\mu\text{M}$  favorecieron considerablemente la producción, dando como resultado una actividad de 5353.3 y 5842.9 U/L, respectivamente. Por el contrario, el control solamente produjo una actividad de 466 U/L. Al igual que en el caso de la Lacasa, el día de máxima actividad para el total de los inductores mostraron un retraso, que fue del día 14 al día 20. El sulfato manganoso y la siringaldazina a ambas concentraciones dieron una actividad de 1797.7 (siringaldazina 1.16  $\mu\text{M}$ ) a 3446.52 U/L (sulfato manganoso 40 mg/L). El etanol fue el compuesto que menos favoreció la actividad, aunque a diferencia de la Lacasa el efecto si fue positivo (Figura 7.42).

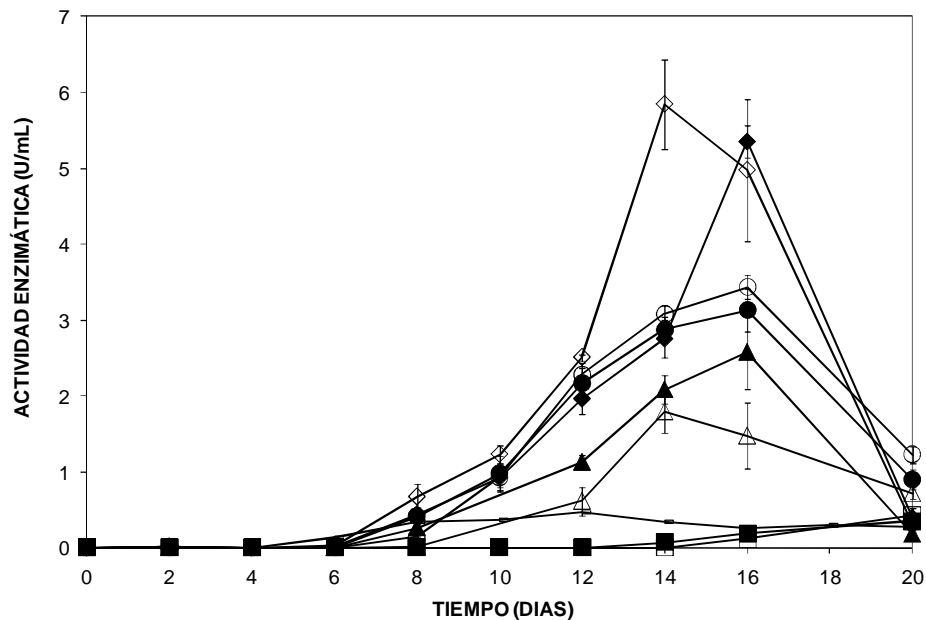


Figura 7.42.- Actividad Enzimática de LiP en el sobrenadante de RVAN12 en SMM, adicionado con diferentes compuestos. ◆, Cobre 500  $\mu\text{M}$ ; ◇, Cobre 1000  $\mu\text{M}$ ; ●, Manganeso 11 mg/L; ○, Manganeso 40 mg/L; ▲, Siringaldazina 0.116  $\mu\text{M}$ ; △, Siringaldazina, 1.16  $\mu\text{M}$ ; ■, Etanol 30 g/L; □, Etanol 35 g/L; ---, Control. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

Con respecto a la actividad de LiP, el análisis de varianza multifactorial arrojó que los factores influyen de forma significativa sobre cada una de las variables de respuesta ( $p \leq 0.000000$ ). En base a esto, se llevó a cabo un análisis de varianza por separada para cada uno de los factores sobre la actividad enzimática. En el primero de los factores, tipo de inductor, el análisis de varianza mostró que existen diferencias altamente

significativas entre los tratamientos ( $p \leq 0.00000$ ). La prueba de rangos múltiples de Tukey determinó la existencia de diferencias significativas del control con respecto al cobre ( $p \leq 0.000124$ ), manganeso ( $p \leq 0.000124$ ) y siringaldazina ( $p \leq 0.000124$ ). El cobre, además de presentar diferencias altamente significativas con respecto al control, fue diferente al etanol ( $p \leq 0.000124$ ), manganeso ( $p \leq 0.000124$ ) y siringaldazina ( $p \leq 0.000124$ ). El etanol presentó diferencias altamente significativas con el cobre ( $p \leq 0.000124$ ), manganeso ( $p \leq 0.000124$ ) y siringaldazina ( $p \leq 0.000124$ ), mas no con respecto al control ( $p \leq 0.9994$ ). El manganeso presentó diferencias altamente significativas con el control ( $p \leq 0.00124$ ), cobre ( $p \leq 0.000124$ ), etanol ( $p \leq 0.000124$ ) y siringaldazina ( $p \leq 0.0452$ ). Finalmente, la siringaldazina presentó diferencias altamente significativas con el control ( $p \leq 0.000124$ ), cobre ( $p \leq 0.000124$ ), etanol ( $p \leq 0.000124$ ) y diferencias significativas con el manganeso ( $p \leq 0.0452$ ). Se formaron cuatro grupos de homogeneidad, el primero representado por el control y el etanol, el segundo por la siringaldazina, el tercero por el manganeso y el último, por el cobre. Finalmente, la prueba de Dunnett, determinó que el cobre, el manganeso y la siringaldazina presentaron diferencias significativas con el control ( $p \leq 0.000009$ ), mientras que el etanol no fue diferente significativamente al control ( $p \geq 0.9972$ ).

En cuanto al análisis de varianza para evaluar el efecto de la concentración, independientemente del inductor sobre la actividad enzimática de LiP, se determinó que existen diferencias significativas ( $p \leq 0.008104$ ). La prueba de rangos múltiples de Tukey arrojó que ambas concentraciones fueron diferentes con respecto al control (medio sin adición de inductores ( $p \leq 0.0067$  y  $p \leq 0.0169$ , respectivamente), mientras que entre la concentración uno y la dos, no se observaron diferencias significativas ( $p \geq 0.8643$ ).

Cómo se mencionó previamente, el análisis multifactorial mostró un efecto altamente significativo de los factores sobre las variables de respuesta (tratamientos), ( $p \leq 0.00000$ ). La comparación de rangos múltiples arrojó la existencia de diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. El control presentó diferencias significativas con el cobre a 500  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000138$ ) y 1000  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000138$ ); manganeso a 11 mg/L ( $p \leq 0.000138$ ) y 40 mg/L ( $p \leq 0.000138$ ); siringaldazina a 0.116  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000138$ ) y 1.16  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000302$ ); no presentó diferencias significativas con el etanol a 30 g/L ( $p \geq 0.9999$ ) y 35 g/L ( $p \geq 1.0000$ ). El cobre 500  $\mu\text{M}$  presentó diferencias altamente significativas con el control, etanol, manganeso y siringaldazina, todos a las dos concentraciones ensayadas ( $p \leq 0.000138$  para todos), mientras que no presentó diferencias significativas con el cobre a 1000  $\mu\text{M}$  ( $p \geq 0.8719$ ). El etanol 30 g/L no mostró



diferencias significativas con el control ( $p \geq 0.9999$ ) ni con el etanol a 35 g/L ( $p \geq 1.0000$ ); por otro lado, se observaron diferencias altamente significativas con respecto al cobre ( $p \leq 0.000138$ , para las dos concentraciones), manganeso ( $p \leq 0.000138$ , a ambas concentraciones) y siringaldazina ( $p \leq 0.000138$  y  $p \leq 0.000452$ , a 0.116  $\mu\text{M}$  y 1.16  $\mu\text{M}$ , respectivamente). El etanol 35 g/L mostró diferencias significativas con el cobre, manganeso ( $p \leq 0.000138$ ), a ambas concentraciones; con la siringaldazina 0.116  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000138$ ) y siringaldazina 1.16  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000781$ ). El manganeso 11 mg/L arrojó diferencias significativas en la actividad de LiP tanto para el control, cobre, etanol, todos a ambas concentraciones ( $p \leq 0.000138$ ), así como para siringaldazina 1.16  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000526$ ); no se detectaron diferencias significativas con el manganeso 40 mg/L y siringaldazina 0.116  $\mu\text{M}$  ( $p \geq 1.0000$ ). El manganeso 40 mg/L mostro diferencias significativas con el control, cobre, etanol, todos a ambas concentraciones ( $p \leq 0.000138$ ) y con siringaldazina 1.16  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000853$ ); no mostró diferencias significativas con el manganeso 11 mg/L y con la siringaldazina 0.116  $\mu\text{M}$  ( $p \geq 1.0000$ ). La siringaldazina 0.116  $\mu\text{M}$ , mostró diferencias altamente significativas con el control, el cobre y etanol, estos últimos a ambas concentraciones ( $p \leq 0.000138$ ), de igual forma presentó diferencias con respecto a siringaldazina 1.16  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000934$ ). Por último, la siringaldazina 1.16  $\mu\text{M}$  presento difrencias significativas con el control ( $p \leq 0.000302$ ), cobre a ambas concentraciones ( $p \leq 0.000138$ ), etanol 30 y 35 g/L ( $p \leq 0.000452$  y  $p \leq 0.000452$ , respectivamente), manganeso 11 y 40 mg/L ( $p \leq 0.000526$  y  $p \leq 0.000835$ , respectivamente) y con siringaldazina 0.116  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000934$ ).

En base a estos resultados se formaron cuatro grupos de homogeneidad. Por otro lado, mediante la prueba de Dunnett se determinó que los tratamientos del cobre 500 y 1000  $\mu\text{M}$ , manganeso 11 y 40 mg/L, así como siringaldazina 0.116 y 1.16  $\mu\text{M}$  presentaron diferencias altamente significativas con respecto al control (Tabla 7.17).

Finalmente, la actividad de la MnP se vio favorecida en menor proporción y solamente por algunos compuestos, tales como el sulfato de cobre a 1000  $\mu\text{M}$  y el sulfato manganeso a 11 y 40 mg/L, con 73, 123 y 208 U/L, respectivamente, mientras el control solamente alcanzó 64 U/L. Tanto para el medio sin adición de inductor, como para el cobre y el manganeso a 11 mg/L, el día de máxima actividad no varió, no así en el caso del manganeso a 40 mg/L, quien alcanzó su máximo valor al día 14 (Figura 7.43).

Tabla 7.17. Efecto de la adición de inductores en la actividad de LiP en RVAN12 en SMM

INDUCTOR	CONCENTRACION	PROMEDIO (U/L) <sup>1</sup>	DUNNETT (p)
CONTROL	-----	466.04±56.57(12) <sup>a</sup>	
COBRE	500 µM	5353.3±206.09(16) <sup>d</sup>	0.000008
	1000 µM	5842.9±590.64(14) <sup>d</sup>	0.000008
ETANOL	30 g/L	364.7±70.25(20) <sup>a</sup>	0.9999
	35 g/L	430.4±96.7(20) <sup>a</sup>	1.0000
MANGANESO	11 mg/L	3133.9±276.7(16) <sup>c</sup>	0.000008
	40 mg/L	3083.7±109.5(14) <sup>c</sup>	0.000008
SIRINGALDAZINA	0.116 µM	3074.5±857(16) <sup>c</sup>	0.000008
	1.16 µM	1835.8±645.8(14) <sup>b</sup>	0.000051

<sup>1</sup> Promedio de tres ensayos independientes ± desviación estándar. ( ) Día máx. actividad

<sup>2</sup> Valores seguidos por letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes p≤0.05

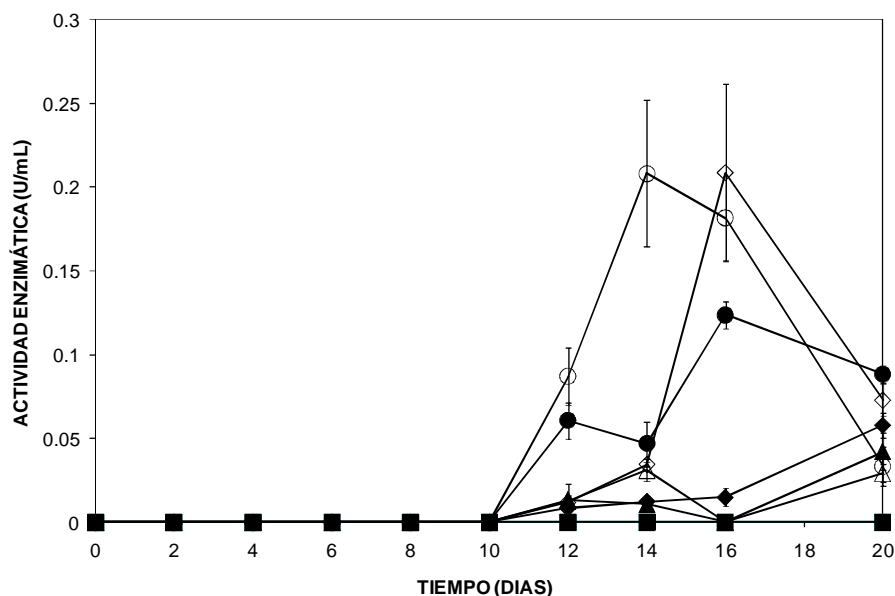


Figura 7.43.- Actividad Enzimática de MnP en el sobrenadante de RVAN12 en SMM, adicionado con diferentes compuestos. ◆, Cobre 500 µM; ◇, Cobre 1000 µM; ●, Manganese 11 mg/L; ○, Manganese 40 mg/L; ▲, Siringaldazina 0.116 µM; △, Siringaldazina, 1.16 µM; ■, Etanol 30 g/L; □, Etanol 35 g/L; ---, Control. Los símbolos representan el promedio ± la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

En cuanto a la actividad de MnP, el análisis de varianza multifactorial mostró que existe un efecto altamente significativo en las variables de respuesta ( $p \leq 0.000002$ ). Por otro lado, el análisis de varianza de una sola vía, arrojó un efecto altamente significativo del tipo de inductor sobre la actividad enzimática ( $p \leq 0.000005$ ). La prueba de rangos múltiples de Tukey, determinó que existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, de los cuales destaca:

El control no mostró diferencias significativas con ninguno de los inductores probados, cobre ( $p \geq 0.1177$ ), etanol ( $p \geq 0.1370$ ), manganeso ( $p \geq 0.06453$ ) y siringaldazina ( $p \geq 0.9646$ ). El cobre presentó diferencias con el etanol ( $p \leq 0.000176$ ) y la siringaldazina ( $p \leq 0.006538$ ), no así para el control y el manganeso ( $p \geq 0.9999$ ). El manganeso presentó diferencias con respecto al etanol ( $p \leq 0.000134$ ) y siringaldazina ( $p \leq 0.001515$ ). Finalmente, la siringaldazina presentó diferencias con el cobre ( $p \leq 0.006538$ ) y siringaldazina ( $p \leq 0.001515$ ). Se generaron dos grupos de homogeneidad, el primero conformado por el control, el etanol y la siringaldazina; el segundo por el control, cobre y manganeso. La prueba de Dunnett arrojó que solo el manganeso presentó diferencias significativas ( $p \leq 0.02825$ ).

Al considerar la interacción de los factores (inductor-concentración), se obtuvieron resultados interesantes. La comparación de rangos múltiples arrojó diferencias significativas del control con el cobre a  $1000 \mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000140$ ) y el manganeso  $40 \text{ mg/L}$  ( $p \leq 0.000208$ ); resultados similares a lo presentado por el cobre a  $500 \mu\text{M}$ , incluso con el mismo nivel de significancia. El cobre  $1000 \mu\text{M}$ , además de las diferencias significativas con el control y cobre  $500 \mu\text{M}$ , presentó diferencias con el etanol  $30$  y  $35 \text{ g/L}$ , con el mismo valor de significancia ( $p \leq 0.000138$ ); con el manganeso  $11 \text{ mg/L}$  ( $p \leq 0.000411$ ) y siringaldazina  $0.116 \mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000140$ ) y siringaldazina  $1.16 \mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000138$ ).

El etanol  $30 \text{ g/L}$ , presentó diferencias significativas con el cobre  $1000 \mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000138$ ) y manganeso  $11 \text{ mg/L}$  ( $p \leq 0.000142$ ) y manganeso  $40 \text{ mg/L}$  ( $p \leq 0.000138$ ); con el resto de inductores y sus respectivas concentraciones no hubo diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ). El etanol  $35 \text{ g/L}$  presentó diferencias significativas con el cobre  $1000 \mu\text{M}$  y el manganeso a  $11 \text{ mg/L}$  ( $p \leq 0.00142$ ) y manganeso  $40 \text{ mg/L}$  ( $p \leq 0.000138$ ); con el resto no hubo diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ). El manganeso  $11 \text{ mg/L}$ , presentó diferencias significativas con el cobre  $1000 \mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000411$ ); con el etanol a  $30$  y  $35 \text{ g/L}$ , presentó el mismo nivel de significancia ( $p \leq 0.00142$ ) y con el manganeso a  $40 \text{ g/L}$  ( $p \leq 0.0138$ ), con el resto de los inductores no se observaron diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ). Con el manganeso  $40 \text{ mg/L}$ , se observaron diferencias significativas con el

control ( $p \leq 0.000208$ ), el cobre 500  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000288$ ); etanol 30 y 35 g/L, con el mismo nivel de significancia ( $p \leq 0.000138$ ), manganeso 11 mg/L ( $p \leq 0.0138$ ) y siringaldazina 0.116  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000225$ ) y 1.16  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000138$ ). Por otro lado, la siringaldazina presentó diferencias significativas con el cobre a 1000  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000140$ ) y con el manganeso 40 mg/L ( $p \leq 0.000225$ ), el resto de los inductores y sus respectivas concentraciones no presentaron diferencias significativas. Finalmente, la siringaldazina 1.16  $\mu\text{M}$ , presentó diferencias significativas con el cobre 1000  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000138$ ), manganeso 11 mg/L ( $p \leq 0.0264$ ) y siringaldazina 1.16  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0.000138$ ).

En base a estos resultados se formaron tres grupos de homogeneidad y mediante la prueba de Dunnett, se determinó que los tratamientos del cobre 1000  $\mu\text{M}$ , etanol a 30 y 35 g/L y manganeso 40 mg/L, diferencias significativas con respecto al control (Tabla 7.18).

Tabla 7.18. Efecto de la adición de inductores en la actividad de MnP en RVAN12

INDUCTOR	CONCENTRACION	PROMEDIO (U/L) <sup>1</sup>	DUNNETT (p)
CONTROL	-----	65.69±10.77(16) <sup>a,b</sup>	
COBRE	500 $\mu\text{M}$	58.1±7.43(20) <sup>a,b</sup>	0.9999
	1000 $\mu\text{M}$	208.7±53.23(16) <sup>c</sup>	0.000008
ETANOL	30 g/L	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.026046
	35 g/L	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.026046
MANGANESO	11 mg/L	99.03±16.99(16) <sup>b</sup>	0.409073
	40 mg/L	171.7±66.14(14) <sup>c</sup>	0.000028
SIRINGALDAZINA	0.116 $\mu\text{M}$	66.94±39.6(16) <sup>a,b</sup>	1.00000
	1.16 $\mu\text{M}$	31.14±6.49(14) <sup>a</sup>	0.370756

<sup>1</sup> Promedio de tres ensayos independientes  $\pm$  desviación estándar. ( ) Día máx. actividad

<sup>2</sup> Valores seguidos por letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes  $p \leq 0.05$

El contenido de proteína fue muy similar a los obtenidos con la cepa anterior, esto en cuanto al comportamiento. En el control, por el contrario, fue más constante en su contenido. Casi todos los inductores mostraron una tendencia similar, siendo el etanol a ambas concentraciones (30 y 35 g/L), los que disminuyeron considerablemente su contenido llegando a casi 0.2 mg/mL de proteína al día 14, para posteriormente mostrar un incremento gradual en el contenido, terminando en alrededor de 1 mg/mL (Figura 7.44).

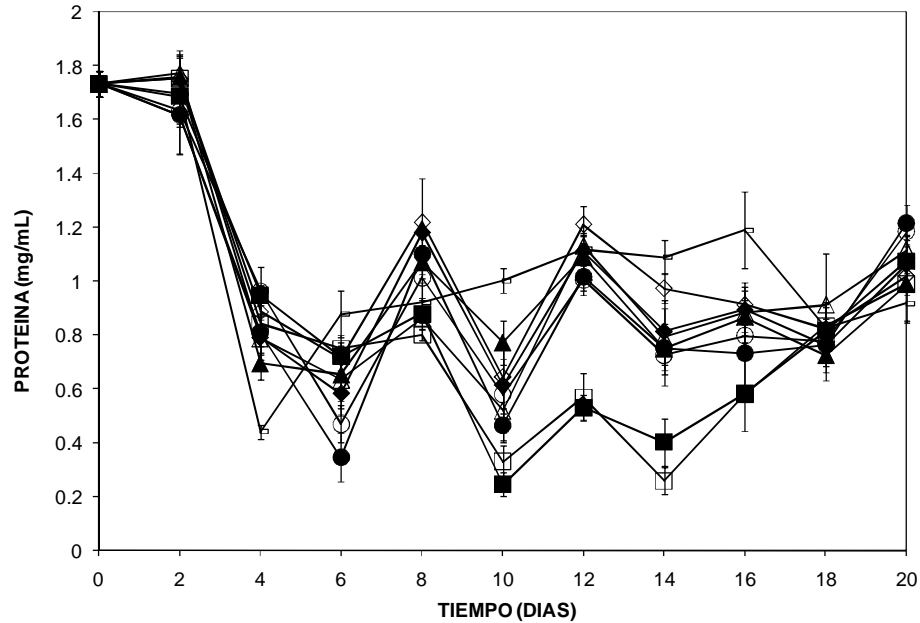


Figura 7.44.- Contenido de Proteína (mg/mL) de RVAN12 en SMM, adicionado con diferentes compuestos. ◆, Cobre 500  $\mu$ M; ◇, Cobre 1000  $\mu$ M; ●, Manganeso 11 mg/L; ○, Manganeso 40 mg/L; ▲, Siringaldazina 0.116  $\mu$ M; △, Siringaldazina, 1.16  $\mu$ M; ■, Etanol 30 g/L; □, Etanol 35 g/L; ---, Control. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

Al ser la actividad específica dependiente de la cantidad de proteína, los resultados variaron ligeramente en el caso del control, ya que este mostró su máximo valor al día 18, mientras que la actividad (unidades arbitrarias), fue al 12, siendo el máximo valor de 17 U/mg de proteína. Por otro lado, en el caso del cobre, así como en la mayoría de los inductores, el comportamiento fue muy similar al obtenido en la actividad en unidades arbitrarias, ya que nuevamente el máximo valor se encontró para el cobre a 500  $\mu$ M, siendo este de 59.6 U/mg de proteína, seguido del cobre 1000  $\mu$ M con 49.2 U/mg de proteína. El resto de los inductores, manganeso y siringaldazina, estuvieron alrededor de 33.7 y 21 U/mg de proteína (11 mg/l y 1.16  $\mu$ M, respectivamente) (Figura 7.45).

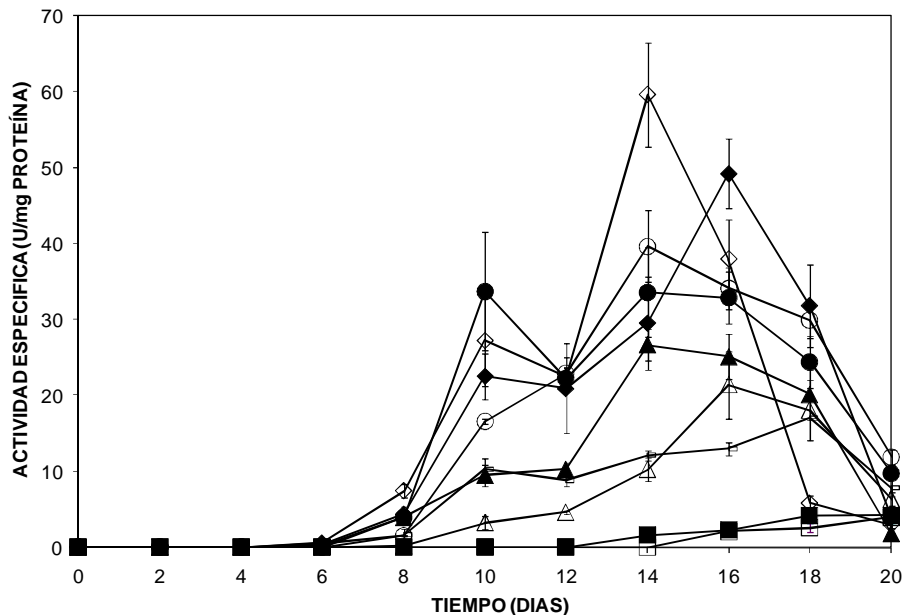


Figura 7.45.- Actividad Específica de Lacasa en el sobrenadante de RVAN12 en SMM, adicionado con diferentes compuestos. ◆, Cobre 500  $\mu\text{M}$ ; ◇, Cobre 1000  $\mu\text{M}$ ; ●, Manganeso 11 mg/L; ○, Manganeso 40 mg/L; ▲, Siringaldazina 0.116  $\mu\text{M}$ ; △, Siringaldazina, 1.16  $\mu\text{M}$ ; ■, Etanol 30 g/L; □, Etanol 35 g/L; ---, Control. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

Los resultados anteriores indicaron que hubo un incremento considerable en las actividades de Lacasa, LiP y MnP en diversas proporciones. RVAN12 fue el hongo que mejor respondió a la presencia de algunos de los compuestos ensayados. Con respecto al medio GMM, si se observaron diferencias considerables en cuanto a la respuesta, ya que en este los inductores a la menor concentración fueron los que lograron un mayor incremento en la actividad, caso contrario al SMM, en el cual a mayor concentración mayor actividad. Así mismo, la actividad específica fue considerablemente mayor en el medio de harina de soya, aun a pesar de la gran cantidad de proteína presente en el medio de cultivo.

Diversos ensayos posteriores fueron hechos en uno y otro medio, dado el comportamiento observado en los inductores.

### 7.5.- DETERMINACIÓN DE pH y TEMPERATURA ÓPTIMA

Se determinó el pH óptimo de los extractos crudos de RVAN2 y RVAN12, así como el comportamiento frente a la temperatura. Los resultados fueron interesantes como se observará posteriormente.

### 7.5.1.- pH ÓPTIMO

#### 7.5.1.1.- Lacasa y LiP

El pH óptimo se determinó tanto en la actividad de Lacasa como de LiP, a partir de pH 2. En el caso de Lacasa, las dos cepas mostraron comportamientos muy diferentes. Los ensayos llegaron hasta pH 8. Se partió de una actividad enzimática de 3.7 y 2 U/mL de Lacasa para RVAN12 y RVAN2, respectivamente.

Como se observó, la actividad de Lacasa se incrementó considerablemente en ambos extractos a pH 2; a este valor de pH, se alcanzó el máximo de actividad, con 3.8 y 7.5 U/mL, tanto para RVAN2 como para RVAN12, respectivamente. La actividad se vio afectada a pH superiores al valor al cual fueron realizados los ensayos enzimáticos previamente descritos. Por otro lado, en cuanto a la LiP, a pH inferiores y superiores a 5 se observa una disminución en los valores, indicando que el mejor valor fue este (Figura 7.46).

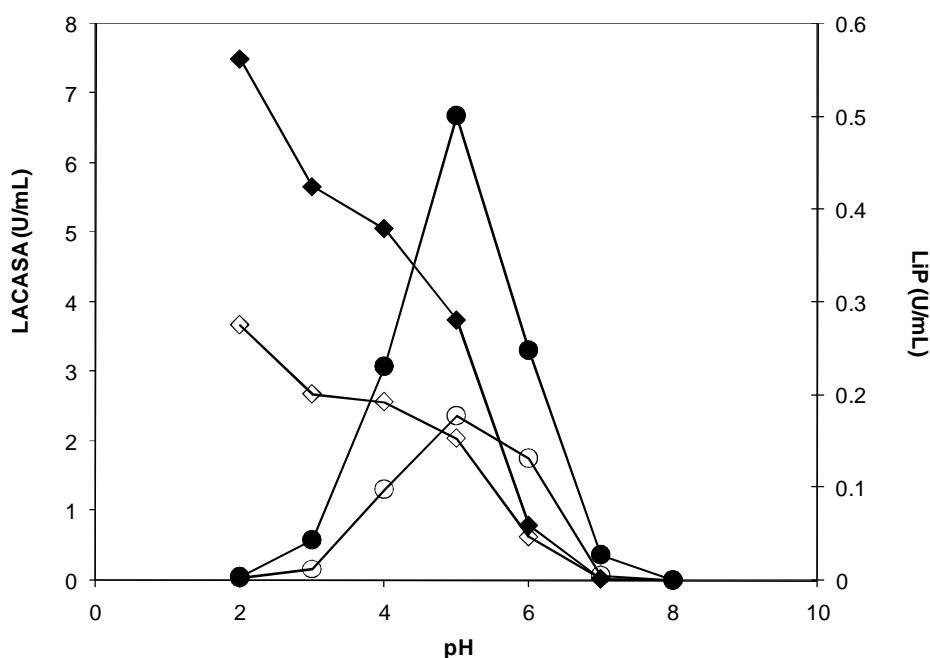


Figura 7.46.- Efecto del pH sobre la Actividad Enzimática de los Extractos Crudos de RVAN2 y RVAN12 en SMM. Extractos obtenidos al día de máxima actividad y ajustados a una concentración inicial de 3.7 y 2.0 U/mL. La desviación estándar fue menor al 5%. ◆, Lacasa RVAN2; ◇, Lacasa RVAN12; ●, LiP RVAN2; ○, LiP RVAN12. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

### 7.5.2.- ESTABILIDAD AL pH

Para evaluar la estabilidad de los extractos a diversos valores de pH, se hizo el ensayo tanto a una hora como a 24.

#### 7.5.2.1.- RVAN2

Para medir la estabilidad a estos extractos, al igual que en el caso anterior, se usaron diferentes buffer, dependiendo del rango a evaluar. Los resultados obtenidos muestran un comportamiento a 1 y 24 hasta el pH de 7, a partir de ahí, las actividades aumentaron o decrecieron. El máximo valor se alcanzó a pH 9, después de 1 hora de incubación, llegando arriba del 100 % de actividad remanente. Caso contrario sucedió a las 24 horas, en las cuales el máximo de actividad remanente fue a pH 8, aunque esta también estuvo arriba del 100% de actividad. A pH 10 aun se conservaban el 88 y 97.6% de la actividad, a 1 y 24 horas, respectivamente (Figura 7.47).

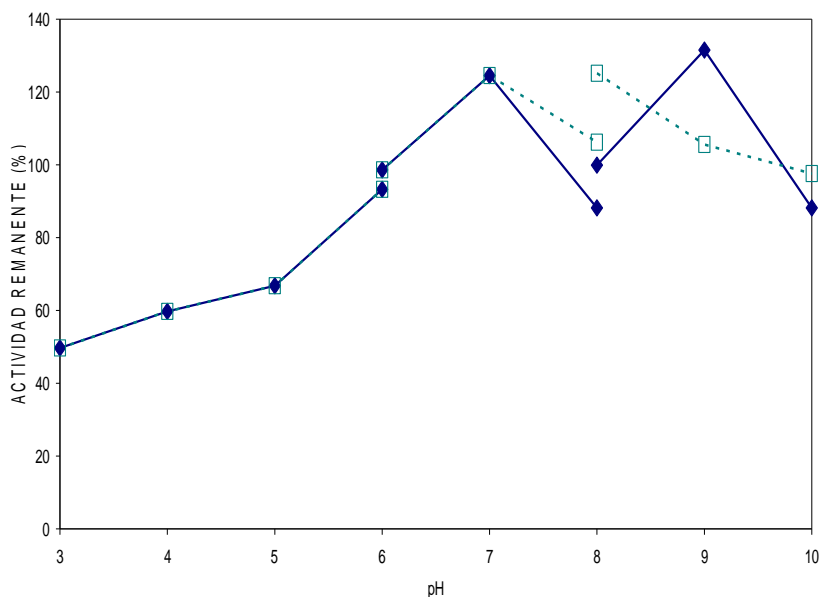


Figura 7.47.- Estabilidad de Lacasa al pH de los extractos de RVAN2. Los extractos fueron incubados por espacio de 1 y 24 h. Cultivos realizados en SMM, obtenidos al día de máxima actividad. La desviación estándar fue menor al 5%. —◆—, 1h de incubación; ---□---, 24 h de incubación. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

En cuanto a la actividad de la LiP, se observó que a pH 3, la actividad remanente fue solamente del 15%, incrementándose a partir de este pH hasta lograr el máximo a 7, con una actividad de 118 y 111 % tanto a 1 como 24 h de incubación, respectivamente.



Por otro lado, a pH 10 los extractos conservaron alrededor del 79% de actividad (Figura 7.48).

Con respecto a MnP, no fueron realizados los ensayos debido a la baja actividad enzimática que mostraron los extractos en el ensayo enzimático.

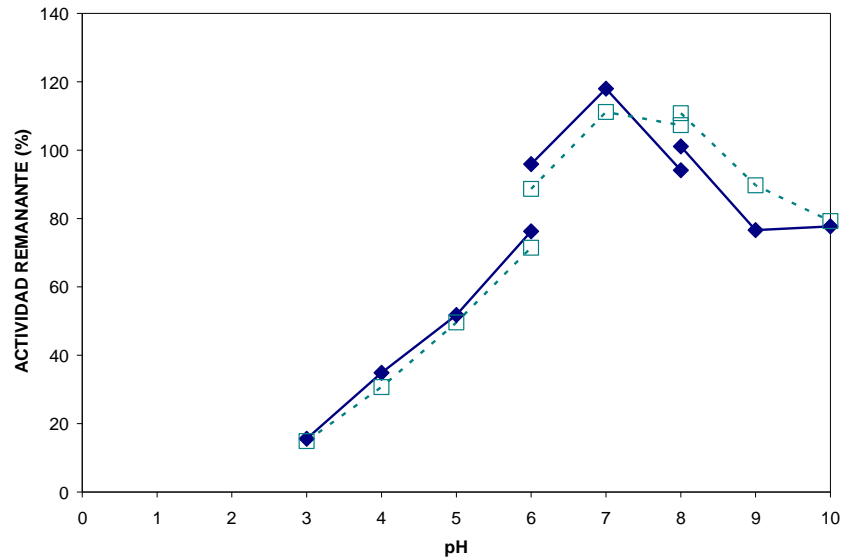


Figura 7.48.- Estabilidad de LiP al pH de los extractos de RVAN2. Los extractos fueron incubados por espacio de 1 y 24 h. Cultivos realizados en SMM, obtenidos al día de máxima actividad. La desviación estándar fue menor al 5%. —◆—, 1h de incubación; ---□---, 24 h de incubación. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

#### 7.5.2.2.- RVAN12

La actividad de Lacasa mostró ser más estable por espacio de 1 h; a pH 4 disminuyó la actividad, sin embargo a partir de este valor comenzó a incrementar hasta lograr el máximo a 8 con una actividad remanente superior al 100% (128%), quedó con un 87.6% a pH 10. Algo muy diferente sucedió después de ser incubado por 24 h, la máxima se alcanzó a pH 6 con el 120%; sin embargo a partir de este valor decreció considerablemente, siendo más evidente a pH 9, en el cual se conservaba alrededor del 10% de la actividad (Figura 7.49).

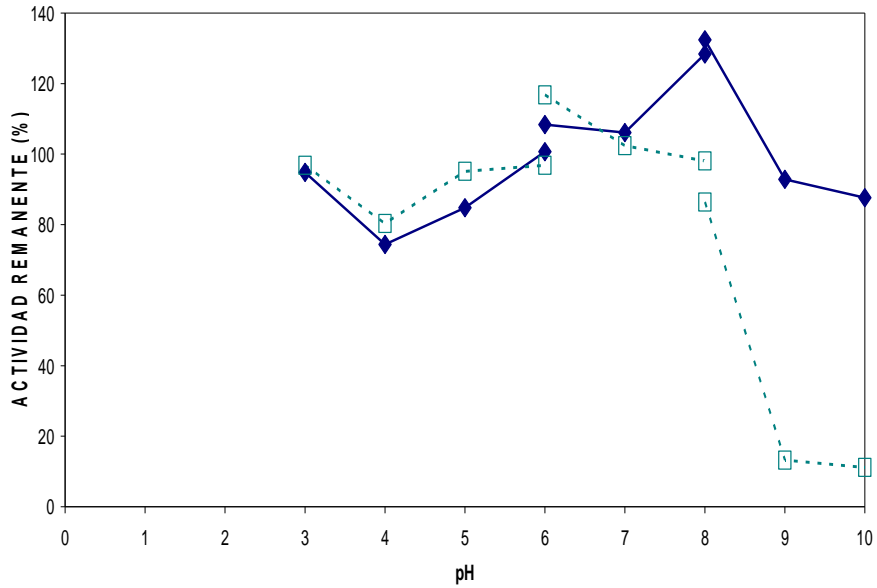


Figura 7.49.- Estabilidad de Lacasa al pH de extractos de RVAN12. Los extractos fueron incubados por espacio de 1 y 24 h. Cultivos realizados en SMM, obtenidos al día de máxima actividad. La desviación estándar fue menor al 5%. —◆—, 1h de incubación; - -□- - -, 24 h de incubación. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

Algo similar ocurrió en el caso de LiP, en la cual se observa como a pH 3 presenta alrededor del 32% de la actividad, sin embargo conforme se va incrementando el pH, la actividad también, llegando al máximo (100%) a pH 7, para posteriormente disminuir hasta llegar a un 76%. Por otro lado, cuando el extracto crudo fue incubado por 24 h, a partir de pH 4 se incremento el valor, hasta alcanzar el 96% de la actividad. Posteriormente, disminuyó a partir de pH 8 hasta llegar a un 10% de actividad remanente cuando se incubo a pH 10 (Figura 7.50).

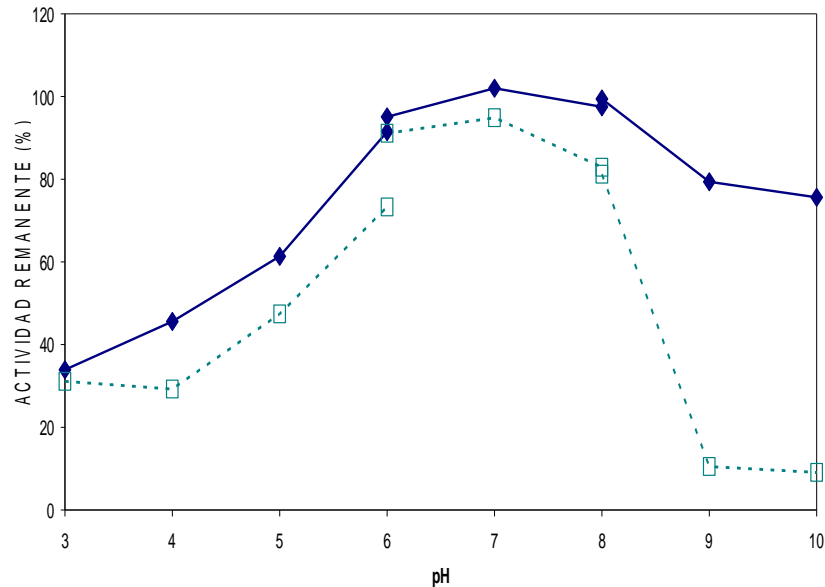


Figura 7.50.- Estabilidad de LiP al pH de los extractos de RVAN12. Cultivos realizados en SMM, obtenidos al día de máxima actividad. La desviación estándar fue menor al 5%. —◆—, 1h de incubación; ---□---, 24 h de incubación. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

### 7.5.3.- TEMPERATURA ÓPTIMA

#### 7.5.3.1.- RVAN2

Todos los ensayos previos fueron llevados a temperatura ambiente, alrededor de 25 °C, sin embargo con el fin de saber la respuesta de los extractos crudos a esta condición, estos fueron sometidos a diferentes temperaturas, en un rango de 20 a 80 °C, con incrementos de 5 °C.

Tanto la Lacasa como la LiP respondieron de forma muy similar, conforme se incrementaba la temperatura, la actividad aumentó, hasta alcanzar un óptimo a los 65 para posteriormente disminuir de forma gradual. Siendo más notorio en la LiP, en la cual a partir de 75 °C se vio un decremento importante (Figura 7.51).

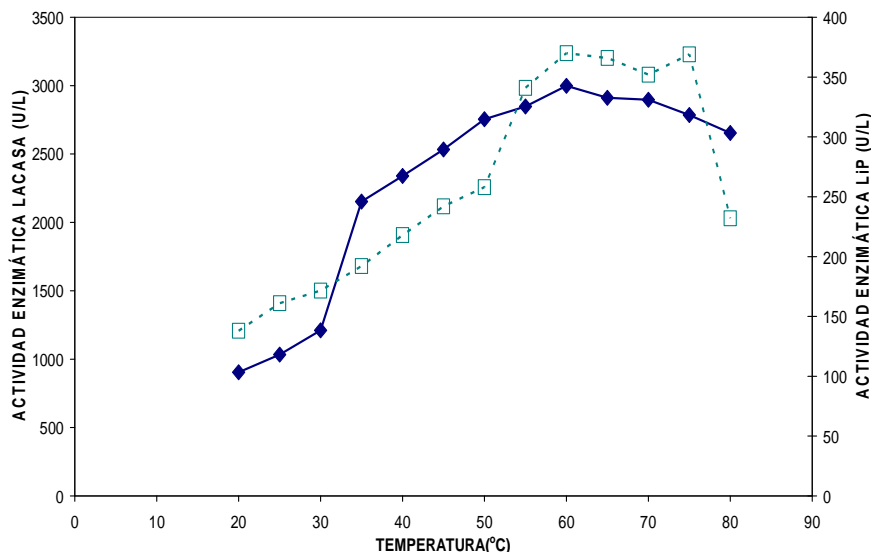


Figura 7.51.- Temperatura Óptima de los extractos de RVAN2. La actividad enzimática fue determinada al pH en el cual mostraron su óptimo valor. Cultivos realizados en SMM, obtenidos al día de máxima actividad. La desviación estándar fue menor al 5%. —◆—, Lacasa; ---□---, LiP. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

### 7.5.3.2.- RVAN12

En el caso de RVAN12, la actividad enzimática inicial fue ajustada a una concentración de 1 y 8.5 U/mL, para LiP y Lacasa, respectivamente. Se observó que la actividad de Lacasa decreció a 20 °C, sin embargo conforme se incrementó la temperatura la actividad también, llegó al máximo valor a los 70 °C con una actividad de 15.2 U/mL, a partir de esa temperatura, disminuyó. Sin embargo, siguió por arriba de la concentración inicial. En cuanto a LiP, esta presentó un comportamiento muy similar, conforme se incrementó la temperatura la actividad lo hizo gradualmente y alcanzó la máxima entre los 45-50 °C. A partir de ese momento, comenzó el declive, a pesar de ello la actividad fue superior al valor inicial (Figura 7.52).

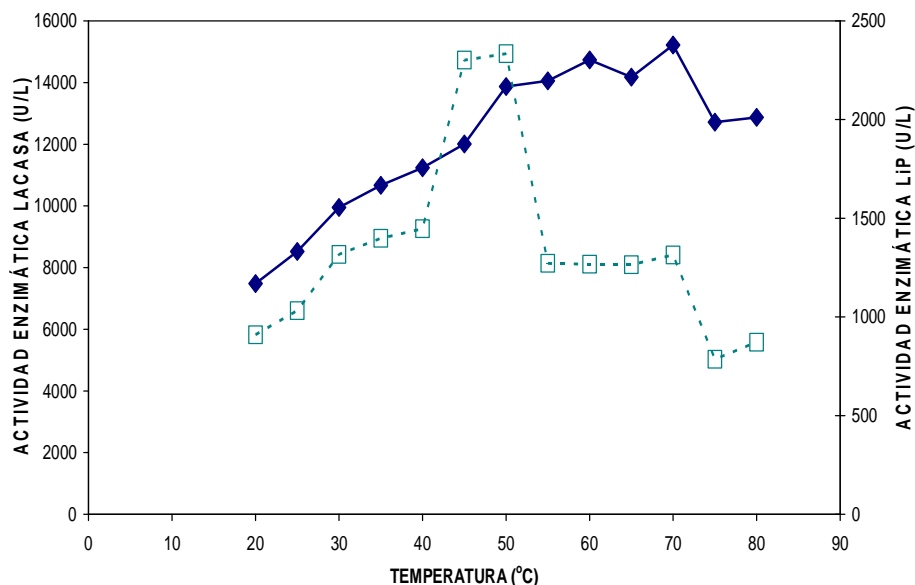


Figura 7.52.- Temperatura Óptima de los extractos de RVAN12. La actividad enzimática fue determinada al pH en el cual mostraron su óptimo valor. La desviación estándar fue menor al 5%. —◆—, Lacasa; ---□---, LiP. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

## 7.6.- ESTABILIDAD DE LOS EXTRACTOS CRUDOS

Se llevaron a cabo estudios de estabilidad de los extractos crudos, en los cuales se busco concentrarlos mediante el uso de una membrana de 10 kDa. Esto con la finalidad de ver su respuesta a condiciones tales como temperatura de 50 °C y pH 5. Los extractos probados fueron aquellos obtenidos con el medio de harina de soya. Se obtuvo la vida media de cada uno de ellos. Lo anterior se hizo utilizando la aplicación de Solver de Excel. Se aplicaron diversos modelos matemáticos para explicar el comportamiento de los datos obtenidos.

Los extractos crudos probados fueron aquellos obtenidos con y sin inductor, tanto concentrados como sin concentrar, para observar si la concentración afectaba el comportamiento y mostraba diferencias de uno con respecto al otro, así mismo, observar si el inductor en cuestión, sulfato de cobre, brindaba mayor estabilidad al extracto que aquel sin la adición de tal compuesto.

### 7.6.1.- RVAN2

#### 7.6.1.1.- Extractos crudos sin $\text{CuSO}_4$ 500 $\mu\text{M}$

Los resultados obtenidos fueron muy interesantes, ya que el extracto crudo de RVAN2 se concentró hasta obtener una actividad de Lacasa de 19 U/mL, mientras que el

extracto crudo sin concentrar mostró una actividad de 5.2 U/mL. A pesar de ello y como pudo observarse, fue más estable este último a las condiciones probadas. Se determinó que a las 2.5 h, el extracto concentrado había perdido el 50% de su actividad, conservando al final del ensayo solamente el 1% de dicha actividad inicial. Por otro lado, el extracto sin concentrar demostró una mayor estabilidad al pH y temperatura probada, el cual conservó el 50% de su actividad inicial a las 24 horas de comenzada la prueba (Figura 7.53). Los tiempos de vida media fueron de 2.75 y 32.2 h, para los extractos concentrados y sin concentrar, respectivamente.

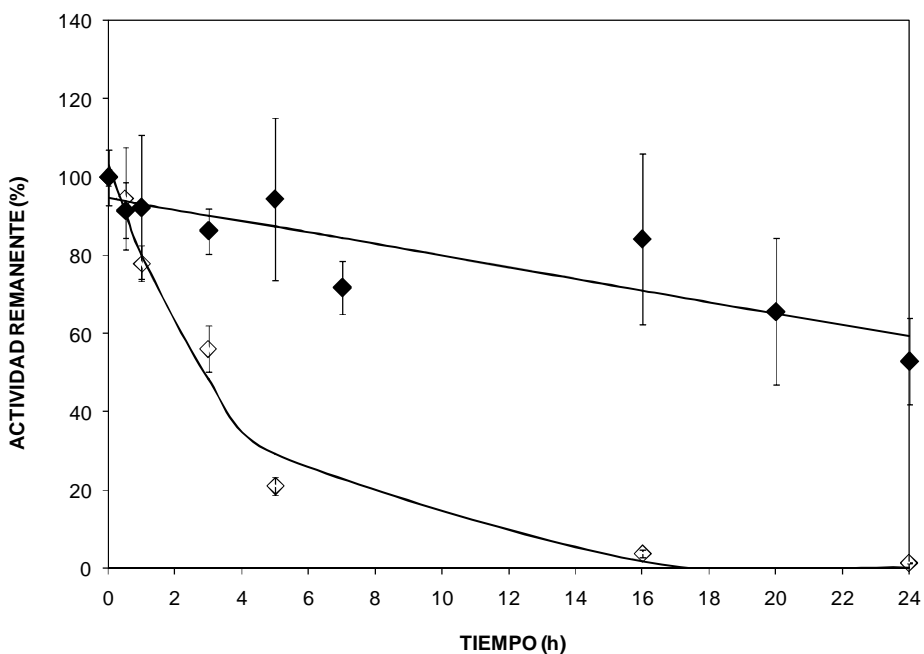


Figura 7.53.- Estabilidad y tiempo de vida media del extracto de RVAN2. ◆, Extracto concentrado; ◇, Extracto sin concentrar; —, Datos ajustados al modelo. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

#### 7.6.1.2.- Extractos crudos con $\text{CuSO}_4$ 500 $\mu\text{M}$

Como se observó en los resultados previos, la actividad de Lacasa se vio favorecida por la adición de cobre a la concentración mencionada, por tal razón, los ensayos de estabilidad se hicieron con los extractos crudos al día de máxima actividad de dichos cultivos. Con este tipo de extractos no fueron obtenidos resultados concluyentes.

En general, se determinó que existe una diferencia considerable en el comportamiento de los diferentes extractos. La finalidad del proceso de concentración fue

la de incrementar por un lado la actividad enzimática y por otro, disminuir la presencia de proteasas que pudieran estar presentes y como consecuencia de ello, afectar la estabilidad de los extractos.

## 7.6.2.- RVAN12

### 7.6.2.1.- Extractos crudos sin $\text{CuSO}_4$ 1000 $\mu\text{M}$

Los extractos provenientes de la cepa con mayor actividad (13.4 U/mL), se llevaron a una concentración final de 29 U/mL. A pesar de esto, mostraron una pérdida de actividad considerable a partir de las 12 h de incubación.

La disminución de la actividad fue muy similar en ambos extractos, a las 2.5 h y 6 h, en promedio, habían perdido el 50 % de su actividad, aunque fue más notorio en los extractos crudos sin concentrar (Figura 7.54). Por otro lado, los tiempos de vida media fueron de 2.5 y 5.9 h, al final del ensayo habían perdido más del 90% de la actividad inicial.

Estos extractos resultaron ser menos estables que el obtenido para el extracto sin concentrar de RVAN2, en el cual el tiempo de vida media fue de 32 h aproximadamente, mientras que el concentrado mostró un comportamiento similar a los obtenidos del cultivo de RVAN12.

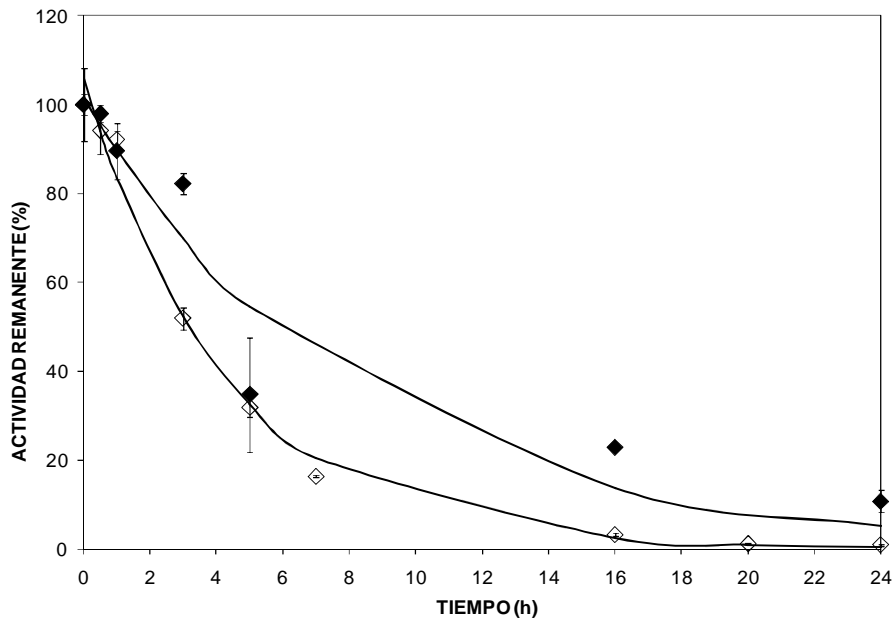


Figura 7.54.- Estabilidad y tiempo de vida media del extracto de RVAN12. ◆, Extracto concentrado; ◇, Extracto sin concentrar; —, Datos ajustados al modelo. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

### 7.6.2.2.- Extractos con $\text{CuSO}_4$ 1000 $\mu\text{M}$

Los extractos crudos concentrados y sin concentrar obtenidos de los cultivos adicionados con sulfato de cobre a 1000  $\mu\text{M}$ , mostraron un comportamiento muy similar a aquellos carentes de inductor. En ambos, las actividades decrecen rápidamente; al final del ensayo pierden más del 95% de su actividad inicial a pesar de que estos mostraron una actividad elevada durante los ensayos realizados en el medio de harina de soya (descrito previamente).

Los tiempos de vida media para cada uno de ellos fueron de 4.8 y 2.6 h, para el extracto sin concentrar y el concentrado, respectivamente (Figura 7.55).

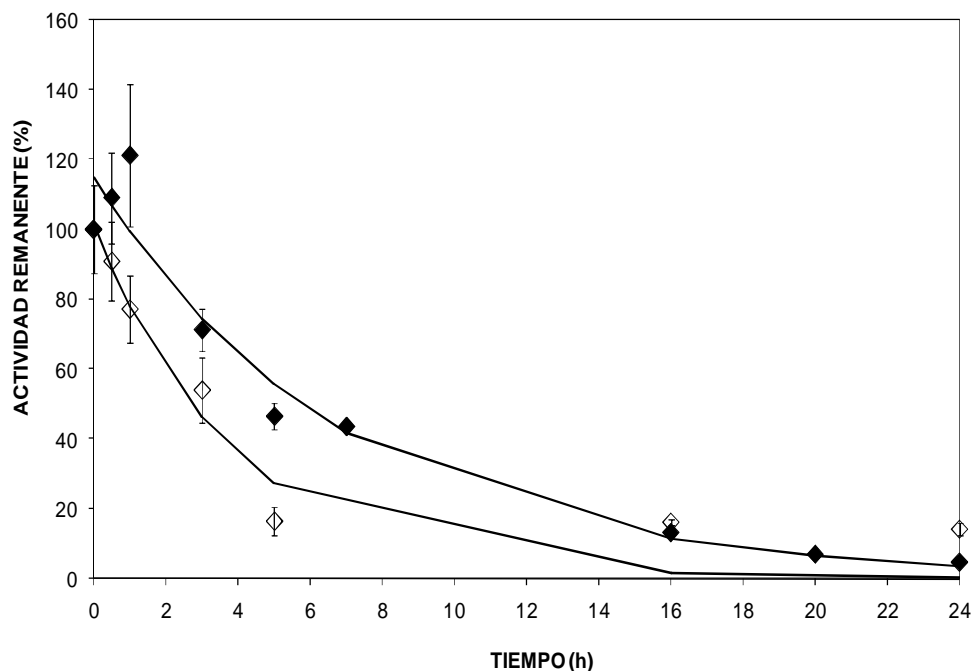


Figura 7.55.- Estabilidad y tiempo de vida media del extracto de RVAN12 adicionado de sulfato cúprico 1000  $\mu\text{M}$ . ◆, Extracto concentrado; ◇, Extracto sin concentrar; —, Datos ajustados al modelo. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

Estos resultados fueron interesantes, puesto que a pesar de mostrar una alta actividad enzimática de Lacasa, la misma no toleró las condiciones probadas de temperatura y pH, siendo más estables aquellos obtenidos de los cultivos de RVAN2.

Los resultados anteriores nos llevaron a implementar una serie de ensayos, por un lado los extractos crudos a diferentes valores de pH y temperatura, así como la inoculación de las cepas (RVAN2 y RVAN12), en un medio menos complejo como el GMM, con el fin de evaluar la capacidad que presentan para la biotransformación de



diversos compuestos. Sin embargo, previo a ello, fue necesario probar tal capacidad en medio sólido.

## 7.7.- COLORANTES

En total se evaluó en medio sólido tres colorantes, el cristal violeta (CV), el naranja de metilo (NM) y el Azul Reactivo de Remazol Brillante (RBBR). Todos ellos con características propias, que los ubican en diversas categorías, los cuales guardan en común la presencia de anillos aromáticos. Estos ensayos se llevaron a cabo en medio sólido, medio líquido para el caso del GMM y con extractos crudos obtenidos a partir de SMM. La concentración manejada de cada uno de ellos fue de 200 ppm, adicionada al medio de cultivo posterior a la esterilización.

### 7.7.1.- DEGRADACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

Los resultados obtenidos en medio sólido indicaron que las cepas nativas RVAN2 y RVAN12 fueron capaces de una total decoloración (Figura 7.56), incluso superior a los hongos utilizados como referencia (*Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium* y *Bjerkandera adusta*).

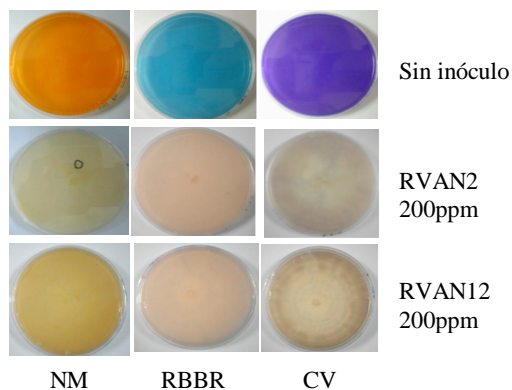


Figura 7.56.- Biotransformación de los diversos colorantes utilizados en el ensayo por las cepas RVAN2 y RVAN12.

El Naranja de Metilo fue transformado a los cinco días, seguido del RBBR a los nueve días y finalmente, el Cristal Violeta con una decoloración cercada al 90 %, a los 16 (Figura 7.57).

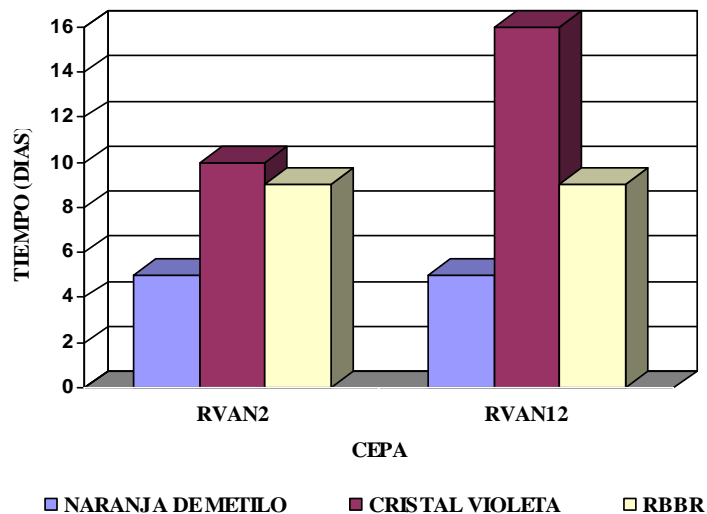


Figura 7.57.- Tiempo Máximo de Biotransformación por las dos cepas nativas, RVAN2 y RVAN12, en medio sólido.

### 7.7.2.- DECOLORACIÓN POR EXTRACTOS CRUDOS

Se realizaron diversos ensayos con los extractos crudos obtenidos a partir de los cultivos de RVAN2 y RVAN12 en SMM, al día de máxima actividad. Estos ensayos se llevaron a cabo a diferentes valores de pH, en un rango de 3-7; así como a 4 temperaturas diferentes: 30, 40, 50 y 60° C, con el fin de observar si existía algún efecto del mismo en el colorante.

#### 7.7.2.1.- RVAN2

El ensayo se llevo a cabo por 2 horas con el fin de determinar la cantidad de colorante remanente, debido a la acción del extracto crudo de RVAN2. En ausencia del extracto crudo, el pH y la temperatura no afectaron las propiedades físicas del colorante. Al ser añadido el extracto al colorante, tanto a pH de 4 y de 5 y una temperatura de 40 °C, se observó el mayor efecto, al ser transformado el 80 % del RBBR. Por otro lado, a 50 y 60 °C y pH 3, 6 y 7, se presentó la menor biotransformación (Figura 7.58).

#### 7.7.2.2.- RVAN12

El extracto crudo de RVAN12, a los pH's de 4 y 5, mostraron la mejor biotransformación cuando esta fue llevada a cabo a 30 y 40 °C. Por otro lado, a 50 y 60 °C, se observó una menor biotransformación de RBBR (Figura 7.59).

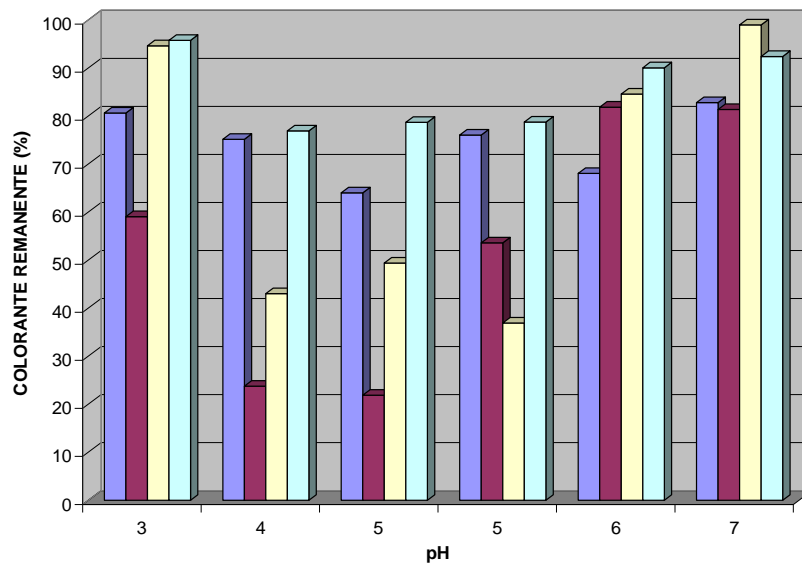


Figura 7.58.- Biotransformación de RBBR a diferentes valores de pH y Temperatura por el Extracto Crudo de RVAN2. ■, 30 °C; ■, 40 °C; ■, 50 °C; ■, 60 °C. Los ensayos representan el promedio de dos determinaciones. La desviación estándar es menor al 1%.

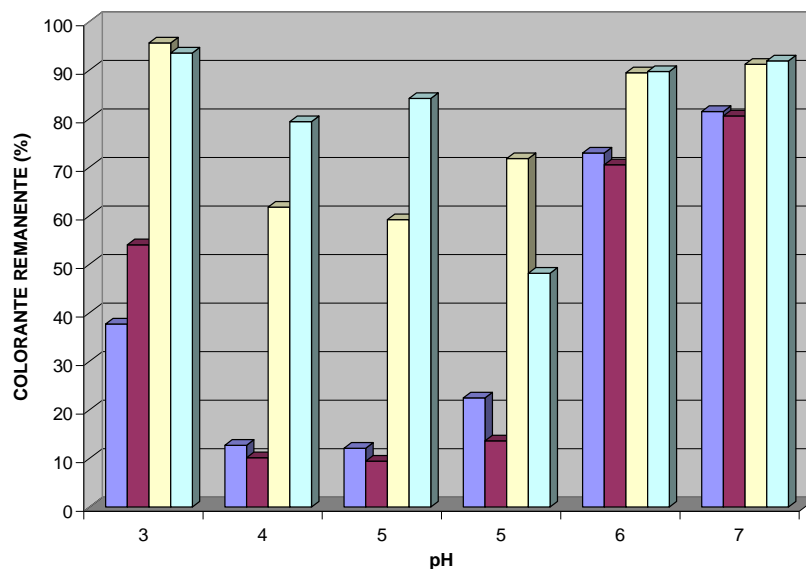


Figura 7.59.- Biotransformación de RBBR a diferentes valores de pH y Temperatura por el Extracto Crudo de RVAN12. ■, 30 °C; ■, 40 °C; ■, 50 °C; ■, 60 °C. Los ensayos representan el promedio de dos determinaciones. La desviación estándar es menor al 1%.

En general, la mejor biotransformación del colorante fue llevada a cabo por RVAN12 en un rango de pH de 4-5 tanto a 30 como a 40° C, con una transformación cercana al 90%. En el caso de RVAN2, solo a 40° C y pH de 3 y 4 se alcanzó una transformación del 80%.

### **7.7.3.- BIOTRANSFORMACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO**

En base a los resultados previamente descritos y con el fin de evaluar si un medio pobre como lo es GMM permitía una rápida decoloración, se estudio dicha capacidad en las cepas seleccionadas.

La concentración inicial del colorante fue de 33.36 mg (200 ppm). Se corrió en paralelo un control el cual presentaba la misma concentración pero sin inóculo con el fin de evaluar si existía un cambio ocasionado por factores abióticos.

RVAN2 fue capaz de decolorar más rápidamente que la cepa RVAN12, a pesar que la segunda dio una mayor actividad enzimática. Así mismo, los medios suplementados con cobre fueron ligeramente más rápidos en conseguir la decoloración, siendo más evidente en RVAN12. Al día 2, casi el 90% del colorante había sido transformado por RVAN2, mientras que la misma proporción fue alcanzada por RVAN12 hasta el día 4 y 6, con y sin cobre, respectivamente. El comportamiento anterior se obtuvo antes de alcanzar el día de máxima actividad, al menos en el caso de los medios suplementados con cobre (Figura 7.60).

Ambas cepas respondieron de forma diferente a las condiciones probadas, tanto de adición de colorante como de este último, más el sulfato de cobre. Sin embargo, a pesar de ser RVAN12 mejor productor de Lacasa, RVAN2 transformó de forma más eficiente el colorante estudiado (RBBR).

De forma conjunta, se determinó la actividad de Lacasa y poder definir si la presencia de colorante presentaba un efecto sobre dicha actividad. Así mismo, se determinó la cantidad de proteína en el medio y el consumo de la fuente de carbono (glucosa), en base a la técnica previamente descrita en material y métodos.

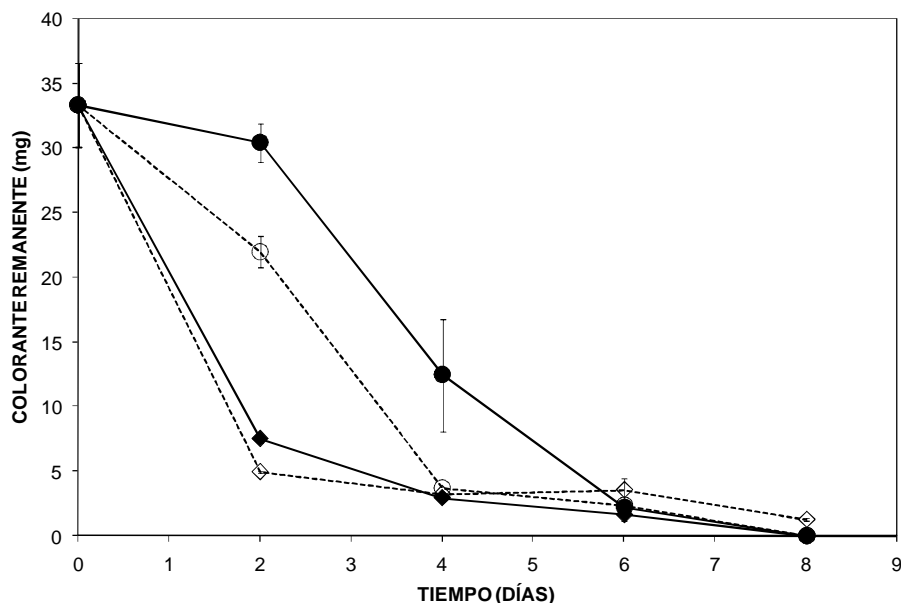


Figura 7.60.- Biotransformación del colorante RBBR por RVAN2 y RVAN12 en GMM. ♦, RVAN2 + RBBR 200 ppm; ◇; RVAN2 + Sulfato de cobre 500 µM + RBBR 200 ppm; ●, RVAN12 + RBBR 200 ppm; ○, RVAN12 + Sulfato de cobre 500 µM + RBBR 200 ppm. Los símbolos representan el promedio ± la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

### 7.7.3.1.- Aspectos Cinéticos de RVAN2

#### 7.7.3.1.1.- Lacasa

La concentración de colorante que se maneja fue de 200 ppm (especificado en material y métodos), lo que da una concentración final en 150 mL de medio de 30 mg. Al comparar el control con los medios adicionados de cobre y/o colorante, se pudo observar una enorme diferencia en cuanto a la producción de Lacasa; se obtuvo una actividad de 0.047 U/mL, mientras en el medio adicionado con colorante esta fue de 0.377 U/mL, seguido del cultivo más cobre con 2.94 U/mL. Finalmente, se obtuvo la mayor actividad en aquel adicionado con RBBR y cobre, con 4.79 U/mL (Figura 7.61).

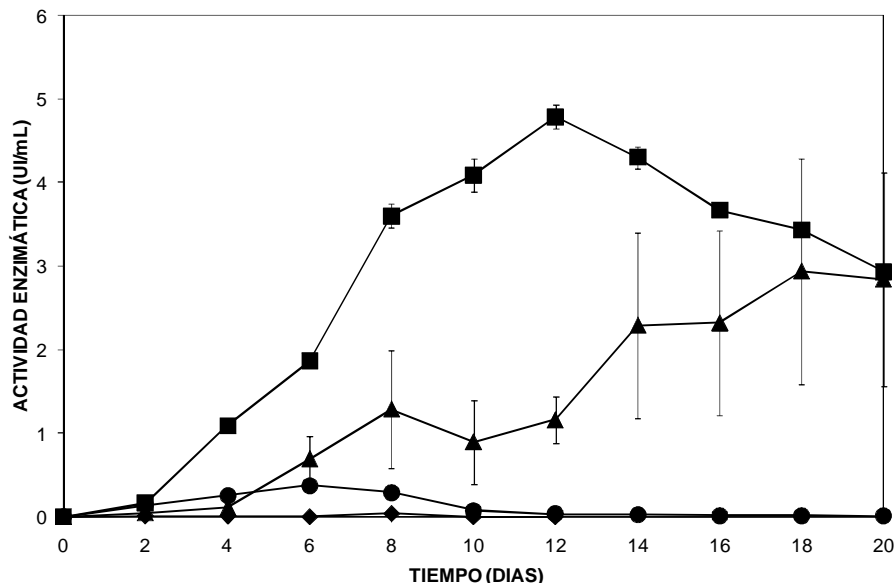


Figura 7.61.- Actividad Enzimática de Lacasa en el sobrenadante de RVAN2 en GMM, bajo diferentes condiciones de cultivo. ♦, Control; ▲, Sulfato de cobre 500 µM; ●, Colorante, RBBR 200 ppm; ■, Cobre 500 µM + RBBR 200 ppm. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

#### 7.7.3.1.2.- Consumo de la Fuente de Carbono

Por otro lado, el consumo de azúcares bajo las diferentes condiciones provocó respuestas muy diversas, aún para el mismo hongo. El consumo más rápido se presentó en el medio adicionado con cobre, siendo el día dos cuando se agotó alrededor del 90% de la fuente de carbono. Algo diferente a lo presentado por el control, el cual alcanzó tal consumo hasta el día ocho; mientras que en el medio con colorante esto se logró hasta el día seis. Finalmente, el medio adicionado de colorante y cobre, presentó el consumo de azúcares más lento, hasta el día 10 (Figura 7.62).

#### 7.7.3.1.3.- Proteína

El contenido de proteína observado en el control y en el medio adicionado con cobre, presentó algunas similitudes. Sin embargo, a partir del día 16, el contenido de la misma tuvo un decaimiento marcado en el control, mientras que el medio con cobre, fue un poco más constante. Por otro lado, la proteína presente en el medio con colorante fue un poco más constante a partir de alcanzar su máximo valor. Finalmente, el medio con sulfato y colorante, mostró un incremento gradual, el cual disminuyó a partir del día 14 hasta 0.025 mg/mL (Figura 7.63).

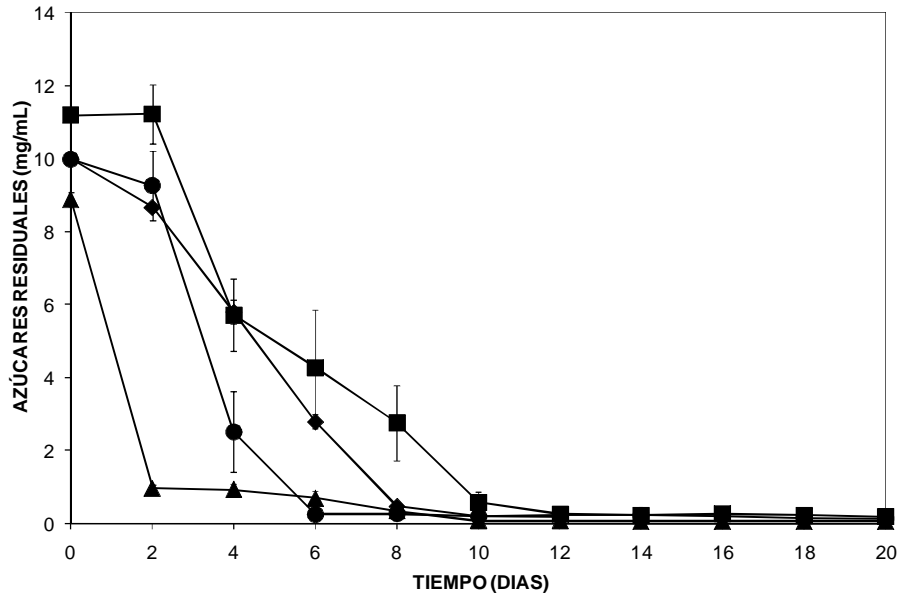


Figura 7.62.- Azúcares Residuales en el sobrenadante de RVAN2 en GMM, bajo diferentes condiciones de cultivo. ◆, Control; ▲, Sulfato de cobre 500  $\mu$ M; ●, Colorante, RBBR 200 ppm; ■, Cobre 500  $\mu$ M + RBBR 200 ppm. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

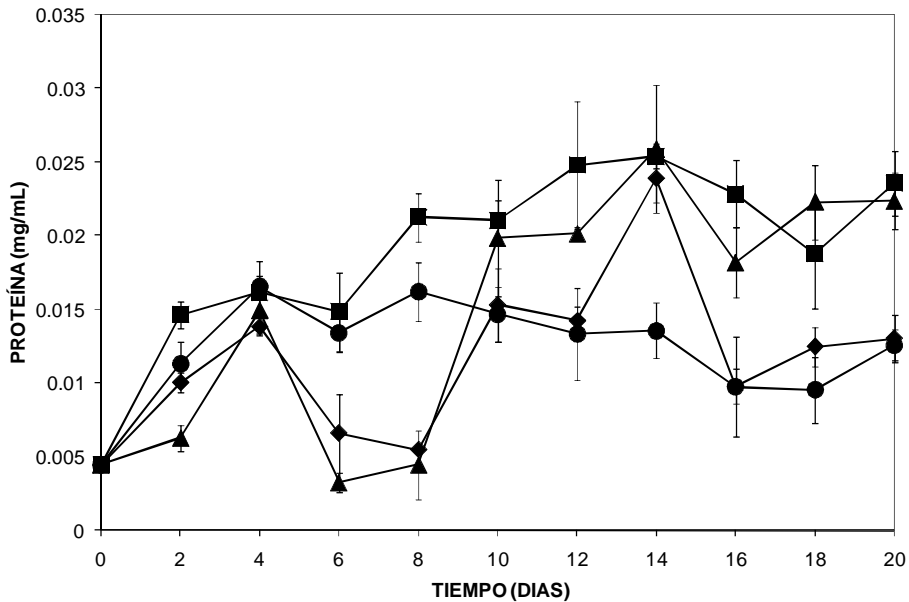


Figura 7.63.- Contenido de Proteína (mg/mL) en el sobrenadante de RVAN2 en GMM, bajo diferentes condiciones de cultivo. ◆, Control; ▲, Sulfato de cobre 500  $\mu$ M; ●, Colorante, RBBR 200 ppm; ■, Cobre 500  $\mu$ M + RBBR 200 ppm. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

#### 7.7.3.1.4.- Actividad Específica

En cuanto a la actividad específica fue más perceptible la diferencia mostrada en cada una de las diferentes condiciones manejadas. El control, medio sin adición de colorante y/o cobre, mostró una actividad específica de 8.6 U/mg de proteína, mientras el medio con cobre produjo 63 U/mg de proteína. Los medios adicionados con cobre y cobre mas colorante, fueron los que reportaron una mayor actividad específica, cada uno con 288 y 187.8 U/mg de proteína, respectivamente (Figura 7.64).

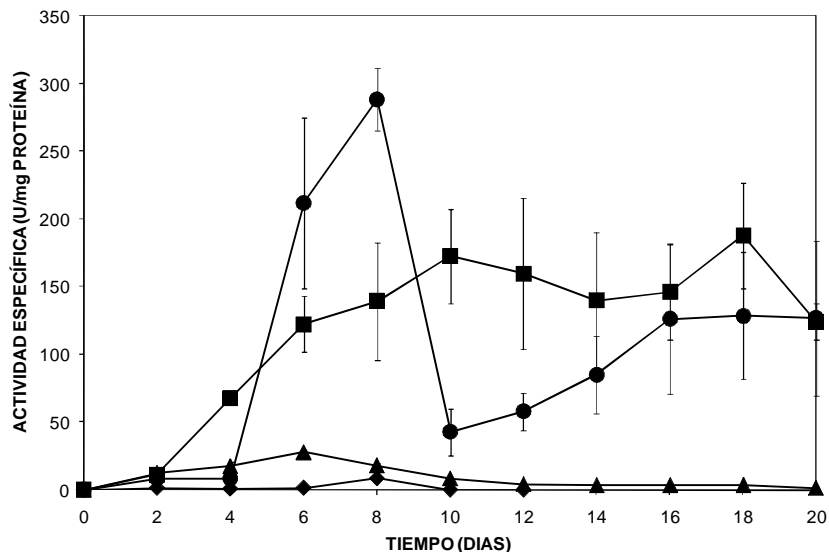


Figura 7.64.- Actividad Enzimática Específica en el sobrenadante de RVAN2 en GMM, bajo diferentes condiciones de cultivo. ◆, Control; ▲, Sulfato de cobre 500 μM; ●, Colorante, RBBR 200 ppm; ■, Cobre 500 μM + RBBR 200 ppm. Los símbolos representan el promedio ± la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

#### 7.7.3.2.- Aspectos Cinéticos de RVAN12

##### 7.7.3.2.1.- Lacasa

La actividad de Lacasa producida en el medio adicionado con el colorante (200 ppm), fue mayor que la presentada por el control (medio sin la adición de colorante y/o cobre), con una actividad de 0.357 U/mL y 0.091 U/mL, respectivamente. Sin embargo, el medio con cobre mostró una actividad de 6.87 U/mL, esto es un incremento considerable con respecto al control y al medio adicionado de colorante. Por otro lado, el medio que presentó tanto cobre como RBBR en su composición, mostró una actividad menor a la dada por el sulfato de cobre, de 4.8 U/mL (Figura 7.65). Aun así, la actividad fue superior a la presentada por el control y el medio con colorante.



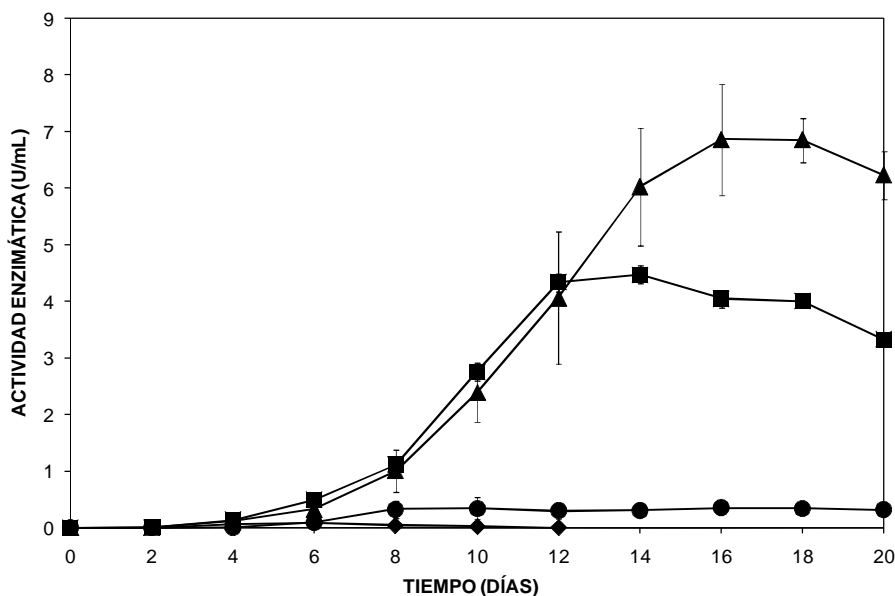


Figura 7.65.- Actividad Enzimática de Lacasa en el sobrenadante de RVAN12 en GMM, bajo diferentes condiciones de cultivo. ♦, Control; ▲, Sulfato de cobre 500  $\mu$ M; ●, Colorante, RBBR 200 ppm; ■, Cobre 500  $\mu$ M + RBBR 200 ppm. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

#### 7.7.3.2.2.- Consumo de la Fuente de Carbono

El consumo de azúcares, al igual que la actividad enzimática fue muy variable para las diversas condiciones de medio de cultivo manejadas. Se observó que el hongo desarrollado en el medio adicionado de sulfato de cobre, consumió de forma muy rápida la fuente de carbono, asimiló más del 90% al día 2 de crecimiento, mientras que el control consumió la misma cantidad al sexto día del ensayo. Por otro lado, en los medios con colorante y colorante mas cobre, el consumo de la fuente de carbono fue más lento, se consumió el 95% al día 14 del ensayo y el 80% hasta el día 20, respectivamente (Figura 7.66).

#### 7.7.3.2.3.- Proteína

Los resultados obtenidos indicaron que en el control se incrementó paulatinamente la cantidad de proteína presente (0.0204 mg/mL), mientras que el medio adicionado con cobre se presentó una disminución inicial y posteriormente, se incrementó la producción de la misma. Este comportamiento fue más notorio a partir del día 14 y llegó al 16 al máximo de proteína (0.031 mg/mL). En cuanto al medio con colorante, este presentó un incremento considerable de 0.08 mg/mL a 0.028 mg/mL. Posteriormente,

disminuyó y, finalmente, se mantuvo constante. Por último, el medio con sulfato de cobre y colorante, se mantuvo relativamente constante. Después de alcanzar el máximo contenido de proteína con 0.0228, disminuyó a 0.021 mg/mL (Figura 7.67).

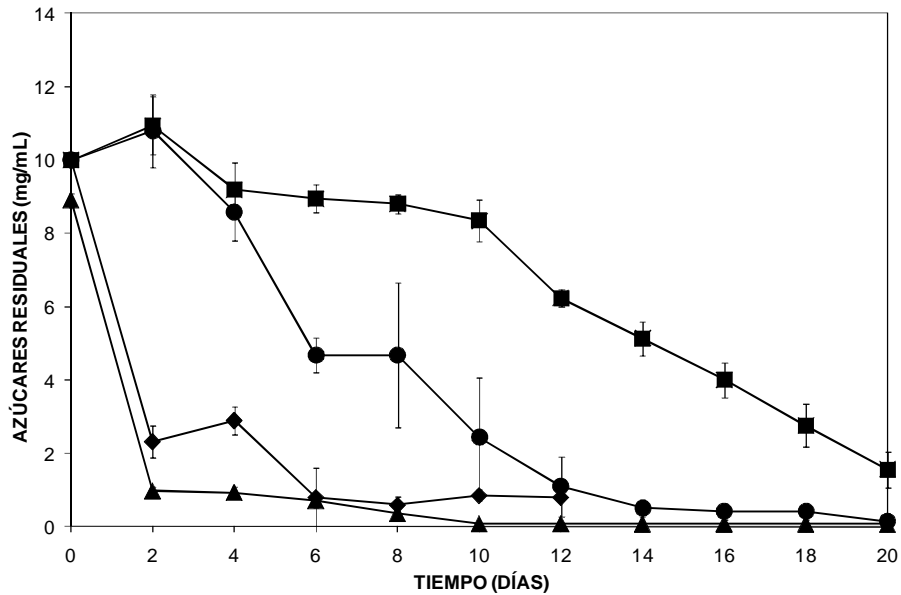


Figura 7.66.- Azúcares Residuales en el sobrenadante de RVAN12 en GMM. ♦, Control; ▲, Sulfato de cobre 500 μM; ●, Colorante, RBBR 200 ppm; ■, Cobre 500 μM + RBBR 200 ppm. Los símbolos representan el promedio ± la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

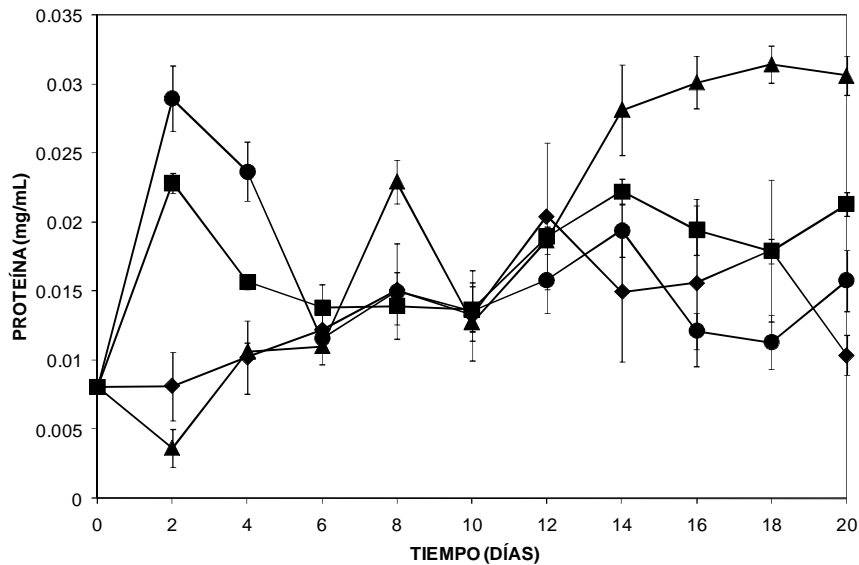


Figura 7.67.- Contenido de Proteína (mg/mL) de RVAN12 en GMM. ♦, Control; ▲, Sulfato de cobre 500 μM; ●, Colorante, RBBR 200 ppm; ■, Cobre 500 μM + RBBR 200 ppm. Los símbolos representan el promedio ± la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

#### 7.7.3.2.4.- Actividad Específica

En a la actividad específica, se observó que a pesar de las diferencias observadas tanto en la actividad enzimática (unidades arbitrarias), como en la cantidad de proteína presente en el sobrenadante, tanto el medio suplementado con cobre y el de cobre más colorante, fueron muy similares, con 227.7 y 224 U/mg de proteína, respectivamente. Aunque el día en el cual se alcanzó dicho valor fue diferente (Figura 7.68).

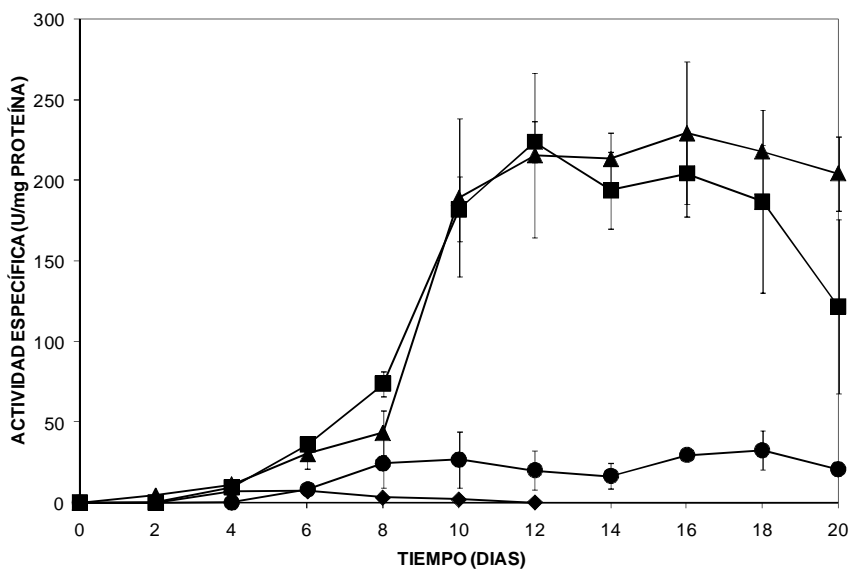


Figura 7.68.- Actividad Específica de Lacasa en el sobrenadante de RVAN12 en GMM. ◆, Control; ▲, Sulfato de cobre 500 µM; ●, Colorante, RBBR 200 ppm; ■, Cobre 500 µM + RBBR 200 ppm. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

## 7.8.- ZIMOGRAMAS

Se realizaron geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes, a una concentración del 10%. Lo anterior con la finalidad de observar el perfil enzimático en cada uno de los ensayos y si en un momento dado las condiciones del medio de cultivo influyeron en el patrón de bandas.

### 7.8.1.- EXTRACTOS DE GMM

Una técnica muy común para la comparación del patrón de isoenzimas, es el uso de zimogramas. Se utilizó el ABTS como substrato para teñir los zimogramas de la Lacasa de cada una de las cepas. Los geles fueron realizados a todas las cepas, sin embargo, no en todos fue posible la visualización de las bandas. Esto debido a la baja

actividad presente y al posible efecto de la congelación en el extracto. Esto ocurrió tanto en la cepa RVAN2 como en la RVAN12.

#### 7.8.1.1.- Fuente de Carbono

Las muestras fueron ajustadas a 15  $\mu\text{L}$  de extracto crudo y 5  $\mu\text{L}$  de buffer de muestra, debido a la baja cantidad de proteína presente, como se pudo observar en los resultados previos. Sin embargo, solamente fue posible visualizar algunas bandas en los extractos provenientes de RVAN2 cuya fuente de carbono fue el acetato, esto a pesar de ser el segundo con mejor actividad enzimática. Lo mismo sucedió con el control, en el cual no se visualizaron las bandas. Por otro lado, se observaron bandas en todos los carriles, aunque fue más evidente lo anterior al final, en el correspondiente al día 12, cuando se alcanzó la máxima actividad (Figura 7.69).

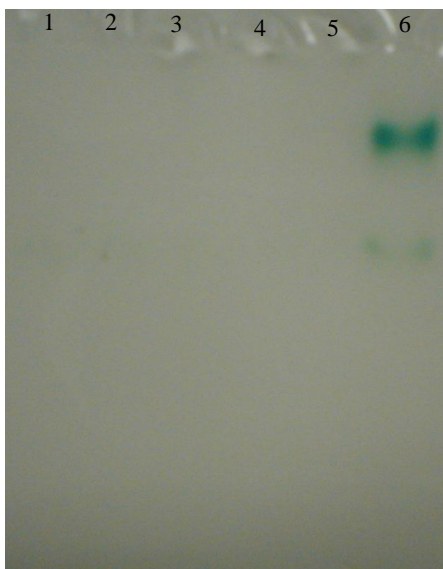


Figura 7.69.- Perfil enzimático de los extractos crudos de RVAN2, en medio con acetato de sodio como fuente de carbono. Los carriles del 1 al 6 representan las muestras tomadas los días 2, 4, 6, 8, 10 y 12 del ensayo. La muestra fue ajustada a un volumen total de 20  $\mu\text{L}$  (15 de extracto y 5 de buffer de muestra).

#### 7.8.1.2.- Inductores

Los zimogramas realizados a los extractos crudos provenientes de los cultivos adicionados con sulfato de cobre, permitieron la visualización de diversas bandas con respecto al tiempo. Estos zimogramas se realizaron con los extractos crudos tomados durante todo el transcurso de la cinética enzimática.

#### 7.8.1.2.1.- Sulfato de Cobre

##### RVAN2

La adición de sulfato de cobre, como pudo observarse en los resultados previamente mostrados, lograron incrementar la actividad enzimática. El perfil enzimático de RVAN2 mostrado en el zimograma, indicó la presencia de al menos dos bandas nítidas, esto a partir del día 12, aunque pudo detectarse actividad desde el día dos. Por otro lado, en el día ocho, pueden observar tres bandas. Siendo más característico a partir del día 16 hasta el 20 (Figura 7.70).

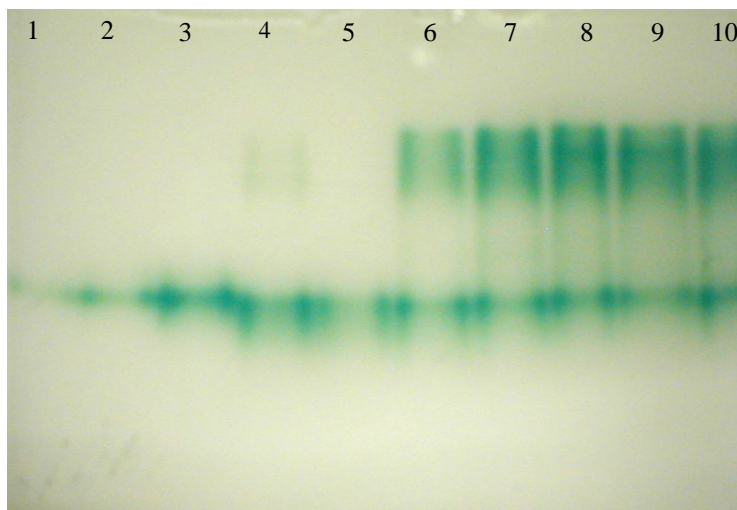


Figura 7.70.- Perfil Enzimático de RVAN2 adicionado de  $\text{CuSO}_4$  500  $\mu\text{M}$  en GMM. PAGE al 10% de poliacrilamida. Se colocaron 20  $\mu\text{L}$  de muestra (15 de extracto y 5 de buffer de muestra). Carril 1-10, representan las alícuotas de cada uno de los días 2 al 20, a intervalos de 48 h. Se almacenaron a 4°C hasta su uso.

En cuanto a una concentración de 1000  $\mu\text{M}$ , la intensidad en cuanto a las bandas mostradas fue menor, lo cual corresponde a lo obtenido en las cinéticas enzimáticas. Se observaron tres bandas, dos muy tenues a partir del día 10 y hasta el 18. Se observó como conforme transcurre el tiempo, algunas bandas aparecen mientras que otras van disminuyendo en intensidad. Las dos bandas superiores se encuentran muy cerca, mientras que la inferior se encontró muy separada. Al día 20, el total de bandas es tan claro que no es posible detectarla al fotografiar el gel (Figura 7.71).

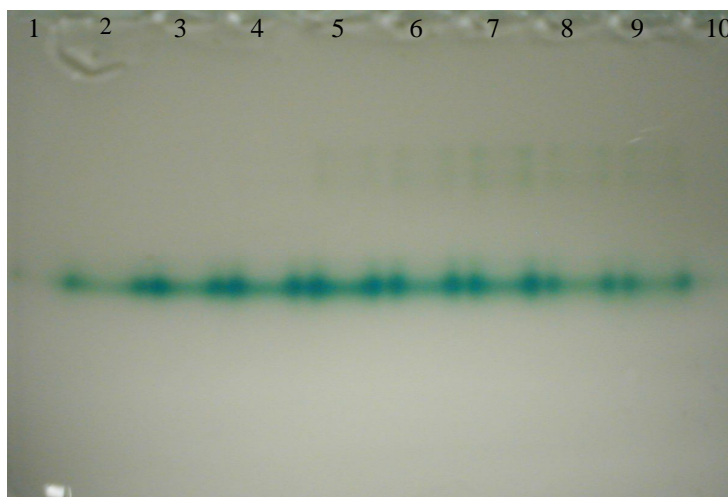


Figura 7.71.- Perfil Enzimático de RVAN2 adicionado de  $\text{CuSO}_4$  1000  $\mu\text{M}$  en GMM. PAGE al 10% de poliacrilamida. Se colocaron 20  $\mu\text{L}$  de muestra (15 de extracto y 5 de buffer de muestra). Carril 1-10, representan las alícuotas de cada uno de los días 2 al 20, a intervalos de 48 h. Se almacenaron a  $4^\circ\text{C}$  hasta su uso.

#### RVAN12

El perfil enzimático de esta cepa fue muy diferente al observado en RVAN2, pues solamente a partir del 10 (línea 5), es que fueron evidentes las bandas. Se observó una por carril, sin embargo fueron más intensas a partir del día 16 (carril 8), que correspondió al día en el cual alcanzó la máxima actividad enzimática, aunque al día 18, esta fue ligeramente inferior, por lo cual la banda generada en el carril 9 es muy similar. No se observó la presencia de otras bandas (Figura 7.72).

En cuanto a  $\text{CuSO}_4$  1000  $\mu\text{M}$ , no se detectaron bandas en el zimograma, esto a pesar de haber obtenido actividad enzimática durante los ensayos.

#### 7.8.1.2.2.- Sulfato Manganoso

Tanto en RVAN2 como RVAN12, no se observó banda alguna en los geles nativos realizados a los extractos crudos obtenidos de los cultivos adicionados con sulfato manganoso a 11 mg/L. Por otro lado, a 40 mg/L, se detectó una banda muy tenue al final del ensayo, día 20 (carril 10), en el caso de RVAN2 (Figura 7.73); no así para RVAN12, puesto que las actividades enzimáticas fueron bajas y la cantidad de proteína más, lo cual impidió hacer los ajustes pertinentes en cuanto a la misma, por lo cual se colocaron 20  $\mu\text{L}$  de muestra.

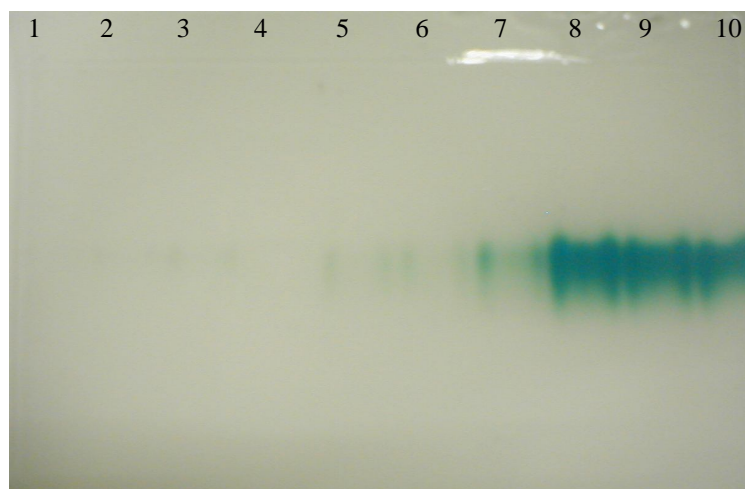


Figura 7.72.- Perfil Enzimático de RVAN12 adicionado de  $\text{CuSO}_4$  500  $\mu\text{M}$  en GMM. PAGE al 10% de poliacrilamida. Se colocaron 20  $\mu\text{L}$  de muestra (15 de extracto y 5 de buffer de muestra). Carril 1-10, representan las alícuotas de cada uno de los días 2 al 20, a intervalos de 48 h. Se almacenaron a 4°C hasta su uso.

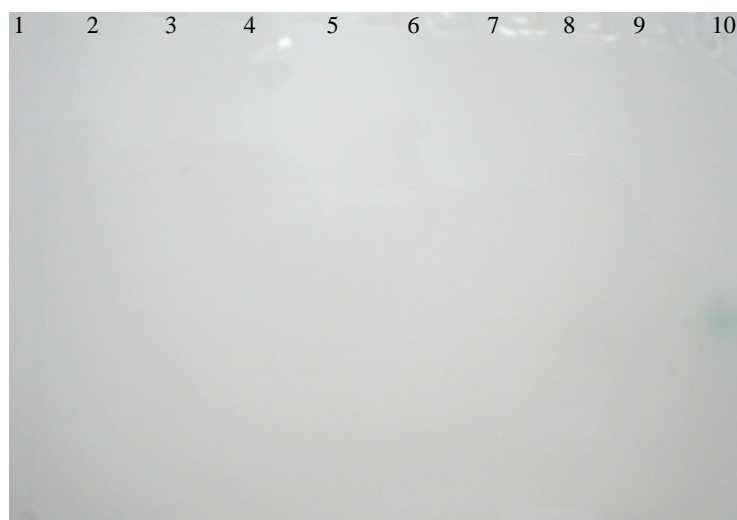


Figura 7.73.- Perfil Enzimático de RVAN2 adicionado de  $\text{MnSO}_4$  40 mg/L en GMM. PAGE al 10% de poliacrilamida. Se colocaron 20  $\mu\text{L}$  de muestra (15 de extracto y 5 de buffer de muestra). Carril 1-10, representan las alícuotas de cada uno de los días 2 al 20, a intervalos de 48 h. Se almacenaron a 4°C hasta su uso.

#### 7.8.1.2.3.- Etanol

Tanto para RVAN2 como para RVAN12, el etanol a ambas concentraciones (30 y 35 g/L), no mostraron bandas perceptibles en los zimogramas, correspondiendo a la baja actividad observada durante los ensayos enzimáticos.

#### 7.8.1.2.4.- Siringaldazina

##### RVAN2

A 0.116  $\mu\text{M}$ , el perfil enzimático no mostró banda alguna en los geles realizados, al igual que en el caso anterior, debido posiblemente a la baja actividad obtenida durante los 20 días en los cuales se llevó a cabo la determinación. Por otro lado, a 1.16  $\mu\text{M}$ , se detectó una banda a partir del día 12 (carril 6). Puesto que la cantidad de proteína no fue ajustado dado que era muy poca la presentada en los sobrenadantes, el ajuste, al igual que en los casos anteriores fue hecho en base a volumen. En este caso, a diferencia del sulfato de cobre, no se detectaron las bandas superiores observadas en tal inductor (Figura 7.74).

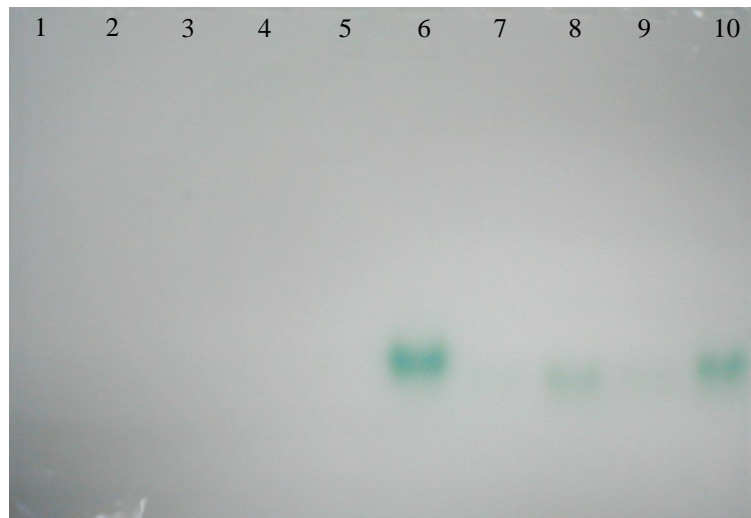


Figura 7.74.- Perfil Enzimático de RVAN2 adicionado de Siringaldazina 1.16  $\mu\text{M}$  en GMM. PAGE al 10% de poliacrilamida. Se colocaron 20  $\mu\text{L}$  de muestra (15 de extracto y 5 de buffer de muestra). Carril 1-10, representan las alícuotas de cada uno de los días 2 al 20, a intervalos de 48 h. Se almacenaron a 4°C hasta su uso.

#### 7.8.2.- EXTRACTOS DE SMM

En el medio de harina de soya (SMM), mostró favorecer en mayor proporción la actividad enzimática, comparado con el medio GMM. Se obtuvieron actividades



enzimáticas superiores a las 2 U/mL (RVAN2), llegando en algunos casos hasta las 63 U/mL, dependiendo del tipo de inductor utilizado.

#### 7.8.2.1.- Control

##### 7.8.2.1.1.- RVAN2

El perfil enzimático en el control (SMM), a diferencia del medio GMM, muestra dos bandas, las cuales son perceptibles a partir del día cuatro (carril 2), aunque la banda superior, más tenue, tiende a desaparecer a partir del día 16. Por otro lado, a partir de este día, se notan dos bandas muy cercanas entre sí, incrementándose una (banda superior) (Figura 7.75).

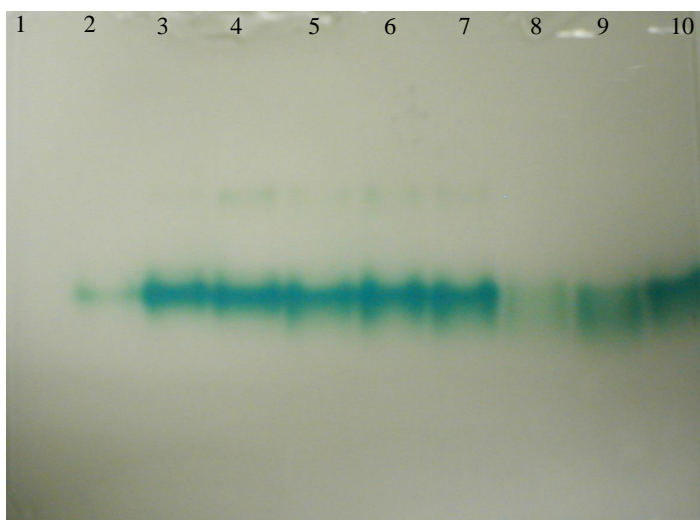


Figura 7.75.- Perfil Enzimático de RVAN2 en SMM sin adición de Inductor. PAGE al 10% de poliacrilamida. Se hizo ajuste de proteína a 2.5µg/mL. Carril 1-10, representan las alícuotas de cada uno de los días 2 al 20, a intervalos de 48 h. Se almacenaron a 4°C hasta su uso.

##### 7.8.2.1.2.- RVAN12

El control, medio sin adición de inductor, de RVAN12, mostró el patrón de bandas muy diferente al dado tanto por RVAN2, como por aquel obtenido en el medio GMM, en el cual no se detectaron bandas, debido a un posible efecto de la temperatura a la cual se encontraba almacenado el extracto.

A partir del día seis (carril 3), se observa una banda muy tenue, incrementando su intensidad conforme avanza el tiempo, lo que correspondió a lo obtenido en la cinética enzimática. Se logran observar tres bandas, dos superiores, más intensas y una inferior tenue. Conforme el tiempo avanzó, las bandas superiores se tiñen más, lo que impide

visualizar a detalle la separación de las mismas. De igual forma, la banda inferior incrementó su intensidad, hasta unirse con el resto, lo que produjo una sola banda al día 18 (carril 9), cuando alcanza la máxima actividad (Figura 7.76).

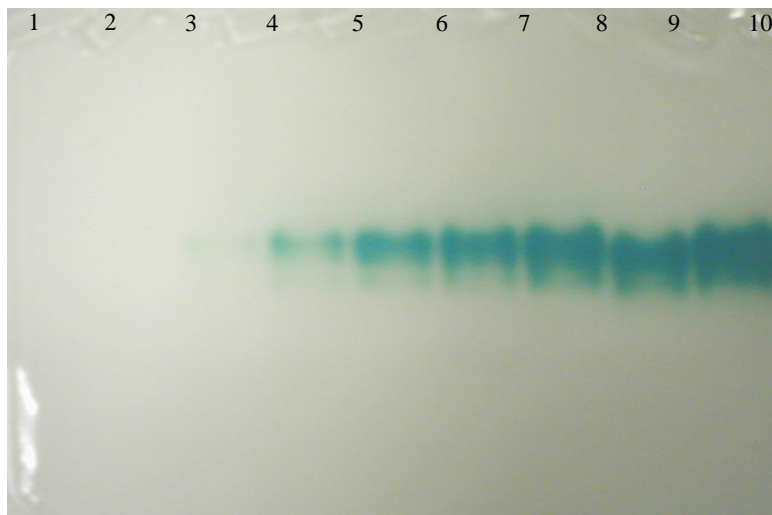


Figura 7.76.- Perfil Enzimático de RVAN12 en SMM sin adición de Inductor. PAGE al 10% de poliacrilamida. Se hizo ajuste de proteína a 2.5 $\mu$ g/mL. Carril 1-10, representan las alícuotas de cada uno de los días 2 al 20, a intervalos de 48 h. Se almacenaron a 4°C hasta su uso.

#### 7.8.2.2.- Inductores

##### 7.8.2.2.1.- Sulfato de Cobre

##### RVAN2

La actividad enzimática alcanzada por este microorganismo bajo el efecto de la adición del sulfato de cobre 500  $\mu$ M fue ligeramente menor a la reportada por el control. A partir del día dos es posible visualizar solamente una banda, detectadas tres a partir del día ocho (carril 4), aunque más tenues que aquellas presentadas en el control. Aunque esta tiende a disminuir conforme transcurre la cinética, similar a lo obtenido en el ensayo (Figura 7.77).

El perfil enzimático obtenido del zimograma, indicó la presencia de dos bandas (isoenzimas), se hizo evidente la banda inferior a partir del día cuatro (carril 2), mientras la banda superior, lo fue a partir del día ocho e incrementó la intensidad al día 10 (carril 5), lo que correspondió a lo obtenido en las cinéticas enzimáticas (Figura 7.78).

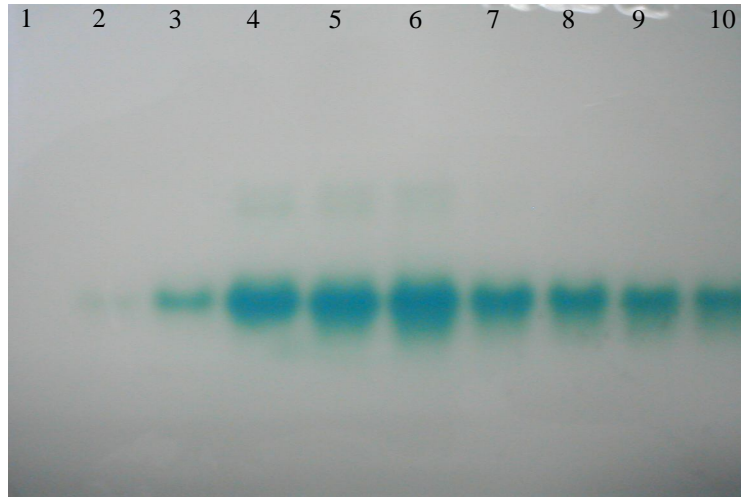


Figura 7.77.- Perfil Enzimático de RVAN2 en SMM con  $\text{CuSO}_4$  500  $\mu\text{M}$ . PAGE al 10% de poliacrilamida. Se hizo ajuste de proteína a 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Carril 1-10, representan las alícuotas de cada uno de los días 2 al 20, a intervalos de 48 h. Se almacenaron a 4°C hasta su uso.

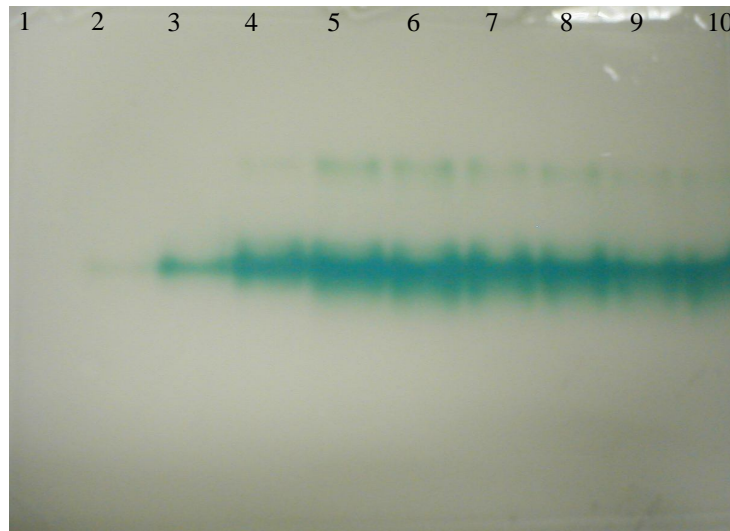


Figura 7.78.- Perfil Enzimático de RVAN2 en SMM con  $\text{CuSO}_4$  1000  $\mu\text{M}$ . PAGE al 10% de poliacrilamida. Se hizo ajuste de proteína a 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Carril 1-10, representan las alícuotas de cada uno de los días 2 al 20, a intervalos de 48 h. Se almacenaron a 4°C hasta su uso.

## RVAN12

Debido a la alta actividad presentada por esta cepa bajo la influencia del  $\text{CuSO}_4$ , la banda obtenida en cada uno de los carriles, correspondiente a cada día de actividad determinado (cada 48 h), fue muy intensa. Esta se detectó a partir del día ocho y fue más evidente al día 16 (carril 8), lo cual correspondió al día de máxima actividad. Por otro lado y a diferencia del control, solamente fue posible visualizar una banda debido a la intensidad, lo anterior dificultó deducir su existencia o por el contrario, solamente es una la que se produjo (Figura 7.79).

Caso contrario al resultado anterior, el perfil enzimático obtenido de los extractos adicionados con  $\text{CuSO}_4$  1000  $\mu\text{M}$ , se lograron observar tres bandas a partir del día 6 (carril 3), en el cual las tres bandas se encuentran muy tenues, dos poco separadas y una tercera un poco más. Conforme transcurre el ensayo, las bandas se intensificaron, lo cual complicó la diferenciación de las mismas. Por otro lado, la máxima intensidad se obtuvo cuando se alcanzó la actividad más alta (día 14, carril 7) (Figura 7.80).

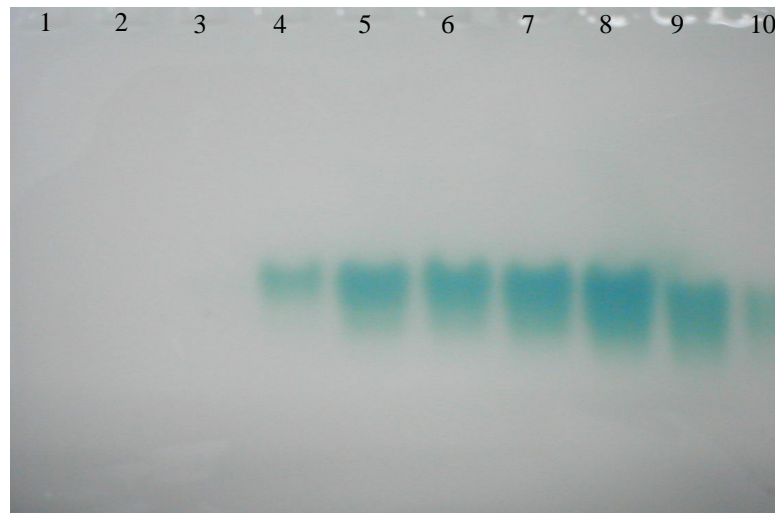


Figura 7.79.- Perfil Enzimático de RVAN12 en SMM con  $\text{CuSO}_4$  500  $\mu\text{M}$ . PAGE al 10% de poliacrilamida. Se hizo ajuste de proteína a 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Carril 1-10, representan las alícuotas de cada uno de los días 2 al 20, a intervalos de 48 h. Se almacenaron a 4°C hasta su uso.

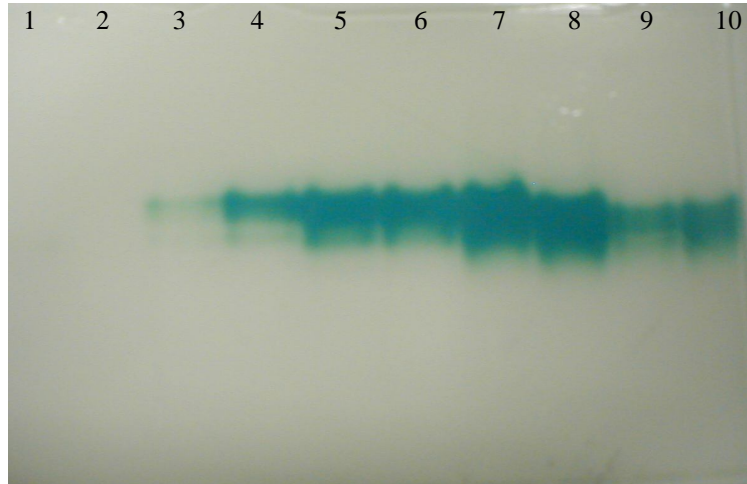


Figura 7.80.- Perfil Enzimático de RVAN12 en SMM con  $\text{CuSO}_4$  1000  $\mu\text{M}$ . PAGE al 10% de poliacrilamida. Se hizo ajuste de proteína a 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Carril 1-10, representan las alícuotas de cada uno de los días 2 al 20, a intervalos de 48 h. Se almacenaron a 4°C hasta su uso.

#### 7.8.2.2.2.- Sulfato Manganoso

##### RVAN2

El perfil enzimático obtenido de los extractos crudos de RVAN2 adicionados con sulfato manganoso a una concentración final de 11 mg/L, dieron como resultado la presencia de tres bandas, aunque no tan intensas como en el sulfato de cobre. La banda más intensa fue detectada a partir del día cuatro (carril 2), la cual se incrementó hasta disminuir a partir del día 18 (carril 9). A partir de este día se detectó la presencia de dos bandas unidas, las que podrían no haberse detectado anteriormente debido a la actividad presentada en los días previos. Por otro lado, la banda que apareció al día ocho, es mucho más tenue que la generada en el medio suplementado con sulfato de cobre (Figura 7.81).

En cuanto a los extractos con sulfato de manganoso a 40 mg/L, el comportamiento fue diferente al mostrado en el perfil enzimático determinado. En este caso se observan tres bandas. Pero dos de ellas en la parte superior, es decir, aquellas que tuvieron un corrimiento electroforético menor que la banda más intensa. Por otro lado, estas dos bandas se detectaron a partir del día 10 (carril 5), mientras que la banda cuyo corrimiento fue mayor, apareció igual que en el caso anterior, a partir del día cuatro (carril 2) (Figura 7.82).

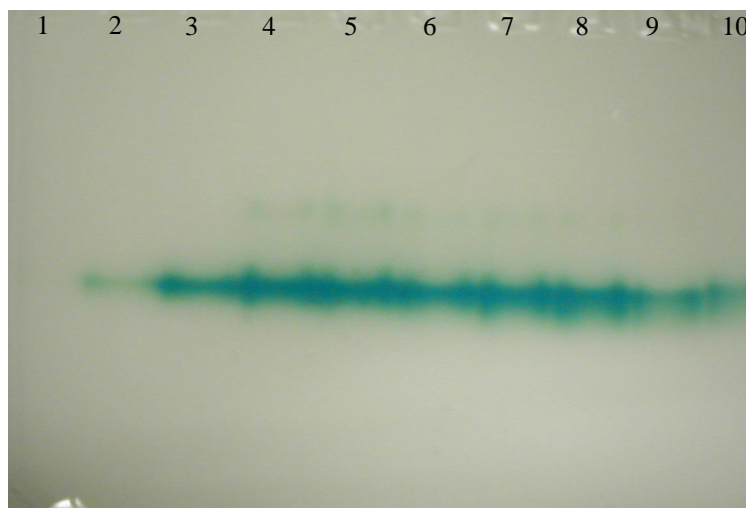


Figura 7.81.- Perfil Enzimático de RVAN2 en SMM con  $\text{MnSO}_4$  11 mg/L. PAGE al 10% de poliacrilamida. Se hizo ajuste de proteína a  $2.5\mu\text{g/mL}$ . Carril 1-10, representan las alícuotas de cada uno de los días 2 al 20, a intervalos de 48 h. Se almacenaron a  $4^\circ\text{C}$  hasta su uso.

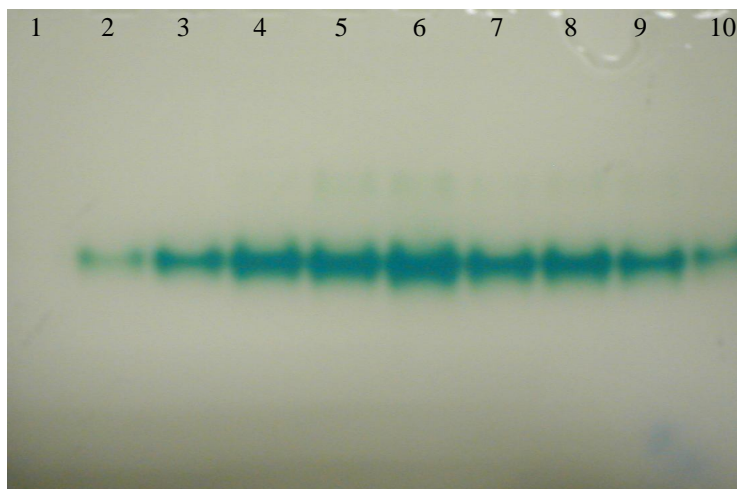


Figura 7.82.- Perfil Enzimático de RVAN2 en SMM con  $\text{MnSO}_4$  40 mg/L. PAGE al 10% de poliacrilamida. Se hizo ajuste de proteína a  $2.5\mu\text{g/mL}$ . Carril 1-10, representan las alícuotas de cada uno de los días 2 al 20, a intervalos de 48 h. Se almacenaron a  $4^\circ\text{C}$  hasta su uso.

### RVAN12

Con respecto a RVAN12, el perfil enzimático, mostró tres bandas, dos de ellas poco separadas y una tercera un poco más. Todas ellas se detectaron a partir del día ocho (carril 4), a pesar de ser detectada la actividad enzimática de Lacasa a partir del día seis,



sin embargo, al ser esta muy baja, 30 U/L, no fue detectada en el zimograma. Las isoenzimas incrementaron su intensidad con respecto al tiempo, fue más evidente a partir del día 12 y hasta el 18 (carril 6 al 9). Finalmente, al día 20 (carril 10), se detectaron dos de las tres isoenzimas (Figura 7.83).

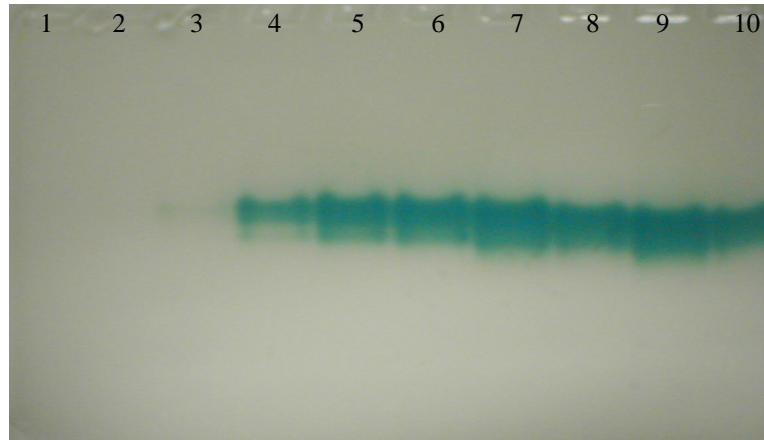


Figura 7.83.- Perfil Enzimático de RVAN12 en SMM con  $\text{MnSO}_4$  11 mg/L. PAGE al 10% de poliacrilamida. Se hizo ajuste de proteína a  $2.5\mu\text{g/mL}$ . Carril 1-10, representan las alícuotas de cada uno de los días 2 al 20, a intervalos de 48 h. Se almacenaron a  $4^\circ\text{C}$  hasta su uso.

A  $40\text{ mg/L}$  de sulfato manganoso, el comportamiento fue muy similar al presentado a la menor concentración añadida el medio de cultivo. Se distinguieron tres isoenzimas, dos de ellas con un perfil electroforético muy similar y la tercera, separada un poco más del las otras. Por otro lado, la intensidad de las bandas se incrementó, lo cual es consistente con lo obtenido en la cinética enzimática y se distinguió una banda al día 18 (carril 9); sin embargo y debido a la actividad alcanzada los días 16 al 18, quizá se enmascaró el resto (Figura 7.84).

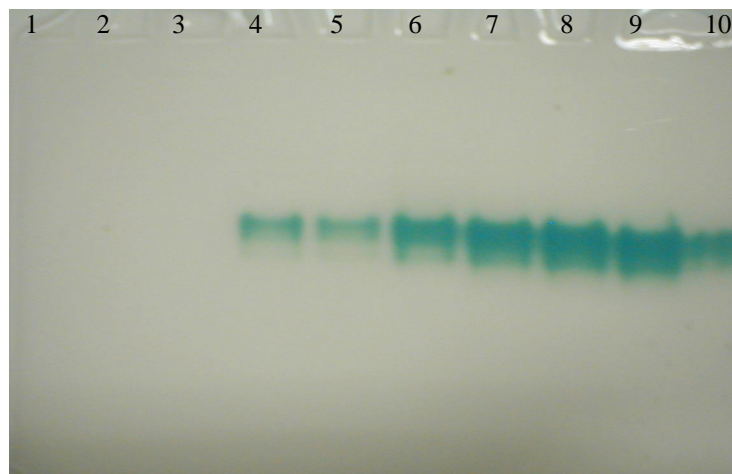


Figura 7.84.- Perfil Enzimático de RVAN12 en SMM con  $\text{MnSO}_4$  40 mg/L. PAGE al 10% de poliacrilamida. Se hizo ajuste de proteína a  $2.5\mu\text{g/mL}$ . Carril 1-10, representan las alícuotas de cada uno de los días 2 al 20, a intervalos de 48 h. Se almacenaron a  $4^\circ\text{C}$  hasta su uso.

#### 7.8.2.2.3.- Siringaldazina

##### RVAN2

Las muestras tomadas durante el transcurso del ensayo enzimático, cada 48 h, mostraron una banda a partir del día cuatro (carril 2) y se incrementó la intensidad. A partir del día 10, se observaron dos isoenzimas; diferente a lo que se observó con los inductores pasados, en los cuales era posible detectar tres. A partir del día 18, por el contrario, la isoenzima con menor intensidad desapareció, mientras la otra disminuyó ligeramente en su intensidad (Figura 7.85).

La actividad fue detectada a partir del día cuatro (carril 2), sin embargo esta es tan baja que no pudo ser observada del todo (Figura 7.84). Por otro lado, la isoenzima superior detectada en la mayoría de las condiciones ensayadas, no fue observada. A partir del día 18 (carril 9), se detectó la presencia de una segunda isoenzima, ligeramente más tenue a aquella presentada desde el día cuatro, más evidente al día 20 (carril 10), último día de la cinética (Figura 7.86).



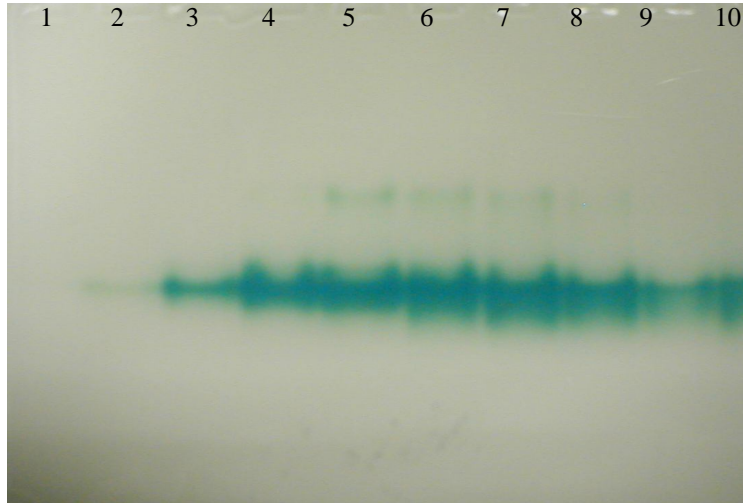


Figura 7.85.- Perfil Enzimático de RVAN2 en SMM con Siringaldazina 0.116  $\mu\text{M}$ . PAGE al 10% de poliacrilamida. Se hizo ajuste de proteína a 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Carril 1-10, representan las alícuotas de cada uno de los días 2 al 20, a intervalos de 48 h. Se almacenaron a 4° C hasta su uso.

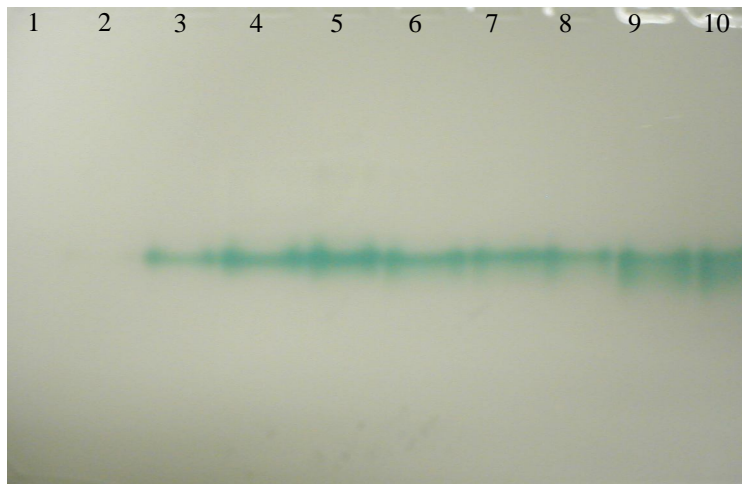


Figura 7.86.- Perfil Enzimático de RVAN2 en SMM con Siringaldazina 1.16  $\mu\text{M}$ . PAGE al 10% de poliacrilamida. Se hizo ajuste de proteína a 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Carril 1-10, representan las alícuotas de cada uno de los días 2 al 20, a intervalos de 48 h. Se almacenaron a 4°C hasta su uso.

## RVAN12

El perfil enzimático de RVAN12 mostró tres isoenzimas, las cuales fueron más evidentes al día ocho (carril 4). Se observa una banda muy teñida, seguida de una que está muy junta a ella y una menos intensa, la que tuvo una migración electroforética mayor. Conforme pasó el tiempo, la superior desapareció; sin embargo, las otras incrementaron su intensidad. Por otro lado, los días 14 y 16 son los que mostraron la mayor actividad lo que correspondió a lo observado en el zimograma realizado (Figura 7.87).

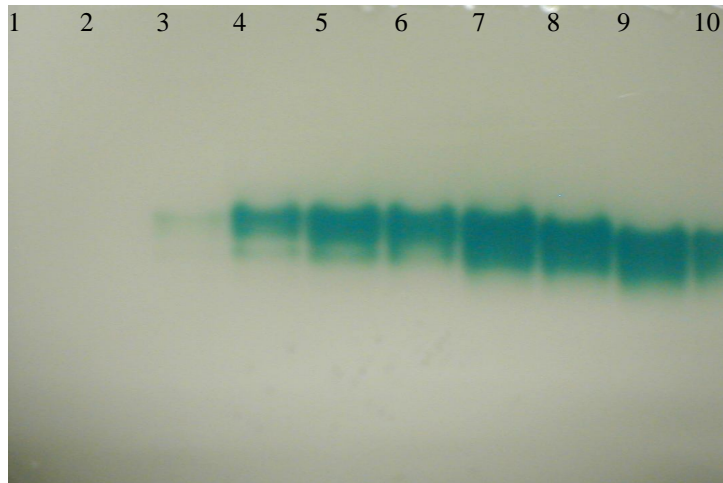


Figura 7.87.- Perfil Enzimático de RVAN12 en SMM con Siringaldazina 0.116  $\mu\text{M}$ . PAGE al 10% de poliacrilamida. Se hizo ajuste de proteína a 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Carril 1-10, representan las alícuotas de cada uno de los días 2 al 20, a intervalos de 48 h. Se almacenaron a 4° C hasta su uso.

Por otro lado, el perfil enzimático presentado por los extractos crudos provenientes del medio de cultivo adicionado con siringaldazina, a una concentración de 1.16  $\mu\text{M}$ , fue similar a lo encontrado a una menor concentración. Aunque las bandas fueron detectadas a partir del día ocho (carril 4), más intensas al día 18 (Figura 7.88).

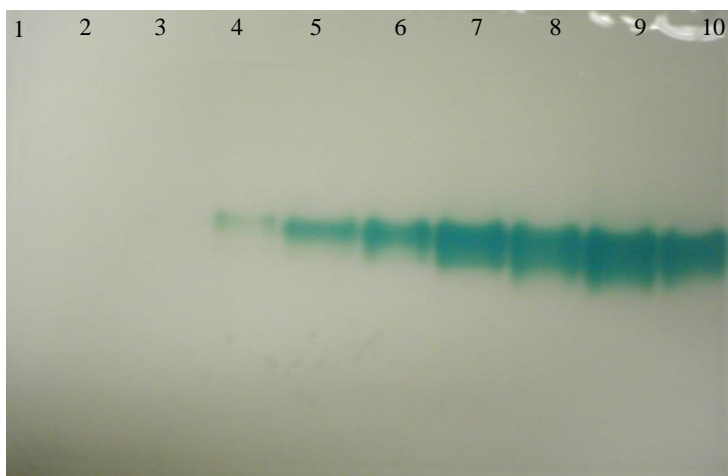


Figura 7.88.- Perfil Enzimático de RVAN12 en SMM con Siringaldazina 1.116  $\mu\text{M}$ . PAGE al 10% de poliacrilamida. Se hizo ajuste de proteína a 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Carril 1-10, representan las alícuotas de cada uno de los días 2 al 20, a intervalos de 48 h. Se almacenaron a 4° C hasta su uso.

#### 7.8.2.2.4.- Etanol

##### RVAN2

El zimograma mostró un perfil enzimático diferente al observado con los inductores anteriores. A partir del día seis (carril 3) se detectó una de las isoenzimas. La actividad de las bandas se incremento considerablemente a partir del día ocho (carril 4) y alcanzó la máxima al día 16 (carril 8). Por otro lado, a partir de este mismo día se detectaron dos isoenzimas, la superior muy tenue, la cual desapareció casi en su totalidad al final del ensayo (carril 10) (Figura 7.89).

En cuanto a la concentración a 35 g/L, el perfil enzimático obtenido en el zimograma, indico la presencia de una banda a partir del día 4 de la cinética enzimática (carril 2) e incrementó la intensidad de la misma conforme el tiempo transcurría. Se alcanzó a observar de forma muy tenue, una banda al final del ensayo. Esto fue muy diferente a los perfiles enzimáticos anteriores, en los cuales eran visibles de dos a tres isoenzimas, en base al inductor y concentración empleado. Por otro lado, se observó una gran diferencia al final (carriles 9 y 10), similar a lo reportado en los ensayos enzimáticos (Figura 7.90).

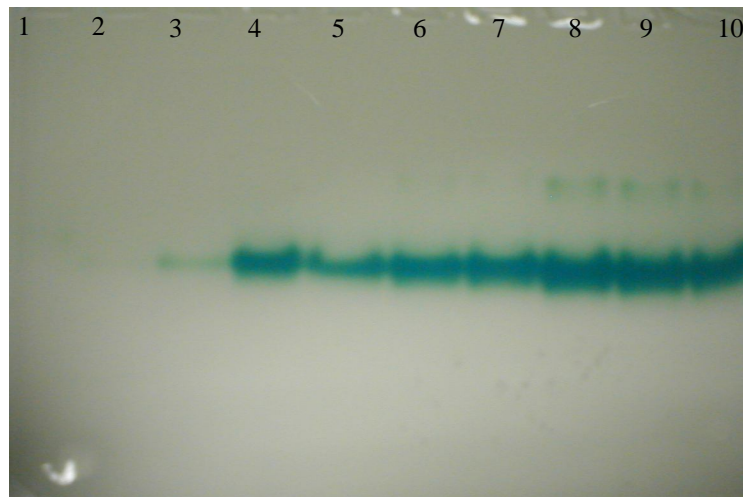


Figura 7.89.- Perfil Enzimático de RVAN2 en SMM con Etanol 30 g/L. PAGE al 10% de poliacrilamida. Se hizo ajuste de proteína a 2.5µg/mL. Carril 1-10, representan las alícuotas de cada uno de los días 2 al 20, a intervalos de 48 h. Se almacenaron a 4°C hasta su uso.

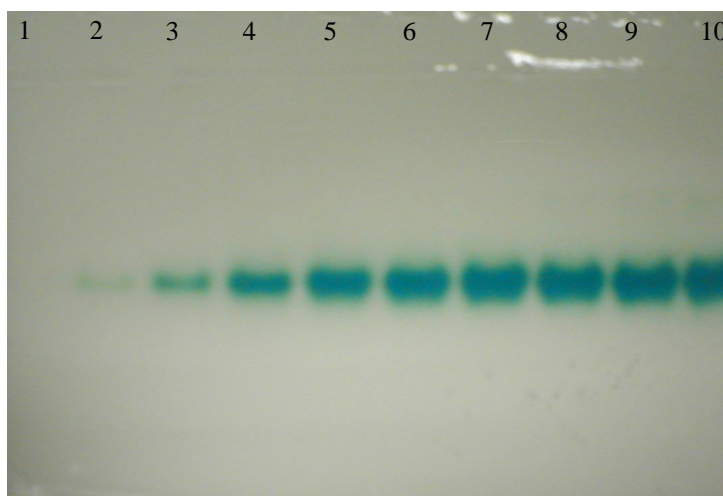


Figura 7.90.- Perfil Enzimático de RVAN2 en SMM con Etanol 35 g/L. PAGE al 10% de poliacrilamida. Se hizo ajuste de proteína a 2.5µg/mL. Carril 1-10, representan las alícuotas de cada uno de los días 2 al 20, a intervalos de 48 h. Se almacenaron a 4°C hasta su uso.

### RVAN12

El etanol, a diferencia de los otros compuestos añadidos al medio de cultivo, presentó un efecto negativo en la actividad enzimática, como se observó en la cinética

enzimática. La actividad fue detectada a partir del día 14 (carriles 7), lo que correspondió a la máxima actividad. Por otro lado, solamente se pudo observar una isoenzima (Figura 7.91).

Por otro lado, a 35 g/L de etanol, el perfil enzimático fue muy similar al presentado a 30 g/L, para la misma cepa, sin embargo esto fue ligeramente diferente a lo obtenido en la cinética enzimática, en la cual se detectó actividad hasta el día 16, lo que corresponde al carril ocho; mientras que el zimograma indicó la presencia de una banda a partir del día 14 (carril 7). Así mismo, no fue detectada otra isoenzima (Figura 7.92).

Todos y cada uno de los compuestos probados para la inducción y/o incremento de la actividad enzimática mostraron diversos comportamientos, en los cuales se determinó que algunos de ellos incrementan la misma. Por otro lado, más que inducir la presencia de isoenzimas, son inhibidas, tal fue el caso del etanol. En algunos era posible observar la presencia de dos o más isoenzimas tanto en RVAN2 como en RVAN12, mientras que algunos compuestos solamente era detectada una de ellas.

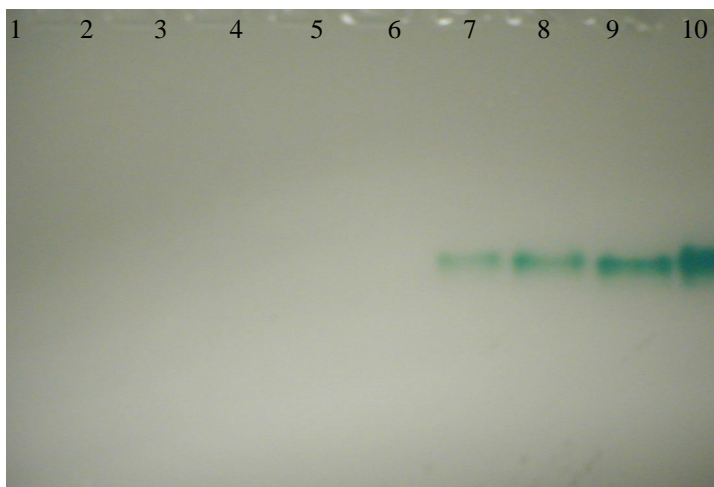


Figura 7.91.- Perfil Enzimático de RVAN12 en SMM con Etanol 30 g/L. PAGE al 10% de poliacrilamida. Se hizo ajuste de proteína a 2.5µg/mL. Carril 1-10, representan las alícuotas de cada uno de los días 2 al 20, a intervalos de 48 h. Se almacenaron a 4°C hasta su uso.

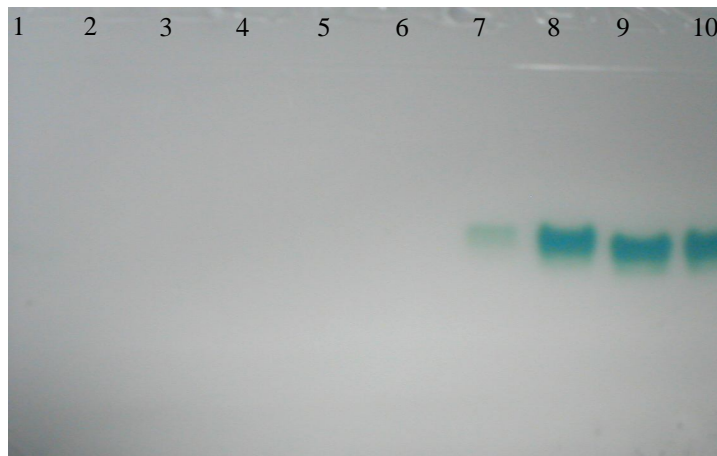


Figura 7.92.- Perfil Enzimático de RVAN12 en SMM con Etanol 35 g/L. PAGE al 10% de poliacrilamida. Se hizo ajuste de proteína a 2.5µg/mL. Carril 1-10, representan las alícuotas de cada uno de los días 2 al 20, a intervalos de 48 h. Se almacenaron a 4°C hasta su uso.

### 7.8.3.- RBBR

Como se observó en los resultados previamente mostrados de decoloración, el RBBR presentó un efecto positivo en cuanto al incremento en la actividad enzimática con respecto al medio control. Por tal razón, se procedió a realizar los zimogramas para evaluar el perfil enzimático y si existía alguna diferencia con respecto a los diferentes tratamientos estudiados y entre cada una de las cepas.

#### 7.8.3.1- RVAN2

El perfil enzimático de los extractos crudos tomados a lo largo de la cinética enzimática mostró una sola banda a partir del día dos y hasta el día 10 (carril 1 al 5). Mientras que a partir del día 12, la actividad enzimática fue muy baja, lo cual se reflejó en el zimograma, ya que no se detectó ninguna banda a partir de ese día (Figura 7.93).

En cuanto al medio adicionado con sulfato de cobre, se presentó un incremento considerable en la actividad enzimática, tanto con respecto al control como aquel adicionado solamente con el colorante (resultados previamente mostrados). El perfil enzimático mostró tres isoenzimas, similares a las encontradas en el medio de cultivo adicionado solamente con sulfato de cobre. Entre los días dos a ocho (carriles 1 a 4), solamente se visualizó una isoenzima; a partir del día 10 se detectaron las otras dos, las cuales se encuentran poco separadas una de la otra. Así mismo, entre el día 10 al 14, es cuando se detecta la mayor actividad, bandas más intensas obtenidas (Figura 7.94).



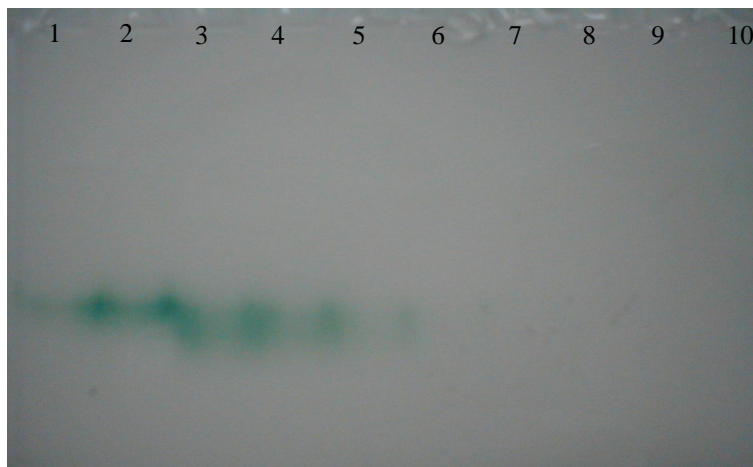


Figura 7.93.- Perfil Enzimático de RVAN2 en GMM + RBBR 200 ppm. PAGE al 10% de poliacrilamida. Se hizo ajuste a 20  $\mu\text{L}$  (15  $\mu\text{L}$  de extracto + 5  $\mu\text{L}$  de buffer de muestra). Carril 1-10, representan las alícuotas de cada uno de los días 2 al 20, a intervalos de 48 h. Se almacenaron a 4° C hasta su uso.

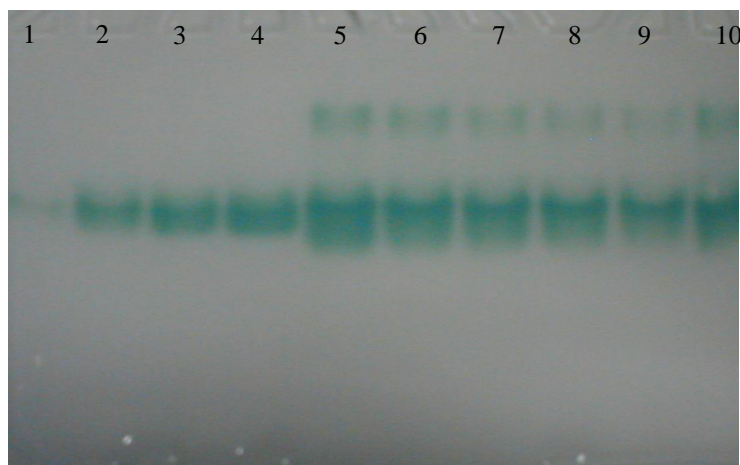


Figura 7.94.- Perfil Enzimático de RVAN2 en GMM +  $\text{CuSO}_4$  + RBBR 200 ppm. PAGE al 10% de poliacrilamida. Se hizo ajuste a 20  $\mu\text{L}$  (15  $\mu\text{L}$  de extracto + 5  $\mu\text{L}$  de buffer de muestra). Carril 1-10, representan las alícuotas de cada uno de los días 2 al 20, a intervalos de 48 h. Se almacenaron a 4°C hasta su uso.

### 7.8.3.2.- RVAN12

Al igual que en el caso de RVAN2, el perfil enzimático mostró la presencia de bandas a partir del día seis (carril 3), muy similares durante el resto de la fermentación. Se observan dos bandas aunque al estar muy cercanas tienden a confundirse (Figura 7.95). Este perfil corresponde a lo encontrado en las determinaciones enzimáticas, previamente mostrado (Figura 7.64).

Por otro lado, cuando el medio de cultivo fue adicionado con sulfato de cobre y colorante, el perfil enzimático fue diferente al obtenido en el medio de cultivo más colorante. En el zimograma se observaron bandas a partir del día dos (carril 1) tenues. Se incremento la intensidad conforme avanzaba el tiempo, siendo a partir del día 10 y hasta el 16 (bandas 5 al 8), cuando se observó la mayor intensidad de las mismas (Figura 7.96).

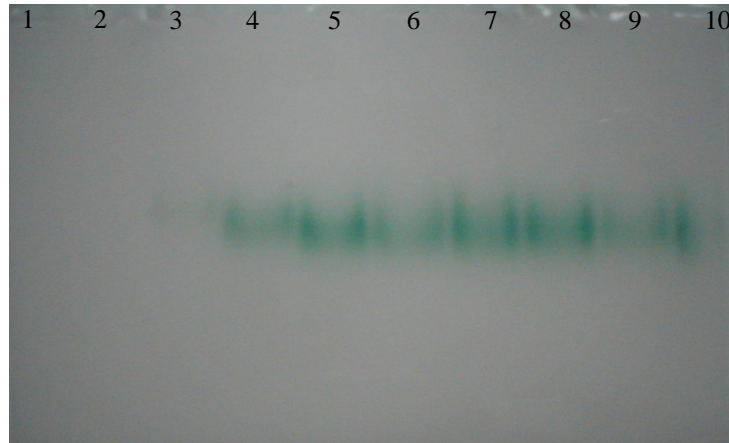


Figura 7.95.- Perfil Enzimático de RVAN12 en GMM + RBBR 200 ppm. PAGE al 10% de poliacrilamida. Se hizo ajuste a 20  $\mu$ L (15  $\mu$ L de extracto + 5  $\mu$ L de buffer de muestra). Carril 1-10, representan las alícuotas de cada uno de los días 2 al 20, a intervalos de 48 h. Se almacenaron a 4°C hasta su uso.

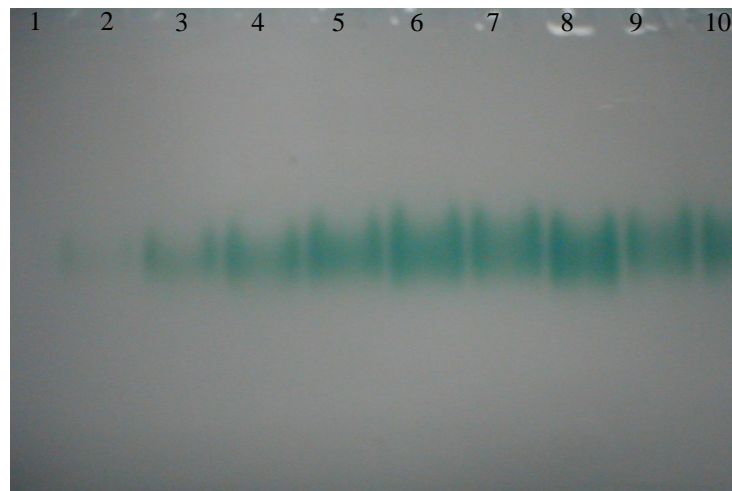


Figura 7.96.- Perfil Enzimático de RVAN12 en GMM + CuSO<sub>4</sub> + RBBR 200 ppm. PAGE al 10% de poliacrilamida. Se hizo ajuste a 20  $\mu$ L (15  $\mu$ L de extracto + 5  $\mu$ L de buffer de muestra). Carril 1-10, representan las alícuotas de cada uno de los días 2 al 20, a intervalos de 48 h. Se almacenaron a 4°C hasta su uso.



### 7.9.- IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE RVAN2 Y RVAN12

La identificación de los microorganismos requiere técnicas más específicas pues no solo las características morfológicas permiten tal acción. Debido a lo anterior, se utilizaron cebadores específicos para amplificar las regiones ITS1 e ITS4, ya que al presentar polimorfismo, defieren en tamaño en base a las cepas analizadas. El PCR fue realizado a partir de ADN cromosomal, extraído de micelio vegetativo.

Los resultados obtenidos indicaron que el ADN genómico fue extraído de forma satisfactoria, tanto para la cepa RVAN2 como para la RVAN12 (Figura 7.97). Lo anterior permitió llevar a cabo la amplificación de las regiones de interés (ITS1 e ITS4) (Figura 7.98), a partir de las regiones altamente conservadas presentes en los genes ribosomales, al utilizar cebadores o primers [(5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') y (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3')].

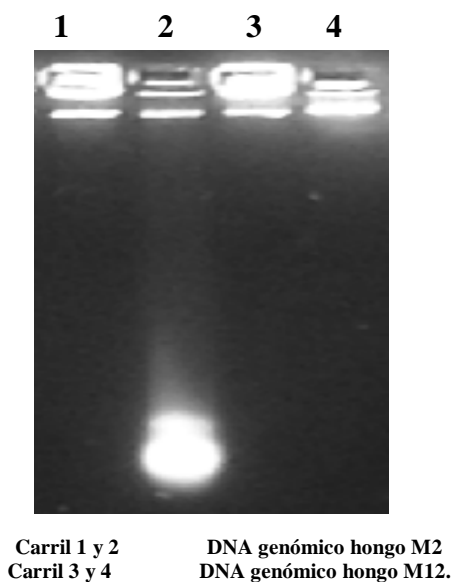


Figura 7.97.- ADN genómico de las cepas RVAN2 y RVAN12. El DNA se visualizo en un gel de agarosa al 1.5%, con buffer TBE 0.5X (0.1 M Tris, 0.09M acido bórico, 1mM EDTA) a 80 volts por 1.2 h.

Obtenido el ADN genómico, se procedió a realizar la secuenciación de la región ITS1, ITS2 del gen ribosomal 5.8S, tanto de la cepa RVAN2 y RVAN12.

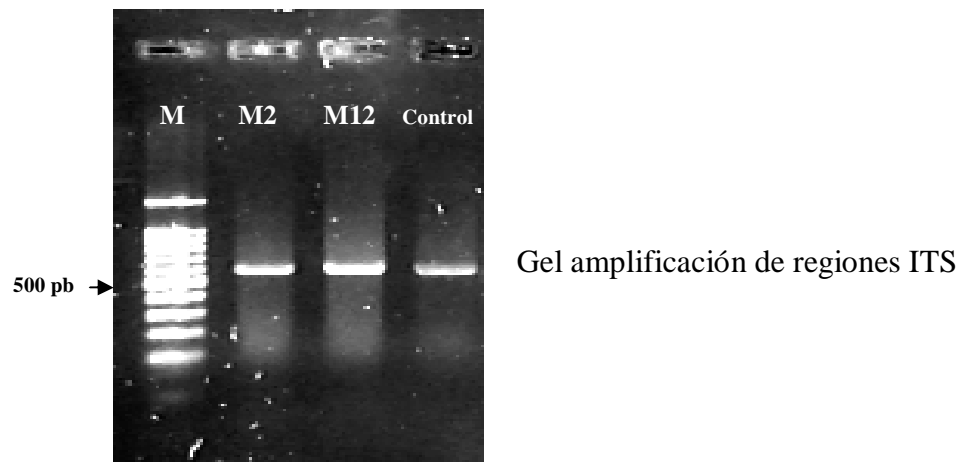


Figura 7.98.- Gel de agarosa al 1.5% de la región ITS. Visualización de los segmentos amplificados, con buffer TBE 0.5X (0.1 M Tris, 0.09M ácido bórico, 1mM EDTA) a 80 volts por 1.2 h con marcador de 100 pb).

Obtenido el ADN plasmídico, este fue amplificado en base al protocolo previamente descrito en material y métodos. En base a los protocolos, se realizó exitosamente la secuenciación en las clonas transformadas (Figura 7.99).

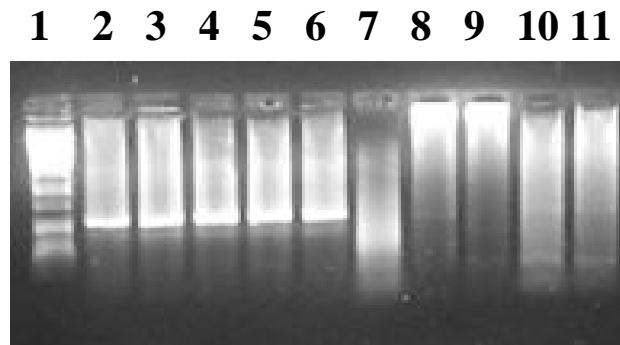


Figura 7.99.- Gel de agarosa 0.8% de las diferentes clonas transformadas. Carriles 2, 3, 4, 5 y 6, clonas transformadas. Carriles 7, 8, 9, 10 y 11, clonas no transformadas.

### 7.9.1 RVAN2

Confirmada la transformación de las clonas en base a la amplificación de los segmentos de interés, se llevo a cabo la secuenciación. Dió como resultado la secuencia parcial de ITS1, secuencia completa del gen ribosomal 5.8S, secuencia completa del ITS2

y la secuencia parcial del gen ribosomal 2.8S. En total fueron secuenciadas 617 pares de bases para la cepa RVAN2 (Figura 7.100).

```
GCCGGGTAGTCCTACCTGATTTGAGGTGAGATGTTATAAAAAGTTGTCCTA
ATGGACGGTTAGAAGCTCGCCAAAACGCTTCACGGTCACAGCGTAGACAA
TTATCACACTGAGAGCCGATCCGCACGGAATCAAGCTAATGCATTCAAGA
GGAGCCGACCGTTACGGCCAGCAAGCCTCCAAATCCAAGCCCATAGATCA
CAAGGATTTATGAGTTGAGAATTTTCATGACACTCAAACAGGCATGCTCCT
CGGAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCAGTGA
ATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATG
CGAGAGCCAACAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTATTAAGATGCGTTAGACG
CGTTTACATTCTGATACTTTAAGAGTTTGTAGTGTACATAGGCCGGCAGA
ATGCTCCCAACCCAGGCTAGAAACCCACGCCACGTACACTACAATAAG
TGCACAGGATGTAAGAGTAGGAATGAGCAGGACGTGGCACAATGCGTACT
CCGGCAGCAGCCAACCGCTTACACACCCCTCTAGGAAACATTTCTCATT
TTTTGTTCTTCCCCC
```

Figura 7.100.- Secuencia de las regiones ITS1-5.8s-ITS2 de la cepa RVAN2, dando como resultado 617 bases.

La secuencia anterior fue comparada en la base de datos de NCBI, en el GeneBank, dando una identidad del 96% con *Trametes hirsuta* y con un basidiomiceto no identificado (Figura 7.101). Las zonas rojas indican la diferencia presentada con respecto a las secuencias reportadas. Se observan inserciones de una a tres bases.

CGGGTAGTCCTACCTGATTTGAGGTGAGATGTTATAAAAAGTTGTCCTAAT	RVAN2
CGGGTAGTCCTACCTGATTTGAGGTGAGATGTTAT-AAAAGTTGTCCTAAT	<i>Trametes hirsuta</i>
CGGGTAGTCCTACCTGATTTGAGGTGAGATGTTATAAAA-TTGTCTAAT	No identificado
CGGGTAGTCCTACCTGATTTGAGGTGAGATGTTATAAAAATTGTCCTAAT	RVAN2
GGACGGTTAGAAGCTCGCCAAAACGCTTCACGGTCACAGCGTAGACAATT	RVAN2
GGACGGTTAGAAGCTCGCCAAAACGCTTCACGGTCACAGCGTAGACAATT	<i>Trametes hirsuta</i>
GGACGGTTAGAAGCTCGCCAAAACGCTTCACGGTCACAGCGTAGACAATT	No identificado
GGACGGTTAGAAGCTCGCCAAAACGCTTCACGGTCACAGCGTAGACAATT	RVAN2
ATCACACTGAGAGCCGATCCGCACGGAATCAAGCTAATGCATTCAAGAGG	RVAN2
ATCACACTGAGAGCCGATCCGCACGGAATCAAGCTAATGCATTCAAGAGG	<i>Trametes hirsuta</i>
ATCACACTGAGAGCCGATCCGCACGGAATCAAGCTAATGCATTCAAGAGG	No identificado
ATCACACTGAGAGCCGATCCGCACGGAATCAAGCTAATGCATTCAAGAGG	RVAN2
AGCCGACCGTTAGGCCAGCAAGCCTCCAAATCCAAGCCCATAGATCACA	RVAN2
AGCCGACCGCTAGGGCCAGCAAGCCTCCAAATCCAAGCCCATAGATCACA	<i>Trametes hirsuta</i>
AGCCGACCGCTAGGGCCAGCAAGCCTCCAAATCCAAGCCCATAGATCACA	No identificado
AGCCGACCGTTAGGCCAGCAAGCCTCCAAATCCAAGCCCATAGATCACA	RVAN2
AGGATTTATGAGTTGAGAATTTTCATGACACTCAAACAGGCATGCTCCTCG	RVAN2
AGGATTTATGAGTTGAGAATTTTCATGACACTCAAACAGGCATGCTCCTCG	<i>Trametes hirsuta</i>
AGGATTTATGAGTTGAGAATTTTCATGACACTCAAACAGGCATGCTCCTCG	No identificado
AGGATTTATGAGTTGAGAATTTTCATGACACTCAAACAGGCATGCTCCTCG	RVAN2
GAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCAGTGAAT	RVAN2
GAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCAGTGAAT	<i>Trametes hirsuta</i>
GAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCAGTGAAT	No identificado
GAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCAGTGAAT	RVAN2
TCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCG	RVAN2
TCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCG	<i>Trametes hirsuta</i>
TCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCG	No identificado
TCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCG	RVAN2

AGAGCCAACAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTATTAAGATGCGTTAGACGCG	RVAN2
AGAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTATTAAGATGCGTTAGACGCG	<i>Trametes hirsuta</i>
AGAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTATTAAGATGCGTTAGACGCG	No identificado
AGAGCCAACAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTATTAAGATGCGTTAGACGCG	RVAN2
TTTACATTCTGATACTTTAAGAGTTTGTAGTGACATAGGCCGGCAGAAT	RVAN2
TTTACATTCTGATACTTTAAGAGTTTGTAGTGACATAGGCCGGCAGAAT	<i>Trametes hirsuta</i>
TTTACATTCTGATACTTTAAGAGTTTGTAGTGACATAGGCCGGCAGAAT	No identificado
TTTACATTCTGATACTTTAAGAGTTTGTAGTGACATAGGCCGGCAGAAT	RVAN2
GCTCCAACCCCGAGGCTAGAAACCCACGCCACGTACCTACAATAAGTG	RVAN2
GCTTCCAACCCCGAGGCTAGAAACCCACGCCA---AC-CTACAGTAAGTG	<i>Trametes hirsuta</i>
GCTTCCAACCCCGAGGCTAGAAACCCACGCCA---AC-CTACAGTAAGTG	No identificado
GCTCCAACCCCGAGGCTAGAAACCCACGCCACGTACCTACAATAAGTG	RVAN2
CACAGGTGTAAGAGTGGATGAGCAGGACGTGCACAAATGC	RVAN2
CACAGG-TGTA-GAGT-GGA-TGAGCAGGGCGTG-CACA-TGC	<i>Trametes hirsuta</i>
CACAGG-TGTA-GAGT-GGA-TGAGCAGGGCGTG-CACA-TGC	No identificado
CACAGGTGTAAGAGTGGATGAGCAGGACGTGCACAAATGC	RVAN2

Figura 7.101.- Comparación de la secuencia de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 con *Trametes hirsuta* y un basidiomiceto no identificado. Las bases diferentes así como las inserciones están resaltadas en rojo.

### 7.9.2 RVAN12

Por otro lado, con respecto a RVAN12, fueron secuenciadas 526 bases (Figura 7.102).

```
GCGGGTAGTCCTACCTGATTTGAGGTCCAGATGTCAAAGTATTGTCCATA
AGGACGGTTTAGAAGCTCGCCAAACGCTTCACGGTCACAGCGTAGACAAT
TATCACACTGAGAGCCGATCCGCACGGAATCAAGCTAATGCATTCAAGAG
GAGCCGACTGACTAGAGCCGGCAAAGCCTCCAAATCCAAGCCCATAGACC
ACAAGGATTTATGGGTTGAGAATTCATGACTCAACAGGCATGCTCC
TCGGAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTGATGATTCCTG
AATTCTGCAATTCACATTAATTCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGAT
GCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTATAAAGATGCGTTAGCA
CGCGTTTACATTTCTGTTACTTTTGTAGTTGTATACATAGGCCGGCAGA
ATGCTTCAAACCCGAAGGCCAAAGCCACGCCACCCGCACAGGGTAGGG
GGATGGGCAAGGTGCACATGCCCTC
```

Figura 7.102.- Secuencia de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 de la cepa RVAN12, dando como resultado 526 bases.

Dicha secuencia fue comparada con la base de datos del GeneBank. En base a estos resultados se determinó que existe una homología del 99% con *Trametes hirsuta* y *Trametes maxima* (Figura 7.104). La secuencia presentó tres inserciones de una base y la diferencia en otra. Debido a la similitud alcanzada con ambas cepas, se comparó la secuencia con las reportadas en la base de datos europea EMBL (Tabla 7.19).

GCGGGTAGTCCTACCTGATTTGAGGTCAGATGTCAAAG-ATTGTCCATA	RVAN12
GCGGGTAGTCCTACCTGATTTGAGGTCAGATGTCAAAG-ATTGTCCATA	<i>Trametes maxima</i>
GCGGGTAGTCCTACCTGATTTGAGGTCAGATGTCAAAG-ATTGTCCATA	<i>Trametes hirsuta</i>
AGGACGG-TTAGAAGCTCGCCAAACGCTTCACGGTCACAGCGTAGACAAT	RVAN12
AGGACGG-TTAGAAGCTCGCCAAACGCTTCACGGTCACAGCGTAGACAAT	<i>Trametes maxima</i>
AGGACGG-TTAGAAGCTCGCCAAACGCTTCACGGTCACAGCGTAGACAAT	<i>Trametes hirsuta</i>
TATCACACTGAGAGCCGATCCGCACGGAATCAAGCTAATGCATTCAAGAG	RVAN12
TATCACACTGAGAGCCGATCCGCACGGAATCAAGCTAATGCATTCAAGAG	<i>Trametes maxima</i>
TATCACACTGAGAGCCGATCCGCACGGAATCAAGCTAATGCATTCAAGAG	<i>Trametes hirsuta</i>
GAGCCGACTGACTAGAGCCGGCAAAGCCTCCAAATCCAAGCCCATAGACC	RVAN12
GAGCCGACTGACTAGAGCCGGCAAAGCCTCCAAATCCAAGCCCATAGACC	<i>Trametes maxima</i>
GAGCCGACTGACTAGAGCCGGCAAAGCCTCCAAATCCAAGCCCATAGACC	<i>Trametes hirsuta</i>
ACAAGGATTTATGGGTTGAGAATTCATGACACTCAAACAGGCATGCTCC	RVAN12
ACAAGGATTTATGGGTTGAGAATTCATGACACTCAAACAGGCATGCTCC	<i>Trametes maxima</i>
ACAAGGATTTATGGGTTGAGAATTCATGACACTCAAACAGGCATGCTCC	<i>Trametes hirsuta</i>
TCGGAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTG	RVAN12
TCGGAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTG	<i>Trametes maxima</i>
TCGGAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTG	<i>Trametes hirsuta</i>
AATTCTGCAATTCACATTA TACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGAT	RVAN12
AATTCTGCAATTCACATTA TACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGAT	<i>Trametes maxima</i>
AATTCTGCAATTCACATTA TACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGAT	<i>Trametes hirsuta</i>
GCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTATAAAGATGCGTTAG- <b>A</b>	RVAN12
GCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTATAAAGATGCGTTAG-A	<i>Trametes maxima</i>
GCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTATAAAGATGCGTTAG-A	<i>Trametes hirsuta</i>
CGCGTTTACATTTCTGTTACTTT <b>T</b> AGTTTGTAGTATACATAGGCCGGCAGA	RVAN12
CGCGTTTACATTTCTGTTACTTTT <b>T</b> GAGTTTGTAGTATACATAGGCCGGCAGA	<i>Trametes maxima</i>
CGCGTTTACATTTCTGTTACTTTT <b>T</b> GAGTTTGTAGTATACATAGGCCGGCAGA	<i>Trametes hirsuta</i>
ATGCTTCAAACCCGAAGGCCCAAAGCCCACGCCA	RVAN12
ATGCTTCAAACCCGAAGGCCCAAAGCCCACGCCA	<i>Trametes maxima</i>
ATGCTTCAAACCCGAAGGCCCAAAGCCCACGCCA	<i>Trametes hirsuta</i>

Figura 7.103.- Comparación de la secuencia de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 con *Trametes hirsuta* y *Trametes maxima*. Las bases diferentes así como las inserciones están resaltadas en rojo.

Tabla 7.19.- Resultados de la comparación con la base de datos EMBL.

<a href="#">DB:ID</a>	<a href="#">Source</a>	<a href="#">Length</a>	<a href="#">Identity%</a>	<a href="#">Similar%</a>	<a href="#">Overlap</a>	<a href="#">E()</a>
<a href="#">EM_FUN:AB158313</a>	<i>Trametes hirsuta</i> genes for	1205	96.104	96.104	539	1.6e-78
<a href="#">EM_FUN:AB158315</a>	<i>Trametes maxima</i> genes for 1	1185	96.104	96.104	539	1.6e-78
<a href="#">EM_FUN:AF461413</a>	Basidiomycete isolate wb436	653	91.128	91.128	541	1e-68
<a href="#">EM_FUN:AY840566</a>	<i>Trametes</i> sp. MGGDL 18S ribo	628	91.128	91.128	541	1.1e-68

Los resultados indicaron que existe un 96% de similitud tanto con *Trametes hirsuta* como con *Trametes maxima*.

## 8. DISCUSIÓN

Existe un enorme interés en el estudio de enzimas lignolíticas debido a la creciente demanda de productos que pueden ser perjudiciales para el ambiente y al mismo tiempo, una mayor conciencia con respecto a un menor daño al mismo. Esta búsqueda no solo está encaminada a encontrar cepas que puedan producir tales enzimas, sino al hecho de que sean eficientes en la degradación de compuestos altamente recalcitrantes y, por otro lado, sean capaces de producir enzimas en cantidad suficiente para ser aplicadas en otros procesos biotecnológicos que requieran cantidades elevadas.

Las cepas aisladas durante el desarrollo del presente trabajo corresponden a basidiomicetos, pues una de las características primarias de tales microorganismos en la presencia de fíbulas o “clamp connection” (Hood, 2006). Aunado a ello, debe ser determinada la capacidad de los hongos aislados, de producir enzimas lignolíticas. Este tipo de enzimas son producidas en su mayor parte de forma extracelular, aunque existen diversos trabajos que indican que pueden estar localizadas intracelularmente, en especial la Lacasa (Schlosser, *et al.*, 1997; Arora y Gill, 2005). En cuanto a la producción extracelular, son diversos los métodos y substratos utilizados para tal efecto, ya sea el uso de lignina Kraft, hasta el uso de ciertos compuestos cromógenos tales como el ABTS, el guaiacol, la O-anisidina e incluso colorantes como el Poly R-478 (Dhouib, *et al.*, 2005), todas estas pruebas son utilizadas como un mecanismo de selección primaria (Dhouib *et al.*, 2005; Osma, *et al.*, 2007). Algunos de los cuales fueron utilizados en el presente trabajo, lo que permitió una selección primaria de las cepas a probar en los dos medios bajo las diferentes condiciones de cultivo. Tales pruebas son realizadas tanto a cepas nativas como aquellas cepas provenientes de colecciones reconocidas internacionalmente. Todos y cada uno de los estudios realizados previamente por los diversos investigadores (Saparrat, *et al.*, 2002; Levin, *et al.*, 2004; Osma, *et al.*, 2007), han encontrado esencialmente actividad de Lacasa así como actividad celulolítica, sin descartar la enorme variabilidad existente entre cepas del mismo género aisladas del mismo lugar (De Koker, *et al.*, 1998).

Por otro lado, *P. chrysosporium*, *B. adusta* y *P. ostreatus* son cepas que se han estudiado ampliamente, no solo por su capacidad para producir enzimas lignolíticas sino también por la capacidad que presentan para la degradación de un sinnúmero de compuestos altamente tóxicos. Sin embargo, no todas ellas son capaces de producir Lacasa, LiP y/o MnP bajo diferentes condiciones de medio de cultivo. Por muchos años se creyó que *P. chrysosporium* era incapaz de producir Lacasa por lo que la oxidación del ABTS puede atribuirse más a la producción de MnP, ya que solo en celulosa como fuente de carbono y/o condiciones represoras, así como en condiciones de cultivo semi-sólido, se ha determinado que es capaz de producirla (Rodríguez, *et al.*, 1997). Sin embargo, estudios recientes han determinado que bajo el efecto de una serie de inductores es sintetizada por *P. chrysosporium* (Gnanamani, *et al.*, 2006), de ahí que se continúe la búsqueda de cepas sobreproductoras.

La producción de enzimas lignolíticas no solo ha sido determinada como sondeo primario en medio sólido, también existen reportes de fermentaciones en medio líquidos, y es este método el más empleado. En este sentido, la diversidad de medios es extensa, los primeros que se probaron aquellos que presentaban baja concentración de carbono y nitrógeno. Esto, debido a que *P. chrysosporium* no es capaz de producir enzimas cuando las concentraciones de carbono y nitrógeno son elevadas. Sin embargo, conforme han pasado los años y se han probado nuevas cepas de basidiomicetos, este concepto ha variado considerablemente; en ese sentido, los medios de cultivo probados son tan diversos como microorganismos se han encontrado. Estos medios de cultivo no solo son aquellos basados en sales, sino también desechos de diversas industrias, los cuales tienen como única finalidad la alta producción de enzimas (Songulashvili, *et al.*, 2006; Songulashvili, *et al.*, 2007). Muchos de estos medios presentan en su composición un alto contenido de nitrógeno, otros por el contrario, llevan trazas de lignina e incluso se han probado desechos de diversas industrias, todo ello encaminado a la producción elevada de enzimas lignolíticas. Es necesario tener presente la cantidad y tipo o fuente de carbono, aunque no está demostrado que exista una relación entre ambas condiciones para garantizar la producción de las enzimas lignolíticas (Hatvani y Mécs, 2002). No solo los nutrientes presentes en el medio tienen un efecto en la síntesis de enzimas lignolíticas, incluso factores tales como el pH así como la temperatura de incubación presenta un efecto, pues diversos investigadores han determinado los hongos incubados entre 25 a 30° C, era óptima para la producción de Lacasa (Arora y Gill, 2000; Pointing, *et al.*, 2000; Vasconcelos, *et al.*, 2000), temperatura seleccionada para llevar a cabo los ensayos tanto en medio sólido como líquido, en el presente trabajo. Por otro lado, la reducción de la actividad enzimática al final de la fermentación podría atribuirse a la acumulación de



compuestos tóxicos que la inhiben y que son producidos durante el metabolismo de los hongos (Rodríguez, *et al.*, 2003).

Los datos obtenidos en el presente estudio, en el cual dos de las cepas nativas (RVAN2 y RVAN12), fueron capaces de producir Lacasa, LiP y MnP en SMM, indica la enorme variabilidad presentada entre las diferentes cepas probadas y ambos medios. Si bien es cierto que existen cepas que pueden alcanzar grandes niveles de actividad enzimática, también es cierto que es vital que estas cepas presenten la capacidad no solo de producir enzimas en cantidad suficiente de modo que sean atractivas; además, deber ser capaces de degradar compuestos altamente tóxicos que aún en la actualidad siguen vertiéndose al medio ambiente e incrementa los riesgos en la salud de la vegetación, la fauna y el ser humano. Además, las enzimas extracelulares Lacasa, LiP y MnP, son producidas por los hongos de pudrición blanca en diferentes combinaciones, siendo la más ampliamente distribuida entre este tipo de hongos la Lacasa y MnP, mientras que la LiP se encuentra presente en menor proporción, lo anterior es similar a lo reportado por otros investigadores, los cuales mencionan que son pocos los hongos que pueden llegar a producir las tres enzimas mencionadas (Rothschild, *et al.*, 2002); y similar a lo encontrado en el presente estudio, donde tanto RVAN2 como RVAN12, fueron capaces de producirla a diversos niveles.

Además, los ensayos realizados con glucosa como fuente de carbono señalaron, que contrario a los reportes existentes, esta fuente de carbono no presentó efecto alguno e incluso a la mayor concentración fue cuando mayor actividad de Lacasa se encontró, esto al menos para una de las cepas (RVAN12). Sin embargo, algunos investigadores señalan que la lacasa se incrementa considerablemente cuando se manejan concentraciones de glucosa superiores a 10 g/L (Krishna Prasad, *et al.*, 2005).

Se encontró que la producción de las enzimas lignolíticas por las cepas nativas, aun tratándose del mismo género, responden de forma diferente a las condiciones de cultivo (medio, composición, etc), resultados similares a lo encontrado por otros investigadores. (Heinfling, *et al.*, 1997; Kachlishvili, *et al.*, 2005; Mikiashvili, *et al.*, 2006). Lo que indica que el sistema enzimático presente en los hongos de pudrición blanca es muy diverso. Además, no solo son capaces de degradar a la lignina, también aquellos compuestos que presenten una estructura similar, debido al amplio rango de especificidad de sustrato, lo que les permite atacar estas estructuras.

Seleccionada la concentración de glucosa, se decidió probar otras fuentes de carbono alternas para tratar de incrementar la actividad enzimática. Adicional a ello, se maneja que la producción se dispara cuando la fuente de carbono es consumida en su totalidad, esto indicó que las respuestas dependerán del microorganismo a ser probado, de

ahí la importancia del trabajo. Los resultados obtenidos en cuanto a fuente de carbono, mostraron que la mejor fuente fue tanto el acetato de sodio y la glucosa, contrario a lo reportado por Revankar y Lele (2007). Ellos definieron la mejor fuente al almidón, ya que este polímero no sólo incrementó la actividad enzimática, incluso aumento considerablemente la capacidad de degradación de colorantes sintéticos. Por otro lado, no solo la concentración de la fuente de carbono presenta efectos tanto benéficos como adversos, también el tipo del mismo favorecerá la síntesis de la Lacasa, pues se ha visto que fuentes orgánicas y su rápida asimilación pueden incrementar la cantidad de enzima producida, en este caso Lacasa (Galhaup, *et al.*, 2002). Contrario a los hallazgos del investigador antes mencionado, la glucosa así como el acetato de sodio (orgánico e inorgánico, respectivamente), favorecieron la síntesis de Lacasa.

Por ello, se decidió probar un medio lo suficientemente complejo que permitiera obtener altos valores en actividad enzimática, basándose en el hecho de que muchos basidiomicetos estudiados responden favorablemente a dicha condición (Songulashvili, *et al.*, 2006). Estos estudios permiten considerar a los hongos de pudrición blanca (basidiomicetos), una alternativa viable para la síntesis de oxidasas y peroxidasas bajo diferentes condiciones de cultivo. Lo anterior fue confirmado por los resultados obtenidos ya que para la misma especie la respuesta fue diferente en medio de harina de soya y en el medio de glucosa; hallazgos similares a los reportados otros investigadores, los cuales indican que un medio rico tanto en nitrógeno como en fuente de carbono favorece la síntesis de Lacasa (Elisashvili, *et al.*, 2008); otros, por el contrario, señalan que un bajo contenido de carbono y nitrógeno favorece dicha síntesis. Esto permitió de forma general, describir los requerimientos fisiológicos para la producción de Lacasa y otras enzimas lignolíticas (LiP y MnP), de las cepas nativas estudiadas, en las cuales fue posible tanto la detección de Lacasa como de LiP y MnP al menos en dos de tres cepas de *Trametes*, contrario a los resultados obtenidos por Jang, *et al.*, (2002), quienes solo detectaron Lacasa como principal fenol oxidasa producida. Esto confirma nuevamente la enorme diversidad que existe con respecto a la producción de las enzimas y como los medios de cultivo utilizados para tal fin influyen considerablemente en la respuesta del microorganismo. Si bien es cierto que el trabajo realizado por Jang, *et al.*, (2002), fue realizado bajo condiciones de alto contenido de nitrógeno, tartrato de amonio, principalmente; un medio de cultivo, que si bien es cierto diferente al utilizado en el presente trabajo, también fue a base de alto contenido de nitrógeno (harina de soya y peptona), la respuesta encontrada durante el transcurso de la fermentación fue diferente a lo reportado por los investigadores previamente señalados.

Además, la mayoría de los reportes señalan que la síntesis de las enzimas lignolíticas se disparan cuando la fuente de carbono empleada es consumida en su totalidad, especialmente LiP y MnP, por lo cual se pensó que dichas condiciones también aplicaban en el caso de la Lacasa, esto no está del todo claro, ya que diversos estudios han mostrado que se presenta un incremento en la producción de Lacasa (Arana-Cuenca, *et al.*, 2004), siendo observado algo similar en el presente estudio. Además, la actividad de Lacasa solamente fue detectada en dos de tres cepas de *Trametes* cuando el medio de cultivo fue a base de minerales (GMM), lo anterior no es de sorprender pues es bien sabido que en diversos trabajos realizados por investigadores como Arana-Cuenca, *et al.*, (2004), mostraron que las especies pertenecientes a la familia *Polyporaceae* no siempre muestran actividad oxidasa extracelular y que el medio de cultivo influye considerablemente para ello. Este comportamiento también fue observado con *P. ostreatus*, microorganismo capaz de producir Lacasa, LiP, MnP, principalmente (Muñoz, *et al.*, 1997), sin embargo al igual que las cepas nativas estudiadas, el medio de cultivo fue un factor importante para detectar o no las enzimas mencionadas.

En cuanto a *P. ostreatus*, la mayoría de los estudios realizados con este microorganismo indican que la producción de lacasa esta relacionada con la biomasa y por lo tanto, se considera que la naturaleza de la enzima es constitutiva (Scheel, *et al.*, 2000; Mansur, *et al.*, 2003); sin embargo, contrario a lo anterior, los resultados obtenidos en el presente trabajo, el microorganismo bajo las condiciones ensayadas, se encontraba en la fase estacionaria del crecimiento. Aunado a ello, la fuente de carbono no fue consumida en su totalidad durante el transcurso de la fermentación. La producción de las enzimas lignolíticas en general están relacionadas a la fase estacionaria de crecimiento, esto puede suceder cuando la fuente de carbono y otros nutrientes han disminuido considerablemente (Cullen, 1997), por lo cual los resultados señalan que posiblemente otros fueron los mecanismos que gobernaron la síntesis de dicha enzima, al menos para el caso de *P. ostreatus*.

Por otro lado, en SMM, medio con alto contenido en nitrógeno y carbono, favoreció considerablemente la síntesis de Lacasa tanto en RVAN2 como en RVAN12, presentando un incremento de 109.4 y 148.7 veces, respectivamente. Lo anterior confirma lo que encontraron Stajić, *et al.*, (2006), quienes determinaron que la naturaleza del medio de cultivo empleado influyen considerablemente en la síntesis de las enzimas lignolíticas, principalmente Lacasa en *P. ostreatus* y *P. pulmonarius*, similar a lo encontrado por Kaal, *et al.*, (1995) y Buswell, *et al.*, (1995), en los cuales los medios adicionados con peptona y condiciones suficientes de nitrógeno incrementaban dicha enzima. Además, el SMM favoreció la síntesis de LiP y MnP, enzimas no detectadas en

el medio de glucosa (GMM). Incluso se ha visto que hongos desarrollados en medios complejos a base de jugo de tomate dan grandes cantidades de Lacasa en comparación al medio a base de azúcares sintéticos, utilizados generalmente para la producción de enzimas lignolíticas (Ullrich, *et al.*, 2005). Algo similar se encontró en un medio formado a partir de semilla de uva, obteniéndose valores ligeramente superiores a los encontrados en el medio de harina de soya, aunque la actividad enzimática a partir del medio de cultivo adicionado con sulfato de cobre sobrepasa dichos valores (63 U/mL de RVAN12), mientras que la cepa de *Trametes hirsuta* probada por Moldes, *et al.*, (2003) produjo 22 U/mL.

No toda la atención ha sido centrada en la búsqueda de cepas nativas sobre-productoras ni en medios de cultivo, también ha sido en el uso de compuestos que presenten un efecto inductor o favorecedor sobre la producción de las enzimas lignolíticas, debido a la enorme aplicabilidad que presentan los basidiomicetos. Tal incremento y/o inducción fue observado con el medio de harina de soya, aun así se probaron diversos compuestos tanto en GMM como en SMM. Se logró un incremento considerable en la actividad enzimática, el sulfato de cobre fue el compuesto que favoreció la producción enzimática de lacasa hasta 694.1 veces con respecto a GMM. Lo anterior está soportado por las investigaciones realizadas por diversos investigadores, como Bourbonnais, *et al.*, (1995) y Mansur, *et al.*, (1998). Ellos encontraron que los hongos de pudrición blanca son influenciados por diversos factores fisiológicos, En ellos, la presencia de diversos compuestos entre ellos los metales, el cobre, cadmio, manganeso, zinc y otros, siendo a bajas concentraciones en donde se logra un incremento en la síntesis de diversas enzimas como la Lacasa, MnP y/o LiP (Baldrian, 2003). Este comportamiento se presentó en GMM, sin embargo, en SMM la mejor respuesta se obtuvo a la mayor concentración. Por otro lado, en el presente trabajo el efecto que presentó el manganeso en la síntesis de Lacasa fue menor al obtenido con el sulfato de cobre en ambos medios de cultivo. Las investigaciones realizadas en tal sentido comenzaron con *P. chrysosporium* dado que era el microorganismo lignolítico por excelencia. Dichas investigaciones determinaron que los inductores juegan un papel significativo en el incremento de enzimas como la Lacasa, aunque en muchas ocasiones el pico máximo se retarda, alargando incluso la fase de crecimiento del microorganismo así como el día en el cual se alcanza la máxima actividad (Songulashvili, *et al.*, 2006).

El cobre ha sido relacionado con la producción de melanina (Zhao y Kwan, 1999) y esta a su vez está supeditada a la presencia de la Lacasa en diversos hongos. Cuando a los cultivos de los hongos utilizados en el presente trabajo, se les adicionó el cobre, estos desarrollaron un micelio café oscuro, a ambas concentraciones, similar a lo reportado por

Galhaup y Haltrich (2001). Otra razón por la cual se piensa que el cobre incrementa la actividad es al hecho de que este metal es un cofactor de la enzima, en la cual se encuentran cuatro iones asociados a una cadena sencilla de polipéptidos y que puede presentar un efecto a nivel de expresión de genes, como se ha visto en muchos hongos lignolíticos.

Finalmente, en hongos como *Trametes pubescens* se determinó que el cobre es necesario para la síntesis de Lacasa mas que para la activación de proteína existente (Collins y Dobs, 1997; Palmieri *et al.*, 2000), lo anterior podría explicar lo sucedido tanto en SMM como en GMM, sin olvidar que en el primero la actividad de Lacasa fue mayor al presentado en el segundo medio mencionado, tanto en presencia como en ausencia de cobre. De igual forma, Cordi, *et al.* (2007), determinó que en cultivos líquidos de *Trametes versicolor*, la cantidad de enzima presente era despreciable en comparación a aquella producida en el medio adicionado con sulfato de cobre, similar a lo encontrado en el presente trabajo, cuando el medio de cultivo fue el GMM. Por otro lado, se ha determinado que la MnP también es favorecida por la presencia de diversos metales como el cadmio y el cobre, como se determinó en estudios de *S. hirsutum* y *P. chrysosporium* (Baldrian, *et al.*, 1996; Mouso, *et al.*, 2003) así como en *Trametes trogii* (Levin, *et al.*, 2002), resultados similares a lo encontrado en el presente trabajo. Es necesario hacer constar que muchos de los ingredientes contenidos en el medio complejo (SMM), han sido evaluados por su capacidad para incrementar la actividad lignolítica, como el Tween.

Las investigaciones no solo han determinado que el cobre presente un efecto inductor en la síntesis de enzimas, también compuestos del tipo aromático han sido estudiados, entre ellos el catecol, ácido gálico, guaiacol, entre otros (Ikehata, *et al.*, 2004), por ello se decidió probar la siringaldazina como un posible inductor de Lacasa y otras enzimas lignolíticas, al tratarse de un mediador específico de la enzima y de un p-fenol. Los resultados obtenidos indicaron el efecto positivo en SMM, no así en GMM. Lo anterior puede deberse a la forma como los hongos responden a las condiciones de cultivo y como en el caso de los estudiados en el presente trabajo, necesitaban condiciones de crecimiento en medios complejos que permitieran la activación de la maquinaria lignolítica en conjunto con los inductores del tipo aromático. Sin embargo, en cepas como *Trametes pubescens*, se ha visto que los compuestos aromáticos no son necesarios para elevar la actividad de Lacasa como ocurre con otras cepas, e incluso afectan de forma negativa dicha producción haciendo que disminuya con respecto al control (Galhaup, *et al.*, 2002). Se ha planteado que la inducción por este tipo de compuestos es debida a la toxicidad que presentan los mismos hacia los hongos, dado que

la Lacasa sirve como un mecanismo de protección polimerizándolos, actuando contra el estrés oxidativo (Xiao, *et al.*, 2004).

Existen diversos estudios señalando que solventes orgánicos, tales como el metanol o el etanol, presentaban la capacidad de incrementar substancialmente la actividad lignolítica en cultivos sumergidos. Los estudios realizados por Lomascolo, *et al.*, (2003), con *Pycnoporus cinnabarinus*, indicaron que la adición de etanol al medio de cultivo, incrementaba considerablemente la producción de Lacasa, aunque inhibiendo de forma paralela el crecimiento del hongo, algo también encontrado por Lee, *et al.*, (1999), el cual alcanza una actividad de 1.9 U/L, comparado con el control. En el primero de los casos se observó un retardo en día de máxima producción de dicha enzima. En nuestro caso, se presentó la inhibición tanto del crecimiento como de la actividad enzimática. Si bien es cierto que no existe una correlación entre el incremento de micelio y la actividad enzimática, también es cierto que en ocasiones la inhibición de dicho crecimiento puede afectar la producción enzimática, lo cual posiblemente sucedió cuando este solvente fue adicionado a los cultivos. Algo similar sucedió en el caso de las otras enzimas lignolíticas.

El manganeso es un metal que se encuentra presente de forma natural en la madera (Papinutti, *et al.*, 2003), muchos de los hongos de pudrición blanca responden de forma favorable a dicha presencia, lo que provoca un incremento en la síntesis de Manganese Peroxidasa e incluso produciendo varias isoformas (Muñoz, *et al.*, 1997; Périé y Gold 1991; Pérez y Jeffries 1992; Bonnarme y Jeffries, 1990). Lo anterior ha motivado al uso de sulfato manganoso como fuente de tal metal en estudios a nivel de laboratorio. En investigaciones previas con *Phanerochaete chrysosporium*, se determinó que la inducción era llevada a cabo a nivel de transcripción. Las cepas nativas estudiadas respondieron favorablemente a la presencia del manganeso en el medio de cultivo; lo anterior fue más evidente en RVAN2 cultivado en SMM. Dichos resultados fueron similares a los encontrados en los estudios realizados con *Trametes versicolor* adicionados con sulfato manganoso aunque presentó un efecto negativo en la síntesis de Lacasa (Swamy y Ramsy, 1999).

Los estudios de estabilidad enzimática fueron realizados por muchos años con enzimas purificadas, sin embargo debido a los altos costos generados en dicha operación, se ha planteado realizarlos con los extractos crudos, ya que está bien establecido que la degradación de diversos compuestos es un proceso multipaso en el cual están involucradas varias enzimas, esto puede favorecer substancialmente la degradación de compuestos altamente tóxicos y por lo tanto eficientizar dicho proceso.

Los extractos crudos responden de forma variable a los factores como temperatura y pH. Por otro lado, las enzimas provenientes de diferentes hongos presentan características muy particulares lo que permite utilizarlas en diversos procesos; incluso dichas diferencias en cuanto a la respuesta se ve para isoformas producidas por el mismo microorganismo (Farnet *et al.*, 2004). Niké-Paavola, *et al.*, (2004), determinó que la Lacasa proveniente de *Peniophora* sp. presentó un tiempo de vida media de 15 min a 70°C; contrario a estos reportes, en el caso de los extractos crudos de las cepas nativas estudiadas, estas presentaron un comportamiento diferente en ambas. Los tiempos de vida media oscilaron de 2.5 a 98 h, dependiendo de las condiciones de cultivo a las cuales fueron sometidos los hongos. Esto los coloca muy por encima de aquellos obtenidos por el trabajo reportado por Niké-Paavola, *et al.* (2004). Mientras que la Lacasa obtenida de cultivos de *Marasmius quercophilus*, fueron estables por más de una hora cuando fueron incubados tanto a 30 como a 40° C (Farnet, *et al.*, 2004).

Los inductores logran incrementar considerablemente la actividad enzimática, sin embargo ello no garantiza que la respuesta que presente a la temperatura sea igual o mejor a la presentada cuando los extractos provienen de cultivos no adicionados con dichos compuestos, lo cual se presentó en el presente trabajo. Por otro lado, debe tenerse presente que los procesos de concentración pueden afectar el comportamiento de los extractos disminuyendo la actividad enzimática de los mismos.

El pH óptimo de la mayoría de las Lacasas producidas por hongos de pudrición blanca se encuentran en valores ácidos (Jordaan y Leukes, 2003; Wang y Ng, 2006) Dicha respuesta es dependiente del tipo de substrato utilizado, ya sea ABTS o siringaldazina. En el caso de este substrato, en Lacasas aisladas y purificadas de hongos pertenecientes a la familia *Chaetomiaceae*, el pH óptimo fue de 7, inactivándose a pH 5.5 (Saito, *et al.*, 2003). Mientras que en el caso de las cepas nativas estudiadas el pH óptimo estuvo alrededor de 2.0, un pH similar a lo reportado para cepas como *Coprinus cinereus* cuando el substrato utilizado fue ABTS (Schnaider, *et al.*, 1999; Ullrich, *et al.*, 2005). Se han hecho algunos estudios con el fin de determinar la diferencia que presentan diversos substratos con respecto al pH y al valor óptimo obtenido. Se determinó que el ABTS, un substrato no fenólico, al ser atacado por la Lacasa y como consecuencia de ello, la generación del radical catiónico no involucra un protón por lo cual es independiente del pH (Xu, *et al.*, 1996). No todas las cepas de basidiomicetos responden de igual forma a este comportamiento, en el caso de las Lacasas producidas por *Phellinus ribis* y ABTS como substrato, el pH óptimo de las mismas presentó un valor de 5 (Min *et al.*, 2001), mas alto comparado a lo obtenido con las cepas nativas estudiadas o con otras reportadas.

La estabilidad al pH resultó muy diferente al pH óptimo. La estabilidad de los extractos crudos se presentó a un valor cercano a la neutralidad. Lo anterior concuerda con diversos estudios realizados previamente (Jaouani, *et al.*, 2005). Se encontró una respuesta similar con *D. querquina* (Baldrian, 2003) y con *Pleurotus sajor-caju*. Los efluentes derivados de la industria textil presentan valores de pH muy ácidos y debido a los resultados obtenidos, indican la posibilidad de usarlos en la detoxificación de esos efluentes.

Al igual que el pH, la temperatura es otro factor importante a ser considerado cuando de enzimas se trata. Algunos investigadores determinaron que las Lacasas provenientes de *Pycnoporus sanguineus* presentaban una temperatura óptima de 50 °C (Lu, *et al.*, 2007) y 65 °C (García, *et al.*, 2006), con ABTS como sustrato. Lo anterior fue ligeramente inferior a lo obtenido con los extractos crudos de RVAN2 (70 °C) y RVAN12 (75 °C). El incremento en la temperatura óptima de las Lacasas puede deberse al desdoblamiento de la estructura proteínica (Van Der Merwe, 2002). Contrario a los resultados obtenidos así como a lo reportado, la Lacasa proveniente de *Phanerochaete flavidobrunnea*, conforme se incrementa la temperatura, la actividad comienza a disminuir considerablemente llegando a un 20% de la actividad a 70° C (Pérez, *et al.*, 1996).

Teniendo presente el gran problema o los dos principales problemas que presentan los efluentes textiles: remoción y degradación, es necesario buscar nuevas alternativas que permitan dichos procesos. En ese sentido y como se ha visto por diversos estudios realizados y los hallazgos del presente estudio, los hongos de pudrición blanca así como las enzimas producidas por ellos, representan una alternativa que puede ser utilizada. El uso de este tipo de hongos es muy amplia debido a la baja especificidad, es decir, al amplio espectro de compuestos que pueden llegar a degradar las enzimas producidas por los hongos de pudrición blanca (Kuhad, *et al.*, 2004), entre este tipo de contaminantes se encuentran compuestos recalcitrantes. Los resultados obtenidos por Sedarati, *et al.*, (2003), indicaron la capacidad que presentó *Trametes versicolor* para la degradación de clorofenoles.

De la misma forma, Joauani, *et al.*, (2005), utilizó *Pycnoporus coccineus* en el tratamiento de aguas residuales derivadas de las plantas de aceite de oliva. Con el fin de determinar si los hongos nativos pueden ser aplicados en diversos procesos industriales, se utilizó la decoloración de RBBR y otros colorantes en medio sólido (Machado, *et al.*, 2005). Tanto con *Trametes hirsuta* como con *P. florida*, se determinó la capacidad que presentaron para producir enzimas lignolíticas bajo diferentes condiciones de cultivo aunado a la presencia de colorantes (Das, *et al.*, 1999; Rodríguez-Couto, *et al.*, 2006; Rosales, *et al.*, 2007). Los primeros estudios de degradación de colorantes comenzaron



con *P. chrysosporium* (Dias, *et al.*, 2003), sin embargo se ha visto que otras especies de hongos son mejores degradadores de colorantes sintéticos, tal como las especies de *P. ostreatus* y *Trametes versicolor*. Incluso los resultados obtenidos en el presente trabajo, indicaron que las cepas nativas fueron más eficientes en la decoloración de los diversos colorantes estudiados en placa a una concentración de 200 pmm (200 mg/L). Esta decoloración puede ser atribuida al complejo enzimático que es capaz de producir el microorganismo cuando está en presencia de este tipo de compuestos, tal como lo determinó previamente Moreira *et al.*, (2004).

Los estudios de degradación de colorantes se ha utilizado como un método de pre-selección de cepas, en el cual los colorantes utilizados son principalmente poly R-478 y/o RBBR (Novotný, *et al.*, 2001) y de esta forma plantear su uso en diversos procesos. Mostrando incluso la capacidad de dichos hongos en la degradación de colorantes en suelo (Novotný, *et al.*, 2001). La diferencia en la decoloración, tiempo y capacidad es dependiente de la estructura del colorante, la especie de hongo y medios de cultivo utilizados. Estudios realizados por Sathiva Moorthi, *et al.*, (2007), con *Trametes hirsuta*, indicaron que los colorantes reactivos fueron decolorados al día 10; mientras que en el presente trabajo, ambas cepas nativas (RVAN2 y RVAN12), mostraron una rápida transformación del RBBR y del naranja de metilo. Sin embargo, en el caso del cristal violeta, colorante del tipo trifenilmetano, en cuya estructura esta presente un grupo quinoide (grupo cromóforo) así como tres grupos dimetilo, pudo originar el retrdo en la degradación y/o transformación de su estructura. Investigaciones previas mostraron que *P. chrysosporium* y su sistema lignolítico fue capaz de degradarlo más del 90% (Bumpus y Brock, 1990).

Así como se han realizado estudios en medio sólido, también se han hecho utlizando la Lacasa purificada para degradar diversos colorantes. Se ha determinado que la transformación da como resultado compuestos no cromóforos (Schliephake, *et al.*, 2000). La evaluación de la capacidad de colorantes con extractos crudos han sido pocos; sin embargo, dado que estos hongos presentan la capacidad de degradar efluentes derivados de la industria textil (D'Souza, *et al.*, 2006), residuos de la industria vitivinícola y del café (Rodríguez, *et al.*, 2003) fotográfica y otras (Han, *et al.*, 2004), se probó cada uno de los extractos provenientes de los cultivos de RVAN2 y RVAN12 del medio de harina de soya. Los resultados obtenidos concordaron con lo obtenido por Yesilada, *et al.*, (1998), en los cuales los extractos crudos fueron capaces de transformar diversos colorantes. Tanto el pH como la temperatura son factores determinantes para lograr la mayor decoloración posible. No todos los extractos crudos son capaces de llevar

a cabo el proceso, posiblemente a que se requiere peróxido de hidrógeno o el sistema productor de dicho compuesto (Vyas y Molitoris, 1995).

Con respecto a la degradación de colorantes en medio líquido, se han evaluado infinidad de especies de hongos desde *Ganoderma* spp (De Souza-Silva, *et al.*, 2005), *P. ostreatus* (Zhao, *et al.*, 2006), *P. chrysosporium* (Asgher, *et al.*, 2006), e incluso deuteromicetos tales como *Pestalotiopsis guepinii* (Nazareno-Saparrat y Hammer, 2006), dicha degradación puede ser llevada a cabo por mecanismo oxidativos como por sistemas alternos, mediante el citocromo P-450. La velocidad en la degradación es variable, como ocurre en medio sólido y dependerá del tipo de microorganismo, las condiciones de cultivo y la naturaleza del colorante estudiado, como ha sido demostrado utilizando a *Phanerochaete chrysosporium* y *Pleurotus sajor-caju*, cuando investigaron la degradación de colorantes tipo azo (Pereira y Durrant, 2001). De igual forma, se ha determinado que la presencia de colorantes activa la maquinaria de síntesis de enzimas lignolíticas, entre ellas Lacasa, como fue observado por D'Souza-Ticlo, *et al.*, (2006), en diversos tipos de efluentes; aunque en los resultados encontrados por Shin (2004), señalan que tanto la Lacasa como la LiP no estaban relacionadas con la decoloración del efluente analizado. Lo anterior es contrario a lo encontrado en el presente trabajo, dado que hubo un incremento substancial en la actividad de Lacasa.

Si bien es cierto que en el medio de harina de soya se obtuvieron las actividades enzimáticas más elevadas, el estudio realizado por Moreira, *et al.*, (2004), encontró que ambos procesos, decoloración y actividad enzimática elevada derivada de un medio de cultivo con alto contenido en nitrógeno, no estarían relacionados. Lo anterior podría ser explicado porque la decoloración podría ser un evento que sucede en cultivos con limitante de substrato, típicamente asociado a la secreción de las enzimas ligninolíticas y que el incremento en la actividad en medios ricos en nitrógeno es debido a una mayor concentración de biomasa derivada de dichas condiciones, aunque como se ha visto en estudios ya mencionados, no existe tampoco una correlación entre la biomasa y la actividad enzimática. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo se observó que hubo una mayor biomasa en SMM que en el medio de glucosa así como una actividad enzimática superior, esto podría corroborar lo expuesto por Moreira, *et al.*, (2004).

Por otro lado y como se observó en los resultados con extracto crudo, si bien es cierto que se obtuvo una remoción de colorante a 50 y 60° C, cercana al 95%, cuando se hicieron los ensayos en el medio de cultivo, la decoloración fue completa. Lo anterior puede indicar que es necesaria la presencia del microorganismo, ya que a pesar de ser alta la actividad tanto de MnP como Lacasa, la decoloración no fue completa; resultados

similares a lo encontrado por Swamy y Ramsay (1999). Sin embargo, existen otros hallazgos que señalan la relación entre los altos niveles de actividad enzimática y la decoloración (Rodríguez, *et al.*, 1999), lo anterior nuevamente indica que la respuesta a la presencia de colorantes así como la dada por los extractos crudos, depende de la procedencia del mismo.

Algunos investigadores han planteado la posibilidad de utilizar la presencia de isoenzimas para identificar hongos pertenecientes a diferentes grupos entre ellos a los basidiomicetos, pues se espera que especies muy relacionadas presenten el mismo perfil, tal como ha sido determinado por Zervakis, *et al.*, (2001). Estos investigadores encontraron que existen diferencias entre individuos pertenecientes a la misma especie y esta diferencia es dependiente del huésped. De la misma forma, Arana-Cuenca, *et al.*, (2004), al estudiar hongos pertenecientes a la familia *Polyporaceae*, específicamente del género *Trametes*, encontró diferencias, lo anterior indicaría que son necesarios estudios más detallados para ser identificadas las cepas. Sin embargo, debe tenerse presente que la presencia de isoenzimas de Lacasa es un evento común entre los hongos de pudrición blanca, detectadas generalmente cuando están en contacto con inductores (Farnet, *et al.*, 2000), tal como fue observado en los resultados obtenidos, en donde en GMM solo se detectó una banda en los extractos crudos de ambos hongos (RVAN2 y RVAN12), mientras que en SMM se detectaron de 2 a 3. Lo anterior es similar a lo reportado para *Pycnoporus cinnabarinus* a partir de un cultivo adicionado con ácido ferúlico (Otterbien, *et al.*, 2000), en el cual se encontraron dos isoenzimas, mientras que en *P. ostreatus*, dependiendo del medio, como lo determino Muñoz *et al.*, (1997); Mansur, *et al.*, (2003) y Palmieri, *et al.*, (1997), se presentaron de 2 a 4 isoenzimas. Similar a lo encontrado en el presente trabajo, cuando los medios se suplementaron con diversos compuestos (inductores o potenciadores), lo que permitió la síntesis de dos a tres isoenzimas. Lo anterior, fue dependiente de la cepa y del medio de cultivo.

Finalmente, existen diversos métodos utilizados para la identificación de microorganismos. En el caso de los basidiomicetos, estos están basados en la morfología del cuerpo fructífero. Sin embargo, la identificación morfológica de los diferentes hongos aislados de la madera es difícil y tediosa, sin considerar que muchos hongos que crecen en dicho sustrato no son cultivables bajo las condiciones de laboratorio (Johannesson y Stenlid, 1999). Además, aquellos hongos de pudrición al ser cultivados en placa petri no producen cuerpos fructíferos que proporcionen las características críticas para la identificación de género, familia y especie (Nobles, 1948).

Por tal razón, en los últimos años se ha optado por herramientas de biología molecular que permitan una identificación real del microorganismo. Las regiones ITS son

utilizadas como blanco para el análisis filogenético, donde la variación de las secuencias entre especies son detectadas, ya que pequeñas variaciones se presentan entre la misma especie (Mitchell, *et al.*, 1992), lo cual permite una identificación certera de los microorganismos analizados. Incluso, diferencias presentadas en la región ITS1 ha sido suficiente para diferenciar entre *Aspergillus* y *Penicillium* (Gaskell, *et al.*, 1997). Dichas regiones están disponibles para la identificación debido a que organismos desconocidos pueden ser identificados a nivel de especie o grupo de especies comparando las secuencias obtenidas con aquellas depositadas en bases de datos electrónicas (Horton y Bruns, 2001).

## 9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- 1.- Se estandarizó la técnica de aislamiento de hongos de pudrición blanca, obteniéndose 23 aislados nativos de diferentes regiones de Nuevo León.
- 2.- Del total de cepas, dos presentaron la mejor oxidación de los substratos en medio sólido, utilizando ABTS, Guaiacol y O-Anisidina.
- 3.- En el medio de glucosa, GMM las mejores cepas fueron RVAN2 y RVAN12, mientras que en el caso de RVAN19 (*S. commune*), no se detectó actividad alguna.
- 4.- Las diferentes concentraciones de glucosa mostraron diferencias altamente significativas con el control, por lo cual se decidió trabajar con 10 g/L, en ambas cepas probadas.
- 5.- La glucosa junto con el acetato, fueron las mejores fuentes de carbono. La síntesis de Lacasa con ambas fuentes de carbono fue similar.
- 6.- El sulfato de cobre 0.5 mM favoreció considerablemente la síntesis de Lacasa, mientras que en el resto de inductores probados mostraron una baja actividad similar a la encontrada en el medio sin la adición de los mismos.
- 7.- De los dos medios de cultivo probados, el medio de harina de soya favoreció considerablemente la síntesis de Lacasa, Ligino Peroxidasa y Manganeso Peroxidasa, siendo mayor en RVAN12 que en la cepa control.
- 8.- A diferencia del medio con glucosa, el sulfato de cobre, incremento más de 4 veces la actividad enzimática de Lacasa en RVAN12, mientras que el sulfato manganeso favoreció a la Manganeso Peroxidasa en RVAN2.
- 9.- La estabilidad de los extractos crudos se vio afectada por la presencia de inductores así como por el proceso de extracción, variando dicha estabilidad de 2 hasta 98 h.
- 10.- El pH óptimo obtenido para la Lacasa tanto de RVAN2 como RVAN12 fue de 2, mientras que para LiP fue de 5, en ambas cepas.
- 11.- Los extractos crudos de RVAN2 fueron más estables a valores superiores a pH 6 después de 24 h de incubación. Mientras que los provenientes de RVAN12, perdieron más del 90% de la actividad después de 24 h a partir de pH 9, tanto para la Lacasa como para la LiP.

- 12.- El incremento de la temperatura provocó un aumento considerable en la actividad de Lacasa y LiP, siendo el óptimo a 60° C para Lacasa y 80° C para LiP, en RVAN2. En el caso de RVAN12, fueron de 70 y de 40-50° C, respectivamente.
- 13.- Ambas cepas, RVAN2 y RVAN12, fueron capaces de degradar colorantes de diferente naturaleza, reactivos, antraquinónicos y tipo azo, en medio sólido, similar a lo reportado para otras cepas.
- 14.- Los extractos crudos obtenidos a partir del medio de harina de soya de ambas cepas, fueron capaces de decolorar el RBBR a pH 3, 6 y 7 y a temperaturas de 50-60° C, de un 85 a 95 %.
- 15.- En los ensayos de decoloración en medio líquido se determinó que el sulfato de cobre no influyó en una mayor velocidad de transformación de colorante, alcanzándose la máxima al día 8. Sin embargo, la presencia del colorante incremento la actividad enzimática con respecto al medio adicionado de inductor, en ambas cepas.
- 16.- En el medio de glucosa se detectaron dos isoenzimas en RVAN2 y una sola banda en RVAN12.
- 17.- La adición de sulfato de cobre, permitió detectar tres isoenzimas, en ambas cepas nativas, tanto en GMM como en SMM.
- 18.- La presencia de RBBR no favoreció la síntesis de isoenzimas en los extractos crudos de RVAN2; sin embargo, la combinación de RBBR y sulfato de cobre, favoreció la síntesis de 3 isoformas. Será necesario determinar si estas son diferentes a las presentadas en el medio solo con sulfato de cobre.
- 19.- La combinación de RBBR y sulfato de cobre, por el contrario, indujeron la síntesis de dos isoenzimas en RVAN12.
- 20.- La secuencia obtenida en el caso de RVAN2 es diferente a las reportadas en el genebank, presentando una homología del 96%, considerando que se trata de una nueva especie.
- 21.- RVAN12 fue identificada como hasta género (*Trametes*), debido a la alta homología que presentó tanto con *Trametes hirsuta* y *Trametes maxima* (99%).

En base a las conclusiones anteriores, se plantean las siguientes recomendaciones:

- 1.- Purificar los extractos crudos obtenidos a partir de los cultivos de ambas cepas, de forma que permitan caracterizar a las enzimas: Lacasa, LiP y MnP.

- 2.- Optimizar la producción de las enzimas mediante el uso de otros compuestos y su combinación, así como otros sustratos que permitan hacer mas atractivos a los hongos de pudrición nativos, aislados en Nuevo León.
- 3.- Utilizar tanto los cultivos como en la degradación de efluentes textiles y otros contaminantes no menos importantes e implementar una estrategia viable que permita disminuir sus efectos al ambiente.
- 4.- Diseñar el proceso mas indicado para la aplicación de los hongos y/o sus extractos crudos a nivel planta piloto.

## 10. LITERATURA CITADA

- Arana-Cuenca A, Roda A, Téllez A, Loera O, Carbajo JM, Terrón MC, González AE. 2004. Comparative analysis of laccase-isozymes patterns of several related *Polyporaceae* species under different culture conditions. *Journal of Basic Microbiology*. 44:79-87.
- Arora DS, and Gill PK. 2005. Production of ligninolytic enzymes by *Phlebia floridensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 21:1021-1028.
- Arora DS, Gill PK. 2000. Laccase production by some white rot fungi under different nutritional conditions. *Bioresource Technology*. 73: 283-285.
- Archibald FS. 1992. Lignin Peroxidase Activity Is Not Important in Biological Bleaching and Delignification of Unbleached Kraft Pulp by *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*. 58:3101-3109.
- Archibald FS. 1992a. A New Assay for Lignin-Type Peroxidase Employing the Dye Azure B. *Applied and Environmental Microbiology*. 58:3110-3116.
- Archibald FS, Bourbonnais R, Jurasek L, Paice MG, Reid ID. 1997. Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. *Journal of Biotechnology*. 53:215-236.
- Asgher M, Shah SAH, Alizard M, Legge RL. 2006. Decolorization of some reactive textile dyes by white rot fungi isolated in Pakistan. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22:89-93.
- Baldrian P, Gabriel J, Nereud F. 1996. Effect of cadmium on the ligninolytic activity of *Stereum hirsutum* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Folia Microbiologica*. 41:363-367.
- Baldrian P. 2003. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*. 32:78-91.
- Bonnarme R, Delattre M, Drover H, Corrieu G, and Asther M. Secretion by *Phanerochaete chrysosporium* in Agitate Vessels: Mechanically Agitated Bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*. 41:440-450.
- Brizuela MA, Garcia L, Pérez L, Mansur M. 1998. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Revista Iberoamericana de Micología*. 15:69-74.



- Bonnarme P, Jeffries TW. 1990. Mn (II) regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. 56:210-217.
- Bourbonnais R, Paice MG, Reid ID, Lanthier P, Yaguchi M. 1995. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Applied and Environmental Microbiology*. 61:1876-1880.
- Bumpus JA, and Aust SD. 1987. Biodegradation of DDT [1,1,1, trichloro-2, 2-bis (4-chlorophenyl) ethane] by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 53:2001-2008.
- Bumpus JA, Brock BJ. 1990. Biodegradation of crystal violet by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 54:1143-1150.
- Buswell JA, Cai Y, Chang S. 1995. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiology Letters*. 128:81-88.
- Camarero S, Sarkan S, Ruíz-Dueñas FJ, Martínez MJ, and Martínez AT. 1999. Description of a Versatile Peroxidase Involved in the Natural Degradation of Lignin That Has Both Manganese Peroxidase and Lignin Peroxidase Substrate Interaction Sites. *Journal of Biological Chemistry*. 274:10324-10330.
- Collins PJ, Dobson AD. 1997. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63:3444-3450.
- Cordi L, Mnussi RC, Freire RS, Duran N. 2007. Fungal laccase: copper induction, semi-purification, immobilization, phenolic effluent treatment and electrochemical measurement. *African Journal of Biotechnology*. 6:1255-1259.
- Cullen D. 1997. Recent advances on the molecular genetic of ligninolytic fungi, *Journal of Biotechnology*. 53:273-289.
- Cullen, D.; Kersten, P.J. 2004. Enzymology and molecular biology of lignin degradation *The Mycota III: biochemistry and molecular biology*. Berlin; Heidelberg : Springer-Verlag, 2004: Pages 249-273.
- Das N, Chakraborty TK, Mukherjee M. 1999. Role of potato extract in extracellular laccase production of *Pleurotus florida*. *Journal of Basic Microbiology*. 39: 299-303.
- Dávila G, Vázquez-Duhalt R. 2006. Enzimas lignolíticas fúngicas para fines ambientales. In: Flores HO, Rendón HE, Velásquez LI, Oria HI (Eds). *Mensaje Bioquímico*. 30:29-55. Disponible: <http://bq.unal.mx/mensajebioquimico>.

- De Souza-Silva CMM, Soares MI, de Oliveira PR. 2005. Ligninolytic enzyme production by *Ganoderma* spp. *Enzyme and Microbial Technology*. 37:324-329.
- D'Souza DT, Tiwari R, Sah AS, Raghukumar. 2006. Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. *Enzyme and Microbial Technology*. 38:504-511.
- D'Souza-Ticlo D, Kumar VA, Mathew M, Raghukumar C. 2006. Effect of nutrient nitrogen on laccase production, its isozyme pattern and effluent decolorization by the fungus NIOCC · 2<sup>a</sup> isolated for mangrove wood. *Indian Journal of Marine Science*. 35:364-372.
- Dhouib A, Hamza M, Zouari H, Mechichi T, H'midi R, Labat R, Martinez MJ Sayadi S. 2005. Autochthonous fungal strains with high lignolytic activities from Tunisian biotypes. *African Journal of Biotechnology*. 4:431-436.
- Dias AA, Bezerra RM, Leos PM, Nazaré Pereira. 2003. *In vivo* and laccase-catalyzed decolourization of xenobiotic azo dyes by a basidiomycetous fungus: characterization of its ligninolytic system. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 19:969-975.
- Edwards SL, Raag R, Wariishi H, and Gold MH. 1993. Crystal Structure of Lignin Peroxidase. *Proceeding Natural Academic Science*. 90:750-754.
- Elisashvili V., Kachlishvili E., Penninckx M. 2008. Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocelluloses-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 35: 1531-1538.
- Farnet AM, Criquet S, Tagger S, Gil G, Le Petit J. 2000. Purification, partial characterization and reactivity with aromatic compounds of two laccases from *Marasmius quercophilus* strain 17. *Canadian Journal of Microbiology*. 46:189-194.
- Farnet AM, Criquer S, Cigna M, Gil G, Ferré E. 2004. Purification of a laccase from *Marasmius quercophilus* induced with ferulic acid: reactivity towards natural and xenobiotic aromatic compounds. 34:549-554.
- Field JA, De Jong E, Feijoo G, and De Bont JAM. 1992. Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by New Isolates of White Rot Fungi. *Applied Environmental Microbiology*. 58:2219-2226.
- Galhaup C, Haltrich D. 2001. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 56:225-232.

- Galhaup C, Wagner H, Hinterstoisser B, Haltrich D. 2002. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology*. 30:529-536.
- Garcia TA, Santiago MF, Ylhoa CJ. 2006. Properties of laccases produced by *Pycnoporus sanguineus* induced by 2,5-xylydine. *Biotechnology letters*. 28:633-636.
- Gaskell GJ, Carter DA, Britton WJ, Tovey ER, Benyon FH, Lovborg U. 1997. Analysis of the internal transcribed spacer regions of ribosomal DNA in common airborne allergenic fungi. *Electrophoresis* 18:1567–1569.
- Gnanamani A, Jayaprakashvel M, Arulmani M, Sadulla S. 2006. Effect of inducers and culturing processes on laccase synthesis in *Phanerochaete chrysosporium* NCIM 1197 and the constitutive expression of laccase siozymes. *Enzyme and Microbial Technology*. 38:1017-1021.
- Grabski AC, Grimek HJ, and Burgess RR. 1998. Immobilization of Manganese Peroxidase from *Lentinula edodes* and its Biocatalytic Generation of Mn<sup>III</sup>-Chelate as a Chemical of Chlorophenols. *Biotechnology and Bioengineering*. 60:204-215.
- Guillen, F, Evans, CS. 1994. Anisaldehyde and Veratraldehyde Acting as Redox Cycling Agents for H<sub>2</sub>O Production by *Pleurotus eryngii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 60:2811-2817.
- Han M-J, Choiand H-T, Song H-G. 2004. Degradation of phenanthrene by *Trametes versicolor* and its laccase. *The Journal of Microbiology*. 42:94-98.
- Hattaka A. 1994. Lignin-modifying Enzymes from Selected White-Rot Fungi: Production and Role in Lignin Degradation. *FEMS Microbiology Reviews*. 13:125-135.
- Hatvani N, Mécs I. 2002. Effect of the nutrient composition on dye decolorisation and extracellular enzyme production by *Lentinus edodes* on solid medium. *Enzyme and Microbial Technology*. 30:381-386.
- Heinfling A, Bergbauer M, Szewzyk U, 1997. Biodegradation and phtalocyanine dyes by *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 48:261-266.
- Hernández Fernaud JR, Marina GA, Vázquez J, Falcón MA. 2005. Production, partial characterization and mass spectrometric studies of the extracellular laccase activity from *Fusarium proliferatum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 70:212-221.
- Herpoël I, Asther M, and Sigoillot JC. 1999. Design and Scale up of a Process for Manganese Peroxidase Production Using the Hyper Secretory Strain

- Phanerochaete chrysosporium* I-4512. Biotechnology and Bioengineering. 65:468-473.
- Higuchi T. 2004. Microbial biodegradation of lignin: role of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase. Proceedings of the Japan Academy. Serie B. 80:204-210.
- Hoegger PJ, Navarro-Gonzalez M, Kilaru S., Hoffmann M, Westbrook E. D., Kües U. 2004. The laccase gene family in *Croprinus cinerea* (*Coprinus cinereus*). Current Genetic. 45:9-18.
- Hood IA. 2006. The mycology of the basidiomycetes. In: Potter K, Rimbawanto A, Beadle C (eds). Heart rot and roor rot in tropical *Acacia* plantations. Proceedings of a workshop held in Yogyakarta, Indonesia, February 7-9.
- Horton TR., Bruns TD. 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. Molecular Ecology. 10:1855-1871.
- Howard RL, Abotsi E, Jansen van Rensburg EL, Howard S. 2003. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. African Journal of Biotechnology 12(2):602-619.
- Ikehata K, Buchanan ID, Smith DW. 2004. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. Journal of Environmental Engineering Science. 3:1-19.
- Jaouani A, Guillén F, Penninckx MJ, Martínez AJ, Martínez MJ. 2005. Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater. Enzyme and Microbial Technology. 36:478-486.
- Johannesson H, Stenlid J. 1999. Molecular identification of wood inhabiting fungi in an unmanaged *Picea abies* forest in Sweden. Forest Ecology and Management. 115:203-211.
- Jordaan J, Leukes. 2003. Isolation of a thermostable laccase with DMAB and MBHT oxidative coupling activity from a mesophilic white rot fungus. Enzyme and Microbial Technology. 33:212-219.
- Joshi DK, and Gold MH. 1993. Degradation of 2, 4, 5-trichlorophenol by the Lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Applied Environmental Microbiology. 59:1779-1785.
- Kaal JEE, Field AJ, Joyce WT. 1995. Increasing ligninolytic enzyme activities in several white-rot Basidiomycetes by nitrogen-sufficient media. Bioresource Technology. 53:133-139.
- Kachlishvili, E., Penninckx, M. J., Tsiklauri, N., Elisashvili, V. 2005. Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under

- solid-state cultivation. *World Journal Microbiology and Biotechnology*. 22:391-397.
- Kornilowicz-Kowalska T, Wrzosek M, Grinalska G., Iglík H, Bancercz R. 2006. Identification and application of a new fungal strain *Bjerkandera adusta* R59 in decolorization of daunomycin wastes. *Enzyme and Microbial Technology*. 38:583-590.
- Krishna Prasad K, Venkata Mohana S, Sreenivas Rao R, Ranjan Pati B, Sarma PN. 2005. Laccase production by *Pleurotus ostreatus* 1804: Optimization of submerged of culture conditions by Taguchi DOE methodology. *Biochemical Engineering Journal*. 24:17-26.
- Kuhad RC, Sood N, Tripathi KK, Singh A, Ward OP. 2004. Developments in microbial methods for the treatment of dye effluents. *Advances in Applied Microbiology*. 56:185-213.
- Leal LH. 1985. La Utilización Microbiológica de Desperdicios Lignocelulósicos. Potenciales y Perspectivas. En *Prospectiva de la Biotecnología en México*. Rodolfo Quintero Ramírez (Compilador). Fundación Javier Barrios Sierra, A. C. Conacyt. pp. 93-97.
- Lee I-Y, Jung KH, Lee C-H, Park Y-H. 1999. Enhanced production of laccase in *Trametes versicolor* by the addition of ethanol. *Biotechnology Letters*. 21:965-968.
- Levin L, Forchiassin F, Ramos AM. 2002. Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Mycologia*. 94:377-383.
- Lomascolo A, Redord E, Herpöel-Gimbert I, Delattre M, Robert JL, Georis J, Dauvrin T, Sigoillot J-C, Asther M. 2003. Overproduction of laccase by monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* using ethanol as inducer. *Journal of Applied Microbiology*. 94:618-624.
- Lu L, Zhao M, Zhang B-B, Yu S-Y, Bian X-J, Wang y. 2007. Purification and characterization of laccase from *Pycnoporus sanguineus* and decolorization of an anthraquinone dye by the enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74:1232-1239.
- Machado KGM, MAtheus DR, Bononi VRL. 2005. Ligninolytic enzymes production and remazol brilliant blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. *Brazilian Journal of Microbiology*. 36:246-252.
- Mansur M, Suárez T, González AE. 1998. Differential gene expression in the laccase gene family from basidiomycete I-62 (CECT 20197). *Applied and Environment Microbiology*. 64:771-774.

- Mansur M, Arias ME, Copa-Patiño JL, Flärdh M, Gonzalez AE. 2003. The white-rot fungus *Pleorotus ostreatus* secretes laccase isoenzymes with different substrate specificities. *Mycologia*. 95:1013-1020.
- Martinez AT, Speranza M, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martinez MJ, Gutierrez A, Del Rio JC. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*. 8:195-204.
- Mikiashvili N, Wasser SP, Nevo E, Elisashvili V. 2006. Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleorotus ostreatus* lignolytic enzyme activity. *World Journal Microbiology and Biotechnology*. 22:999-1002.
- Miller GL, 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31:426-428.
- Min K-L, Kim Y-H, Kim YW, Jung HS, Hah YC. 2001. Characterization of a novel laccase produced by the wood-rooting fungus *Phellinus ribis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 392: 279-286.
- Mitchell TG, White TJ, Taylor JW. 1992. Comparison of 5.8S ribosomal DNA sequencers among the basidiomycetous yeast genera *Cystofilobasidium*, *Filobasidium* and *Filobasidiella*. *Journal Medical Veterinary Mycology*. 30:207–218.
- Moldes D, Gallego PP, Rodríguez-Couto S, Sanromán A. 2003. Grape seeds: the best lignocellulosic waste to produce laccase by solid state cultures of *Trametes hirsuta*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 25:491-495.
- Moreira MT, Feijoo G, Palma C, and Lema JM. 1997. Continuous Production of Manganese Peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* Immobilized on Polyurethane Foam in a Pulsed Packed-Bed Bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 56:131-137.
- Moreira MT, Viacava C, Vidal G. 2004. Fed-batch decolorization of Poly R-478 by *Trametes versicolor*. *Brazilian Archives of Biology and Technology. An International Journal*. 47:179-183.
- Mouso N, Papinutti L, Forchiassin. 2003. Efecto combinado del cobre y pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de Lacasa y Manganese Peroxidasa por *Stereum hirsutum* (Willd) Pers. *Revista Iberoamericana de Micología*. 20:176-178.
- Muñoz C, Gillen F, Martinez TA, Martinez JM. 1997. Induction and characterization of laccase in the lignolytic fungus *Pleorotus eryngii*. *Current Microbiology*. 34:1-5.

- Muñoz C, Guillén F, Martínez TA, Martínez JM. 1997. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn<sup>2+</sup> oxidation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 63:2166-2174.
- Nazareno-Saparrat MC, Hammer Elke. 2006. Decolorization of synthetic dyes by the deuteromycete *Pestalotiopsis guepinii* CLPS no. 786 strain. *Journal of Basic Microbiology*. 46:28-33.
- Niladevi KN, Prema P. 2005. Mangrove actinomycetes as the source of ligninolytic enzymes. *Actinomycetologica*. 19:40-47.
- Niku-Paavola M-L, Fagerström R, Kruus K, Viikari L. 2004. Thermostable laccases produced by a white-rot fungus from *Peniophora* species. *Enzyme and Microbial Technology*. 35:100-102.
- Nobles MK. 1948. Studies in forest pathology VI. Identification of cultures of wood-rotting fungi. *Canadian Journal of Forest Research*. 26:281-431.
- Novortý C, Rawal B, Bhatt M, Patel M, Šašec V, Molitoris HP. 2001. Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. *Journal of Biotechnology*. 89: 113-122.
- Ohkuma M, Maeda Y, Johjima T, Kudo T. 2001. Lignin degradation and roles of white rot fungi: Study on an efficient symbiotic system in fungus growing termites and its application to bioremediation. *Riken Review*. 42:39-42.
- O'Malley DM, Whetten R, Bao W, Chen CL, Sederoff RR. 1993. The role of laccase in lignification. *The Plant Journal*. 45:751-757.
- Osma J, Osma JF, Rodríguez CS, Toca HJL. 2007. Poly R-478 and ABTS oxidation by the white-rot fungus *Trametes pubescens* on agar plates. Abstracts. *Journal of Biotechnology*. 131S:S229.
- Otterbien L, Record E, Chereau D, Herpöel I, Asther M, Moukha SM. 2000. Isolation of a new laccase isoform from the white-rot fungi *Pycnoporus cinnabarinus* strain ss3. *Canadian Journal of Microbiology*. 46:759-763.
- Paice MG, Bernier R, and Jurasek L. 1988. Viscosity-Enhancing Bleaching of Hardwood Kraft Pulp with Xylanase from a Cloned Gene. *Biotechnology and Bioengineering*. 32:235-239.
- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Scaloni A, Capasso A, Sannia G. 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal Biological Chemistry*. 272:31301-31307.

- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Fontanella B, Sannia G. 2000. Copper induction of laccase isoenzymes in the lignolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:920-924.
- Papinutti VL, Diorio LA, Forchiassin. 2003. Degradación de madera de álamo por *Fomes sclerodermeus*: producción de enzimas lignolíticas en aserrín de álamo y cedro. *Revista Iberoamericana de Microbiología*. 20:16-20.
- Pereira CE, Durrant LR. 2001. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. *Enzyme and Microbial Technology*. 29:473-477.
- Perez J, Jeffries TW. 1992. Roles of manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 58:2402-2409.
- Pérez J, Martínez J, de la Rubia T. 1996. Purification and partial characterization of a laccase from the white rot fungus *Phanerochaete flavido-alba*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:4263-4267.
- Pérez J, Muñoz-Dorado J, de la Rubia T, Martínez J. 2003. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: and overview. *International Microbiology*. 5:53-63.
- Péirié PH, Gold MH. 1991. Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white-rot fungus *Dichomitus squalens*. *Applied and Environmental Microbiology*. 57:2240-2245.
- Pointing SB, Jones EBG, Vrijmoed LLP. 2000. Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture. *Mycologia*. 92:139-144.
- Revankar MD, Lele SS. 2007. Synthetic dye decolorization by white rot fungus, *Ganoderma* sp. WR-1. *Bioresource Technology*. 98:775-780.
- Rodríguez CS, Santoro R, Cameselle C, Sanromán A. 1997. Laccase production in semi-solid cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology*. 19:995-998.
- Rodríguez-Couto S, Rodríguez A, Paterson RRM, Lima N, Teixeira JA. 2006. Laccase activity from the fungus *Trametes hirsuta* using an air-lift bioreactor. *Letters in Applied Microbiology*. 42:612-616.
- Rodríguez E, Oickard MA, Vazquez-Duhalt R. 1999. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Current Microbiology*. 38:27-32.
- Rodríguez S, Fernández M, Bermúdez RC, Morris H. 2003. Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus* spp. *Revista Iberoamericana de Micología*. 20:164-166.



- Rosales E, Rodríguez Couto S, Sanromán MA. 2007. Increased laccase production by *Trametes hirsuta* grown on ground orange peelings. *Enzyme and Microbial Technology*. 40:1286-1290.
- Rothschild N, Novotný C, Šásek V, Dosoretz CG. 2002. Ligninolytic enzymes of the fungus *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*): Isolation and characterization of lignin peroxidase. *Enzyme and Microbial Technology*. 31:627-633.
- Ruckenstein E, and Wang X. 1994. Production of Lignin Peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* Immobilized on Porous Poly (Styrene-Divinylbenzene) Carrier and its Application to the Degrading of 2-Chlorophenol. *Biotechnology and Bioengineering*. 44:79-86.
- Saito T, Hong P, Kato K, Okazaki M, Inagaki H, Maeda S, Yokogawa Y. 2003. Purification and characterization of an extracellular laccase of a fungus (family Chaetomiaceae) isolated from soil. *Enzyme and Microbial Technology*. 33:520-526.
- Sathiya Moorthi P, Periyar Selvam S, Sasikalaveni A, Murugesan K, Kalaichelvan PT. 2007. Decolorization of textile dyes and their effluents using white rot fungi. *African Journal of Biotechnology*. 6:424-429.
- Scheel T, Höfer M, Ludwig S, Hölker U. 2000. Differential expression of manganese peroxidase in white-rot fungi in the presence of manganese aromatic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 54:686-691.
- Schliephake K, Mainwaring DE, Lonergan GT, Jones IK, Baker WL. 2000. Transformation and degradation of disazo dye Chicago Sky Blue by a purified laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Enzyme and Microbiology Technology*. 27:100-107.
- Schlosser D, Grey R, Fritsche W. 1997. Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor* distribution of extra- and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose wheat straw and beech wood. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 47:412-418.
- Schneider P, Caspersen MB, Mondorf K, Halkier T, Skov LK, Øtergaard PR, Brown KM, Brown SH, Hu F. 1999. Characterization of a *Corpinus cinereus* laccase. *Enzyme and Microbial Technology*. 25:502-508.
- Sedarati MR, Keshavarz T, Leontievsky, Evans CS. 2003. Transformation of high concentrations of chlorophenols by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor* immobilized on nylon mesh. *Electronic Journal of Biotechnology*. 6: 105-114. Disponible <http://www.ejbiotechnology.info/content/voll6/issue2/full/7>.

- Shin K-S. 2004. The role of enzymes produced by white-rot fungus *Irpex lacteus* in the decolorization of the textile industry effluent. *The Journal of Microbiology*. 42:37-41.
- Songulashvili G, Elisashvili V, Wasser S, Nevo E, Hadar Y. 2006. Laccase and manganese peroxidase activities of *Phellinus robustus* and *Ganoderma adspersum* grown on food industry wastes in submerged fermentation. *Biotechnology Letters*. 28:1425-1429.
- Songulashvili G, Elisashvili V, Wasser SP, Nevo E, Hadar Y. 2007. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. *Enzyme and Microbial Technology*. 41:57-61.
- Stajić M, Persky L, Friesem D, Hadar Y, Wasser SP, Nevo E, Vukojević. 2006. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme and Microbial Technology*. 38:65-73.
- Swamy N, Ramsay JA. 1999. Effects of  $Mn^{2+}$  and  $NH_4$  concentrations on laccase and manganese peroxidase production and Amaranth decolorization by *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51:391-396.
- Ullrich R, Houg LM, Dung NL, Hofrichter M. 2005. Laccase from the medicinal mushroom *Agaricus blazei*: production, purification and characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 67:357-363.
- Van Der Merwe JJ. 2002. *Production of laccase by the white-rot fungus Pycnoporus sanguineus*. Thesis (MSc). University of the Free State, Bloemfontein, South Africa. Disponible en [http://etd.uovs.ac.za/cgi-bin/ETD-browse/view\\_etd?URN=etd-02172004-154321](http://etd.uovs.ac.za/cgi-bin/ETD-browse/view_etd?URN=etd-02172004-154321).
- Vasconcelos AF, Barbosa AM, Dekker RFH, Scarminio IS, Rezende MI. 2000. Optimization of laccase production by *Botruospaeria* sp. In the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. *Process Biochemistry*. 35:1131-1138.
- Vyas MRB, Molitoris PH. 1995. Involvement of an extracellular  $H_2O_2$ -dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleorotus ostreatus* in the decolorization of Remazol Brilliant Blue R. *Applied and Environment Microbiology*. 61:3919-3927.
- Wang HX, Ng TB. 2006. Purification of a laccase from fruiting bodies of the mushroom *Pleorotus eryngii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 69:521-525.
- Wariishi H, Valli K, Gold MH, 1992. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biological Chemistry*. 267:23668-23695.

- Whiteley CG, Lee D-J. 2006. Enzyme technology and biological remediation. *Enzyme and Microbial Technology*. 38:291-316.
- Xiao YZ, Chen Q, Hang J, Shi YY, Wu J, Hong YZ, Wang YP. 2004. Selective induction, purification and characterization of a laccase isozyme from the basidiomycete *Trametes* sp. AH28-2. *Mycologia*. 96:25-36.
- Xu F, Shin W, Brown SH, Wahleitner JA, Sundaram UM, Solomon EI. 1996. A study of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1292:303-311.
- Yeşilada Ö, Turkey M, Özcan B, Turkey H. 1998. Decolorization of Orange II dye with crude culture filtrate of white rot fungus, *Coriolus versicolor*. *Trends Journal of Biology*. 22:463-476.
- Zervakis GI, Enturella G, Papadopoulou K. 2001. Genetic polymorphism and taxonomic infrastructure of the *Pleurotus eryngii* species-complex as determined by RAPD analysis, isozyme profiles and ecomorphological characters. *Microbiology*. 147:3183-3194.
- Zhao J, Kwan HS. 1999. Characterization, molecular cloning, and differential expression analysis of laccase genes from the edible mushroom *Lentinula edodes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:4908-4913.
- Zhao X, Hardin IR, Hwang H-M. 2006. Biodegradation of a model azo disperse dye by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 57:1-6.

## **RESUMEN CURRICULAR**

Ma. Guadalupe Rojas Verde

Candidato para el Grado de  
Doctor en Ciencias con Especialidad en Biotecnología

Tesis: **PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNOLÍTICAS POR HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA, AISLADOS EN NUEVO LEÓN**

Campo de Estudio: Biotecnología Ambiental

Datos Personales: Nacida en Rioverde, San Luis Potosí el 25 de Enero de 1972,  
Hija de Claudio Rojas Torres y Ma. Guadalupe Verde Reséndiz

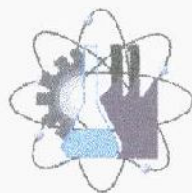
Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, grado obtenido Ingeniero en Alimentos en 1998.  
Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Maestro en Ciencias con Especialidad en Microbiología, en 2000.

Experiencia Profesional: Investigador no Docente de Tiempo Completo en la Universidad Autónoma de Nuevo León, de Enero del 2005 a Agosto del 2006 y de Septiembre del 2007 a la fecha.  
Maestro por horas en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, de Enero del 2005 a Junio del 2005.

# La Ingeniería Química en México, 2008



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



AMIQ  
Academia Mexicana de Investigación y  
Docencia en Ingeniería Química

© Universidad Autónoma del Estado de Morelos  
© AMIDIQ  
ISBN 978-968-878-6



Vol. 1 Biotecnología	páginas: 1 – 250
Vol. 2 Catálisis	páginas: 1 – 262
Vol. 3 Educación	páginas: 1 – 176
Vol. 4 Fenómenos de Transporte	páginas: 1 – 195
Vol. 5 Ingeniería Ambiental	páginas: 1 – 415
Vol. 6 Ingeniería de Alimentos	páginas: 1 – 361
Vol. 7 Ingeniería de Procesos	páginas: 1 – 546
Vol. 8 Ingeniería de Materiales	páginas: 1 – 376
Vol. 9 Polímeros	páginas: 1 – 227
Vol. 10 Simulación y Control	páginas: 1 – 618
Vol. 11 Termodinámica	páginas: 1 – 193

## BIO-38

PRODUCCIÓN DE CELULASAS POR BASIDIOMICETOS AISLADOS EN  
NUEVO LEÓNG. Rojas Verde<sup>a</sup>, E. Alemán Huerta<sup>a</sup>, M. S. Flores González<sup>a</sup>, O. Loera Corral<sup>b</sup>,  
K. Arévalo Niño<sup>a\*</sup><sup>a</sup> Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Pedro de Alba Esq. Manuel L. Barragan S/N, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N. L. C. P. 66451, Nuevo León, México<sup>b</sup> Depto. de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa\* [karevalo@fcb.uanl.mx](mailto:karevalo@fcb.uanl.mx)

**Resumen:** Los desechos derivados de la industria forestal son fuente natural de celulosa con potencial de ser utilizados en la producción de etanol, sin embargo el tratamiento al que deben ser sometidos en base al contenido de lignina suelen ser drásticos, lo que ha limitado su uso extensivo. Los hongos de pudrición blanca pueden producir tanto enzimas lignolíticas como celulolíticas, por lo que a partir de una colección de cepas nativas se realizó una selección, en medio sólido en placa. A partir del medio sólido se seleccionaron 6 cepas, nativas y dos de referencia. Los resultados en medio líquido indicaron mayor producción de endoglucanasas en las cepas nativas, con 39, 32 y 28 mg de glucosa/mg de proteína en *Trametes villosa*, RVAN12 y CC2, respectivamente. Mientras que en el caso de xilanasas, fueron las cepas de colección, *Phanerochaete chrysosporium* y *Pleurotus ostreatus*, las que presentaron la mayor actividad con 80 y 158 mg xilosa/mg proteína, respectivamente. Estudios previos indican que *Trametes villosa*, RVAN12 y CC2 son capaces de producir además de endoglucanasas, lacasa, lo que las convierte en candidatos potenciales para ser utilizadas en el tratamiento de desechos forestales que permitan la obtención de los azúcares fermentables.

The waste generated by the forest product industry is a natural source of cellulose with a potential of being utilized in the production of ethanol; however, the treatment to which it must undergo, based on its lignin content, tends to be drastic, which has limited its extensive use. White-rot fungi can produce lignolytic as well as cellulolytic enzymes; therefore, through a collection of native strains in solid medium plates, a selection of 6 native strains and 2 reference strains was conducted. The results in liquid medium indicated a greater production of endoglucanases by the native strains, with 39, 32, and 28 mg of glucose/mg of protein in *Trametes villosa*, RVAN12 and CC2, respectively. While in the case of the production of xylanases it was the reference strains *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus ostreatus* which presented higher activity, with 80 and 158 mg xilosa/mg protein, respectively. Previous studies indicate that *Trametes villosa*, RVAN12 and CC2 are capable of producing laccase besides endoglucanases which makes them potential candidates for their use in the treatment of the forest waste, which would allow for the extraction of fermentable sugars later.

**Palabras clave:**

Hongos de pudrición blanca, producción de endoglucanasas, lacasa, selección

**Key words:**

White-rot fungi, endoglucanases production, laccase, screening



## INTRODUCCION

Debido a que los desechos forestales son abundantes en la naturaleza y una fuente renovable, se ha propuesto convertir estos en glucosa y esta última, mediante métodos químicos o fermentativos, en productos tales como etanol (Chen y col., 2007). Sin embargo, la conversión más prometedora de ellas continúa siendo vía hidrólisis enzimática, debido al alto rendimiento, por lo cual la aplicación de enzimas sigue siendo un proceso costoso por los tratamientos de purificación requeridos para estas moléculas (Solomon y col., 1997). Este proceso es llevado a cabo de manera natural por diversos microorganismos mediante la síntesis de diversas enzimas específicas, denominadas celulasas, las cuales actúan de forma sinérgica, compuestas por endoglucanasas (EC 3.2.1.4), que hidrolizan los enlaces internos en las cadenas de la celulosa y actúan principalmente en las partes amorfas de la misma; exoglucanasas (EC 3.2.1.91), hidrolizan a partir del final de la cadena, dando como resultado la celobiosa, así mismo es capaz de degradar la celulosa cristalina. De igual forma son requeridas las  $\beta$ -glucosidasas, que hidrolizan la celobiosa producida por la acción de las exoglucanasas.

Este sistema de enzimas celulolíticas ha sido poco estudiado en los hongos de pudrición blanca, siendo los ascomicetos y deuteromicetos en los cuales se han llevado a cabo la mayoría de las investigaciones (Stutzenberger, 1971). Destaca dentro de los basidiomicetos *P. chrysosporium* e *Ischnoderma resinorum*. En los ensayos realizados con el primero se ha determinado que el sistema presente es muy similar al encontrado en los ascomicetos y deuteromicetos. Las enzimas responsables de la degradación de la celulosa son inducibles por el sustrato y reprimidas por los productos derivados de tal acción. Sin embargo, en algunos hongos de pudrición oscura, las endoglucanasas están expresadas de forma constitutiva y no son reprimidas catabólicamente por la glucosa.

En basidiomicetos tales como *P. chrysosporium*, estos llevan a cabo la degradación de todos los componentes de celulosa y hemicelulosa. Las hidrolasas glucosiladas, reflejan directamente la prioridad del organismo para la degradación de la madera mediante las enzimas extracelulares (Martínez *et al*, 2005). La degradación sistemática de la celulosa y hemicelulosa por este basidiomiceto, después de la degradación completa de la lignina, muestra que el hongo puede sentir la fuente de carbohidratos celular. La secreción de enzimas extracelulares es un proceso consumidor de energía. La regulación permite la síntesis de enzimas específicas que pueden degradar los polímeros de las plantas como una fuente de energía y carbono (Aro *et al* 2005). La expresión de las enzimas degradativas al mismo tiempo, es posible debido a la complejidad de la pared celular.

Debido a lo anterior, a la creciente demanda en combustibles más amigables con el medio ambiente y al agotamiento de los recursos no renovables, se propuso el estudiar la capacidad de los hongos de pudrición blanca, cepas nativas aisladas

en Nuevo León y depositadas en la Colección del Instituto de Biotecnología, para producir además de enzimas lignolíticas, enzimas celulolíticas con el fin de usarlas en el aprovechamiento de recursos renovables como los desechos derivados de la industria forestal.

## METODOLOGIA

**Microorganismos.** Los hongos utilizados en el presente trabajo forman parte de la colección depositada en el Instituto de Biotecnología/FCB de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Dichos hongos son conservados en agar dextrosa y papa (PDA, marca Difco), a 4° C, resemebrándose periódicamente.

**Ensayo en medio sólido.** El medio de cultivo utilizado fue un medio a base de minerales, cuyo contenido por litro fue: extracto de levadura, 1.0 g (Difco); Carboximetil-celulosa, 10 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 g; KCl, 0.5 g; solución mineral, 1.0 mL ( $\text{B}_4\text{O}_7\text{Na}_2 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , 100 mg;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 10 mg;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 10 mg;  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 10 mg; por litro), agar bacteriológico, 10 g (Difco). Todos los reactivos fueron grado analítico marca Sigma (Sigma-Aldrich, México). El pH se ajustó a 5.5 y se esterilizó el medio a 121° C por 15 min. Se inocularon las placas, por duplicado, con fragmentos de micelio (5 mm de diámetro), incubándose a 30° C por espacio de 15 días, observándose el crecimiento diariamente.

**Evaluación en medio líquido.** El ensayo fue llevado a cabo en medio mineral-glucosa, presentando la misma composición que el utilizado para su evaluación en medio sólido, sin la adición de agar bacteriológico, sin embargo la carboximetil-celulosa fue substituida por glucosa en la misma concentración (Sigma-Aldrich, México). El pH se ajustó a 5.5 y se esterilizó el medio a 121° C por 15 min. Los matraces se incubaron en un shaker orbital (Labconco), a 150 rpm y 30° C, durante 14 días. Se tomaron alícuotas cada 40 h y se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 min. La determinación de las actividades endoglucanasa (1,4-β-D-glucan-4-glucanohidrolasa, EC 3.2.1.4) y xilasa (endo 1,4-β-D-xilanasasa, EC 3.2.1.8) se determinaron utilizando CMC al 1% y birch Wood xylan a la misma concentración, preparado en buffer de citrato de sodio (50 mM, pH 6.0), respectivamente. La mezcla de reacción contenía cantidades iguales de enzima diluida y el sustrato se incubó a 50 C por 60 y 15 min, respectivamente. La reacción se detuvo mediante la adición de DNS, seguido de ebullición (Determinación de azúcares reductores, Miller 1959), la reacción fue monitoreada mediante el cambio de absorbancia a 540nm, en un espectrofotómetro Beckman DU 650. La cantidad de azúcares liberados fueron cuantificados utilizando glucosa y xilosa como estándar, respectivamente.

**Determinación de proteína.** El contenido de proteína fue determinado utilizando el método de Bradford, usando albúmina de suero bovino como estándar (Sigma-Aldrich, México).



**Zimogramas.** La actividad endoglucanasa será detectada mediante la realización de zimogramas. Posterior a la electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturizante, los geles serán incubados en buffer de acetato de sodio 50 mM, pH 6, durante 30 minutos y sobre puesto en un gel de poliacrilamida con CMC al 0.5%, durante 30 min a 50° C. Pasado el tiempo, el gel será removido y teñido con una solución de rojo Congo al 0.2%. Posteriormente, el gel será destechado con una solución de NaCl 1M seguido de un tratamiento con una solución de ácido acético al 10% (v/v) (Jatinder y col., 2006).

Los valores son el promedio del duplicado de tres ensayos totalmente independientes.

## RESULTADOS Y DISCUSION

La degradación de desechos celulósicos por enzimas fúngicas es una alternativa viable para la conversión de los derivados lignocelulósicos en azúcares fermentables y etanol (Szengyel et al; 2000). Sin embargo, es necesario seleccionar aquellos hongos capaces no solo de degradar la celulosa, sino también ataquen la lignina permitiendo que la primera se encuentre disponible al ataque de las enzimas específicas.

En ese sentido, se realizaron ensayos de selección en medio sólido, encontrándose que del total de 27 cepas, 8 cepas fueron capaces de crecer en el medio sólido, pertenecientes a los géneros de *Polyporus* (CH1, CH12), *Trametes* sp. (RVAN2, RVAN12, *Trametes villosa*) una cepa no identificada (CC2) y dos cepas de referencia (*Pleurotus ostreatus* ATCC 58053 y *Phanerochaete chrysosporium*), (Figura 1). Este tipo de ensayos son ampliamente utilizados, no solo con la finalidad de determinar si un microorganismo dado es capaz de producir celulasas, sino también otro tipo de enzimas como las lignolíticas, cambiando solo sustrato de interés (Saparrat y col., 2000; Ramírez y Coña, 2003).



Figura 1.- Crecimiento en Agar Mineral-CMC, incubado a 30° C por 15 días.

Trabajos previos indican que los hongos bajo estudio también presentan la capacidad de producir enzimas lignolíticas específicamente lacasa (Rojas-Verde y col., 2006).

Los resultados obtenidos al ser determinada la actividad celulolítica, indicaron que existieron diferencias en todas las cepas ensayadas, incluyendo a las dos de referencia. En el caso de las endoglucanasas, *Trametes villosa*, una de las cepas aisladas en la región mostró ser la mayor productora con 39 mg xilosa/mg proteína, mientras que *P. ostreatus*, mostró la menor actividad con 9 mg xilosa/mg de proteína (Figura 2). Estas diferencias encontradas confirman lo determinado por diversos investigadores en los cuales indican que el medio de cultivo, las condiciones de crecimiento así como la naturaleza del microorganismo, influye significativamente en la producción de diversos metabolitos (Jatinder y col., 2006).

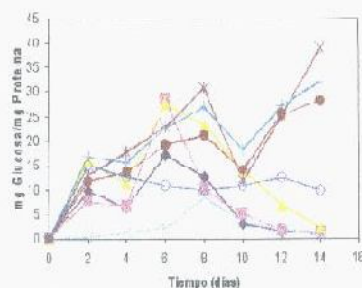


Figura 2.- Producción de endoglucanasas en medio CMC. —♦—, CH1; ■—, CH12; —▲—, RVAN2; —●—, CC2; —\*—, *Trametes villosa*; —X—, *Pleurotus ostreatus*; —+—, RVAN12; —○—, *Phanerochaete chrysosporium*.

El microorganismo más ampliamente utilizado en los diversos estudios para la producción de celulasas (endo y exoglucanasas) ha sido *Thricoderma reesei*, obteniéndose valores de 74 UI/mL (Muthuvelayudham y Viruthagiri, 2006). Sin embargo, una de las principales ventajas que presentan los hongos de pudrición blanca, como las utilizadas en el presente estudio, es la capacidad para sintetizar no solo celulasas, sino también enzimas lignolíticas, lo cual permitiría la degradación de la lignina presente en los residuos forestales, reduciendo los costos derivados del tratamiento dado para hacer más disponible la celulosa y de este modo, obtener azúcares fermentables derivados del tratamiento dado a dicho sustrato.

Por otro lado, no solo las endoglucanasas y exoglucanasas son las responsables de la obtención de azúcares fermentables a partir de residuos lignocelulósicos. Las xilanasas con las responsables de la degradación del xilano presente en las paredes celulares de plantas y en la pulpa del árbol, atrapando este polímero a la lignina (Paice y col., 1988; Wong y col., 1997).

Son varios los microorganismos que producen una o varias de los enzimas antes mencionados, destacando *Trametes versicolor* (Archibald, 1992), un basidiomiceto localizado en las raíces de muchas plantas, así como *Phanerochaete chrysosporium*, perteneciente a una familia de hongos causante de podredumbre

de las raíces de los árboles (Grabski y col., 1998). Lo anterior fue confirmado con los resultados obtenidos, en los cuales se determinó que los hongos nativos así como las cepas de referencia, *Phanerochaete chrysosporium* y *Pleurotus ostreatus* fueron capaces de dicha síntesis. Siendo la mayor productora *Pleurotus ostreatus* con 160 mg glucosa/mg proteína, mientras que de las cepas nativas, la mayor productora fue CH12 y RVAN2 con 80 mg glucosa/mg proteína (Figura 3).

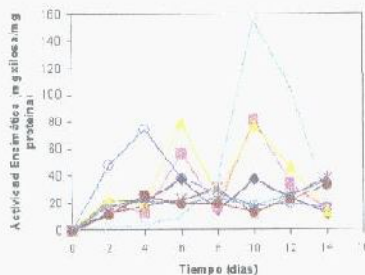


Figura 3.- Producción de xilanasas en medio CMC. —◆—, CH1; —■—, CH12; —▲—, RVAN2; —□—, CC2; —+—, *Trametes villosa*; —x—, *Pleurotus ostreatus*; —†—, RVAN12; —■—, *Phanerochaete chrysosporium*.

Se observó una banda prolongada durante toda la cinética enzimática, lo anterior puede indicar que dicha actividad celulolítica de CC2 está dada por enzimas constitutivas o bien por una enzima inducible por la fuente de carbono; la cual está presente de manera constante en el hongo, señalando que bajo tales condiciones de crecimiento no hubo síntesis de isoenzimas (Figura 4).



Figura 4.- Gel en condiciones no desnaturizantes de los extractos crudos de CC2.

Al igual que el resto de metabolitos producidos por los microorganismos, las celulasas y xilanasas, su síntesis está sujeta a diversos mecanismos de regulación, inducción y represión. Por ello, la diversidad de medios de cultivo que permitan una mayor producción de las mismas.



Muchos estudios, por otro lado, se realizan en sustrato sólido (Jatinder y col., 2006). Sin embargo, Los ensayos en medio líquidos son necesarios para confirmar la capacidad de producción de las enzimas de interés.

#### CONCLUSIONES

Los hongos estudiados presentaron la capacidad de producir endoglucanasas y xilanasas, haciendo posible el uso de los mismos en el tratamiento de residuos lignocelulósicos. Además, pueden sintetizar enzimas lignolíticas, que permitirán hacer más disponible a la celulosa evitando los tratamientos químicos severos que limitan el aprovechamiento de tales residuos. Lo anterior dará como consecuencia la posibilidad de obtener azúcares fermentables y su posterior transformación en productos tales como el etanol, entre otros.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Archibald, F. S. (1992). A new assay for lignin-type peroxidase employing the dye azure B. *Appl. Environ. Microbiol.* (58):3110-3116.
- Aro, N., Pakula, T., and Penttila, M. (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev.* (29): 719-739.
- Chen H. Z., Xu J., and Li Z. H. (2007). Temperature cycling to improve the ethanol production with solid state simultaneous saccharification and fermentation. *Appl. Biochem. Microbiol.* (43): 57-60.
- Grabski A. C., Grimek H. J., and Burguess R. R. (1998). Immobilization of Manganese Peroxidase from *Lentinula edodes* and its biocatalytic generation of Mn<sup>II</sup>-chelate as a chemical of chlorophenols. *Biotech. and Bioeng.* (60):204-215.
- Jatinder K, Chadha B. S, and Saini H. S. (2006). Optimization of medium components for production of cellulases by *Molanocarpus* sp. MTCC 3922 under solid-state fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* (22): 15-22.
- Martinez A. T., Speranza M, Ruiz-Dueñas F. J., Ferreira P., Camarero S., Guillén F., Martinez M. J., Gutierrez A., Del Rio J. C. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Intl. Microbiol.* (8): 195-204.
- Muthuvelayudham, R., and Viruthagiri, T. (2006). Fermentative production and kinetics of cellulase protein on *Trichoderma reesei* using sugarcane babasse and rice straw. *African J. Biotechnol.* (5): 1873-1881.
- Paice, M. G., Bernier R. Jr., and Jurasek, L. (1988). Viscosity-enhancing bleaching of hardwood kraft pulp with xylanase from a cloned gene. *Biotechnol. Bioeng.* (32):235-239.

Ramírez P., y Coña J. M. (2003). Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. *Rev. Peru Biol.* (10): 67-77.

Rojas-Verde G., Salazar A. R. Y., Loera C. O., Arévalo N. K. (2006). Estudio de oxidasas y peroxidasas producidas por basidiomicetos nativos. V Congreso Internacional y XI Congreso Nacional de Ciencias Ambientales: Memorias. ISBN 968-878-265-3

Saparrat M. C. N., Martínez M. J., Cabello M. N., Arrambarri A. M. (2002). Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strains from Argentina isolated from different substrata. *Rev. Iberoam. Micol.* (19): 181-185.

Solomon B. O., Amigun B., Betiku E., Ojumu T. V., Layokun S. K. (1997). Optimization of cellulase production by *Aspergillus flavus* Linn isolate NSPR101 grown on bagasse. *J. Niger Soc. Chem. Eng.* (16): 61-68.

Stutzenberger F. J. (1971). Cellulase production by *Thermospora curvata* isolated from municipal solid waste compost. *Appl. Microbiol.* (22): 147-152.

Wong, K. K. Y., Martin A. Gama F. M., and Saddler J. N. (1997). Bleach boosting and direct brightening by multiple xylanase treatments during peroxide bleaching of kraft pulp. *Biotechnol. Bioeng.* (54):312-318.



Volume 131, Issue 2S, September 2007

ISSN 0168-1656

# Journal of BIOTECHNOLOGY

## Symbiosis

Science, Industry & Society

13TH EUROPEAN CONGRESS  
ON BIOTECHNOLOGY  
BARCELONA, SPAIN  
16-19 SEPTEMBER, 2007

[www.ecb13.eu](http://www.ecb13.eu)

[www.elsevier.com/locate/jbiotec](http://www.elsevier.com/locate/jbiotec)



# Journal of BIOTECHNOLOGY

## Chief Editor

A. PÜHLER,  
Universität Bielefeld,  
Universitätsstraße 25, D-33615  
Bielefeld, Germany  
Tel.: +49 521 1065607  
Fax: +49 521 1065628

## Regional Editor Japan

T. Imanaka, Kyoto, Japan

## Associate Editors

**Physiology/Biochemistry:**  
H. Schwab, Graz, Austria

**Nucleic Acids/Molecular Biology:**  
H. Blöcker, Braunschweig, Germany

**Biochemical Engineering/  
Bioprocess Engineering:**  
E. Srien, St. Paul, MN, USA  
J. Seo, Seoul, Korea

**Industrial Processes/New Products:**  
M.J.T. Carrondo, Oeiras, Portugal

**Medical Biotechnology:**  
M. Fussenegger, Zurich, Switzerland

**Agro- and Food Biotechnology:**  
M. Leimer, Vienna, Austria

## AIMS AND SCOPE

The Journal provides a medium for the rapid publication of both full-length articles and short communications on all aspects of biotechnology. The Journal will accept papers ranging from genetic or molecular biological positions to those covering biochemical, chemical or bioprocess engineering aspects as well as computer application of new software concepts, provided that in each case the material is directly relevant to biotechnological systems. Papers presenting information of a multidisciplinary nature that would not be suitable for publication in a journal devoted to a single discipline, are particularly welcome. The following is an outline of the areas covered by the Journal:

**Nucleic Acids/Molecular Biology:** Novel contributions in the general area of Nucleic Acids/Molecular Biology will be considered. This includes studies for the physical and functional characterization of genomes, studies on the expression of genomic information in cellular and cell-free systems, the development and application of technologies for the detection of single molecules and molecular interactions (molecular recognition), the development and application of strategies towards the identification of biotechnologically interesting new compounds via chemical synthesis (combinatorial strategies in particular), molecular design and evolution, as well as molecular bioinformatics. The development of automated systems for the above mentioned fields may be of particular interest.

**Physiology/Biochemistry:** This section covers biochemical and physiological studies of metabolism and enzymes as relevant to product formation including intermediary metabolism of micro-organisms, tissue culture cells and cell-free systems; bioregulatory investigations at the molecular level including transcription/translation control and growth/product-synthesis relationships; design and engineering of products by molecular strategies with emphasis on protein/enzyme engineering and modification; quality improvement of non-protein products; engineering of cellular modification and transport systems such as post-translational protein modifications as well as protein and metabolite secretion; novel (molecular) strategies of screening for new or modified products (e.g. pharmaceuticals, bioactive compounds, enzymes) including applications based on directed evolution and combinatorial strategies.

**Biochemical Engineering/Bioprocess Engineering:** This section includes studies on transport phenomena, reaction kinetics, design of reactors, downstream operations and software applications as well as research on cellular biology and physiology in biochemical processes employing enzymes, micro-organisms, mammalian cells, plant cells and tissue. Of special interest is the rational manipulation of reactions through metabolic engineering techniques, the design of specific biocatalysts, or specific reactor operations that lead to biomaterials with unique properties. The use of a quantitative framework for the description of the processes to enhance the understanding of the experimental data is encouraged.

**Industrial Processes/New Products:** Articles describing the design, simulation, experimental testing/validation and economic evaluation of novel processes using biotechnological approaches, their products or devices constitute the area of interest of this section. Papers dealing with biologically based process integration with clear rational approaches to design and evaluation are particularly welcome; similarly, products and devices should be interpreted in the broadest sense and use or integrate different technologies, as long as the core technology and/or the design rationale are biologically or biochemically based.

**Medical Biotechnology:** Manuscripts submitted for the *Medical Biotechnology* section are expected to put current progress in life sciences and life technologies into therapeutic perspective. *Medical Biotechnology* is covering pioneering activities related to molecular diagnostics and drug discovery, genetic and protein-based vaccines, gene therapy, tissue engineering, stem cell biology, cancer markers and therapeutics, drugs and drug targets for treatment of human pathologies, metabolic and infectious diseases and molecular characterization of viral, bacterial and parasitic infections.

**Agro- and Food Biotechnology:** Manuscripts in this section should focus on current or novel crop plants and domesticated animal species or contribute substantially to the improvement of their performance. Conservation and utilization of biodiversity, development of tools contributing to marker assisted breeding, improved transformation approaches, introduction of novel traits and contributions to unravel host-pathogen interactions to improve pest control are of particular interest. Issues related to IPRs, nutritional aspects concerned by improved quantification assays and control measures for desirable or undesirable compounds and issues related to food safety should also be addressed in this section.

Ⓢ The paper used in this publication meets the requirements of ANSI/NISO Z39.48-1992 (Permanence of Paper).

### 70. Lignolytic enzyme production and RBBR decolorization by native white rot fungi

Guadalupe Rojas-Verde, Ruby Yarisol Salazar-Alpuche, Benito Pereyra-Alferez, Luis Galán-Wong, Katiushka Arévalo-Niño\*

Instituto de Biotecnología, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Mexico

Due to low biodegradability of dyes by conventional biological wastewater treatment, it is usually treated by physical or chemical processes. Although in recent years the findings are promissory, the searching continue and are focused in basidiomycetes because some evidence suggest that white rot fungi might be potential tools for remediation, and are currently being studied for their ability to degrade and transform different industrial chromophores (Zhao et al., 2006), due their capability to produce several enzymes, laccase, lignin peroxidase, manganese peroxidase and others. A simple and rapid method to select fungi with lignolytic activity is the use of synthetic dyes that are similar to the lignin polymer. The anthraquinone-based Reinzol Brilliant Blue R, an industrial important dye was used in this study. Native white rot fungi, isolated in Nuevo Leon, three belonging to *Trametes* sp. (RVAN2, RVAN12, RVAN18), and the fourth *Schizophyllum commune* (RVAN19), were analyze for their lignolytic enzyme production and RBBR decolorization capability. Three collection strains were used as control (*Phanerochaete chrysosporium* ATCC 2472, *Pleurotus ostreatus* ATCC 58053 and *Bjerkandera ulusta* UAMH8258). The strains were growth in solid basal media added with 200 mg/L of dye. The strains with positive decolorization results were evaluated for lignolytic enzyme production in same liquid basal media. After that, the effect of different carbon source was evaluated (acetate, cellulose, kraft lignin and starch). The results showed an RBBR decolorization by RVAN12, RVAN12 and RVAN18 after 6 days, whereas not changes were observed in RVAN19 at the same time. By the other side, the control strains showed a less decolorization degree by *P. ostreatus* and *B. ulusta*, while in *P. chrysosporium*, not evidence of dye decolorization was observed at 6th day. The lignolytic enzyme production in basal media showed that RVAN2 and RVAN12 were two- and four-folds more than RVAN18. In different carbon sources, both strains (RVAN2 and RVAN12), produce laccase to except in kraft lignin; the values ranging between 11.6–47.4 and 63.3–98.9 IU/L, respectively. The better carbon source were glucose (RVAN2) and glucose and acetate (RVAN12), while LiP and MnP were not detected in all carbon sources tested. Due there are several reports indicating that high nitrogen content enhance the lignolytic enzyme production in this kind of fungi, a soy meal media was tested. In this media, not only laccase, in addition LiP and MnP were produced with 5100–13400, 150–460 and 130–170 IU/L, respectively. Finally, the crude extract of RVAN2 and RVAN12, at day of maximum laccase activity in high nitrogen content media showed a 94.7–96% of decolorization of 200 mg/L of dye solution, after 15 min. The carbon source has not affect in laccase production. In addition, the native strains were more capable to decolorize

the RBBR than control strains. The high nitrogen content media enhance the lignolytic enzyme, laccase, LiP and MnP, as well as the crude extract has a high decolorization degree of RBBR. Is well know that enzymatic production is affected by growing condition and kind of nutrients present in media, several reports says that in media supplemented with high nitrogen allowed high titers of enzymes (Scheel et al., 2000). Due operating conditions (dye concentration, pH and temperature), may negatively effect the decolorization potential of growing cells (Fu and Viraraghavan, 2001), the results showed the promissory use of crude extract produced by this basidiomycetes, in bioremediation of textile effluent and this may be a cheap and efficient method for decolorization because this crude extract could be stored for indeterminate time.

### References

- Fu, Y., Viraraghavan, T., 2001. Fungal decolorization of dye wastewater: a review. *Bioreour Technol.* 79, 251–262.  
 Scheel, T., Häter, M., Ludwig, S., Höbker, V., 2000. Differential expression of manganese peroxidase and Lac in white rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 686–691.  
 Zhao, X., Hardin, J.A., Hwang, H.M., 2006. Biodegradation of a model azo dye by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Int. Biode. Biodeg.* 57, 1–6.

doi:10.1016/j.jbiotec.2007.07.900

### 71.

#### Biodegradation of polyurethane foams modified by carboxymethyl cellulose by several bacteria

Ivana Marova\*, Stanislav Obruca, Vladimír Ondruška, Jana Hrdličková, Jan David, Lucey Vojtova, Josef Janecar

Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Brno, Czech Republic

In order to avoid environmental pollution by non-degradable polymer waste dump, new biodegradable flexible polyurethane (BIO-PU) foams as well as BIO-PU elastomers modified by natural materials with a controlled period of decomposition were prepared with respect to their microbial degradation.

Carboxymethyl cellulose at concentration of 1, 5, 10, 20, 30 and 40% of was used as bio-polyol partially replacing commercial polyether polyol in the polyurethane synthesis. Both BIO-PU foams and BIO-PU elastomers will be prepared from the identical raw materials except the blowing agent (water). BIO-PU samples were studied with respect to their chemical, morphological and physical properties followed by microbial degradation.

Single bacterial cultures of *Arthrobacter globiformis* and *Comamonas acidovorans* as well as mixed culture of thermophilic bacteria were used for biodegradation of modified BIO-PU. First, cultivation of *A. globiformis* and *C. acidovorans* cells and production of biomass in defined synthetic medium was optimized. Mixed thermophilic aerobic bacteria (mainly *Bacillus* sp. and *Thermus* sp.) culture was originally obtained from sludge of wastewater treatment (Dysfické pod Hostýncm). The waste medium was simulated by synthetic lactose substrate.





Universidad Nacional Autónoma de México



Universidad Autónoma de Tlaxcala



Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares

REV. INT. CONTAM. AMBIENT.

VOLUMEN 21

REVista INTernacional



*CONTAMinación*

*AMBIENTal*

(INTERNATIONAL JOURNAL OF ENVIRONMENTAL POLLUTION)

SUPLEMENTO 1

ISSN – 0188-4999

2005



Universidad Veracruzana



Instituto Politécnico Nacional



*Universidad de Quintana Roo*

REV. INT. CONTAM. AMBIENT.

VOLUMEN 21

REVista INTernacional

de

*CONTAMinación*

*AMBIENTal*

(INTERNATIONAL JOURNAL OF ENVIRONMENTAL POLLUTION)

SUPLEMENTO 1

ISSN - 0188-1999

2005

*X Congreso Nacional y IV Internacional  
de Ciencias Ambientales*

6, 9 y 10 de junio, Chetumal, Q. Roo

<p>UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA</p> <p>Rector <i>Mtro. Santino Lecnel Leiza Sánchez</i>          Secretario Académico <i>Dr. Serafín Ortiz Ortiz</i>          Secretario de Investigación Científica  <i>M.V.Z. Abasco Salazar Lozano</i>          Secretario Técnico <i>Mtro. Victor Job Paredes Cuchquenter</i>          Secretario Administrativo <i>C.P. Primo José Cruz</i>          Secretario de Extensión Universitaria y Difusión Cultural  <i>Ida. Efrén Ortiz Tamaras</i>          Coordinador del Centro de Investigación en Genética y Ambiente  <i>Dr. Pedro Rafael Valencia Quintan</i></p>	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO</p> <p>RECTOR <i>Dr. Juan Ramón de la Fuente Santrez</i>          SECRETARIO GENERAL <i>Dr. Enrique del Val Blanco</i>          SECRETARIO ADMINISTRATIVO <i>Dr. Daniel Barrera Pérez</i>          ABOGADO GENERAL <i>Mtro. Jorge Palas López</i>          COORDINADOR DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA  <i>Dr. René Erucker Colón</i></p>
<p>INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL</p> <p>Director General <i>Dr. José Enrique Villa Rivera</i>          Secretario General <i>Dr. Efrén Parada Arias</i>          Secretario Académico <i>M. en C. José Madrid Flores</i>          Secretario de Apoyo académico <i>Ing. Manuel Quintana Quintero</i>          Secretaria de Administración <i>C. P. Raúl Sánchez Anguiles</i>          Secretario Técnico <i>Dr. Isidro Alberto Rodríguez Casas</i>          Coordinador General de Posgrado e Investigación  <i>Dr. Luis Humberto Banda Treviño</i></p>	<p>INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES</p> <p>Director General <i>M.C. Raúl Ortiz Magaña</i>          Secretario Técnico <i>Dr. Julián Sánchez Cuatrecasas</i>          Director de Investigación Científica  <i>Dr. Luis Carlos Longoria Córdova</i>          Director de Investigación Tecnológica  <i>M.C. Lydia Paredes Gutiérrez</i>          Director de Servicios Tecnológicos <i>Ing. Walter Fanzel Uribe</i>          Director de Administración <i>M.A. Hernán Rico Méndez</i></p>
<p>UNIVERSIDAD VERACRUZANA</p> <p>Rector <i>Dr. Raúl Arias Lovillo</i>          Secretario Académico <i>Mtra. Ida del Pilar Velasco Jiménez Ledo</i>          Contralor General <i>C.P. Luis Ferragrosa Armentia</i>          Secretario de Administración y Finanzas <i>C.P. Eliza Álvarez Vélez</i></p>	
<p>REVISTA INTERNACIONAL de CONTAMINACIÓN AMBIENTAL  <i>Consejo Editorial/Editorial Board</i></p>	
<p><i>Boo-Gore Aler</i>, Centro de Investigación del Ambiente y la Salud, Neuchâtel, Alemania  <i>Aramando P. Bata</i>, Centro de Ciencias de la Atmósfera, Universidad Nacional Autónoma de México  <i>Miguel Rodríguez-García</i>, Dirección de Investigación Científica, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares  <i>Alfonso V. Botello</i>, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México  <i>Frank M. Euteneier</i>, Institute for River Research International, Rochester, EUA  <i>Barbara J. Finlayson</i>, University of California, Irvine, EUA  <i>Alfonso L. de Garay</i>, Centro de Investigaciones en Genética y Ambiente, Universidad Autónoma de Tlaxcala  <i>Tomás Giebeler</i>, Institute for Experimental Botany, República Checa  <i>Ulrich Graf</i>, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Suiza  <i>William F. Grant</i>, McGill University, Montreal, Canadá  <i>Margarita E. Gutiérrez-Roa</i>, Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México  <i>James M. Pitts Jr.</i>, University of California, Irvine, EUA</p>	<p><i>Michael J. Plewa</i>, Institute for Environmental Studies, University of Illinois, EUA  <i>Javier Reyes-Luján</i>, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares  <i>Irma Rojas-Pérez</i>, Centro de Ciencias de la Atmósfera, Universidad Nacional Autónoma de México  <i>Harold E. Schlöberg Jr.</i>, Biocontrol Co. Port Sanilac, Michigan, EUA  <i>Stefan Waliszewski</i>, Instituto de Medicina Forense, Universidad Veracruzana  <i>Stanley Zimmerman</i>, Brown University, Rhode Island, EUA</p> <p>Claudio M. Amescua-García, ASESOR EDITORIAL          Sandra Gómez-Arroyo, Centro de Ciencias de la Atmósfera, Universidad Nacional Autónoma de México, EDITORA ASOCIADA          Rafael Villalobos Pierrini          EDITOR          Revista Internacional de Contaminación Ambiental,          Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM          Coyoacán 04510 D.F. México          Tel. (52) 5556 714077          correo electrónico/e-mail: <a href="mailto:rvp@atmosfera.unam.mx">rvp@atmosfera.unam.mx</a></p>
<p>Tarifa de Suscripción por volumen (4 números) Subscription Rates per volume (4 numbers):          Institucional/Institutional USD 72.00, persona/private USD 52.00</p>	
<p>La Revista Internacional de Contaminación Ambiental es una publicación trimestral patrocinada por la Universidad Autónoma de Tlaxcala, La Universidad Veracruzana, El Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, el Instituto Politécnico Nacional, y el Programa Universitario de Medio Ambiente de la Universidad Nacional Autónoma de México. Número de Reserva de Título ante el Instituto Nacional de Derechos de Autor 04-2030-090711582900-102. Certificado de Libertad de Título y Certificado de Libertad de Contenido en trámite.</p>	

**DIRECTORIO DE LA UQROO**

**Dr. Francisco Javier Rosado May**  
Rector

**M.C. Ildefonso Palmón Hernández Silva**  
Secretario General

**M.C. María Lourdes Castillo Villanueva**  
Directora de la División de Ciencias e Ingeniería

**Comité Científico del Congreso**

**Presidentes**

**Rafael Villalobos Pietrini**  
(SNI-III)

y

**Sandra Gómez Arroyo**  
(SNI-II)

**Revisores**

**Ma. Laura Ortiz Hernández**  
**Enrique Sánchez Salinas**  
(Morelos)

**Antonio Aranda Regalado**  
**Miguel Ángel Rico Rodríguez**  
(Querétaro)

**Gunther Geissler**  
**Miguel Ángel Valera Pérez**  
(Puebla)

**Laura Sanpedro Rosas**  
(Guerrero)

**Gerardo Sánchez Rojas**  
**Alberto José Gordillo Martínez**  
(Hidalgo)

**José Mariano Montiel González**  
**Pedro Rafael Valencia Quintana**  
(Tlaxcala)



## BIOTRANSFORMACIÓN DE COLORANTES SINTÉTICOS POR HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA NATIVOS

Rojas V. M. G., De Luna S. E. J., Arévalo N. K.

Unidad de Microbiología Industrial, Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León

Pedro de Alba Esq. Manuel L. Berragán, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, N. L. Tel. y Fax: 81-83294110 Ext. 6415. E-mail: [karevalo@ccr.dsi.uanl.mx](mailto:karevalo@ccr.dsi.uanl.mx)

( X ) Cartel Temática: Tecnología Ambiental

Grandes cantidades de colorantes son utilizados en diversidad de industrias, entre las que destaca la textil. Los tratamientos físicos y químicos utilizados para la remoción de los colorantes son muy efectivos sin embargo, presentan un costo elevado. Por otro lado, la biodegradación ha resultado ser un método alternativo, cuyo costo de aplicación es menor, aunque presenta algunas desventajas como la generación de aminas aromáticas bajo condiciones anaeróbicas, que pueden llegar a ser más tóxicas que los compuestos iniciales. En los últimos años, se han estudiado los hongos de pudrición blanca, que producen una serie de enzimas, lacasa, lignino peroxidasa, manganeso peroxidasa, principalmente, capaces de degradar diversos compuestos debido a la baja especificidad que presentan, tales como los colorantes (Cripps, C. *et al*, 1990). En base a ello, el objetivo fue estudiar la capacidad decolorativa en medio sólido, de hongos de pudrición blanca, denominados M2, M12, CC1 y CC2, aislados de algunas regiones de Nuevo León. Los colorantes utilizados fueron naranja de metilo (azo), cristal violeta (trianilmetano) y RBBR (antraquinónico) a 10, 50 y 100ppm. Se inocularon fragmentos de micelio y se incubaron por espacio de 3 semanas, midiéndose el crecimiento radial y halo de decoloración cada 24 horas. A 10 ppm, todas las cepas fueron capaces de transformar los tres colorantes probados. Algo similar ocurrió a 50ppm, aunque el cristal violeta fue decolorado en un mayor tiempo, siendo la cepa CC1 la más lenta para ello. A 100 ppm, el naranja de metilo fue decolorado entre los días 5 a 8; el cristal violeta fue decolorado totalmente por M12 y CC2, mientras que CC1 y M2 lo decoloró parcialmente. En el caso del RBBR este fue transformado totalmente por las cuatro cepas estudiadas. Se probaron extractos crudos de cultivos líquidos de M2 y M12, obteniéndose resultados muy similares a los generados en medio sólido. Estos hongos seleccionados producen enzimas, las cuales han sido capaces de decolorar y oxidar distintos compuestos contaminantes, tales como los colorantes sintéticos. En base a ello, es factible el uso de los mismos para el tratamiento de efluentes derivados de la industria textil, implementando una metodología que permita efficientizar y mejorar en un momento dado las técnicas utilizadas en la actualidad. Sin embargo, es necesario continuar con la investigación utilizando un mayor número de colorantes principalmente los aplicados en la industria textil.

### BIBLIOGRAFÍA

Cripps, C., Bumpus, J. A., Aust, S. D. 1990. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1114-1118.

### AGRADECIMIENTOS

Proyecto Paicyt CN884-04

Conacyt

## BIOTRANSFORMACIÓN DE COLORANTES SINTÉTICOS POR HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA NATIVOS

Rojas V. M. G., De Luna S. E. J., Arévalo N. K.

Unidad de Microbiología Industrial, Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León  
Pedro de Alba Esq. Manuel L. Barragán, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, N. L. Tel. y Fax: 81-83294110 Ext. 6415. E-mail: [karevalo@ccr.uisi.unl.mx](mailto:karevalo@ccr.uisi.unl.mx), [grojasverde@gmail.com](mailto:grojasverde@gmail.com)

### RESUMEN

Los tratamientos físicos y químicos utilizados para la remoción de los colorantes liberados son muy efectivos, sin embargo presentan un costo elevado. En los últimos años, se han estudiado los hongos de pudrición blanca, que producen una serie de enzimas denominadas lignolíticas, capaces de degradar diversos compuestos por la baja especificidad que presentan, entre ellos los colorantes. A 10 ppm, todas las cepas fueron capaces de transformar los tres colorantes probados. Algo similar ocurrió a 50 ppm, aunque el cristal violeta fue decolorado en un mayor tiempo, siendo la cepa CC1 la más lenta para ello. A 100 ppm, el naranja de metilo fue decolorado entre los días 5 a 8; el cristal violeta fue decolorado totalmente por M12 y CC2, mientras que CC1 y M2 lo decoloraron parcialmente. En el caso del RBBR, este fue transformado totalmente por las cuatro cepas estudiadas. Con los extractos crudos de cultivos líquidos de M2 y M12, se obtuvieron resultados muy similares a los generados en medio sólido. En base a los resultados obtenidos es factible el uso de los mismos para el tratamiento de efluentes derivados de la industria textil. Sin embargo, es necesario continuar con la investigación utilizando un mayor número de colorantes, principalmente los aplicados en la industria textil.

### INTRODUCCIÓN

Durante décadas la industria ha liberado al ambiente un sinnúmero de compuestos altamente tóxicos, los cuales pueden ser mutagénicos, carcinogénicos e incluso teratogénicos. El uso de microorganismos para la degradación de estos compuestos ha crecido en los últimos 30 años, por lo que es necesario continuar la búsqueda de nuevos organismos capaces de degradar un amplio espectro de compuestos mediante el uso de los metabolitos sintetizados por ellos. Debido a que las enzimas producidas por los basidiomicetos, principalmente aquellos causantes de pudrición blanca, son inespecíficas, los convierte en una opción viable para ser utilizados en la degradación de compuestos tales como los clorofenoles, dioxinas, colorantes usados en la industria textil, así como en procesos tales como el blanqueo de la pulpa de papel. El comportamiento de los microorganismos dependerá en gran medida de las condiciones ambientales en las cuales se encuentren, por lo que resulta imprescindible la continua búsqueda de nuevas cepas capaces no solamente de producir cantidades apreciables de metabolitos, sino también de poder degradar compuestos tóxicos liberados por la industria.

En México no existe un inventario completo sobre el tipo y volumen de desechos generados por las diversas industrias. Debido al alto impacto que tienen los desechos producidos, es necesario la aplicación de alternativas en las cuales los residuos tóxicos liberados al ambiente sean mínimos. Sin embargo, dado que los microorganismos presentan características particulares, aún tratándose de la misma especie, conferidas por las condiciones ambientales de cada lugar, es importante aislar cepas nativas productoras de este tipo de enzimas, con el fin de evitar el o los efectos adversos que pudiera tener el ambiente (temperatura, humedad, etc.), sobre la capacidad de producción de enzimas por los microorganismos.



## ANTECEDENTES

Los hongos perfectos son fuente abundante de un amplio rango de productos naturales. Dentro de este grupo de hongos, se encuentran los basidiomicetos, los cuales se clasifican en hongos de pudrición blanca, pudrición parda y pudrición oscura, en base a los cambios que ocasionan en la madera. Los hongos de pudrición blanca son los mejores degradadores de compuestos lignolíticos.

La principal característica de los hongos basidiomicetos, principalmente los de pudrición blanca, es su habilidad para producir una gran cantidad de metabolitos secundarios mediante la ruta metabólica de los ácidos shikímico y cinámico (Guillen, F., Evans, C. S., 1994). Enzimas extracelulares, incluyendo lignino peroxidasa, manganeso peroxidasa, lacasa y oxidasas que generan peróxido de hidrógeno necesario para la actividad peroxidasa, son las responsables de la degradación de lignina y compuestos similares (Hattaka A. 1994). Debido a su baja especificidad y a la fuerte habilidad oxidativa de los sistemas de degradación lignolítica, los hongos de pudrición blanca degradan un amplio espectro de químicos orgánicos que contienen esqueletos similares a aquellos encontrados en la lignina, tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos (Collins, P. J., *et al* 1997), TNT (Thorn, G. R., *et al* 1996), dioxinas, DDT, cloroanilinas y colorantes (Field, J. A., *et al* 1993). Basados en los patrones de las enzimas lignolíticas, los hongos de pudrición blanca pueden dividirse en dos grupos, aquellos productores de lacasa y manganeso peroxidasa exclusivamente, y aquellos que además producen lignino peroxidasa. Estos dos grupos, han sido relacionados con la habilidad que tienen los hongos de pudrición blanca para degradar preferentemente la lignina de la pared celular y mineralizar eficientemente preparaciones sintéticas de lignina (Hattaka A., 1994).

La lacasa (benzenediol:oxígeno oxidoreductasa) es una fenol oxidasa que contiene cobre el cual usa al oxígeno molecular como el aceptor de electrones, el cual es reducido a agua (Muñoz, C., *et al* 1997). Esta enzima puede degradar la lignina, así como causar su solubilización a partir de lignocelulosa y presenta un bajo potencial de oxidación (Eggert, C., *et al* 1996).

La lignino peroxidasa es una glicoproteína, caracterizada por un alto potencial redox, permitiéndole la oxidación de compuestos aromáticos no fenólicos difíciles de biodegradar, tales como el alcohol veratrilol y bencenos metoxilados (Edwards, S. L., *et al* 1993; Camarero S., *et al* 1999); compuestos aromáticos policíclicos, tales como el DDT; bifenoles policlorinados, dibenzo(p)dioxinas policloradas, lindano y alcanos clorados (Dumppus, J. A., *et al* 1987; Field J. A., *et al* 1992; Joshi, D. K., *et al* 1997).

La manganeso peroxidasa es una enzima lignolítica, extracelular al igual que el enzima anterior. Utiliza el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) como un oxidante para oxidar  $Mn^{II}$  a  $Mn^{III}$  hasta el ion mangánico  $Mn^{+3}$ . El  $Mn^{III}$ , estabilizado por quelación, actúa como un oxidante no específico, participando en la degradación de la lignina por el microorganismo que la produce.

Dentro de los contaminantes que mas preocupación han generado en los últimos años se encuentran los colorantes sintéticos, debido a su resistencia al tratamiento de aguas residuales lo que los hace difíciles de eliminar, poniendo en riesgo los ambientes acuáticos, que por consecuencia se ven directamente afectados. Comúnmente, los colorantes son utilizados en la industria alimenticia, de cosméticos y textil, estos son arrojados al medio ambiente como residuos contaminantes. El procesamiento de productos textiles, por ejemplo, implica una inevitable agresión en menor o mayor grado al ambiente, hasta este momento. El uso extendido de colorantes azoicos, en el proceso del teñido textil a puesto en

evidencia que a algunos de ellos pueden ser cancerígenos. Generalmente, estos no son degradados fácilmente por microorganismos.

#### OBJETIVOS

- ❖ Determinar cualitativamente la actividad extracelular oxidativa de ABTS, Guaiacol y O-anisidina de los hongos aislados.
- ❖ Probar la capacidad degradativa de diversos colorantes sintéticos en medio sólido utilizando hongos de pudrición blanca nativos.
- ❖ Probar la capacidad degradativa de los extractos crudos obtenidos de medio líquido inoculado con algunas de las cepas nativas.

#### METODOLOGÍA

*Evaluación cualitativa de la actividad oxidativa extracelular de ABTS, Guaiacol y O-anisidina (Medio sólido).*- Se prepararon cajas petri con agar extracto de malta mas 100 mg/L de ABTS, guaiacol u O-anisidina. Los tres substratos fueron esterilizados por filtración y añadidos al medio de cultivo previamente esterilizado y enfriado a 45°C. Se inocularon con un fragmento de micelio (5 mm diámetro), cada 24 horas se observó la formación de color debido a la oxidación del ABTS, guaiacol u O-anisidina, así mismo se midió el crecimiento radial del hongo.

*Degradación de colorantes tipo azo, antraquinonas y heterocíclicos.*- Se prepararon soluciones de colorantes (naranja de metilo, Cristal violeta y RBBR). Estos fueron esterilizados por filtración y añadidos al medio de cultivo hasta una concentración final de 10, 50 y 100ppm. Los hongos fueron inoculados en las placas preparadas, colocando un fragmento de micelio de 5 días de cultivo. Se midió el crecimiento radial y el halo de decoloración de las mismas por espacio de tres semanas. Para las pruebas de transformación utilizando los extractos crudos, estos fueron obtenidos sembrando los hongos en medio harina de soya y retirándose el día de máxima actividad enzimática. Se determinó la longitud de onda de cada uno de los colorantes a la cual presentaron la máxima absorbancia.

#### RESULTADOS

Se evaluó la capacidad de producir enzimas tales como las peroxidasas y oxididasas en medio sólido. Los resultados obtenidos nos indicaron que las cuatro cepas estudiadas producen en mayor o menor proporción tales enzimas (Figura 1).

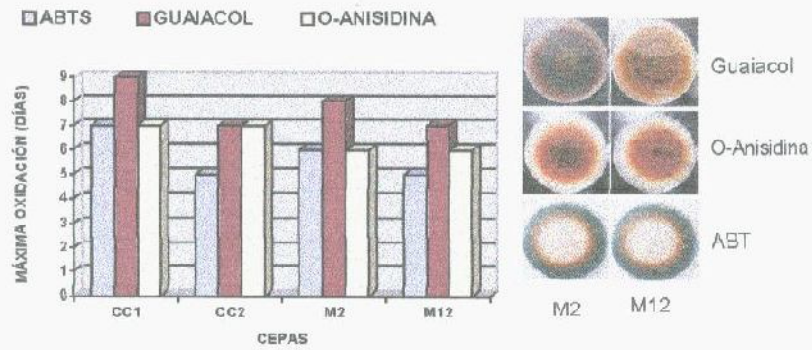


FIGURA 1.- Patrón oxidativo en medio MMG, de las cepas estudiadas

Se procedió a determinar las actividades enzimáticas en dos medios de cultivo reportados para tal efecto, harina de soya (MHS) y medio mínimo adicionado de glucosa (MMG). Cuatro cepas dieron altos títulos de lacasa y/o lignina peroxidasa en medio harina de soya, caso contrario al medio mínimo (Datos no mostrados). La decoloración, sin embargo fue llevada a cabo en el medio MMG, debido a que en el fue posible visualizar con mayor detalle los cambios ocurridos en cada uno de los colorantes. A 10ppm, las cuatro cepas fueron capaces de transformar totalmente los colorantes estudiados, mientras que a 50ppm, si hubo diferencias al respecto, siendo el cristal violeta el colorante más recalcitrante, mientras que RBBR y naranja de metilo fueron decolorados alrededor de los días 6 a 9 (Datos no mostrados). A 100 ppm, M2 fue más eficiente para decolorizar RBBR y naranja de metilo, mientras que el cristal violeta fue el mas tardado para ser transformado, debido posiblemente a su estructura compleja, ya que su transformación por este hongo fue parcial, no observándose cambio alguno después de 3 semanas de incubación (Figura 2)



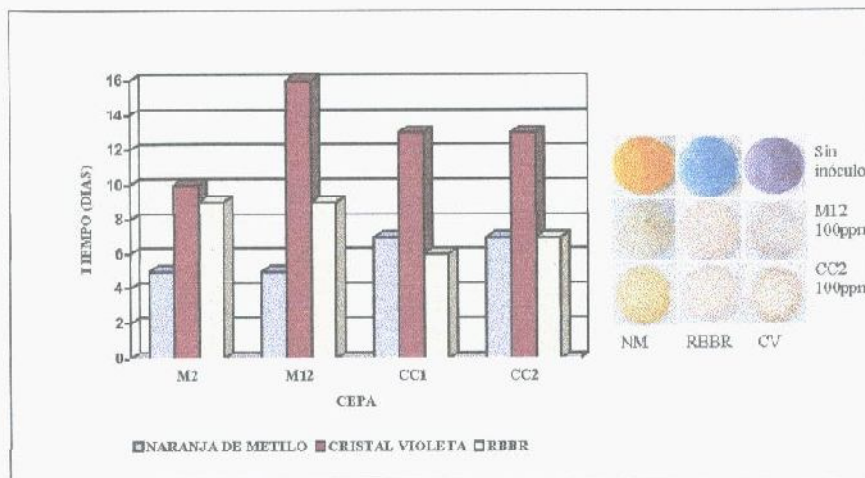


Figura 2.- Día de máxima decoloración de Naranja de Metilo, Cristal violeta y RBBR por M2, M12, CC1 y CC2

Finalmente, los resultados obtenidos al probar los extractos enzimáticos tuvieron un efecto similar que aquellos obtenidos en medio sólido, al menos para RBBR. Sin embargo, con respecto al resto de colorantes se observa una transformación parcial, aún después de 24 h de incubación.

#### DISCUSIÓN

Muchos compuestos son utilizados para evaluar la capacidad oxidativa de los hongos basidiomicetos, principalmente llevando a cabo fermentaciones en líquido y en sólido. Los sistemas degradativos de este tipo de hongos son altamente no específicos y como consecuencia de ello, estos hongos pueden oxidar un amplio espectro de contaminantes ambientales. Por esta razón, es necesario determinar si las cepas nativas presentan tales capacidades, evaluando la producción de oxidasas y/o peroxidasas en medio sólido. El sistema lignolítico exhibido por estos microorganismos, presenta diferentes características dependiendo del ambiente, factores nutricionales, condiciones de cultivo, entre otros.

Por otro lado, aunque algunas investigaciones indican que alto contenido en nitrógeno puede tener un efecto positivo en la transformación de colorantes (Novotný et al 2001), nuestros resultados mostraron que en un medio con bajo contenido en nitrógeno la decoloración es efectiva. Estos resultados documentan que las cepas nativas aisladas en Nuevo León pertenecientes a los hongos de pudrición blanca son capaces de decolorar eficientemente un amplio espectro de colorantes químicamente diferentes. Nuestros datos son similares a los obtenidos por otros investigadores (Knapp et al, 1995), quienes reportaron la habilidad de sus aislados nativos para transformar diferentes colorantes tipo azo, antraquinónicos y otros tipos en medio mineral. La variación observada entre las diferentes cepas puede ser debida al tipo de medio utilizado.

## CONCLUSIONES

Fue demostrado que los basidiomicetos aislados en Nuevo León son capaces de producir tanto oxidasas como peroxidasas en medio sólido, esto aunado al hecho de que son capaces de transformar los colorantes sintéticos utilizados, debido a las propiedades convenientes presentadas por estas cepas, pueden llegar a ser usadas para la remoción de colorantes sintéticos a partir de efluentes y/o suelo contaminado. Por tal razón, es necesario realizar estudios más específicos, tal como la decoloración en medio líquido inoculado con los hongos, así como utilizando efluentes textiles, sin dejar a un lado otras aplicaciones biotecnológicas encaminadas a mejorar las condiciones ambientales.

## AGRADECIMIENTOS

CONACYT.  
Proyecto Paicyt CN 884-04 (UANL)

## BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Bumpus, J. A., and S. D. Aust. 1987. Biodegradation of DDT [1,1,1, trichloro-2, 2-bis (4-chlorophenyl) ethane] by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2001-2008.
- Camarero, L., Martínez, M. J., and Martínez, A. T. 1999. A Search for Ligninolytic Peroxidases in the Fungus *Pleurotus eryngii* Involving  $\alpha$ -keto- $\gamma$ -thiomethylbutyric Acid and Lignin Models Dimers. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(3): 916-922.
- Collins, P. J., Field, J. A., Teunissen, P., and Dobson, A. D. W. 1997. Stabilization of Lignin Peroxidases in White Rot Fungi by Tryptophan. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(7): 2543-2548.
- Edwards, S. L., Raag, R., Wariishi, H., Gold, M. H., and Poulos, T. L. 1993. Crystal Structure of Lignin Peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:750-754.
- Eggert, C., Temp, U., Eriksson, K. E. 1996. The Ligninolytic System of the White Rot Fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and Characterization of the Laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(4): 1151-1158.
- Field, J. A., de Jong, E., Fejo Costa E., De Bont JAV. 1993. Screening for Ligninolytic Fungi Applicable to the Biodegradation of Xenobiotics. *Trends Biotechnol.* 11:44-49.
- Guillen, F., and Evans, C. S. 1994. Anisaldehyde and Veratraldehyde Acting as Redox Cycling Agents for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Production by *Pleurotus eryngii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(8): 2811-2817.
- Hattaka A. 1994. Lignin-modifying Enzymes from Selected White-Rot Fungi: Production and Role in Lignin Degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 125-135.
- Joshi, D. K., and M. H. Gold. 1993. Degradation of 2, 4, 5-trichlorophenol by the Lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1779-1785.
- Knapp, J. S., F. Zhang, and K. N. Tapley. 1997. Decolorization of orange II by a wood-rotting fungus *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 69: 289-296.
- Novotný, C., B. Rawal, M. Bhatt, M. Patel, V. Sasek, and H. P. Molitoni. 2001. Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. *J. Biotechnol.* 89: 113-122.
- Thom, G. R., Reddy, C. A., D. Harris, and Paul E. A. 1996. Isolation of Saprophytic Basidiomycetes from Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(11): 4288-4292.

REVISTA *de la* SOCIEDAD  
**QUÍMICA**  
*de* MÉXICO

---



Vol. 49, Núm. Especial 4, 2005



**CONACYT**

*Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología*



REVISTA *de la* SOCIEDAD  
QUÍMICA  
*de* MÉXICO

(*Rev. Soc. Quím. Méx.*)

XL CONGRESO MEXICANO DE QUÍMICA

XXIV CONGRESO NACIONAL  
DE EDUCACIÓN QUÍMICA

Morelia, Michoacán, México  
25-29 de septiembre, 2005



Páginas 1-280

ISSN 0583-7693

*Rev. Soc. Quím. Méx.* (Núm. Especial 4) 2005, 49  
México, D.F.

REVISTA *de la* SOCIEDAD  
**QUÍMICA**  
*de* MÉXICO

---

FUNDADOR

Q. José I. Bolívar Guyanes†

EDITOR

Guillermo Delgado Lamas

CONSEJO EDITORIAL

- Francisco Bolívar Zapata • Guillermina Burillo Amezcua • Miguel Costas Basín
- Gabriel Cuevas González-Bravo • Eduardo Díaz Torres • Carl Djerassi
- Ernest L. Eliel • Nikolaus H. Fischer • Federico García Jiménez
- Ángel Guzmán Sánchez • Pedro Joseph-Nathan • Eusebio Juaristi Cosío
- Jaime Keller Torres • Víctor Manuel Loyola Vargas • Maric Molina Pasquel
- Joaquín Palacios Alquisira • Héctor Salgado Zamora • Elyra Santos de Flores
- Ratnasamy Somanathan Ramasamy • Joaquín Tamariz Mascarúa
- Hugo Torrens Miquel • Luz Elena Vera Ávila • Francisco Yuste López

EDITOR TÉCNICO

Arturo Sánchez y Gándara

TIPOGRAFÍA

Eric Sánchez Romero

ASISTENCIA SECRETARIAL

Rosa Jaime Cerón • Raquel Feregrino Curiel • Lidia Hernández García

---

La *Revista de la Sociedad Química de México* publica preferentemente contribuciones originales de investigación en todas las ramas de la teoría y práctica de esta ciencia. Los artículos son sometidos a proceso de arbitraje del cual depende la aceptación del manuscrito para su publicación.

Indizada en Chemical Abstracts, Bioscience Information Service, Chemisches Zentralblatt, Sumario Actual de Revistas (España), Latindex, Periódica, Russian Institute of Scientific and Technical Information. Incluida en el Índice de Revistas Mexicanas de Investigación Científica y Tecnológica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Las instrucciones para los autores aparecen publicadas en el número 1 de cada volumen.  
El costo de la suscripción anual es de \$500.00 para la República Mexicana y \$35 USD para el extranjero.  
Se distribuye gratuitamente entre los socios de la *Sociedad Química de México*.

---



REVISTA de la SOCIEDAD  
**QUÍMICA**  
 de MÉXICO

CONTENIDO

<b>XL Congreso Mexicano de Química</b>		Programa y Resúmenes Trabajos Libres en Cartel	124
Editorial	3	<b>XXIV Congreso Nacional de Educación Química</b>	
Comité Organizador	5	Simposia	188
Coordinadores de Simposia	6	Resumen Conferencia Divisional	189
Benefactores	7	Resúmenes Talleres	190
Expositores	7	Programa y Resúmenes Trabajos Libres Orales	193
Programa General	10	Programa y Resúmenes Trabajos Libres en Cartel	206
Programa por Salas	16	Programa y Resúmenes de Trabajos que Participan en el Concurso Nacional de Carteles Estudiantiles	230
Resúmenes Conferencias Magistrales	20	Índice Autores	
Resúmenes Conferencias Plenarias	21	XL Congreso Mexicano de Química	264
Resúmenes Conferencias Divisionales	24	XXIV Congreso Nacional de Educación Química	274
Resúmenes Conferencias Técnicas	25	Carteles Estudiantiles	277
Programa y Resúmenes de Simposia	26		
Resúmenes Talleres	82		
Presentación de Libros	84		
Mesa Redonda	85		
Programa y Resúmenes Trabajos Libres Orales	88		

Páginas 001-280

*Rev. Soc. Quím. Méx.* (Núm. Especial 4) 2005, 49

C/180  
MIÉR

### FERROMAGNETISMO EN MONOCRISTALES MnPS<sub>2</sub> Y COMPUESTOS INTERCALADOS.

Leticia Lomas R<sup>1</sup>, Félix Valencia S<sup>1,2</sup>, Sadot U. Pacheco A<sup>3</sup>, Víctor H. Lara C<sup>1</sup>, Roberto Escudero<sup>1</sup>, Francisco Morales<sup>3</sup>. (1)Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, B. P.55-534, México D. F., 09340. (2)Instituto Mexicano del Petróleo, Lab. Análisis Físicos e Ingeniería Molecular, Eje Central Lázaro Cárdenas No 152, México D. F., 07730. (3)Instituto de Investigaciones en Materiales UNAM, Circuito Exterior S/N, Cd. Universitaria, Coyoacán, México D. F. 04510.

**Resumen:** El objetivo del presente trabajo es el estudio de las propiedades magnéticas de compuestos intercalados MnPS<sub>2</sub> bajo un campo magnético aplicado desde 0 Oe hasta 1kOe a una temperatura de 4K, la magnetización (M) vs campo magnético aplicado (H) se realizaron en un equipo SQUID. Estos monocristales se caracterizaron por: Difracción de rayos X, espectroscopia infrarroja y análisis elemental.

## QUÍMICA AMBIENTAL

C/181  
MIÉR

### ACTUALIZACIÓN DE LA NOM-AA-94-1985 MEDICIÓN DE FOSFORO TOTAL.

<sup>1,2</sup>Delfín Alcalá Irma, <sup>2</sup>Espinosa Valdemar Rosa María, <sup>2</sup>Raygoza Maceda Isabel y <sup>2</sup>Turpin Marion Sylvic

<sup>1</sup>FES-Iztacala. <sup>2</sup>UAM-Azcapotzalco. Av. Sn Pablo 180 Azcapotzalco. [delfin@servidor.unam.mx](mailto:delfin@servidor.unam.mx) [rmev@correo.azc.uam.mx](mailto:rmev@correo.azc.uam.mx)  
El fósforo es un elemento esencial para la vida, por lo que debe estar presente en el suelo y en los sustratos y alimentos requeridos por seres vivos. La NOM-AA-94-1985 describe el procedimiento para la determinación de *fósforo total* en los residuos sólidos urbanos utilizando una técnica que se aplica a la medición de fósforo en suelos. Las especies bio-disponibles de fósforo son los fosfatos solubles por lo que es necesario conocer su concentración en la "basura orgánica" que va a ser sometida a composteo. La metodología que se describe en la Norma oficial es muy complicada y algunas de las manipulaciones son poco claras. Se proponen dos metodologías, una para la determinación de *fósforo disponible* y la otra para la de *fósforo total* aunque para residuos sólidos bastaría con determinar el fósforo disponible, diseñadas a partir de un análisis detallado de las técnicas usadas para suelos, haciendo las adaptaciones que se consideraron pertinentes para su aplicación a los residuos sólido urbanos. Al determinar experimentalmente el contenido de fósforo en muestras de composta por la metodología oficial y las metodologías propuestas los resultados entre ellas son concordantes.

C/182  
MIÉR

### BIOTRANSFORMACIÓN DEL COLORANTE RBBR MEDIANTE EL USO DE DOS HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA.

Guadalupe Rojas Verde, Ruby Y. Salazar Alpuche, Katiushka Arévalo Niño. Instituto de Biotecnología, Universidad Autónoma de Nuevo León. Pedro de Alba Esq. Manuel L. Barragán S/N. Cd. Universitaria. San Nicolás de los Garza, N. L. C. P. 66451. [grojasverde@gmail.com](mailto:grojasverde@gmail.com), [karevalo@ccr.dsi.uanl.mx](mailto:karevalo@ccr.dsi.uanl.mx)

Dentro de los principales contaminantes liberados al ambiente se encuentran los colorantes sintéticos utilizados en la industria textil, entre ellos del tipo azo. Por un lado, afectan significativamente el ecosistema al cual son liberados ya que muchos de ellos son producidos a partir de carcinógenos conocidos como las benzidinas y otros compuestos aromáticos. Se demostró que los extractos crudos obtenidos de los basidiomicetos aislados son capaces de transformar colorantes sintéticos del tipo antraquinónico. La decoloración cercana al 90% en soluciones a una concentración de 200ppm, indican la posibilidad de utilizar los sistemas enzimáticos derivados de los cultivos líquidos de la cepa M12 en el tratamiento de colorantes sintéticos liberados al ambiente, aunque para la implementación de una metodología será necesario probar tales extractos enzimáticos en efluentes textiles, lo que permitirá evaluar la factibilidad de uso a nivel industrial.